

최 종 보 고 서

보안과제(), 일반과제(○) 과제번호: 107094-3

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000487-01

돼지 태반 추출물의 생리활성 탐색 및 면역증강 사료첨가제의 개발

(Development of immune-enhanced animal feed
supplement and identification of bio-active
substances using porcine placenta)

경상대학교

농림수산식품부

농림수산식품자료실



0005118

0.7
239
2010-71

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돼지 태반 추출물의 생리활성 탐색 및 면역증강 사료첨가제의 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 08 월 일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 서한극

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 송혁

협동연구책임자 : 김진희

요 약 문

I. 제 목

: 돼지 태반 추출물의 생리활성 탐색 및 면역증강 사료첨가제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

돼지 태반의 유효성분 추출방법의 확립을 통해 태반 추출물의 생리기능 및 활성을 탐색하고, 돼지 태반 추출물의 대량생산공정 기술을 개발함과 동시에 태반 추출물의 면역증강 효과를 세포, 실험동물, 자돈에서 규명하여 항생제 대체제로서의 자돈용 면역증강 사료첨가제의 개발과 이를 산업화 하는데 목적이 있음.

2. 연구개발의 필요성

- 전 세계적으로는 물론 한국에서도 가축전염병의 발생율이 매년 증가 추세에 있으며, 그중에서도 특히, 자돈폐사율이 최근 급격하게 증가(30%)하여 매년 약 700억원 정도의 경제적 손실이 발생하고 있음.
- 따라서, 이러한 자돈의 폐사율을 감소시킬 수 있는 새로운 면역증강제의 개발은 **막대한 경제적 손실보전으로 인한 경제적 가치는 물론, 그 파생효과가 매우 높음**
- 태반은 태아의 발육, 성장에 필요한 생리기능을 가지고 있으며 미백, 갱년기 장애극복, 노화방지 등의 효능을 가지고 있다고 알려져 있음.
- 따라서, 이러한 기능을 가진 돼지태반으로부터 면역증강활성을 지닌 물질을 탐색하여 대량으로 생산할 수 있는 공정기술을 개발한다면, **저비용 고부가가치로 면역을 증강시킬 수 있는 새로운 사료첨가제등의 개발이 가능함.**
- Well-being에 대한 사회적 관심을 고려해 볼 때 **항생제 오남용으로부터 안전한 고기육을 생산할 수 있는 대체 면역증강제의 개발에 대한 연구는 대단히 중요함.**

III. 연구개발 내용 및 범위

- 돼지 태반에서 면역증강 관련 물질을 효율적으로 추출할 수 있는 효과적인 추출 방법의 개발
- 돼지 태반 추출물을 세포, 실험 동물 수준에서 면역증강 효과를 규명
- 자돈에 급여할 수 있는 태반추출물이 포함된 자돈 사료 시제품을 개발
- 자돈에서 증체량, 면역세포 활성화도, 면역증강 관련 혈중 면역단백질의 농도 변화, 폐사율, 질병 메카니즘 차단 효과 등을 규명
- 최종적으로 돼지 태반추출물이 함유된 자돈용 면역증강 사료의 시제품을 개발
- 연구결과를 논문 및 지적재산권의 형태로 확보하여 산업화 기반 조성

IV. 연구개발결과

- 유효 태반 추출물 추출방법 확립: 80 °C/30분 열수 추출물
- 체외배양 세포 수준에서 면역 세포의 활성화 확인
- 실험동물(생쥐)모델에서 실험동물의 체중 증가, 혈중 면역세포 농도 증가, 면역세포 활성화도 상승, 면역단백질 농도 증가, 혈중 면역증강 관련 사이토카인 증가 등 태반추출물의 면역증강 활성의 확인
- 태반 추출물이 첨가된 자돈 전용 사료 시제품 개발
- 시제품 급여 후 자돈에서 일당 증체량증가 확인, 혈중 면역세포 농도 증가, 면역세포의 활성화도 증가 등 확인
- 자돈에서 혈중 IgG, IL-1 β , IFN- γ 농도 상승을 통한 면역력 증가 확인
- 시제품의 생리·면역 안전성 검증
- 자돈에서 바이러스에 대한 저항성 향상

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 3건의 태반추출물 관련 특허 확보
- 태반 추출물의 사료첨가제로서의 효능 검증
- (주)고려산업에 기술이전 실시 예정

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

: Development of immune-enhanced animal feed supplement and identification of bio-active substances using porcine placenta

II. Objective and Market Demand

1. Objective

The final objective of this study is to develop animal feed supplement using porcine placenta and to industrialize this product through the development of mass extract protocol, in vivo and in vitro efficacy test, and piglet challenge test.

2. Market demand

- Since animal epidemic is increased, the death rate of piglet has been rapidly inclined, and its economic loss reached to over 700 billion won.
- Development of immune-enhanced supplement for piglet has been required to save such economic loss.
- Placenta has been known as a powerful anti-aging and development-promoting factor, however most of the porcine placenta are abandoned in pig farm.
- Identification and extraction of efficient materials to enhance immunity of piglet from porcine placenta will help to develop immune-enhanced feed supplement for piglet
- In addition, development and industrialization of porcine placenta extracts as an immune-enhancer may facilitate for production of non-antibiotics fresh pork

III. Research Scope

- Identification and characterization of efficient materials of porcine placenta.
- Development of an effective extraction method of porcine placenta.
- Identification of immune-enhanced effects of porcine placenta extracts in *in vitro* cultured immune cells and laboratory animal model.
- Development of trial products of porcine placenta extracts to apply to piglet
- Identification of immune-enhanced effects of trial products on piglet model
- Technology transfer and industrialization

IV. Results

- Establishment of the effective extraction method: 80 °C/30 min in water
- Identification of immune-enhancing activity of porcine placenta extracts in *in vitro* cultured macrophage cells
- Efficacy verification of placental extracts in enhancement of body weight, white blood cell number, activation rate of T and B lymphocytes, phagocytic cells, IgG, and serum level of cytokine by feeding placenta extracts to mice
- Development of trial product containing porcine placenta extracts
- Efficacy identification of placental extracts in immune-enhancing activity like as increase of body weight, WBC number in blood, and the activation of lymphocyte and phagocytic cells in piglet
- Verification of placental extracts in increase of blood IgG, IL-1 β , and IFN- γ concentrations in piglet serum feed with placental extracts

V. Research Outcomes and Further Applications

- 3 patents were obtained from these results
- Technology transfer will be processed between this research group and Korea Industry LTD.

<CONTENTS>

(영문목차)

Submission document	1
Summary	2
Summary in English	4
Contents in English	6
Contents	12
Chapter 1. Overview	18
1. Objective	18
가. The final goal and research characteristic	18
(1) The final goal	18
(2) The research characteristic	18
나. Annual goal	18
2. Necessity	19
가. The importance in economic and industrial aspects	19
3. Research scopes	21
Chapter 2. Overview of current technique in domestic and abroad	22
1. International levels	22
2. domestic levels	22
3. Current research in domestic and abroad	22
Chapter 3. Contents and results	23
Part 1. Componental analysis and yield judgment of placenta extract	23
1. Yield judgment of final extract following different extraction method	23

2. Comparative analysis of Amino acid components by following extraction method	24
Part 2. Analysis on immune enhancing effect of placenta extract in swine	27
1. Screening of placenta extract containing immune enhancing component	27
가. Effect of placenta extract on NO synthesis in J774A.1 cell	27
나. Screening of immune-activating component from placenta extract	28
다. Selection of final immune-activating component from placenta extract	30
2. Effects of Raw-80 and Raw-peptide in Reactive Oxygen Species(ROS) production	31
가. Effect of Raw-80 and Raw-peptide of ROS production	31
3. Effect of placenta extract Raw-80 and Raw-Peptide in Cyclooxygenase I & II expression	32
Part 3. Anti-bacterial effects of placenta extract	33
Part 4. Analysis on the cytotoxicity and cell viability of placenta extract	34
1. Cellular toxicity of placenta extract	34
가. Effects of Raw-80 on the cell viability in J774A.1 cells	34
나. Effects of Raw-peptide on the cell viability	35
2. Evaluation on the immune cell activation of placenta extract in In vivo	35
가. Activation of B-cell	36
나. Activation of T-cell	36

Part 5. Physiologic and metabolic effects of pig placenta extract	38
1. Effects of placenta extract in basic physiology	38
가. Effects of placenta extract on body weight	38
나. Effects of placenta extract on liver weight	38
다. Effects of placenta extract on pancreas weight	39
2. Effects of placenta extract in endocrine regulation	40
3. Effects of placenta extract in digestive organs absorbing rate	40
4. Effects of placenta extract in pig digestive organs degradation rate	41
5. Evaluation on superiority of placenta extract as a nutrition	42

Part 6. Studies on the pharmacological mechanism of placenta extract in pig	43
1. Evaluation of placenta extract on changes in the blood component and phagocytosis	43
가. Changes in immune cell number	43
(1) WBC	43
(2) RBC	44
(3) Blood platelet	45
(4) Hematocrit	46
(5) Neutrophil and lymphocyte ratio	47
(6) Summary	47
나. Changes in phagocytic ability	48
(1) Changes in macrophage cell number	48
(2) Changes in phagocytic efficiency	49
2. Effects of placenta extracts in blood immunoglobulin and cytokine secretion	49
가. Changes in blood immunoglobulin	49
(1) Immunoglobulin(Ig) G	50

(2) Immunoglobulin(Ig) M	51
(3) Immunoglobulin(Ig) E	52
나. Changes in blood cytokine	53
(1) Interleukin-10(IL-10)	53
(2) Interleukin-6(IL-6)	54
(3) Interleukin-1 beta(IL-1 β)	54
(4) Interferon gamma (IFN- γ)	55
(5) Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)	56
Part 7. Development of feeding process of pig placenta extract	58
1. Stability of placenta extract in feed	58
가. Piglet mortality	58
나. Detection of pathogen in placenta extract	58
2. Preparation of trial products in liquefied and pellet forms	59
3. Measurement of digestion and absorption ratio	60
가. Digestion ratio	60
나. Ration of digestion and absorption in organs	60
4. Optimal preservation of placenta extracts	61
Part 8. Investigation on immune-enhancing effects of trial products	
(1st trial)	62
1. Changes in body weight of piglet	62
2. Changes in number of immune cells	63
가. White blood cell	63
3. Changes in Lymphocytes, Granocyte and Monocyte	63
가. Eosinophil	63
나. Basophil	64
다. Neutrophil	64
라. Monocyte	65
4. Activation of white blood cell	65
5. Activation of Immune-related proteins	67
가. Immunoglobulin (Ig)G	67

나. Interleukin-1 beta(IL-1 β)	67
다. Interferon gamma (IFN- γ)	68
6. Effect on immune-turbulance	69
Part 9. Investigation on immune-enhancing effects of trial products (2nd trial)	70
1. Changes in body weight of piglet	70
2. Changes in number of immune cells	70
가. White blood cell	70
3. Changes in Lymphocytes, Granocyte and Monocyte	71
가. Eosinophil	71
나. Basophil	72
다. Neutrophil	72
라. Monocyte	73
4. Activation of Immune-related proteins	73
가. Interleukin-1 beta(IL-1 β)	73
나. Interferon gamma (IFN- γ)	74
Part 10. Conclusion	75
Chapter 4. Economic evaluation	76
Part 1. Objectives and necessity	76
1. The final goal	76
2. The research necessity	76
Part 2. Research scopes	78
1. Evaluation of social benefit on porcine placental feed supplement through consumer survey	78
Part 3. Research contents and results	78
1. Evaluation on social benefit	78

가. Research methods	78
나. Plans of questions for customers	80
다. Contents of questions for customers	81
라. Opinions for additional payment	86
마. Evaluation on economical benefit of placental extracts	89
Part 4. Conclusion	92
Chapter 5. Execution levels and contribution in relative fields	93
Part 1. Point of evaluation and execution levels	93
Part 2. Contribution on technical development of relative fields	94
Chapter 6. Research outcome and application	95
Part 1. Plan for commercialization and industrialization	95
Part 2. Plan for education, coaching and public reaction	95
Part 3. Plan for intellectual property	95
1. Research outcomes	95
가. Patient	95
2. Plan for further intellectual property	96
Part 4. Further research	96
Chapter 7. References	97

< 목 차 >

제출문	1
요약문	2
Summary(영문요약문)	4
Contents(영문목차)	6
목차	12

제 1 장 연구개발과제의 개요 18

1. 연구개발과제의 목적	18
가. 연구개발의 최종목적 및 성격	18
(1) 연구개발의 최종목표	18
(2) 연구개발의 성격	18
나. 연차별 연구개발 목표	18
2. 연구개발의 필요성	19
가. 연구 개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성	19
3. 연구개발의 범위	21

제 2 장 국내외 기술개발 현황 22

1. 세계적 수준	22
2. 국내 수준	22
3. 국내·외의 연구현황	22

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 23

제 1 절 태반추출물의 성분 분석 및 수율 평가	23
1. 추출방법에 따른 최종 추출물의 수율평가	23
2. 추출방법에 따른 아미노산 성분의 비교분석	24

제 2 절 돼지 태반추출물의 면역증강 효과 분석	27
1. 면역활성화 성분을 포함하는 태반추출물의 스크리닝	27
가. NO 생성분비를 표적으로 한 J774A.1세포의 면역활성화에 대한 각 태반 추출물의 효과	27
나. 면역활성화 성분을 포함하는 태반추출물의 스크리닝	28
다. 최종적인 면역활성화 태반추출물의 선정	30
2. Reactive Oxygen Species(ROS)의 생성에 대한 Raw-80 및 Raw-peptide 태반추출물의 효과 검토	31
가. ROS 생성에 대한 Raw-80 및 Raw-peptide의 효과	31
3. Cyclooxygenase I & II의 대한 Raw-80 및 Raw-Peptidase 태반 추출물의 효과	32
 제 3 절 돼지 태반추출물의 항균작용 분석	 33
 제 4 절 돼지 태반추출물의 세포독성 및 세포활성화 분석	 34
1. 돼지 태반추출물의 세포독성분석	34
가. J774A.1 세포의 Viability에 대한 Raw-80의 효과	34
나. Cell Viability에 대한 Raw-peptide의 효과	35
2. In vivo에서의 태반 추출물의 면역세포 활성화 능력 평가	35
가. B-세포 활성화능력 평가	36
나. T-세포 활성화능력 평가	36
 제 5 절 돼지 태반추출물의 생리 및 대사기전 연구	 38
1. 태반 추출물의 기초 생리 현상 규명	38
가. 태반 추출물 투여에 따른 체중 변화	38
나. 태반 추출물 투여에 따른 간 질량의 변화	38
다. 태반 추출물 투여에 따른 췌장 질량의 변화	39
2. 태반 추출물의 내분비 조절 작용 규명	40
3. 태반 추출물의 돼지 소화기 내 흡수력 규명	40
4. 태반 추출물의 돼지 소화기 내 분해능력 규명	41
5. 태반 추출물의 영양상 우수성 규명	42

제 6 절 돼지 태반 추출물의 약리 기전 규명	43
1. 태반 추출물 경구 투여 시 혈액조성 변화관찰 및 in vivo 탐식세포 탐식능 효과 규명	43
가. 태반 추출물 경구 투여 시 혈중 면역세포 수들의 변화	43
(1) 백혈구 수치 변화	43
(2) 적혈구 수치 변화	44
(3) 혈소판 수치의 변화	45
(4) 헤마토크리트	46
(5) 중성과립구와 lymphocyte의 비율	47
(6) 요약	47
나. 80℃ 열수추출물 경구투여 시 탐식세포 수의 변화와 탐식능력 측정	48
(1) 태반 추출물 처리에 따른 탐식세포 수	48
(2) 분리한 탐식세포들의 phagocytosis efficiency	49
2. 태반 추출물을 실험동물에 경구 투여 시 혈중 면역글로블린 및 사이토카인분비에 대한 영향	49
가. 태반 추출물 경구 투여 시 혈중 immunoglobulin의 변화	49
(1). Immunoglobulin(Ig) G	50
(2). Immunoglobulin(Ig) M	51
(3). Immunoglobulin(Ig) E	52
나. 태반 추출물 경구 투여 시 혈중 cytokine 변화	53
(1). Interleukin-10(IL-10)	53
(2). Interleukin-6(IL-6)	54
(3). Interleukin-1 beta(IL-1 β)	54
(4). Interferon gamma (IFN- γ)	55
(5). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)	56
제 7절. 돼지 태반 추출물의 사료화 공정 개발	58
1. 태반 추출물의 사료 첨가시 안전성 확보	58
가. 자돈 폐사율	58
나. 태반 추출물 내 감염성 바이러스의 존재 유무 확인	58

2. 최적의 액상 및 펠렛 사료 첨가제 시제품 제작	59
3. 사료 및 첨가제 병용 투여 시 소화생리 및 흡수율 측정	60
가. 태반 추출물 함유 사료의 소화흡수율	60
나. 장관별 소화흡수능력	60
4. 사료첨가제의 최적 및 장기 보존 방법 규명	61

제 8 절 돼지 태반 추출물 함유 시제품 사료의 면역 증강작용 규명

(제1차 시험)	62
1. 태반 추출물의 농도에 따른 자돈의 체중 변화	62
2. 혈액 중 면역세포 수의 변화	63
가. 백혈구(White blood cell)	63
3. 혈액 면역세포의 구성성분 변화(Lymphocytes, Granocyte, Monocyte)	63
가. 호산과립구(Eosinophil)	63
나. 호염과립구(Basophil)	64
다. 중성과립구(Neutrophil)	64
라. Monocyte	65
4. 시제품의 자돈 내 면역세포의 탐식능 향상효과	65
5. 시제품 자돈 체내 면역증강 관련 단백질 인자 활성화 규명	67
가. Immunoglobulin (Ig)G	67
나. Interleukin-1 beta(IL-1 β)	67
다. Interferon gamma (IFN- γ)	68
6. 시제품의 면역교란 억제 효과 규명	69

제 9 절 돼지 태반 추출물 함유 시제품 사료의 면역 증강작용 규명

(제2차 시험)	70
1. 태반 추출물의 농도에 따른 자돈의 체중 변화	70
2. 혈액 중 면역세포에 대한 태반추출물의 효과	70
가. 백혈구(White blood cell)	70
3. 혈액 면역세포의 구성성분 변화에 대한 영향평가	71
가. 호산과립구(Eosinophil)	71
나. 호염과립구(Basophil)	72

다. 중성과립구(Neutrophil)	72
라. Monocyte	73
4. 시제품 자돈 체내 면역증강 관련 단백질 인자 활성 규명	73
가. Interleukin-1 beta(IL-1 β)	73
다. Interferon gamma (IFN- γ)	74
제 10 절 결론	75
제 4 장 경제성 평가	76
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	76
1. 연구개발의 목적	76
2. 연구개발의 필요성	76
제 2 절 연구개발의 내용과 범위	78
1. 소비자조사를 통한 돼지태반유래 사료첨가제의 사회적 편익추정	78
제 3 절 연구개발수행 내용 및 결과	78
1. 사회적 편익 추정	78
가. 연구방법	78
나. 소비자설문조사의 설계	80
다. 설문조사 내용	81
라. 추가 지불 의사 금액	86
마. 돼지태반유래 사료첨가제 이용의 사회경제적 가치 분석	89
제 4 절 결론	92
제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	93
제 1절. 평가의 착안점 및 달성도	93

제 2절. 관련분야 기술발전예의 기여도	94
제 6 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	95
제 1 절 실용화·산업화 계획	95
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획	95
제 3 절 지식재산권 확보계획	95
1. 특허 등 연구개발성과	95
가. 특허출원 성과	95
2. 향후의 지식재산권 확보계획	96
제 4 절 추가연구, 타연구에의 활용 계획	96
제 7 장 참고문헌	97

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

가. 연구개발의 최종목적 및 성격

(1) 연구개발의 최종목표

- 돼지 태반 추출방법의 확립
- 돼지 태반 추출물의 생리기능 및 활성 탐색
- 돼지 태반 추출물의 대량 생산 공정 기술 개발
- 돼지 태반 추출물의 면역증강 효과 규명
- 면역증강 사료첨가제의 개발

(2) 연구개발의 성격

아이디어 개발		시작품 개발		제품 또는 공정개발	√	기타	
---------	--	--------	--	------------	---	----	--

나. 연차별 연구개발 목표

년차	연구개발 목표
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 돼지 태반 성분의 추출 ◆ 돼지 태반 추출물의 면역증강효과 규명 ◆ 돼지 태반 추출물의 생리 및 대사 기전 연구
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 돼지 태반 성분추출물의 분획 ◆ 돼지 태반 추출물의 약리기전 규명 ◆ 돼지 태반 추출물의 사료 재료화 공정 개발
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 돼지 태반 유래 기능성 추출물의 대량 생산 공정방법 확립 ◆ 돼지태반 유래 사료첨가제의 질병 저항성 효과 검증 ◆ 돼지 태반 유래사료 첨가제의 제품화 및 산업화

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

- (1) 밀집사육으로 인한 자돈의 면역력 감소와 질병 전파율의 확대로 자돈의 폐사율이 최근들어 30%까지 급격하게 증가하고 있음 (1). 따라서, 자돈시기에 효과적인 면역증강 방법의 개발로 질병에 대한 저항성을 극대화시킴으로써 매년 발생하는 약 700억원 정도의 경제적 손실을 줄일 필요가 있음(그림 1).

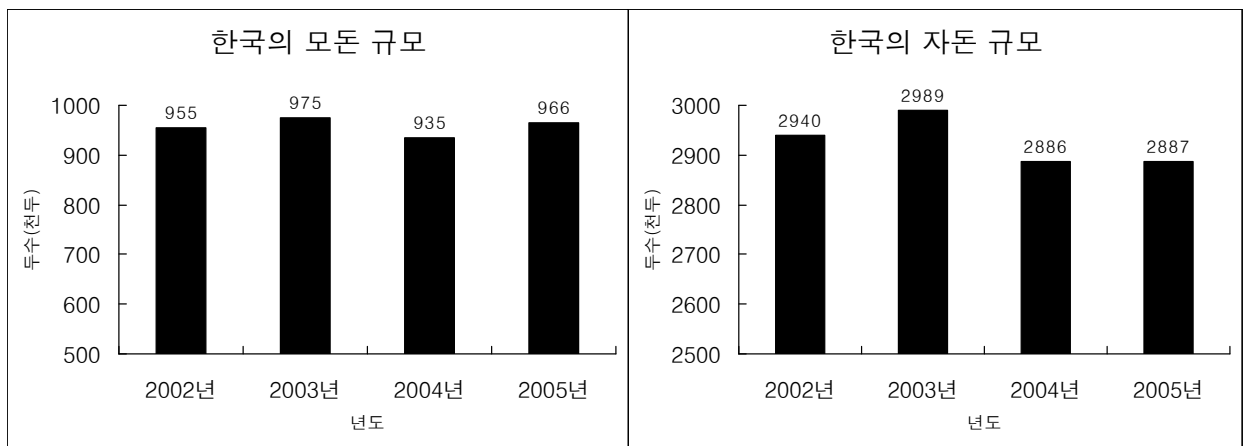


그림 1. 우리나라 모든 및 자돈규모의 변화추이

경제 산업적 측면

전 세계적으로는 물론 한국에서도 가축전염병의 발생율이 매년 증가 추세에 있으며, 그중에서도 특히, 자돈폐사율이 최근 급격하게 증가(30%)하여 매년 약 700억원 정도의 경제적 손실이 발생하고 있음 (1). 따라서, 이러한 자돈의 폐사율을 감소시킬 수 있는 새로운 면역증강제의 개발은 막대한 경제적 손실보전으로 인한 경제적 가치는 물론, 그 파생효과가 매우 높음.

- (2) 열악한 사육환경으로 인한 구제역, 콜레라등과 같은 전염병의 빈번한 발생으로 인하여 도산 농가가 속출하고 있으나 (표 1), 현재로서는 이를 획기적으로 억제할 수 있는 뚜렷한 방법이 도출되어 있지 않음.

<표1> 최근 5년간 돼지의 법정전염병(제1종 및 제2종)발생 현황(건수)

질병명	2000	2001	2002	2003	2004	2005. 9	비고
구제역	0	0	0	15	0	0	제1종
돼지콜레라	0	0	13	72	9	5	제1종
돼지오제스키병	135	277	39	30	43	17	제2종
돼지일본뇌염	0	0	1	1	1	2	제2종
돼지전염성 위장염	23	5	4	1	0	0	제2종
돼지단독	4	3	3	3	0	1	제2종
돼지생식기호흡기증후군	51	68	36	21	21	23	제2종
유행성설사병	36	55	48	90	45	20	제2종

※ 가축전염병발생자료관리시스템(Animal Infectious Disease Data Management System, AIMS, 검역원) 자료

(3) 따라서, 이러한 전염병을 예방하고 치료하기 위하여 기존에 사용하여온 항생제를 대체할 수 있는 새로운 면역증강제를 개발함으로써 **항생제가 잔류하지 않는 고기육을 생산**하여 국민생활의 질을 향상시킬 수 있는 **면역증강 사료첨가제의 개발이 시급히 요구**됨.

과학기술적 측면

태반은 태아의 발육, 성장에 필요한 생리기능을 가지고 있으며 미백, 갱년기 장애극복, 노화방지 등의 효능을 가지고 있다고 알려져 있음 (2-7). 따라서, 이러한 기능을 가진 돼지태반으로부터 면역증강활성을 지닌 물질을 탐색하여 대량으로 생산할 수 있는 공정기술을 개발한다면, **저비용 고부가가치로 면역을 증강**시킬 수 있는 새로운 사료첨가제등의 개발이 가능함.

(4) 한편, 이러한 효능을 가진 태반 유래 제품이 오래전부터 많은 나라에서 만들어져 판매되어져오고 있으며, 2005년 현재 일본, 독일, 호주, 뉴질랜드로부터 양 태반으로 만든 제품의 국내수입 판매량은 국내 25 업체에서 183 억원 정도임.

(5) 따라서, 돼지 태반으로부터 면역을 증강시킬 수 있는 생리활성 물질을 탐색하여 **대량 생산 공정기술을 개발**하고 **면역증강 사료제등과 같은 산업적 이용기술의 개발이 절실히 필요**함.

사회 문화적 측면

Well-being에 대한 사회적 관심을 고려해 볼 때 **항생제 오남용으로부터 안전한 고기육을 생산할 수 있는 대체 면역증강제의 개발**에 대한 연구는 대단히 중요함.

3. 연구개발의 범위

항생제 대체를 위해 “돈 태반을 이용한 자돈의 면역증강 사료 첨가제의 개발”이라는 최종 목표 달성을 위해 본 과제의 개발 범위는 다음과 같다.

- 가. 돼지 태반에서 면역증강 관련 물질을 효율적으로 추출할 수 있는 효과적인 추출 방법을 개발하여,
- 나. 개발된 추출방법으로 생산된 돼지 태반 추출물을 세포, 실험 동물 수준에서 면역증강 효과를 규명하는데,
- 다. 면역증강 효과의 규명은 면역세포의 활성화 측정, 실험동물체 내 면역세포 농도 변화, 면역증강 관련 혈중 면역단백질의 변화 등을 규명한다.
- 라. 실험동물 모델에서 규명된 최적의 태반 추출물 포물리를 이용하여 자돈에 급여할 수 있는 태반추출물이 포함된 자돈 사료 시제품을 개발하고,
- 마. 시제품을 자돈에 다양한 농도로 급여하여 증체량, 면역세포 활성화도, 면역증강 관련 혈중 면역단백질의 농도 변화, 폐사율, 질병 메카니즘 차단 효과 등을 규명한다.
- 바. 최종적으로 돼지 태반추출물이 함유된 자돈용 면역증강 사료의 시제품을 개발하고, 관련 자료를 이용하여 논문 및 지적재산권을 확보함으로써 산업화의 기반을 조성하는 것이 본 연구과제의 연구개발 범위이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 세계적 수준

개념정립 단계	√	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

2. 국내 수준

인태반 및 양태반을 이용한 제품은 국외로부터 수입하여 사용되고 있으나, 돼지태반을 이용한 생리활성물질등에 대한 연구가 현재 몇몇 벤처회사를 중심으로 진행하려고 시도되고 있거나, 진행중에 있음.

3. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
경희대 및 케이에이취팜	돼지태반에서 인태반을 대체할 수 있는 재료 개발	- 갱년기장애로 인한 여성호르몬불균형의 개선효과 입증 - 바이오프라센탐 출시(현재 임상실험중): 성장기어린이 및 폐경을 앞둔 여성등을 위한 건강기능식품으로의 개발가능성.
중앙바이오텍	돼지태반에서 생리활성물 질의 개발	현재 연구진행중
국외 (일본, 호주, 뉴질랜드 등)	돼지태반 이용기술의 개발	현재 의약품 대체 건강기능식품, 주사제, 음료, 화장품 원료등으로 수많은 상품이 출시 되어 판매되고 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 태반 추출물의 성분 분석 및 수율 평가

1. 추출방법에 따른 최종추출물의 수율평가

태반을 PBS로 간단하게 washing한 후, 감압 멸균한 것(Autoclaved Placenta)과 멸균을 생략한 시료 (Raw Placenta)를 사용하여 위에서 열거한 가수분해법, 열수추출법, 유기용매추출법등으로 추출한 최종산물의 Yield을 검토한 결과, 표 2과 3에서 보여주고 있는 것처럼, 열처리에 의한 가수분해 및 열수에 의한 추출물은 약 36 ~ 48%로 높은 yield을 보여주고 있으나, 알카리 가수분해 및 유기용매에 의한 추출물에서는 3-5%내외의 낮은 yield을 보여주었다.

표 2. Autoclaved Placenta을 사용한 각 추출물의 최종수율

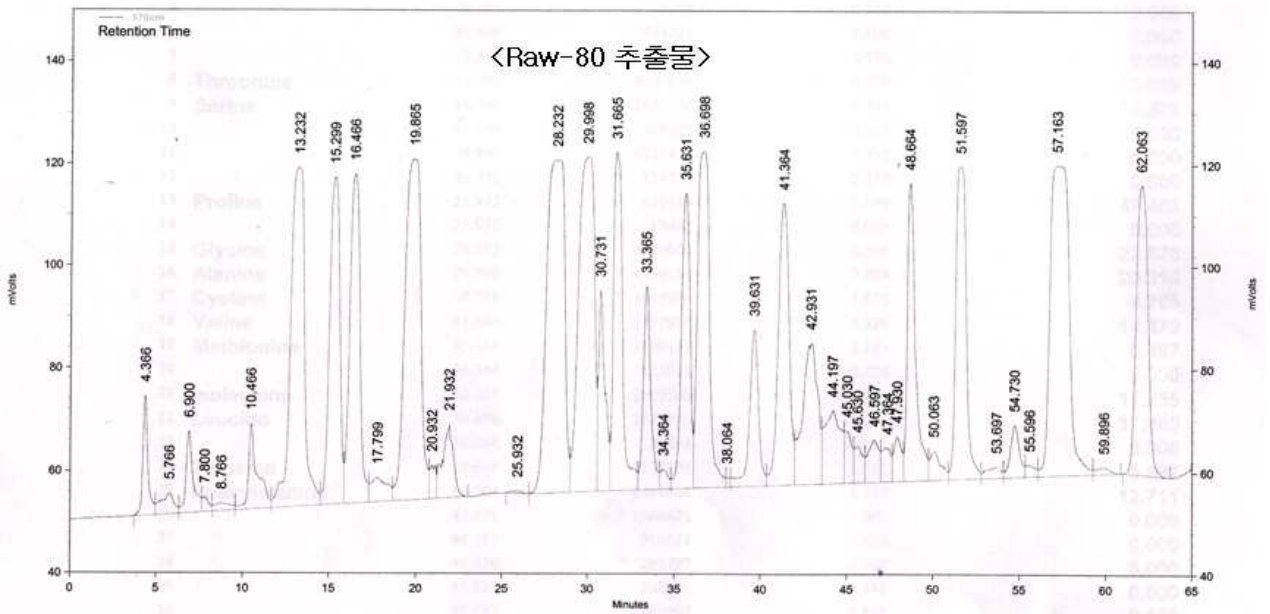
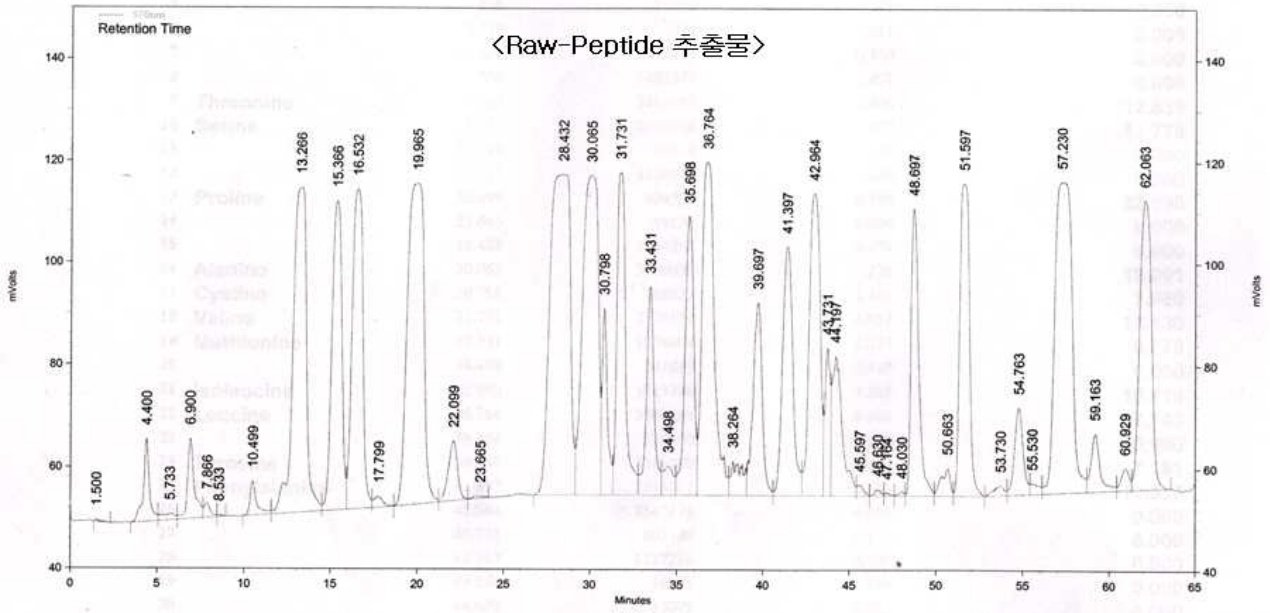
Extraction method (designation)	Sample (g) wet/dry	Extraction weight (g)	Extraction ratio (%)	Sample conc.(mg/ml)
4℃ (Auto-4)	25 /0.5	0.190	38.0	200
37℃ (Auto-37)	25 /0.5	0.181	36.0	200
60℃ (Auto-60)	25 /0.5	0.210	42.0	200
80℃ (Auto-80)	25 /0.5	0.240	48.0	200
Homogenization (Auto-Total)	25 /0.5	0.240	48.0	200
NaOH hydrolysis (Auto-NaOH)	25 /0.5			100
Boiling (Auto-Peptide)	25 /0.5	0.190	38.0	200
Chloroform : MeOH extraction (Auto-TFA)	50 /1.0	0.054	5.4	0.7
Phenol extraction (Auto-ECP)	50 /1.0	0.03	3	0.1

표 3. Raw Placenta을 사용한 각 추출물의 최종수율

Extraction method (Designation)	Sample (g) wet /dry	Extraction weight (g)	Extraction ratio (%)	Sample conc.(mg/ml)
4°C (Raw-4)	25 /0.5	0.230	46.0	200
37°C (Raw-37)	25 /0.5	0.249	49.8	200
60°C (Raw-60)	25 /0.5	0.219	43.8	200
80°C (Raw-80)	25 /0.5	0.200	40.0	200
Homogenization (Raw-Total)	25 /0.5	0.270	54.0	200
NaOH hydrolysis (Raw-NaOH)	25 /0.5			100
Boiling (Raw-Peptide)	25 /0.5	0.270	54.0	200
Chloroform : MeOH extraction (Raw-TFA)	50 /1.0	0.0484	4.84	0.6
Phenol extraction (Raw-ECP)	50 /1.0	0.03	3	0.1

2. 추출방법에 따른 아미노산성분의 비교분석

아미노산은 단백질을 구성하고 있는 성분으로 각각의 추출방법에 따라 추출되어지는 단백질의 차이를 나타내는 지표이며, 이것은 매번 동일한 방법에 의해 추출된 동일한 추출물의 성분지표로써 활용이 가능하다 (8-9). 면역증강효능이 뛰어난 Raw Placenta을 Boling하여 추출한 Raw-Peptide 추출물, Raw Placenta을 80°C에서 30분간 가온하여 추출한 Raw-80 추출물, Raw Placenta을 NaOH로 추출한 Raw-NaOH 추출물에 대하여 아미노산분석을 수행한 결과 (그림 2), Raw-Peptide 추출물과 Raw-80 추출물의 아미노산 조성은 대단히 유사함을 보여주고 있으나, 두 추출물과 비교하여 Raw-NaOH 추출물의 아미노산 조성은 큰 차이를 보이고 있음 (표 4). 따라서, 각추출물의 특이적인 지표성분으로서 활용이 가능하다고 판단되었음.



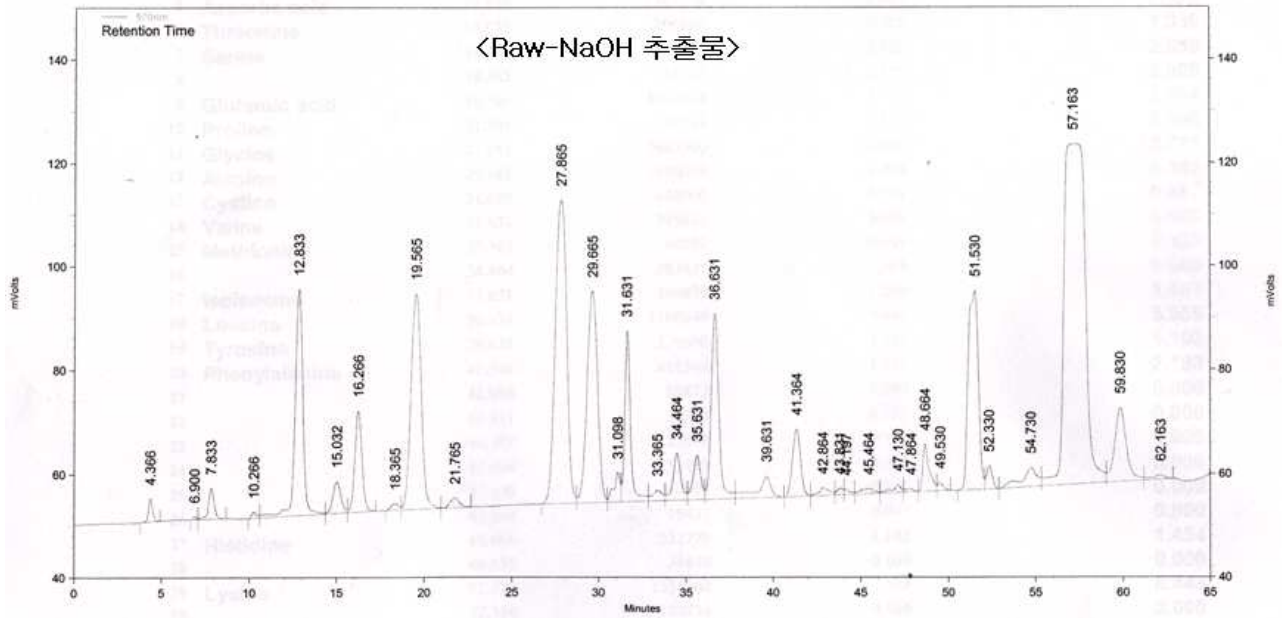


그림 2. 각추출물의 아미노산분석 Histograms

표 4. 각추출물의 아미노산 조성

아미노산	Raw-Peptide 추출물	Raw-80 추출물	Raw-NaOH 추출물
Alanine	7.278	7.499	8.424
Leucine	6.156	5.733	5.441
Arginine	5.008	4.812	0.216
Serine	4.977	4.749	2.720
Threonine	4.496	4.705	0.965
Lysine	4.375	4.660	7.532
Valine	4.052	4.326	3.658
Phenylalanine	3.753	4.375	2.053
Isoleucine	3.565	3.626	1.280
Histidine	3.259	3.529	1.142
Tyrosine	2.589	2.055	1.131
Methionine	2.337	2.165	0.394
Cystein	1.466	1.838	0.721
Proline	0.810	1.139	0.332
Glycine	-	8.569	13.062
Glutamic acid	-	-	8.169
Aspartic acid	-	-	6.690

제 2 절 돼지 태반추출물의 면역증강 효과 분석

1. 면역활성화 성분을 포함하는 태반추출물의 스크리닝

생쥐유래 macrophage 세포주인 J774A.1세포를 사용하여 면역활성화에 의해서 생성 분비되는 Nitric Oxide(NO)의 생성에 미치는 각 태반추출물의 효과를 비교 검토하였다.

가. NO 생성분비를 표적으로한 J774A.1세포의 면역활성화에 대한 각 태반추출물의 효과

먼저, 잘 알려진 면역증강제인 Lipopolysaccharide (LPS) 및 Interferon- γ (IFN- γ)을 사용하여 J774A.1세포의 면역활성화에 의한 반응을 검토하였다 (10-13). 면역증강제를 단독 혹은 병합하여 투여한후, NO가 생성되어 배양액중에 축적된 Nitrite을 Sodium Nitrite을 표준물질로 하여 Griess reagent을 사용하여 정량하였다. NO의 생성과 Sodium Nitrite의 농도사이에 $r=0.9994$ 의 Correlation이 형성되어 정량이 이루어지고 있음을 보여 주었다(그림 3).

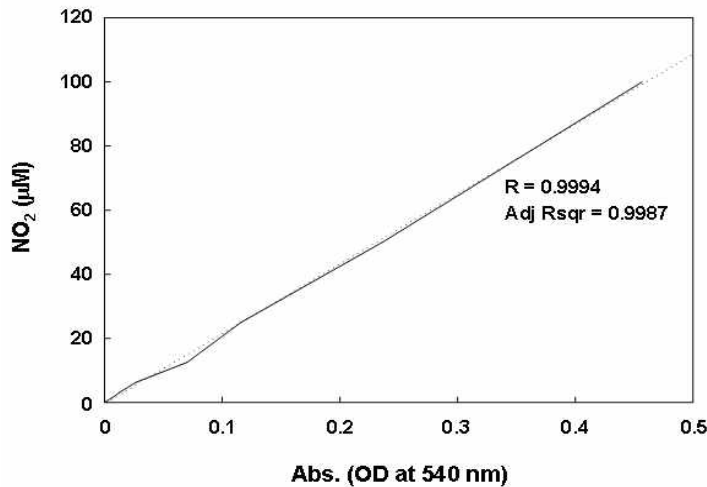


그림 3. Griess Reagent에 의한 Nitrite의 정량

이러한 Correlation을 바탕으로 LPS (1 µg/ml) 및 IFN- γ (100 U/ml)을 단독 혹은 병합하여 세포에 처리한후, 경시적인 NO의 생성량을 분석한 결과, LPS단독처리에 의해 유의하게 NO의 생성이 증가되었지만, IFN- γ 단독에 의해서는 NO의 유의한 생성은 관찰되지 않았다(그림 4). 한편, 우리체내에서 생성되어 분비되는 IFN- γ 와 LPS을 병합하여 처리한 결과 LPS단독과 비교하여 5배이상 NO생성량이 증가하였다. 이러한 병합효과는 처리 48시간이후에 최대에 도달하였으므로 각각의 태반추출물의 면역증강효과를 처리 48시간째에 생성된 NO의 양을 정량함으로써 면역증강활성을 스크리닝하였다.

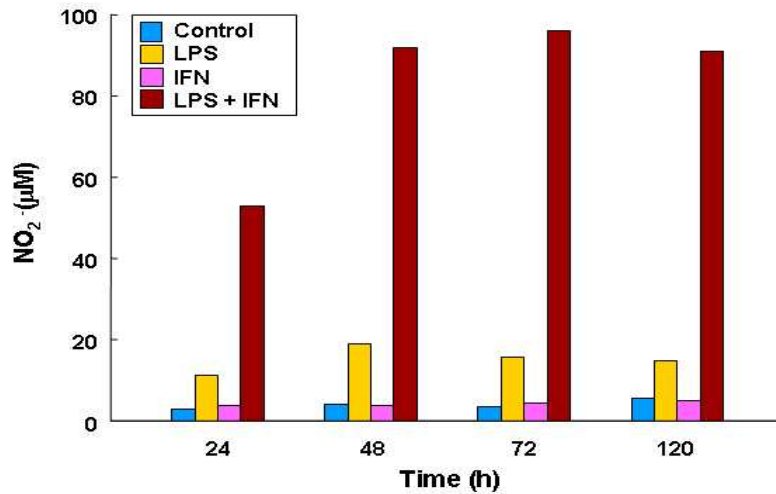


그림 4. LPS 및 IFN- γ 치리에 의한 NO생성량의 경시적인 변화

나. 면역활성화 성분을 포함하는 태반추출물의 스크리닝

앞에서 NO의 생성양이 곧 생쥐 macrophage유래 세포주인 J774A.1세포의 면역활성화와 관련된다는 사실로부터 서로 다른 방법으로 추출한 태반성분의 면역활성화능에 대하여 검토하였다.

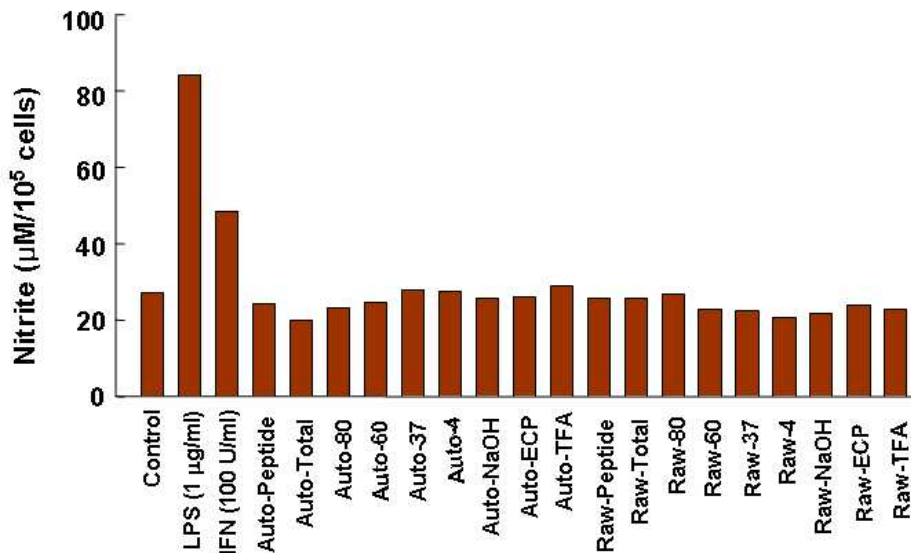


그림 5. Screening of the immune active fraction

먼저 1×10^5 개의 세포를 각각의 추출물 1 mg/ml의 농도로 처리하여 48시간후에 배양액중에 축적된 NO를 분석한 결과, LPS단독처리만큼의 NO생성효과를 나타내는 태반추출물은 없었다 (그림 5). 한편, 앞선 결과에서 우리체내에서 생성되어 분비되는 IFN- γ 와 LPS를 병합하여 처리한 결과 LPS단독과 비교하여 5배이상 NO생성량이 증가

하였다. 이러한 병합효과는 처리 48시간이후에 최대에 도달하였으므로 각각의 태반추출물의 면역증강효과를 IFN- γ 와의 병합처리에 의해 스크리닝을 수행하였다. 놀랍게도 단독처리에 의해서는 면역증강효과가 나타나지 않았던 모든 태반추출물에서 IFN- γ 와의 병합처리에 의해 Boiling에 의해 추출한 Peptide 추출물과 80°C에서 30분간 처리하여 추출한 추출물 및 알카리 추출물 (NaOH)에서 유의하게 NO 생성량이 증가하고 있음이 감압멸균한 태반(Autoclaved Placenta)과 비 감압멸균 태반(Raw Placenta)모두에서 관찰되었다 (그림 6).

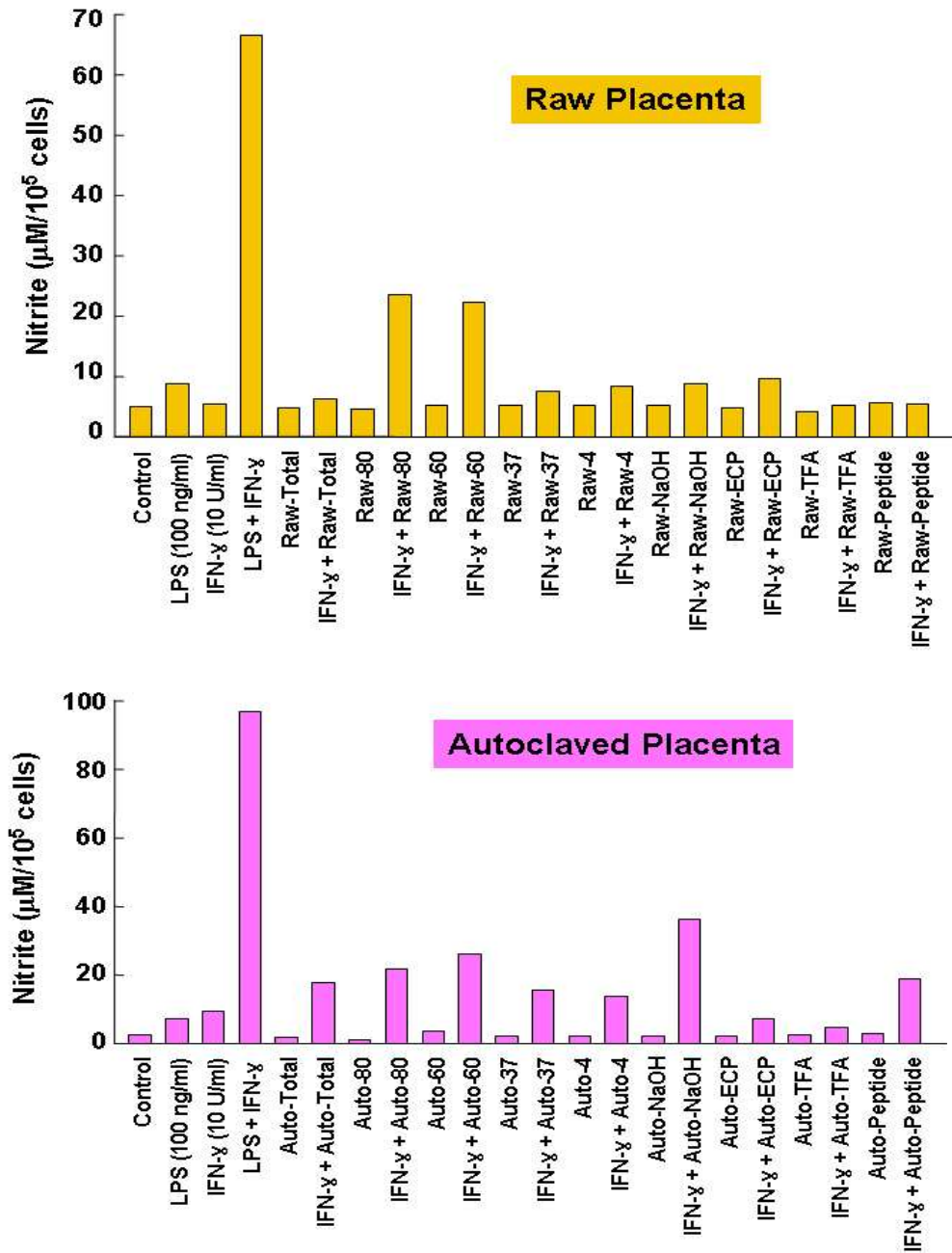


그림 6. 각 태반추출물(0.5 mg/ml)의 NO 생성량 추정

위에서 스크리닝된 면역활성화 태반추출물들을 대상으로 최종적으로 NO 생성촉진

능력을 재검토한 결과, Raw-Peptide fraction과 Raw-80 fraction에서 재현성 있는 결과가 도출되었고, 농도의존적으로 NO의 생성량을 증가시킴으로써 J774A.1세포에 대한 면역증강효과를 나타내었다(그림 7).

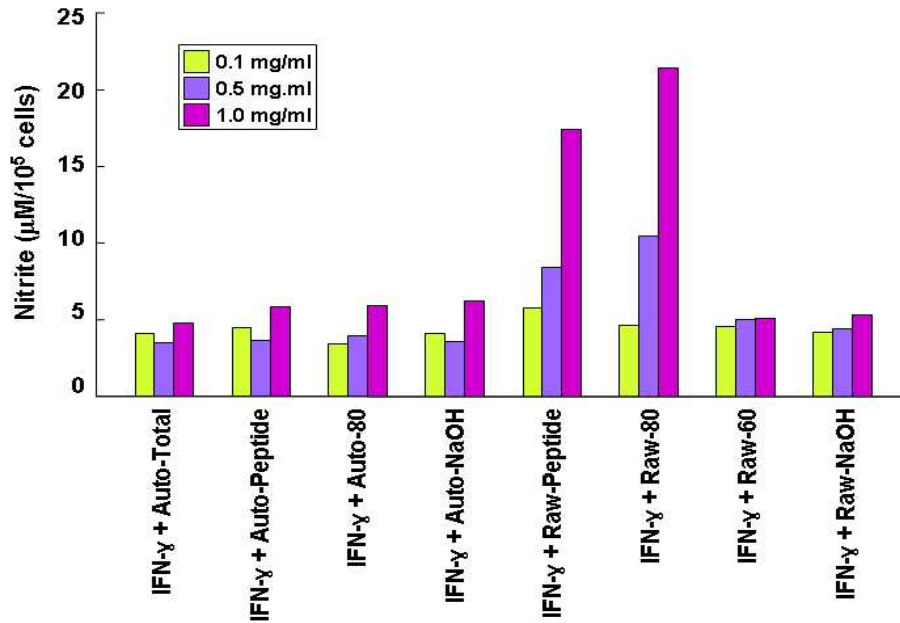


그림 7. 각 태반추출물의 NO생성에 대한 농도의존적인 효과

다. 최종적인 면역활성화 태반추출물의 선정

최종적으로 가장 면역활성화 성분을 많이 포함하는 태반추출물을 선정하기 위하여 N=5의 실험군을 가지고 J774A.1세포에서의 NO의 생성량에 대한 효과를 검토분석한 결과, Raw-80 및 Raw-Peptide fraction이 면역활성화 능력에서 가장 뛰어난 추출물임이 증명되었다 (그림 8). 따라서, 이후의 모든 실험은 위의 두가지 태반추출물에 Negative control로서 Raw-NaOH fraction을 사용하여 실험을 수행하였다.

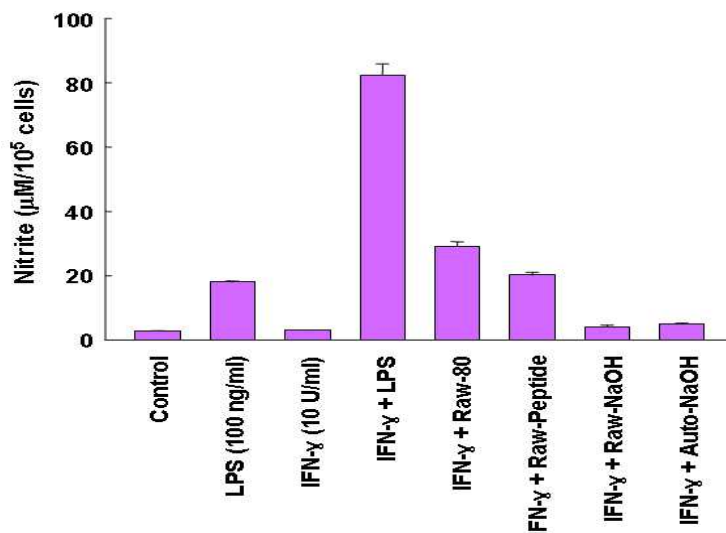


그림 8. Final selection of Placental Extracts containing immune-enhancing factors

2. Reactive Oxygen Species (ROS)의 생성에 대한 Raw-80 및 Raw-Peptide 태반추출물의 효과 검토

인체가 여러 가지 pathogen에 의해 감염되면, 감염원을 제거하기 위하여 체내의 면역 시스템이 작동하게 되는데, 그중의 하나로 macrophage 세포가 유해한 ROS를 대량으로 생성하여 pathogen을 죽이는 살상무기로 사용되고 있는 것이 잘 알려져 있다 (14-15). 따라서, 본 실험에서는 이러한 앞선 연구결과에서 면역활성화 능력이 뛰어난 태반추출물인 Raw-80 및 Raw-Peptide fraction이 macrophage 세포주인 J774A.1세포에서 ROS의 생성에 효과가 있는지를 분석하였다.

가. ROS 생성에 대한 Raw-80 및 Raw-Peptide의 효과

ROS의 생성을 증가시키는 것이 잘 알려진 Lipopolysaccharide (LPS)와 면역활성화 능력이 알려진 Interferon-gamma (IFN- γ) 및 Raw-80 및 Raw-Peptide를 J774A.1세포에 처리하여 ROS의 생성량을 FACSCalibur로 분석하였다 (그림 9). LPS (100 ng/ml) 및 IFN- γ (10 U/ml)을 단독 혹은 병합하여 세포에 처리한 결과, LPS단독처리에 의해 유의하게 ROS의 생성이 증가되었지만, IFN- γ 단독에 의해서는 ROS의 유의한 생성은 관찰되지 않았다(그림 9).

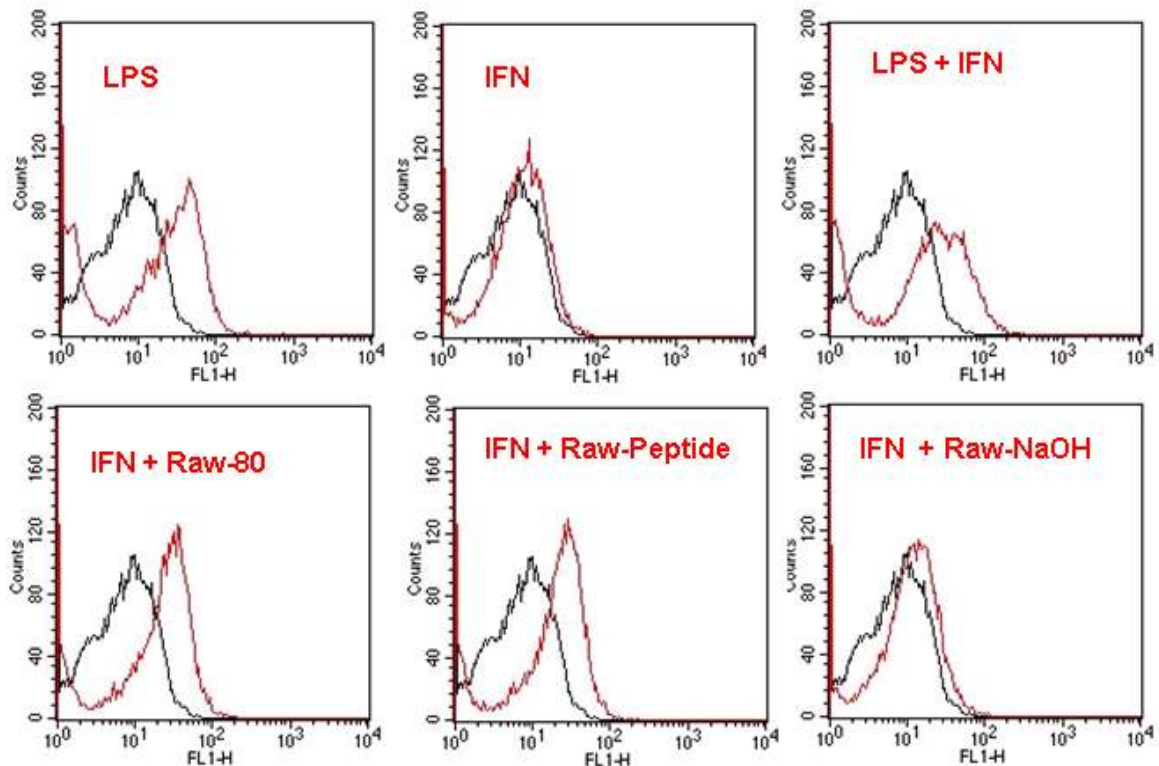


그림 9. Effects of Raw-80 and Raw-Peptide extracts on the ROS production

한편, IFN- γ 와 LPS를 병합하여 처리한 결과 LPS를 단독으로 처리한 정도의 ROS가 생성되는 것으로보아 IFN- γ 는 ROS 생성에는 영향을 미치지 않는 결과를 나타내었

다. 하지만, IFN- γ 와 Raw-80 및 Raw-Peptide을 병합처리한 결과, 유의한 ROS의 생성이 관찰되었으나, Negative control로 사용된 Raw-NaOH에서는 ROS가 거의 생성되고 있지 않음을 관찰할 수 있었다 (그림 10).

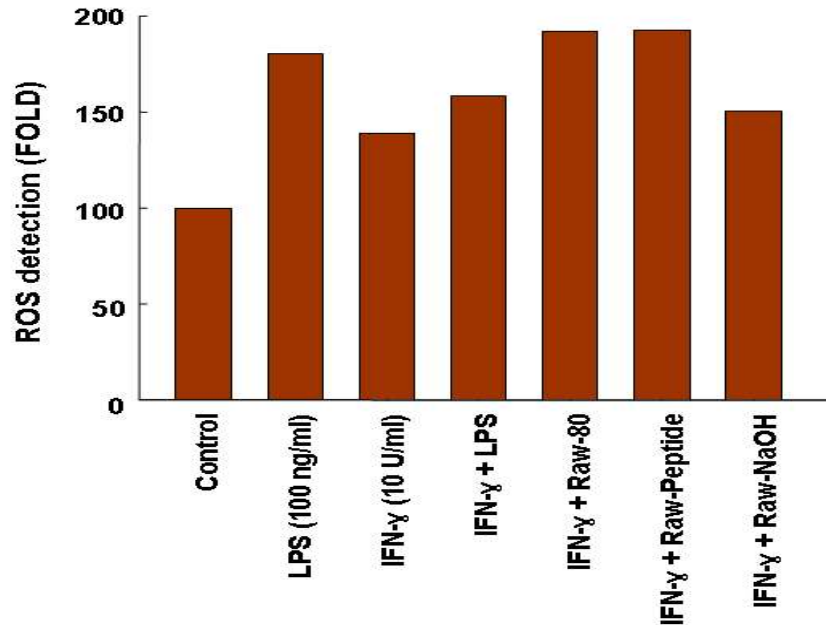


그림 10. Quantitation of ROS production

3. Cyclooxygenase I & II의 발현에 대한 Raw-80 및 Raw-Peptide 태반추출물의 효과

염증반응을 조절하기 위한 Non-Steroidal Anri-Inflammatory Drug (NSAID)의 표적 단백질인 COX는 prostaglandin의 합성에 관여하는 효소로, 체내에서의 염증반응조절에 있어서 중요한 위치를 점하고 있다 (16-17). 따라서, 인체가 pathogen에 의해 감염되어 발생하는 염증반응에 있어서 면역활성화 능력이 뛰어난 태반추출물인 Raw-80 및 Raw-Peptide fraction의 효과를 분석하였다. LPS, Raw-80, Raw-Peptide을 단독 혹은 병합으로 J774A.1세포에 처리하여 COX I & II의 발현을 Northern Blot으로 분석한 결과, LPS는 COX II의 발현을 유의하게 증가시켰으나, Raw-80 및 Raw-Peptide단독은 유의하게 발현에 영향을 미치지 않았으며, LPS와의 병합처리에 의해서도 LPS단독에 의한 효과에 유의한 영향을 미치지 않았다 (그림 11). 이상의 결과로부터 Raw-80 및 Raw-Peptide는 체내의 염증반응에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

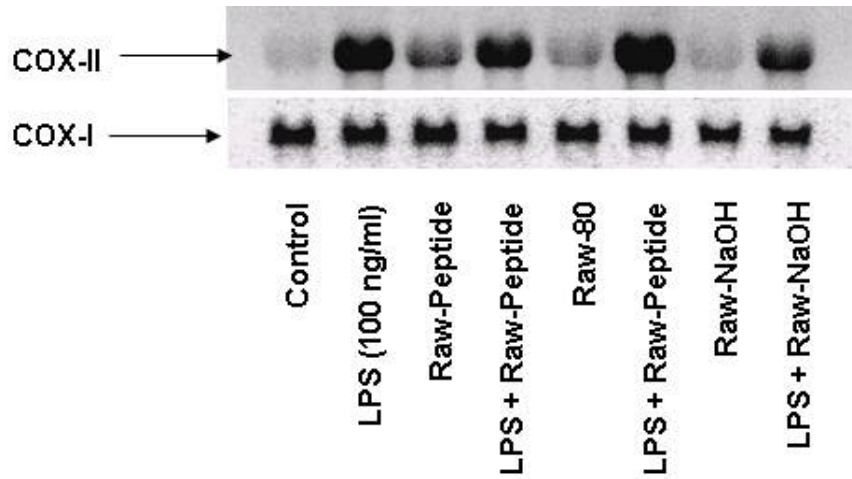


그림 11. Effects of Raw-80 and Raw-Peptide placental extract on the expression of COX-I & II

제 3 절 돼지 태반추출물의 항균작용 분석

대표적인 병원성 균인 *Staphylococcus aureus*와 *Pseudomonas aeruginosa*을 사용하여 Disk-Diffusion법에 의해 macrophage 유래 J774A.1세포의 면역을 활성화시킨 Raw-80 및 Raw-Peptide Fraction을 사용하여 항균작용을 분석한 결과, 두가지 태반 추출물 모두 항균활성을 보이지 않았다 (그림 12). 결론적으로 인체내의 조직인 태반에서 유래한 성분에는 항균력을 지닌 항생제와 같은 성분은 포함되어 있지 않음을 확인할 수 있었다.

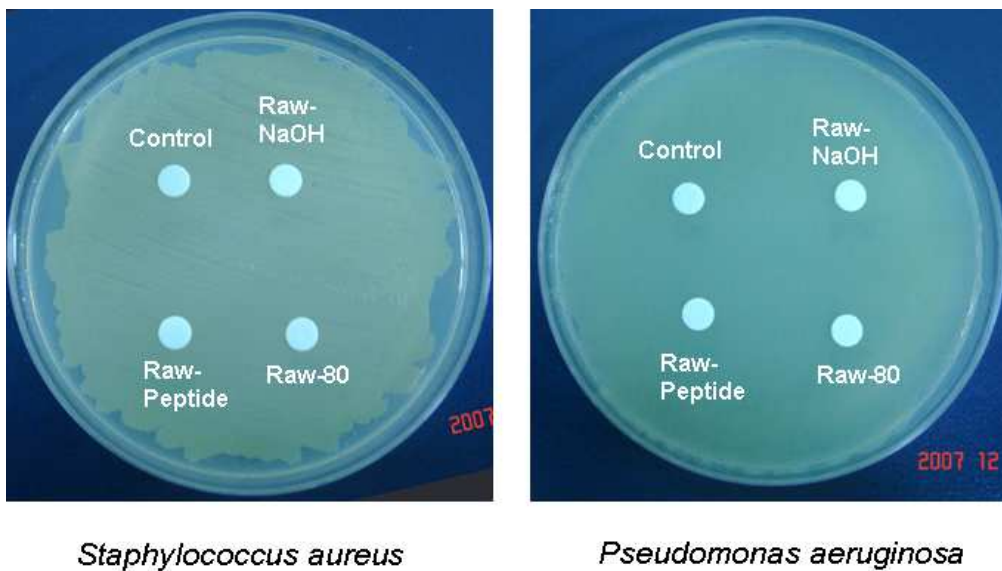


그림 12. Anti-microbial effects of Raw-80 and Raw-Peptide Fraction derived from porcine placenta

제 4 절 돼지 태반추출물의 세포독성 및 세포활성화 분석

1. 돼지 태반추출물의 세포독성분석

생쥐 macrophage 유래 J774A.1세포의 면역을 활성화시킨 Raw-80 및 Raw-Peptide의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기로 MTT 및 LDH Release Assay을 수행하였다 (18-19).

가. J774A.1 세포의 Viability에 대한 Raw-80의 효과

Raw-80의 농도를 면역증강효과가 있는 0.5 ~ 1.0 mg/ml의 농도를 기준으로 단독으로 J774A.1세포에 처리하여 48시간 배양후에 MTT 및 LDH release assay로 분석한 결과, 0.5 ~ 1.0 mg/ml의 농도에서는 큰 영향을 미치지 않았으나, 1 mg/ml 이상의 농도에서는 약간의 세포독성을 나타내었다(그림 13 A). 한편, Interferon과의 병합처리에 의해서도 LDH의 유리에 미치는 영향은 태반추출물 단독처리와 유사한 결과를 나타내었으나(그림 13 B), MTT assay에서는 유의하게 영향을 미치고 있는 것으로 보였으나, 이는 Interferon이라는 사이토카인의 특성이 세포분화를 유도하는 물질로 아마도 세포분화로 인한 증식정지에 의해 나타난 현상이라고 사료된다. 따라서, 1 mg/ml이하의 농도를 사용하여 세포의 면역력을 증강시킬 수 있었기 때문에 세포독성은 문제가 되지 않을 것으로 사료된다.

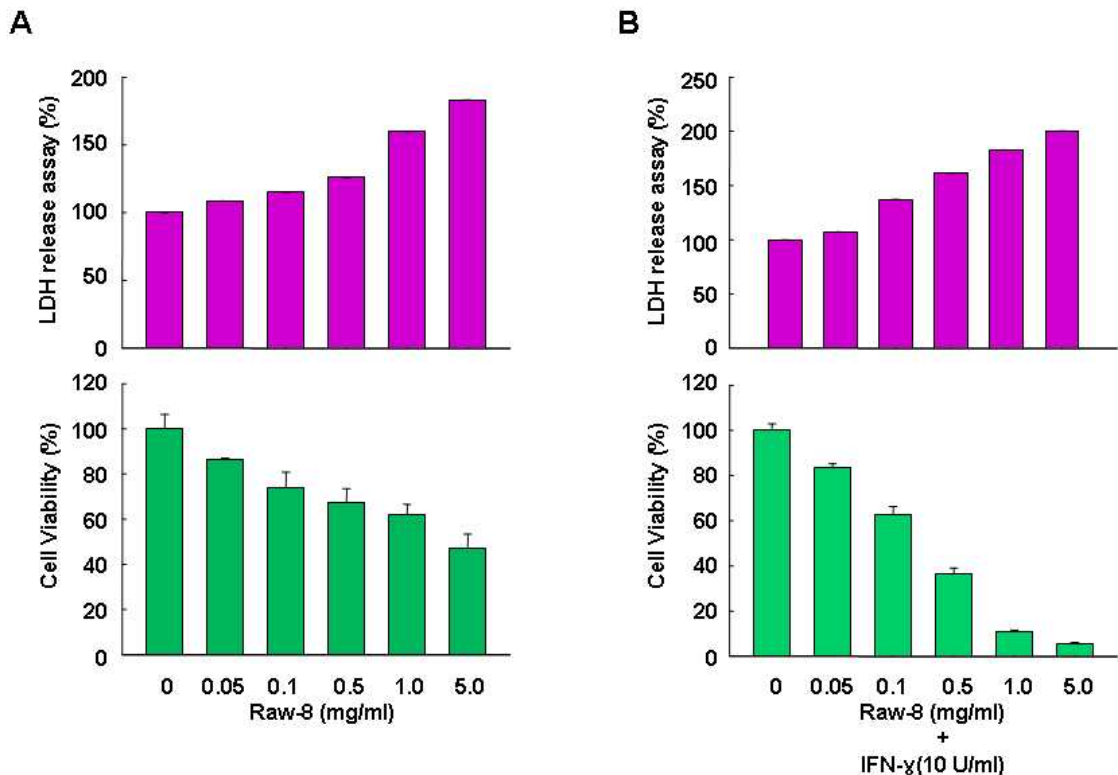


그림 13. Effects of Raw-80 on the cell viability

나. Cell Viability에 대한 Raw-Peptide의 효과

Raw-Peptide의 농도를 면역증강효과가 있는 0.5-1.0 mg/ml의 농도를 기준으로 단독으로 J774A.1세포에 처리하여 48시간 배양후에 MTT 및 LDH release assay로 분석한 결과, 0.5-1.0 mg/ml의 농도에서는 큰 영향을 미치지 않았으나, 5 mg/ml 농도에서는 약간의 세포독성을 나타내었다(그림 14 A). 한편, Interferon과의 병합처리에 의해서도 LDH의 유리에 미치는 영향은 태반추출물 단독처리와 유사한 결과를 나타내었으나 (그림 14 B), MTT assay에서는 유의하게 영향을 미치고 있는 것으로 보였으나, 이것도 위의 Raw-80과 같이 Interferon의 세포분화 활성으로 인한 증식정지에 의해 나타난 현상이라고 사료된다. Raw-Peptide가 Raw-80 Fraction 보다도 세포독성에 있어서는 더욱더 안전한 결과를 나타내었다.

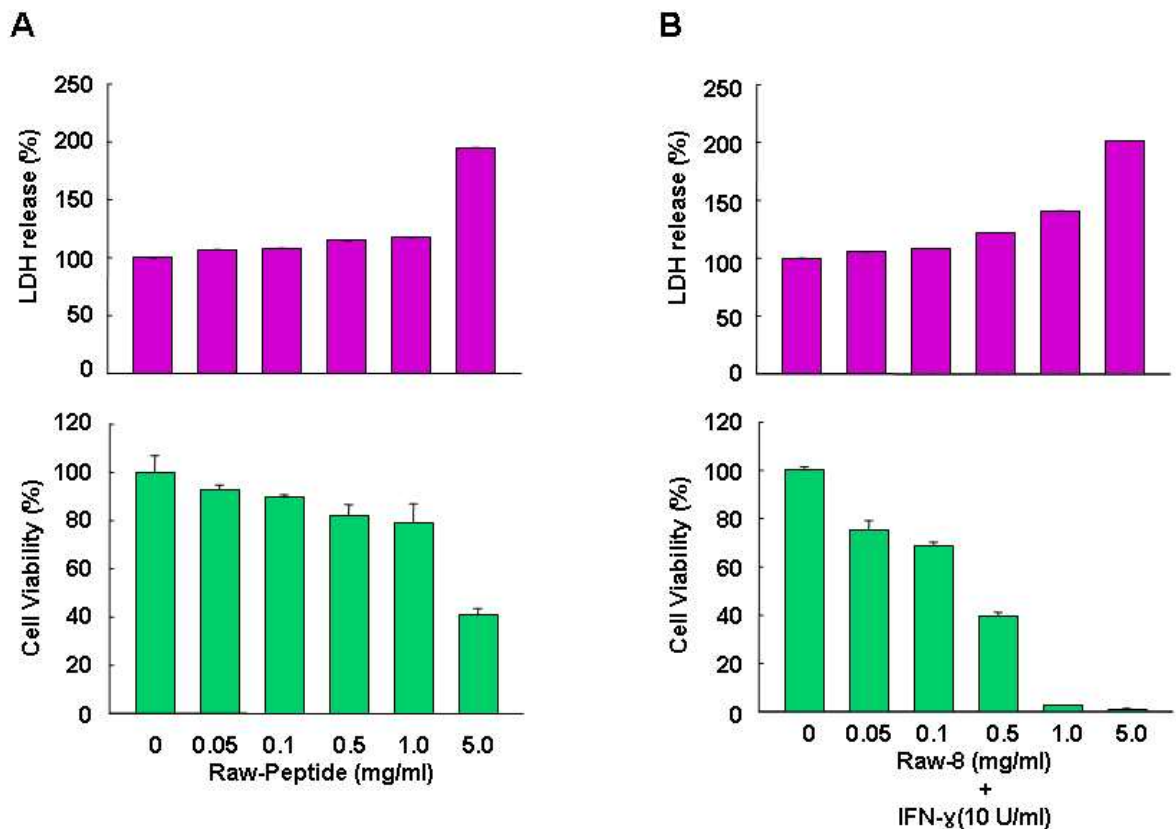


그림 14. Effects of Raw-80 on the cell viability

2. In vivo에서의 태반 추출물의 면역세포 활성화 능력 평가

In vitro에서의 면역세포활성화 효과가 in vivo에서도 나타나는지를 규명하기 위하여 태반추출물을 생쥐에 경구 투여한 후, 췌장을 적출하여 췌장 유래 면역세포의 활성화에 미치는 Raw-80의 효과를 검토하였다.

가. B-세포 활성화능력 평가

Raw-80 태반 추출물을 각 농도별로 Balb/c 생쥐에 3주간 투여 후, 주별로 spleen에서 splenocyte를 적출하여 B 면역 세포의 활성화능력을 평가하였다 (20). 아무 것도 처리하지 않은 생쥐와 태반 추출물을 녹인 용매(Vehicle)를 처리한 군(negative control)과 면역교란을 유도하는 항원인 ovalbumin을 처리한 군(positive control)으로 설정하여 실험을 진행하였다. 태반 추출물을 급여한 생쥐 군에서 채취한 splenocyte에 B 세포 활성화물질인 LPS를 농도별로 처리 하였을 때, 미 처리군과 vehicle 군에 비해 급격한 B 세포 활성화가 나타났으며, ovalbumin을 주사한 군과 유사한 정도의 B 세포의 활성화 능력을 보여주었다(그림 15). LPS의 농도에 따른 변화는 크게 나타나지 않았지만, 5 µg/ml의 농도에서 가장 좋은 효과가 나타났다. 이는 태반 추출물 농도에 따른 가중 효과는 없었지만 태반 추출물이 항체를 생성하는데 중요한 역할을 하는 B 세포를 활성화시키는데 기여를 한다는 것을 시사하였다.

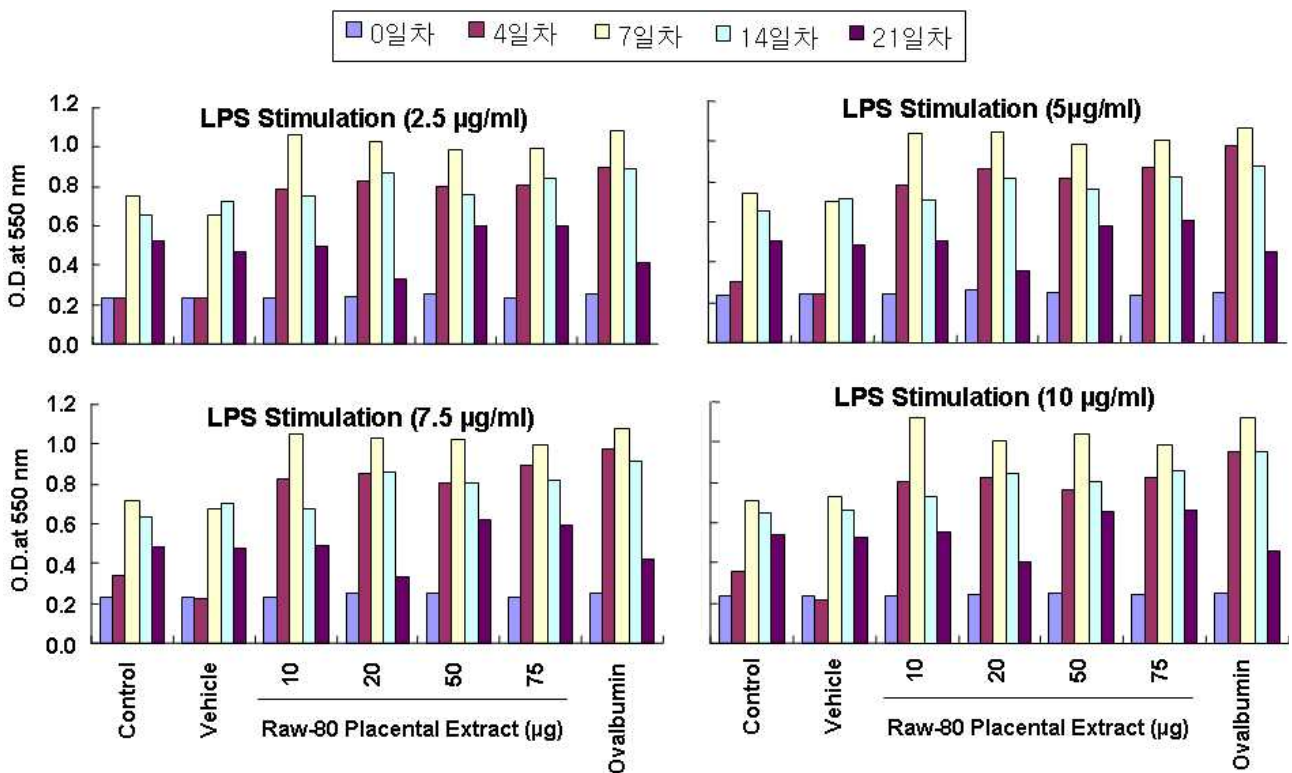


그림 15. Effects of Raw-80 placental extract on the activation of B lymphocytes

나. T-세포 활성화능력 평가

Raw-80 태반 추출물을 Balb/c 생쥐에 3주간 투여 후 각 주별로 spleen에서 splenocyte를 적출하여 T 면역 세포의 활성화능력을 평가하기 위하여, 아무 것도 처리하지

않은 생쥐와 태반 추출물을 녹인 용매(Vehicle)를 처리한 군(negative control)과 면역교란을 유도하는 항원인 ovalbumin을 처리한 군(positive control)으로 설정하여 실험을 진행하였다 (21). 태반 추출물을 급여한 생쥐 군에서 채취한 splenocyte에 T 세포 활성화물질인 ConA를 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리 하였을 때 아무것도 처리하지 않은 군과 vehicle 군에 비해 급격한 T 세포 활성화를 보여주었으며, 이는 ovalbumin을 주사한 군과 거의 비슷한 정도로 T 세포의 활성화 능력을 나타내었다(그림 16). 이는 태반 추출물 농도에 따른 가중 효과는 없었지만 태반 추출물이 항체를 생성하는데 중요한 역할을 하는 T 세포를 활성화시키는데 기여를 한다는 것을 시사하였다.

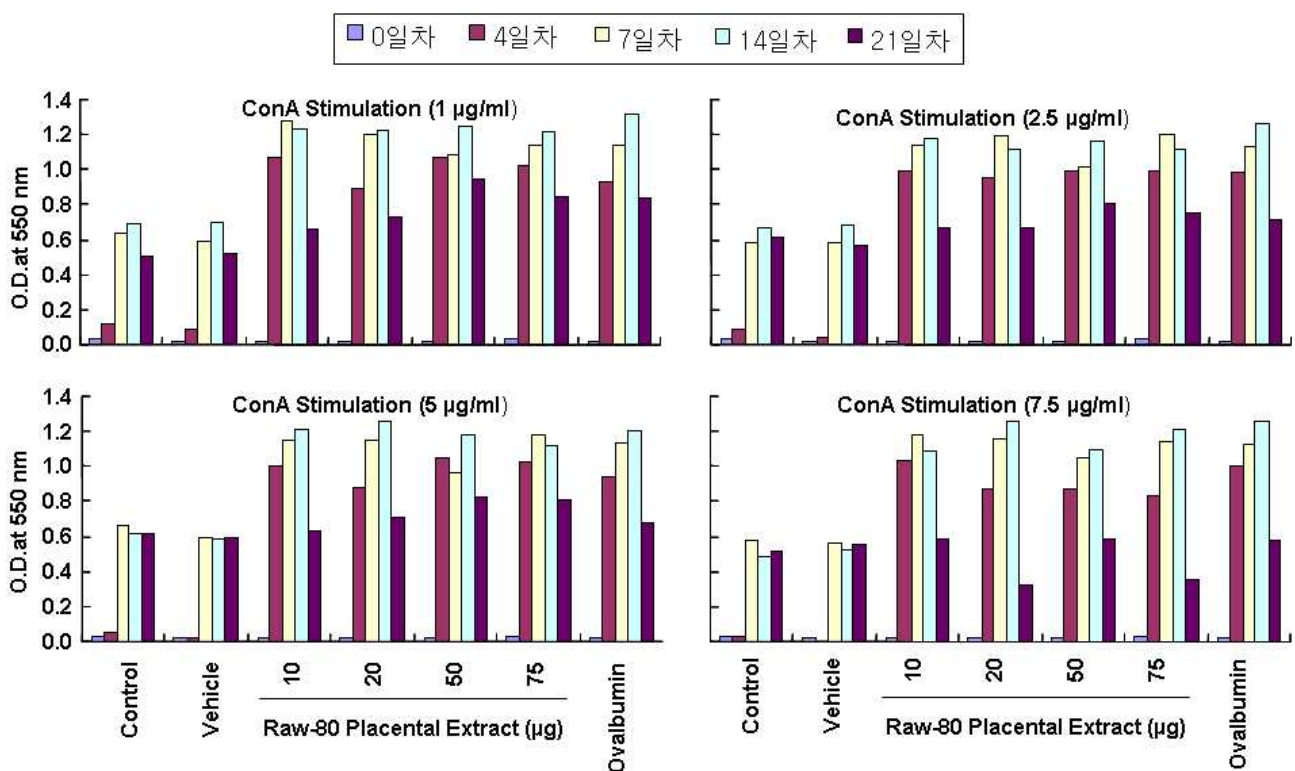


그림 16. Effects of Raw-80 placental extract on the activation of T cells

이러한 결과로부터, 태반 추출물이 면역증강의 중요한 parameter인 T 세포와 B 세포의 활성화에 긍정적인 영향을 주고 있다는 것이 시사되어졌으며, 특히, Ovalbumin 주사 시 나타나는 면역독성의 일종인 spleen의 무게증가가 태반추출물 급여 시에는 이러한 spleen의 무게증가가 나타나지 않은 것으로 보아 Raw-80 태반추출물은 면역독성 없이 면역세포의 활성화를 증가시키는 순수한 면역증강 효과를 나타내고 있는 것으로 판단된다.

제 5 절 돼지 태반추출물의 생리 및 대사기전 연구

1. 태반 추출물의 기초 생리 현상 규명

태반추출물을 투여하였을 시 나타날 수 있는 생리현상을 체중, 간, 췌장의 질량을 측정함으로써 돼지의 기초대사에 미치는 영향을 분석하였다.

가. 태반 추출물 투여에 따른 체중 변화

Raw-80 태반 추출물을 각각 10, 20, 50, 75 mg을 Balb/c 생쥐에 투여하여 3주간 체중의 변화를 관찰한 결과 태반 추출물 투여 군에서 control 군의 자연 증가율에 비해 현저한 체중의 증가를 보여주었다(그림 17). 이는 태반 추출물이 동물의 증체량에도 긍정적인 영향을 준다는 것을 직접적으로 시사하였다.

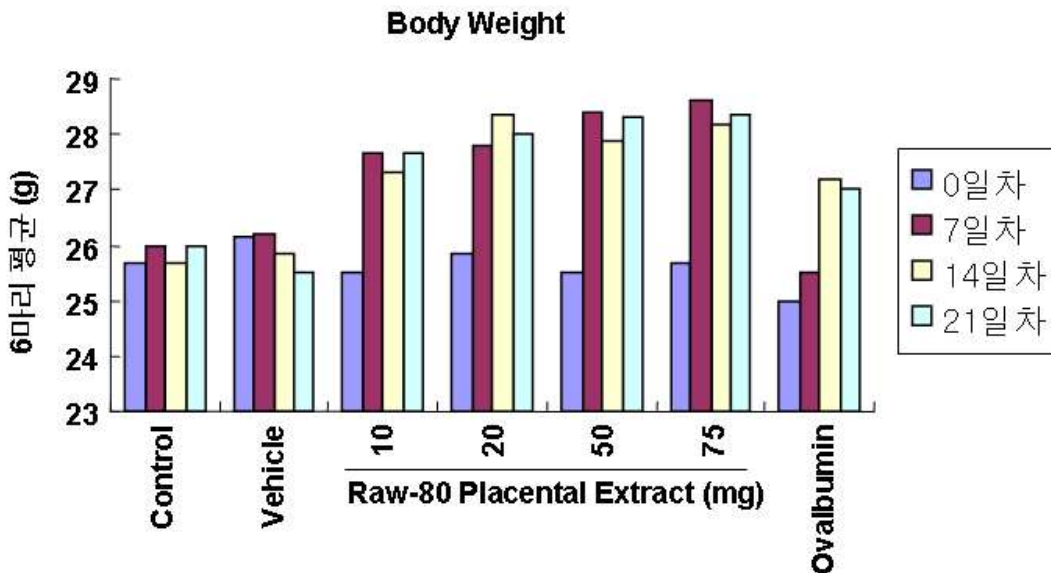


그림 17. Effects of Raw-80 placental extract on the body weight of mouse

나. 태반 추출물 투여에 따른 간 질량의 변화

Raw-80 태반 추출물을 각각 10, 20, 50, 75 mg을 Balb/c 생쥐에 투여하여 3주간 간 질량의 변화를 관찰한 결과 간 질량의 변화는 나타나지 않았다. 하지만 negative control로 사용된 ovalbumin 투여의 경우 약간의 간 질량 증가를 보여주어, 태반 추출물이 생쥐의 체내에서 독성물질로 작용하지 않는다는 것이 시사되었다 (그림 18).

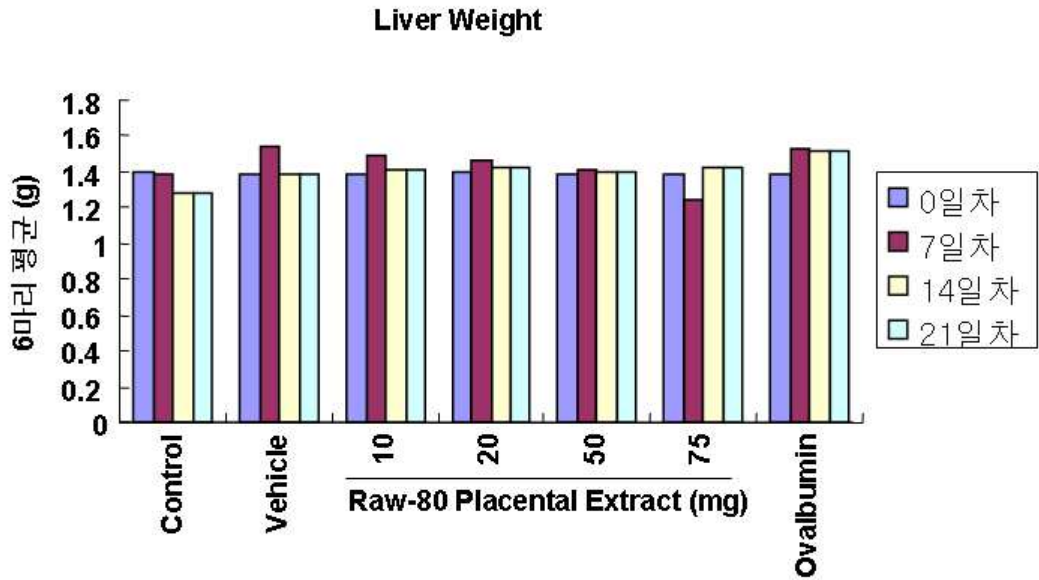


그림 18. Effects of Raw-80 placental extract on the liver weight of mouse

다. 태반 추출물 투여에 따른 췌장 질량의 변화

Raw-80 태반 추출물을 각각 10, 20, 50, 75 mg을 Balb/c 생쥐에 투여하여 3주간 췌장 질량의 변화를 관찰한 결과 췌장 질량의 변화는 나타나지 않았다(그림 19). 하지만, 역시 Ovalbumin 투여 군에서는 췌장 질량의 증가를 보여 태반 추출물이 ovalbumin과 같은 항원으로 작용하지 않고, 면역체계 이상이나 면역불균형을 초래하지 않는다는 것이 시사되었다.

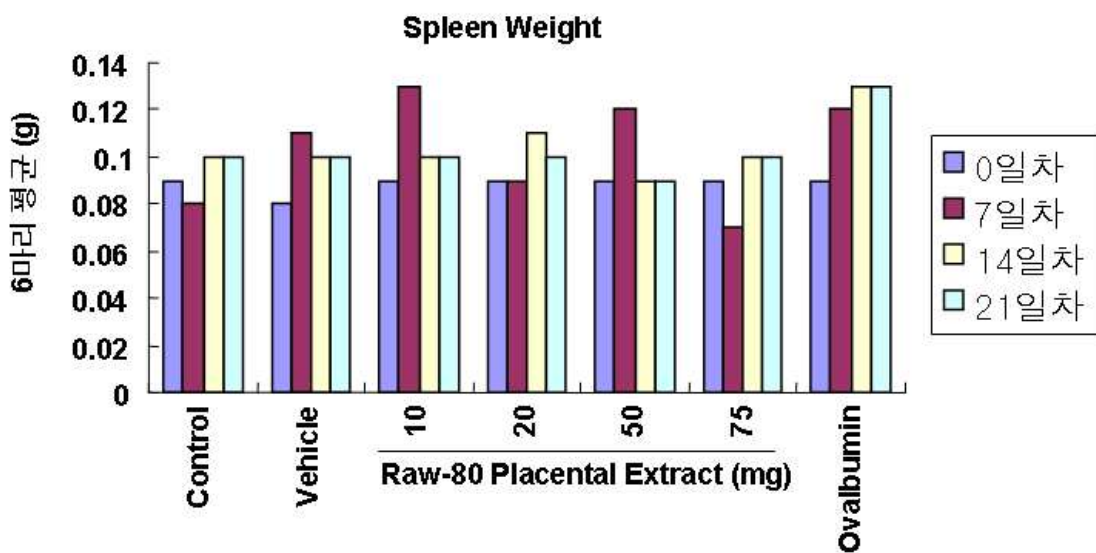


그림 19. Effects of Raw-80 placental extract on the spleen weight of mouse

2. 태반 추출물의 내분비 조절 작용 규명

태반 추출물을 투여한 생쥐와 그렇지 않은 생쥐에서 serum을 분리하여 FSH, LH, Testosteron, Estrogen의 농도를 측정 한 결과 FSH와 LH의 경우 처리군과 비처리군에서 호르몬 농도는 큰 차이를 보이지 않았으나, Estrogen과 testosteron의 경우 소량 증가하는 경향을 나타내었다(그림 20).

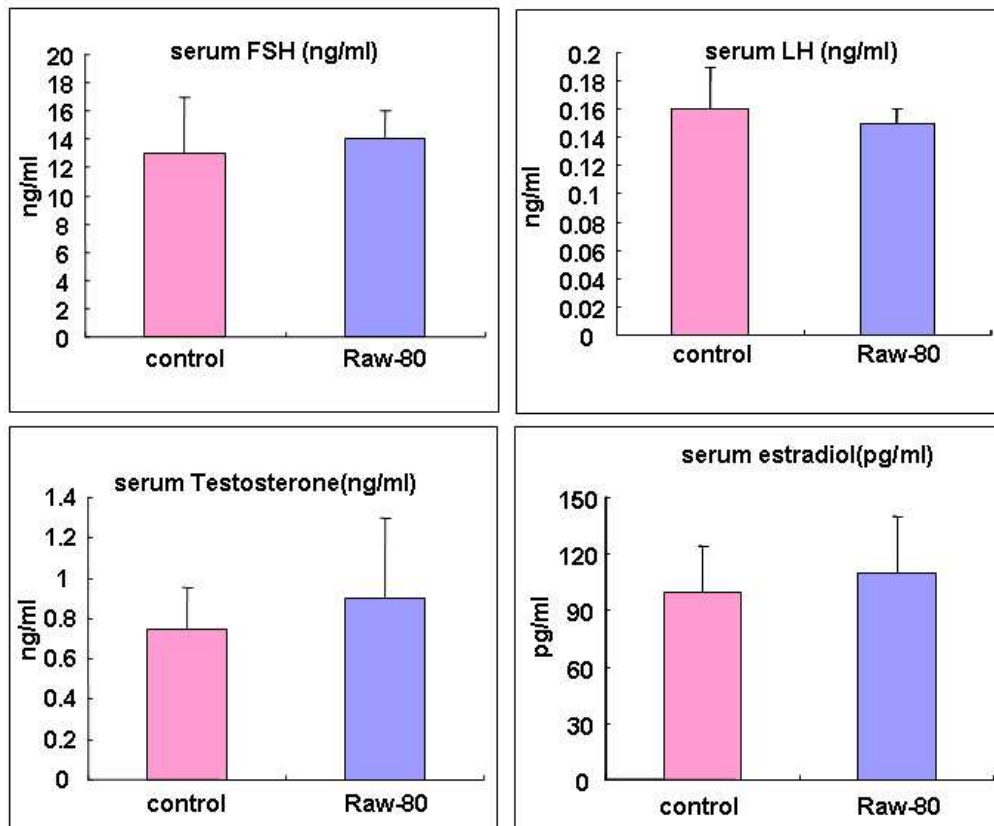


그림 20. Effects of Raw-80 placental extract on hormone excretion

3. 태반 추출물의 돼지 소화기 내 흡수력 규명

가. 일반사료와 태반 추출물이 함유된 사료를 돼지에게 급여한 후 소화기내 흡수율을 규명한 결과 3일동안 약 80%에 가까운 높은 흡수율을 보여 주었다 (그림 21). 따라서 태반 추출물이 일반 사료와 마찬가지로 돼지가 소화시키고, 흡수하여 영양소로 사용하는 데에는 아무런 문제점을 보이지 않음이 시사되었다.

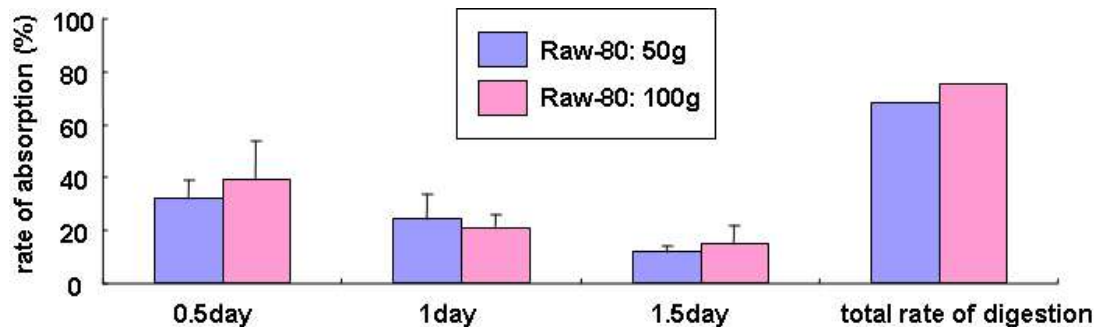


그림 21. Absorption rate of Raw-80 placental extract

나. 태반 추출물의 각 장관별 소화 흡수능력을 측정한 결과 소장, 위, 대장의 용적은 비슷 하였으나 상대적인 태반 추출물의 소화율은 소장에서 매우 높게 나타났다 (그림 22). 이는 태반 추출물이 소장에서 대부분 직접 흡수되고, 바로 면역증강 작용에 이용될 수 있음을 시사하였다.

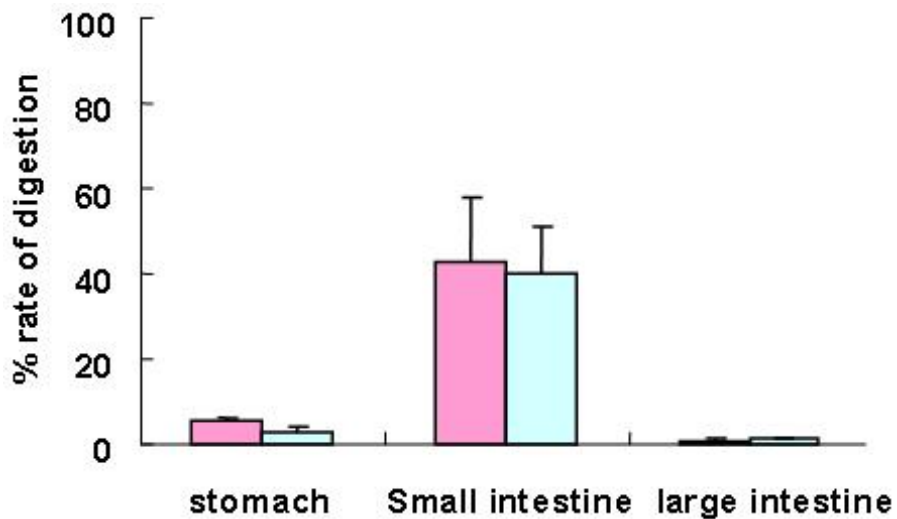


그림 22. Digestion rate of Raw-80 placental extract

4. 태반 추출물의 돼지 소화기 내 분해능력 규명

Pepsin을 이용한 소화기내 분해능력 측정 실험에서 평균 40% 이상의 태반 추출물이 분해됨을 확인할 수 있었다 (그림 23).

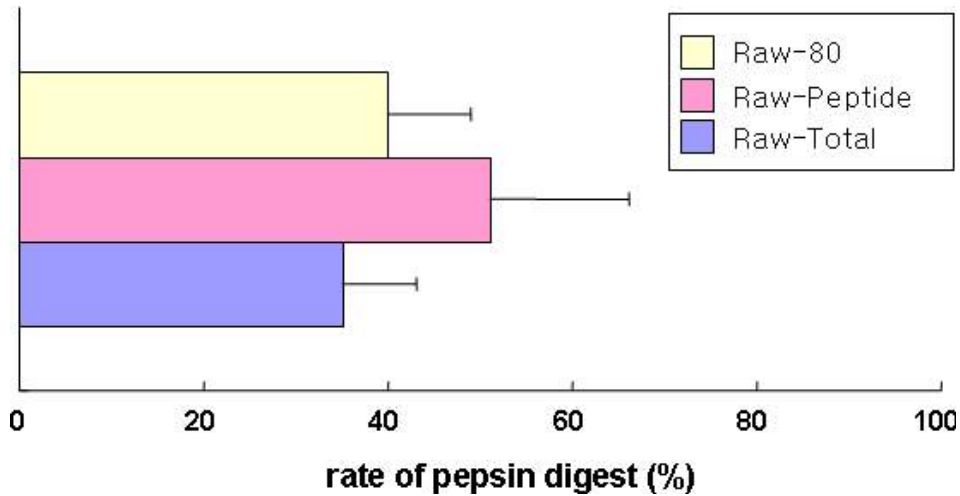


그림 23. Effects of Placental Extracts on the rate of pepsin digestion

5. 태반 추출물의 영양상 우수성 규명

태반 추출물의 영양학적 우수성을 조사한 결과 태반 추출물은 대부분 단백질로 구성되어 있으며, 다양한 아미노산 중 필수아미노산이 매우 다량으로 함유되어 있었다(표 5). 또한 다양한 mineral과 vitaminE의 성분도 검출되어 면역증강 효과를 기대할 수 있다고 사료된다 (표 6).

표 5. 태반추출물의 일반성분 분석

성분	80°C 추출물	Homogenate	시험방법
단백질	0.2 g/g	0.3 g/g	Kjeldahl법
회분	0.1 g/g	1 g/g	식품공전(2008) 회분시험법
지방	N.D	N.D	chloroform-methanol 추출법
Calcium	6.5 mg/g	4.6 mg/g	식품공전(2008) 무기성분시험법
Fe	0.1 mg/g	0.3 mg/g	식품공전(2008) 무기성분시험법
Phosphorus	6.6 mg/g	24.7 mg/g	식품공전(2008) 무기성분시험법
Zn	N.D	0.02 mg/g	식품공전(2008) 무기성분시험법

표 6. Mineral and Vitamine contents from Placental Extract

Mineral & Vitamines	Raw-Peptide 추출물	Raw-80 추출물
sodium(ppm)	8600	10300
potassium(ppm)	7500	8200
phosphorus(ppm)	1600	2800
calcium(ppm)	1050	2250
iron(ppm)	750	1000
magnesium(ppm)	350	400
zinc(ppm)	20	40
copper(ppm)	28	42
maganese(ppm)	0.8	1.1
vitaminE(ug/g)	2.0	4.3

제 6 절 돼지 태반 추출물의 약리 기전 규명

1. 태반 추출물 경구 투여 시 혈액조성 변화관찰 및 in vivo 탐식세포 탐식능 효과 규명

가. 태반 추출물 경구 투여 시 혈중 면역세포 수들의 변화

태반 추출물의 경구 투여 시 혈액 중에 있는 세포들의 변화를 알아보기 위해 태반 추출물을 농도별(1, 10, 20mg/ml)로 각 분획별 추출물(80℃ 추출물, 100℃ 추출물, NaOH 추출물)과 PBS only, 세포배양액(RPMI1640)을 각각 10마리의 생쥐에 7일간 투여한 후 생쥐의 혈액을 전혈 채취하여 각각의 혈액 세포의 증식 변화를 관찰하였다. 실험 결과는 가장 높은 값을 나타내는 2개체와 가장 낮은 값을 나타내는 2개체를 제외한 유효 6개체의 실험 값을 결과에 활용하였다. 실험결과에 대한 유효성은 ANOVA 방법을 이용하여 통계처리하였다.

(1). 백혈구 수치 변화

백혈구는 생체의 1차 면역반응을 매개하는 혈구로서 세균이나 바이러스 등 기타 감염에 저항하여 면역반응 전방에 중요한 기능을 한다 (22). 실험결과 80℃ 추출물 1mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml을 경구 투여한 마우스에서 아무것도 처리하지 않은 정상생쥐나 vehicle 처리군 보다 약 $3 \times 10^3 \text{ cell}/\mu\text{l}$ 정도 높은 수치가 관찰되었으며, 80℃ 추출물 1, 10, 20mg/

ml과 NaOH 추출물 1, 10, 20mg/ml 추출물 투여군에서 유의한 차이를 보여주었다(그림 24). 이는 태반 추출물 투여 시 면역 1차 반응을 매개하는 백혈구 수치의 증가를 가져와 면역반응이 향상되는 결과를 초래할 수 있다는 것을 의미하고 있다.

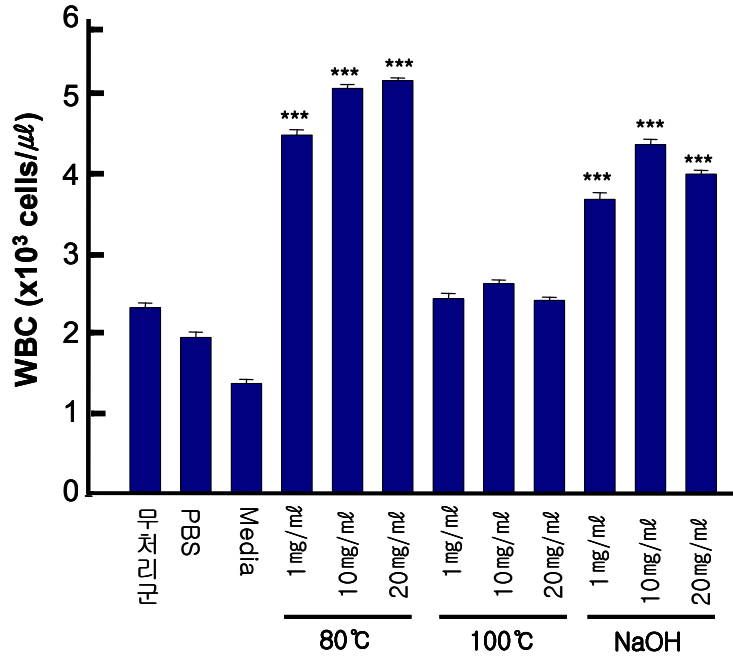


그림 24. Number of white blood cells by treatment of placental extracts in mice. *** $P < 0.01$.

(2). 적혈구 수치 변화

적혈구는 산소운반을 위한 혈구로 세포질 내부의 헤모글로빈이 산소와 결합하여 체내의 다른 조직이나 세포에 산소를 운반하는 역할을 한다. 적혈구의 결핍은 빈혈 등의 원인이 되는데 태반 추출물을 투여했을 시 80°C 추출물과 100°C 추출물을 투여했을 때 모두 적혈구 수치의 유의적인 상승효과를 보였다(그림 25). 그중에서도 80°C 추출물을 투여했을 때 농도에 따라 적혈구 수치가 추가적으로 상승하는 효과를 보여 주었다. 100°C 추출물의 경우에는 control 보다는 유의적인 차이가 있지만 농도에 따라 적혈구 수치의 감소가 관찰되었다. 태반 추출물 투여에 따른 적혈구 수치의 증가는 태반 추출물이 세포나 조직에 원활한 산소공급을 이끌어내어 생쥐의 순환계통에도 positive한 영향을 줄 수 있음을 시사하고 있다.

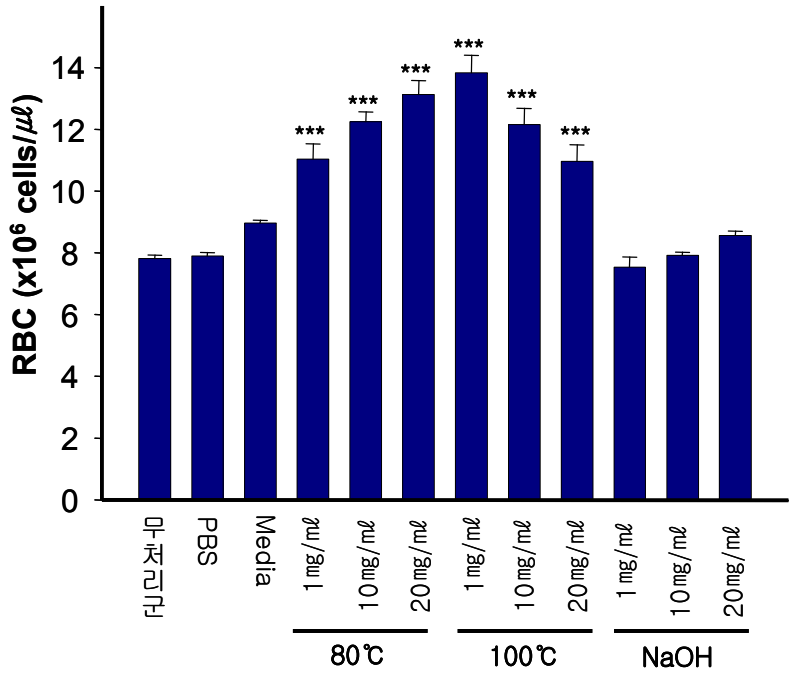


그림 25. Changes of Red blood cell number by treatment of placental extracts in mice.

*** $P < 0.01$.

(3). 혈소판 수치의 변화

혈소판은 혈장 속에 포함되어 있는 다른 여러 종류의 혈액 응고 인자들과 함께 피가 계속 나지 않게 피를 응고시키는 역할을 하며 혈소판이 부족하게 되면 혈액이 응고 되지 않아 계속 방출되어 위험해질 수 있다. 태반 추출물을 경구투여 했을 시 100°C 추출물의 1, 10mg/ml 처리군에서 아무것도 처리하지 않은 정상 생쥐 보다 통계적으로 유의성이 있는 혈소판 수치의 증가를 나타내는 것을 보이나 다른 대부분의 처리군에서는 거의 비슷한 양상을 보이는 것이 관찰되었다(그림 26).

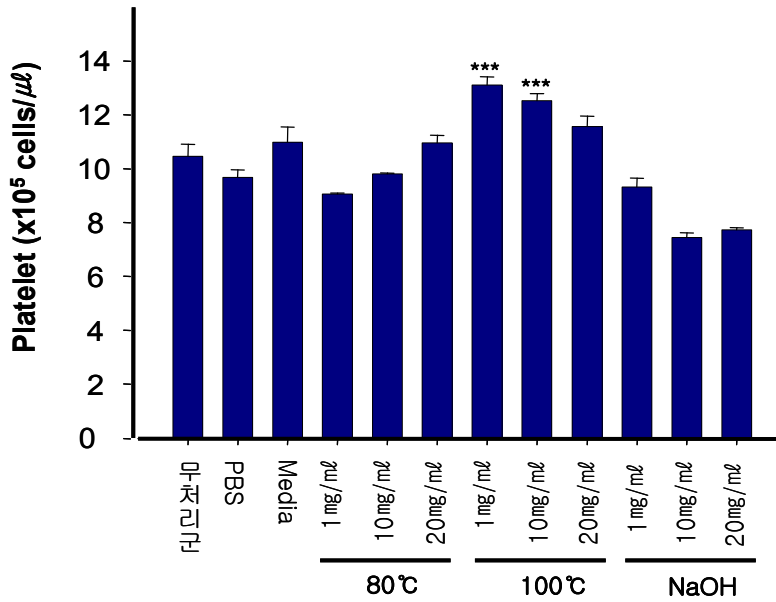


그림 26. Changes of blood platelet by treatment of placental extracts in mice. *** $P<0.01$.

(4) 헤마토크리트

헤마토크리트는 혈액 중 면역세포의 양을 나타내는 지표이며, 태반 추출물을 경구 투여했을 시 80°C 추출물과 100°C 추출물 중 20mg/ml을 투여한 생쥐군에서 혈액내 헤마토크리트의 수치가 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 27). 태반 추출물을 투여했을 시 헤마토크리트가 증가한다는 것은 혈액 내 면역반응을 매개할 수 있는 면역세포의 양적 증가를 야기하여 면역반응이 활성화 될 수 있다는 것을 의미한다.

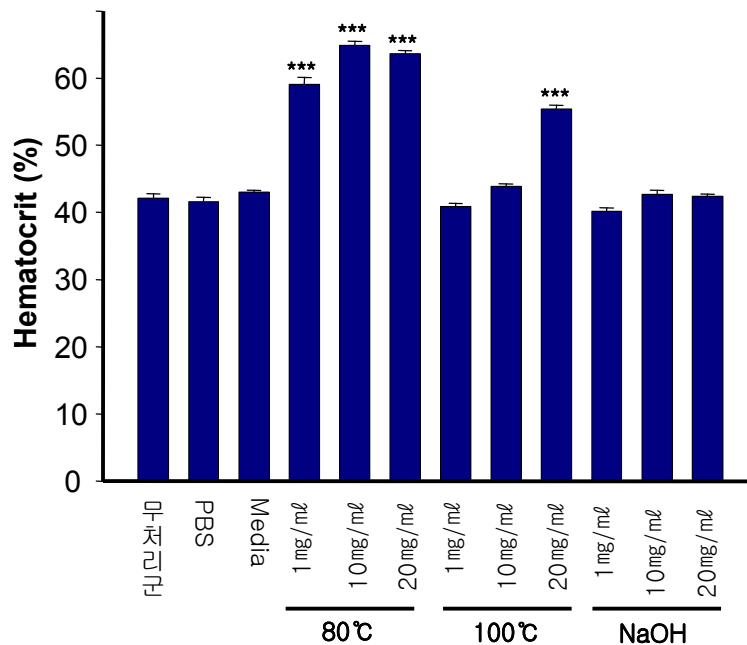


그림 27. Changes of Hematocrit by treatment of placental extracts in mice. *** $P<0.01$.

(5) 중성과립구와 lymphocyte의 비율

백혈구 내 중성과립구는 세균이 체내에 침입했을 때 세균을 제거하는 최일선의 방어 작용을 하는 세포이다. 태반추출물을 경구 투여했을 시 추출방법에 따라 80℃와 100℃로 추출한 군에서는 아무것도 처리하지 않은 정상생쥐와 같은 수준의 중성과립구와 lymphocyte의 비율을 나타냈지만, NaOH로 추출한 군에서는 중성과립구가 증가한 만큼 lymphocyte의 감소가 관찰되어 중성과립구와 lymphocyte가 거의 같은 비율로 존재함을 알 수 있었다(그림 28).

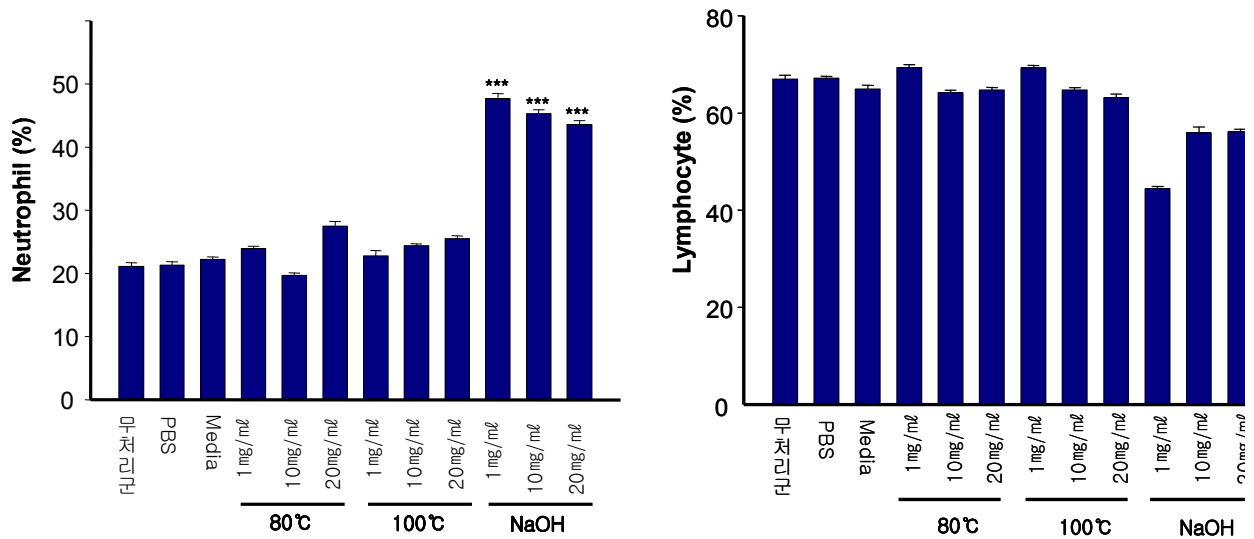


그림 28. Ratio of neutrophil and lymphocytes by treatment of placental extracts in mice. *** $P < 0.01$.

(6) 요약

각각 다른 추출방법을 통해 태반 추출물을 생쥐에 투여한 후 혈액조성 및 면역에 관련된 세포의 수 및 비율을 분석한 결과 80℃ 열수 추출물이 백혈구 수치, 적혈구 수치, 헤마토크리트 수치 등에서 우수한 성적을 보였다. 이는 1차년도에 보고한 *In vitro* 실험과 일치하는 결과로서 향후 생쥐 및 돼지를 이용한 동물 실험에는 80℃ 열수 추출물을 이용하는 것으로 결론을 지었다.

나. 80°C 열수추출물 경구투여 시 탐식세포 수의 변화와 탐식세포의 탐식능력 측정

1차년도 *in vitro* 세포실험과 혈액조성 실험결과 향 후 실험에 80°C 열수추출물이 선택되었고 이를 이용하여 탐식세포의 수 변화와 탐식세포의 탐식능을 측정하였다. 실험에 사용된 태반추출물은 20mg과 50mg의 농도가 사용되었고, control 군으로는 PBS only와 면역교란을 유도하는 ovalbumin을 처리하였다. 실험에 사용된 생쥐는 각 15마리를 한 군으로 사용하였다.

(1) 태반 추출물 처리에 따른 탐식세포 수

태반 추출물(각 20, 50mg)과 vehicle(PBS), ovalbumin을 21일 동안 경구 투여한 후 0, 7, 14, 21 차에 체내 탐식세포를 수거하여 탐식세포 수를 측정한 결과 모든 처리군에서 대조군과 비슷한 세포수를 관찰할 수 있었다(그림 29). 태반 추출물 20mg을 처리한 군에서 14일차에 조금 증가한 것을 볼 수 있었고, 50mg 처리군에서는 시간이 경과함에 따라 탐식세포의 수가 점진적으로 증가함을 알 수 있었다. 면역교란 반응을 일으키는 ovalbumin을 처리했을때는 예상과 같이 탐식세포의 수가 증가하여 태반 추출물을 이용한 탐식세포 및 탐식능력 규명 실험이 정상적으로 진행되었다는 것을 간접적으로 시사하고 있다. 태반 추출물을 경구투여했을 시에 1차적인 면역반응을 매개하는 탐식세포의 증가를 보여주어 태반 추출물이 1차적인 면역반응에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

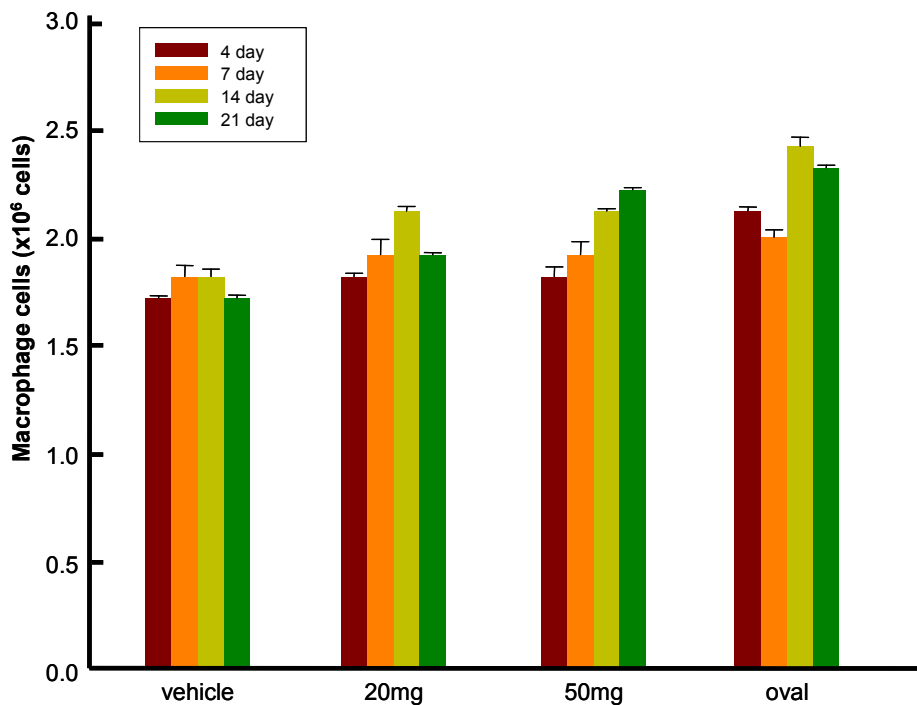


그림 29. Changes of macrophage cell number in mice treated with placental extracts.

(2) 분리한 탐식세포들의 phagocytosis efficiency

각각의 처리군에서 분리한 탐식세포 1×10^5 cell을 이용하여 탐식세포의 탐식능(phagocytosis)을 측정하였다. 실험시작 4일차에는 모든 처리군의 탐식능이 거의 비슷한 수준이었으나 7, 14, 21일차로 시간이 경과함에 따라 모든 태반 추출물 처리군에서 대조군 보다 높은 탐식능을 보여주었다(그림 30). 태반 추출물을 경구 투여했을 시 탐식세포의 양적 증가 뿐만 아니라 질적인 향상도 보여줌을 의미하고 있다.

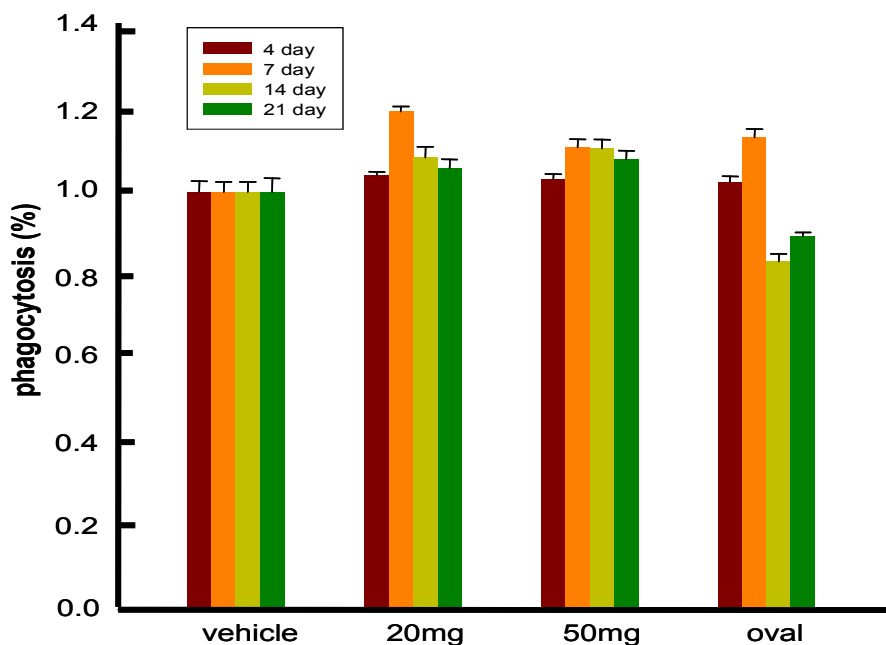


그림 30. Changes in phagocytosis efficiency of macrophage isolated mice treated with placental extracts

2. 태반 추출물을 실험동물의 경구 투여 시 혈중 면역글로블린 및 사이토카인 분비에 대한 영향

가. 태반 추출물 경구 투여 시 혈중 immunoglobulin의 변화

적정농도의 태반 추출물의 양을 결정하기 위하여 80℃ 열수추출물을 각각 20마리/군의 생쥐에 농도별(10, 20, 50, 75mg/수)로 3주(21일)간 경구 투여하고, control로는 아무것도 처리하지 않은 생쥐(20마리)와 PBS only(vehicle, 20마리)를 사용하였다. 면역글로블린과 사이토카인의 증가를 유도하는 treatment control(20마리)로는 면역 불균형을 초래하는 ovalbumin을 이용하여 혈중 immunoglobulin의 변화와 면역관련 cytokine의 변화를 비교 측정하였다. 실험으로 얻어진 모든 결과 값은 아무것도 처리하지 않은 Control의 일자에 해당하는 각 처리군의 일자의 결과값을 'one way ANOVA' 통계방법을 이용하여 유의성을 검증하였다.

(1) Immunoglobulin(Ig) G

농도별로 태반 추출물을 처리한 결과 control, vehicle, ovalbumin을 처리한 군에서는 시간의 경과에 따라 혈중 IgG의 농도가 크게 변하지 않음을 보여주었다. 하지만 태반 추출물을 처리한 군에서는 10mg과 20mg 처리군에서 4일째부터 급격하게 혈중 IgG 농도가 유의성있게 상승하는 것을 보여 주었고 7일째부터 서서히 감소하여 21일차에는 control과 비슷한 수준을 유지하였다(그림 31). 50mg과 75mg을 처리한 군에서는 10mg, 20mg에서 보여주었던 급격한 상승은 보여주지 않았고 단지 4일차에 control에 비해 유의한 상승을 보여주다 7일차 부터는 감소하였다. treatment control로 사용된 ovalbumin의 경우 체내 면역방어 기전과 마찬가지로 혈중 IgG의 농도가 일차에 따라 점진적인 상승을 보이다 감소하는 반면 태반 추출물을 투여했을 경우 급속한 혈중 IgG의 상승을 보여 투여된 태반 추출물이 면역글로불린의 분비를 직접자극하거나 분비를 촉진시키는 인자의 분비를 촉진시키는 것으로 사료된다. 태반 추출물의 투여에 따른 혈중 IgG의 농도 상승은 ovalbumin 처리와 같은 면역반응에 의한 것이 아닌 직접효과인 것으로 보인다. 결과적으로 적정 농도의 태반추출물 급여할 경우 체내 IgG의 상승효과를 유도할 수 있음을 시사하고 있다.

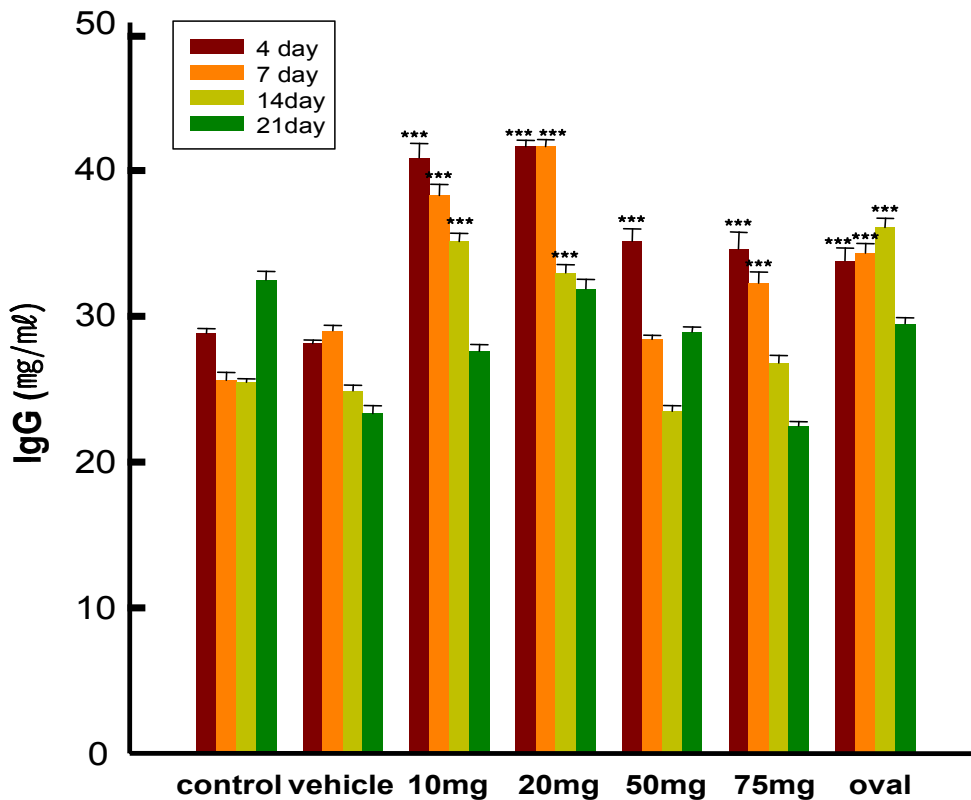


그림 31. Effects of placental extract on the secretion of immunoglobulin G in mice serum. *** $P < 0.01$.

(2) Immunoglobulin(Ig) M

IgM은 IgG와 함께 박테리아 등의 외부 감염물질을 파괴하며, 생성된 항체는 영구적으로 특정 항원을 인식하는 것으로 알려져 있다. 혈중 IgM의 농도는 면역증강 측정에서 매우 밀접한 연관을 가지고 있다. 각각 다른 태반 추출물의 혈중 IgM 생성 실험 결과 control과 vehicle 처리군에서는 IgM의 생성이 증가되는 양상은 보이지 않았다. 태반추출물을 10, 20mg을 처리한 군에서는 초기에는 IgM 생성이 없다가 14일째에 급격한 증가를 보였고 21일차에는 약간 감소하는 것을 보여 주었다. 또한 50과 75mg 처리군에서는 7일차에 급격한 IgM 생성을 나타내었다(그림 32). 태반 추출물을 처리했을 때 control과 비교해 통계적으로 유의한 혈중 IgM의 상승효과를 보여주고 있는데, 이는 항원항체 반응을 유도하는 ovalbumin을 처리했을 때 보다 높은 수치로 IgM을 생성하여 태반추출물이 체내 면역반응에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 간접적으로 증명하고 있다.

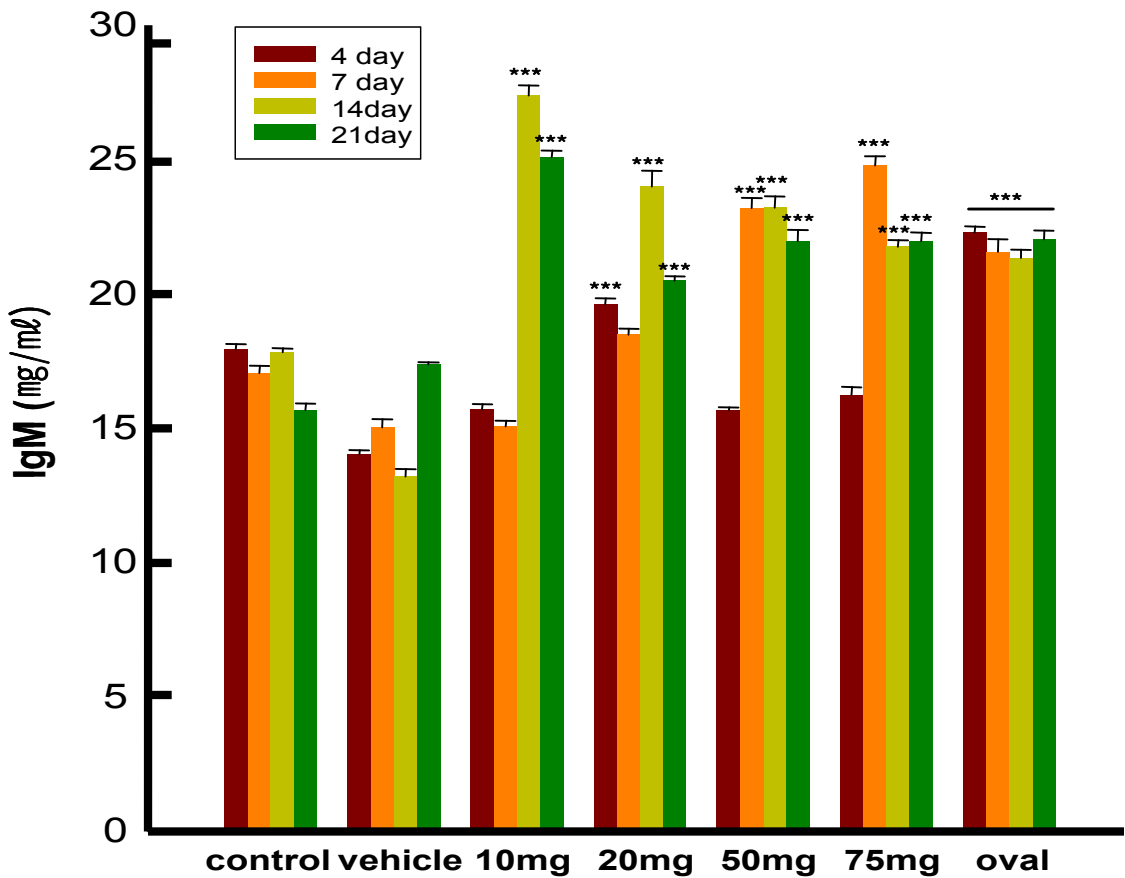


그림 32. Effects of placental extract on the secretion of immunoglobulin M in mice serum. *** $P < 0.01$.

(3) Immunoglobulin(Ig) E

IgE는 알러지 등 체내에 면역 불균형이 초래되었을때 급격히 증가하는 면역글로불린으로 알려져 있다. IgE가 상승했다는 것은 체내의 면역시스템이 교란되어 면역력이 저하되었다는 것을 의미하기도 한다. 본 실험에서 사용한 ovalbumin은 대표적인 알러지 유발물질로 생체에 투여하게 되면 혈중 IgE가 급격히 상승하게 된다. 각각 다른 농도의 태반 추출물 및 control, vehicle을 처리한 군에서는 혈중 IgE의 농도가 변함없이 유지되나 ovalbumin을 처리한 군에서는 처리 직후부터 혈중 IgE의 농도가 약 2배이상 급격히 증가됨을 볼 수 있다(그림 33). 이는 태반 추출물이 알러지 반응을 포함한 면역 교란 작용에 안전하다는 것을 의미하며, 사료 첨가제로서도 안전하다는 것을 말한다.

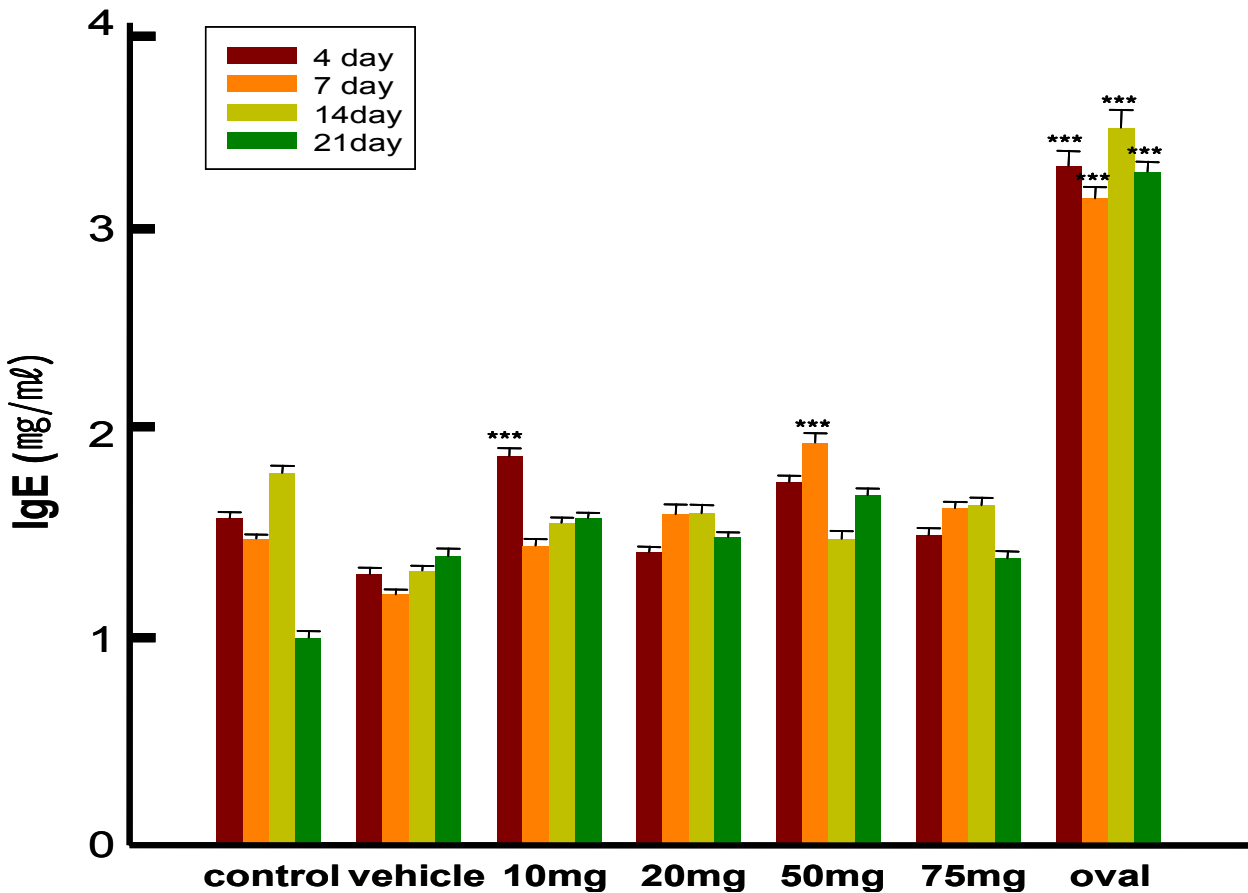


그림 33. Effects of placental extract on the secretion of immunoglobulin E in mice serum. *** $P < 0.01$.

나. 태반 추출물 경구 투여 시 혈중 cytokine 변화

(1) Interleukin-10 (IL-10)

체내 cytokine 중 IL-10은 항염증에 관련된 사이토카인으로 T cells, mast cells, B cells을 자극 시켜 항원 인식세포의 항원 인식을 억제 한다 (23). 일반적으로 IL-10의 발현이 결여 되면 면역반응이 지나치게 활성화되어 면역 병리학적 현상을 일으키고, IL-10이 과 발현 하게 되면 면역 억제 기능을 가져오게 되는 것으로 알려져 있다. IL-10 발현의 positive control로 사용한 ovalbumin 처리군에서는 처리직후부터 21일동안 계속해서 급격한 IL-10 상승을 보였지만, 태반추출물 10mg 처리군에서는 control과 vehicle 처리군과 같은 정도로 IL-10 상승을 나타내지 않았다. 20mg 태반추출물 처리군에서는 4일차에 통계적으로 유의한 상승을 보였지만 7일차 이후에는 정상 수준의 IL-10 분비를 보여주었다. 75mg 처리군에서는 14일차에 유의한 IL-10 상승을 보였지만 21일 차에 Control과 같은 수준으로 감소되는 양상을 보여주고 있다(그림 34). 태반추출물에 의한 IL-10 분비 효과를 종합해 보면 태반 추출물은 IL-10 분비에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었고, 태반 추출물이 급격한 면역불균형을 초래하지 않는다는 것을 시사하고 있다.

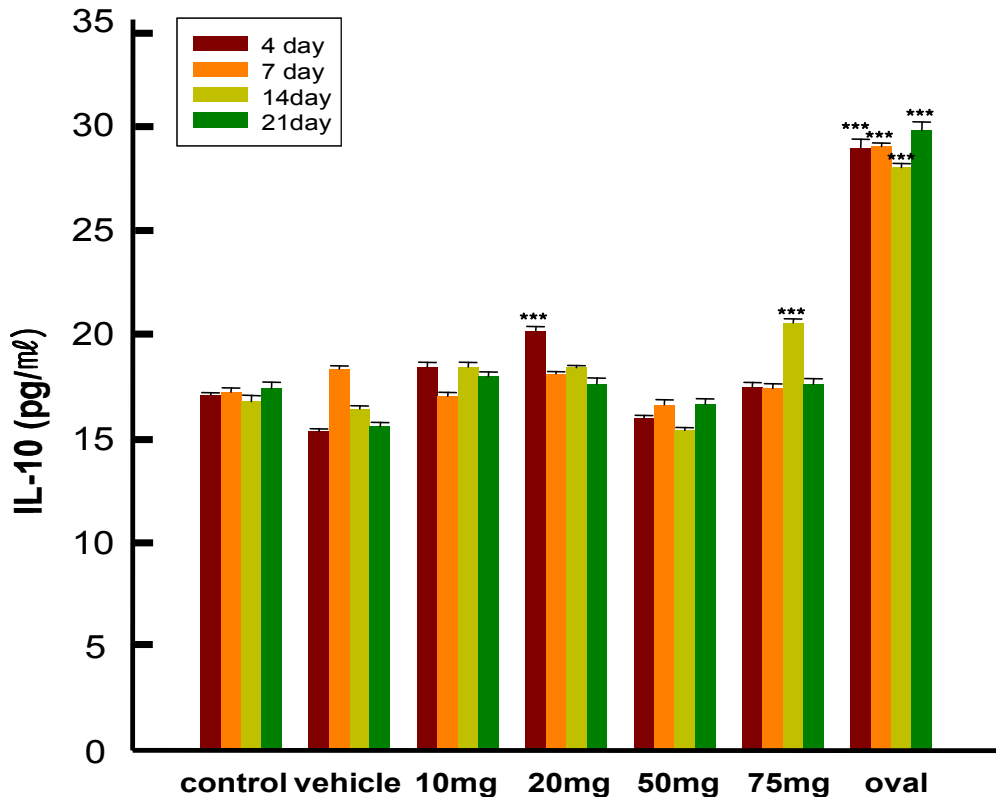


그림 34. Effects of placental extract on the secretion of IL-10 in mice serum. *** $P < 0.01$.

(2) Interleukin-6(IL-6)

체내 cytokine 중 IL-6는 체내의 면역반응에서 B 세포의 분화에 작용하여 면역글로불린 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 IL-6의 생성 증가는 면역증강에 긍정적인 영향을 준다는 것을 의미한다 (24). 태반 추출물을 농도별로 생쥐에 투여하였을 경우 20mg 처리군에서는 21일차에 유의적인 상승을 보였고, 50mg 투여시 4일차에 유의적인 증가를 보였다. 75mg 처리군에서는 4일째에 급격히 증가하다 21일 차에는 control이나 vehicle 처리군과 같은 수준으로 떨어지는 것을 확인하였다(그림 35). 이 결과는 태반 추출물을 투여하였을 경우 태반추출물이 투여 초기에 IL-6의 분비를 촉진시켜 B 세포를 활성화시켜 체내 면역글로불린 생성을 촉진시킬 수 있다는 것을 시사하고 있다. 이 결과는 태반 추출물 투여시 혈중 IgG의 상승과도 연관이 있을 것으로 사료된다. ovalbumin 처리군의 경우 IL-6의 상승은 유도되지 않았다.

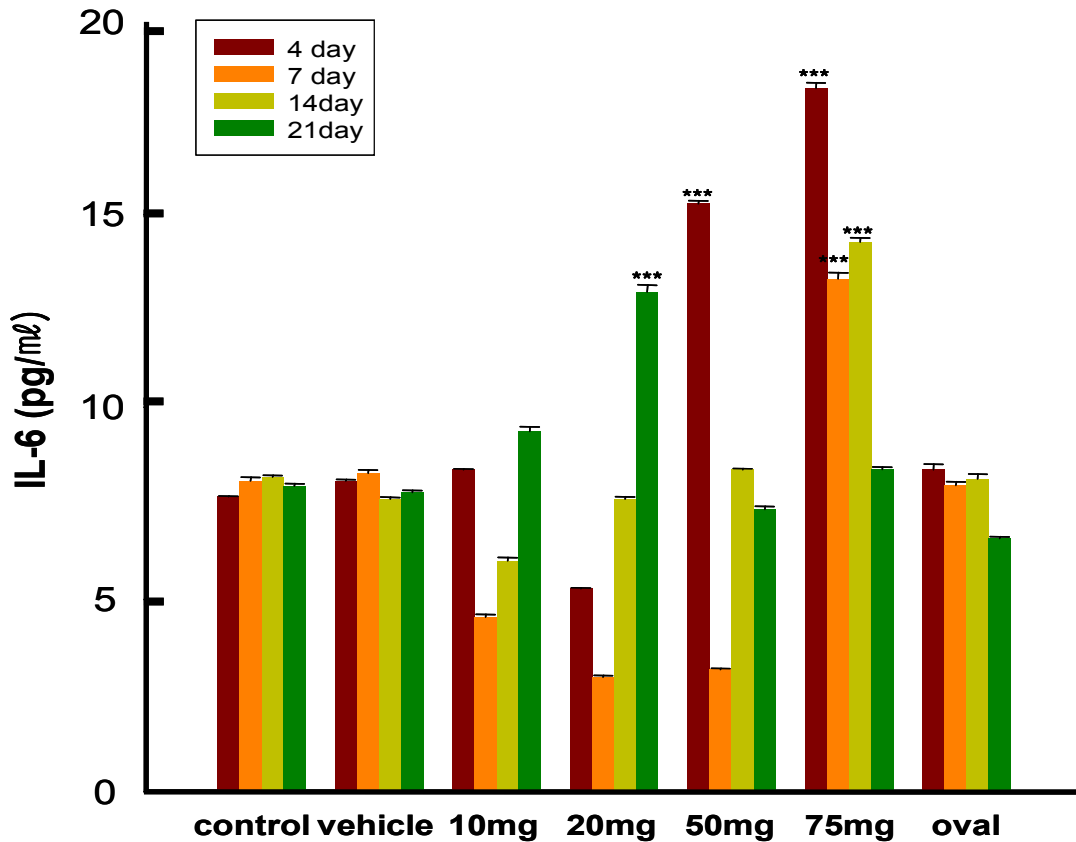


그림 35. Effects of placental extract on the secretion of IL-6 in mice serum. *** $P < 0.01$.

(3) Interleukin-1 beta(IL-1 β)

체내 cytokine 중 IL-1 β 는 대표적인 염증관련 cytokine으로써 외부 세균 등의 감염으로 부터의 면역방어 물질이며, 또한 면역세포인 macrophage, monocyte, lymphocyte 등을 생산하는데 관여하거나 조절하는 것으로 알려져 있다 (25). 태반 추출물을 농도별

로 생쥐에 급여한 후 혈액에 존재하는 IL-1 β 의 농도를 측정된 결과 모든 처리군에서 4, 7, 14, 21일차에서도 통계적으로 유의한 상승을 보였지만 20mg과 50mg을 투여한 군에서 control과 vehicle 처리군보다 약 12pg/ml 이상의 높은 상승률을 보였다(그림 36). 75 mg 투여군에서는 20mg과 50mg 투여군 보다는 다소 상승률이 둔화되기는 했지만 역시 통계적으로 유의성이 있는 높은 상승률을 보여 주었다. 면역교란물질인 ovalbumin을 투여한 군에서는 체내 면역방어 시스템이 가동되어 약 30pg/ml이상의 높은 상승률을 보였다. 태반 추출물을 투여하였을 때 증가되는 면역세포의 양은 아마도 태반추출물 투여 시 증가되는 IL-1 β 의 증가와도 연관이 있을 것으로 사료되며, 본 실험을 통해 면역교란이 아닌 정상적인 생쥐에 태반추출물을 투여하면 면역 방어작용을 유발하는 IL-1 β 의 증가가 이루어짐을 알 수 있었다.

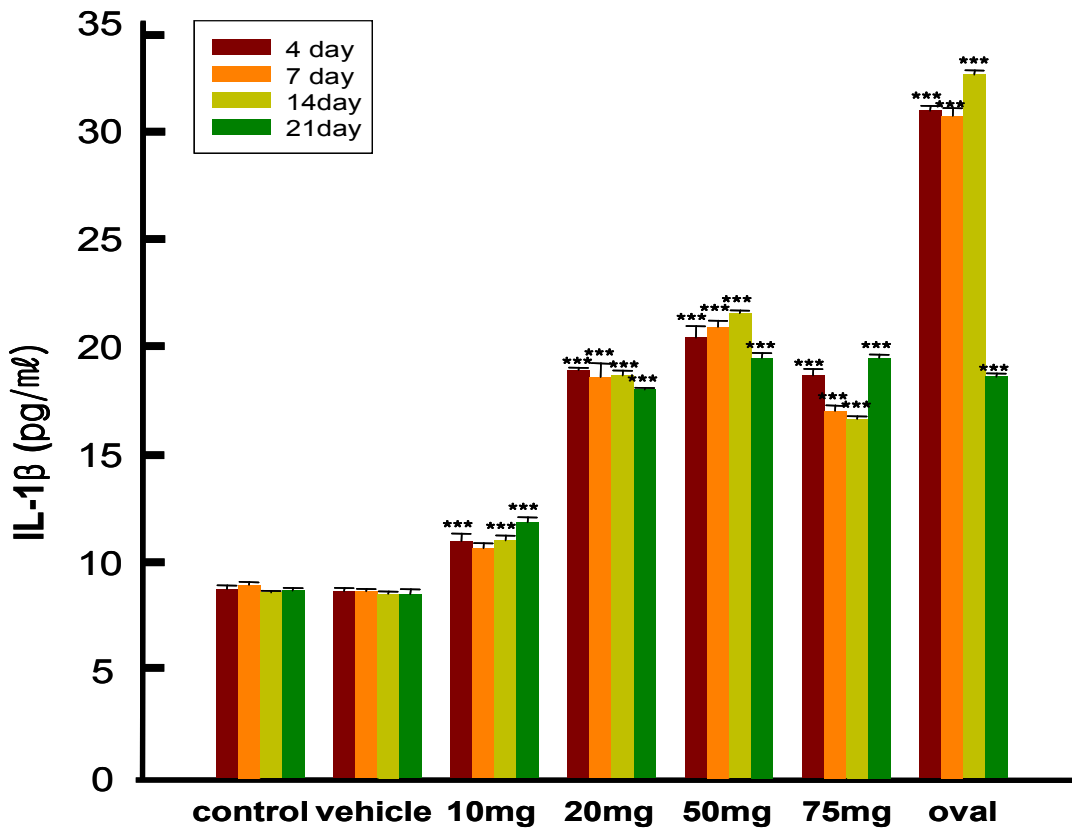


그림 36. Effects of placental extract on the secretion of IL-1 beta in mice serum. *** $P < 0.01$.

(4) Interferon gamma (IFN- γ)

체내 cytokine 중 interferon- γ 는 면역력 증강의 척도가 되는 cytokine 으로서 면역력이 증가되면 IFN- γ 의 수치도 증가하게 된다 (26). 면역기능이 활성화되면서 증가하는 IFN- γ 의 양은 태반 추출물을 생쥐에 급여했을 때 모든 태반추출물 처리군에서 통계적으

로 유의성있게 증가하는 것을 확인하였다. 태반 추출물 10mg을 투여하였을때 혈중 IFN- γ 의 양은 약 12pg/ml로 control과 vehicle에 비해 약 3pg/ml이 높은 수치였으며, 20mg과 50mg을 투여하였을때는 약 17pg/ml 까지 상승하였다(그림 33). 하지만 75mg을 투여한 생쥐에서는 10, 20, 50mg 투여군과 마찬가지로 통계적으로 유의성있는 IFN- γ 의 상승은 보였지만 20mg과 50mg에서 나타난 것과 같은 급격한 증가 양상은 없었다(그림 37). 이는 과도한 태반 추출물 투여가 면역증강에는 큰 영향을 주지 않는다는 것을 의미한다. 반대로 ovalbumin 투여의 경우 IFN- γ 의 양은 일시적인 감소 후 control 수준을 유지하는 것을 보여주었다. 이는 ovalbumin에 의해 알러지 반응이 유도되어 체내 면역 불균형이 초래되어 나타나는 일반적인 현상이다. 따라서 ovalbumin을 처리했을때 혈중 IFN- γ 의 양이 최소화 됐다는 것은 본 실험의 접근방법과 결과가 정확히 진행되고 도출되었음을 의미한다.

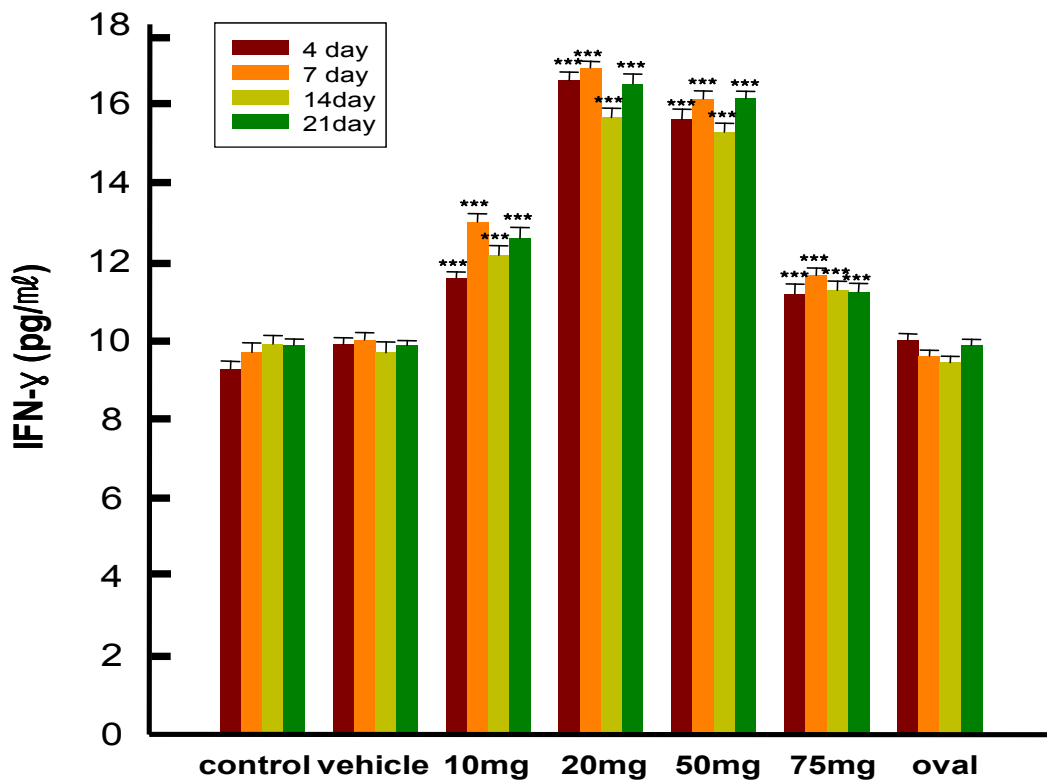


그림 37. Effects of placental extract on the secretion of IFN-gamma in mice serum. *** $P < 0.01$.

(5) Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

체내 cytokine 중 tumor necrosis factor alpha (TNF- α)는 세포 면역물질이면서 종양을 괴사시키는 특수한 성질을 가지고 있고, 면역촉진제들을 감작시키는 중요한 기능을 하고 있는 것으로 알려져 있다 (27-28). 태반 추출물 10, 20, 50mg을 처리한 군에서는 TNF- α 분비량이 control에 비해 통계적으로 유의성 있게 증가하는 것을 보여주었으며

(10mg과 75mg의 21일차, 20mg과 50mg 전체 처리군), 이는 알러지 반응(ovalbumin 투여)에 의해 증가된 TNF- α 양과 거의 비슷한 양적 증가를 보였다(그림 38). 태반 추출물에 의한 TNF- α 분비의 증가는 태반 추출물의 면역증강 작용에 긍정적인 영향을 줄 것으로 시사되었다.

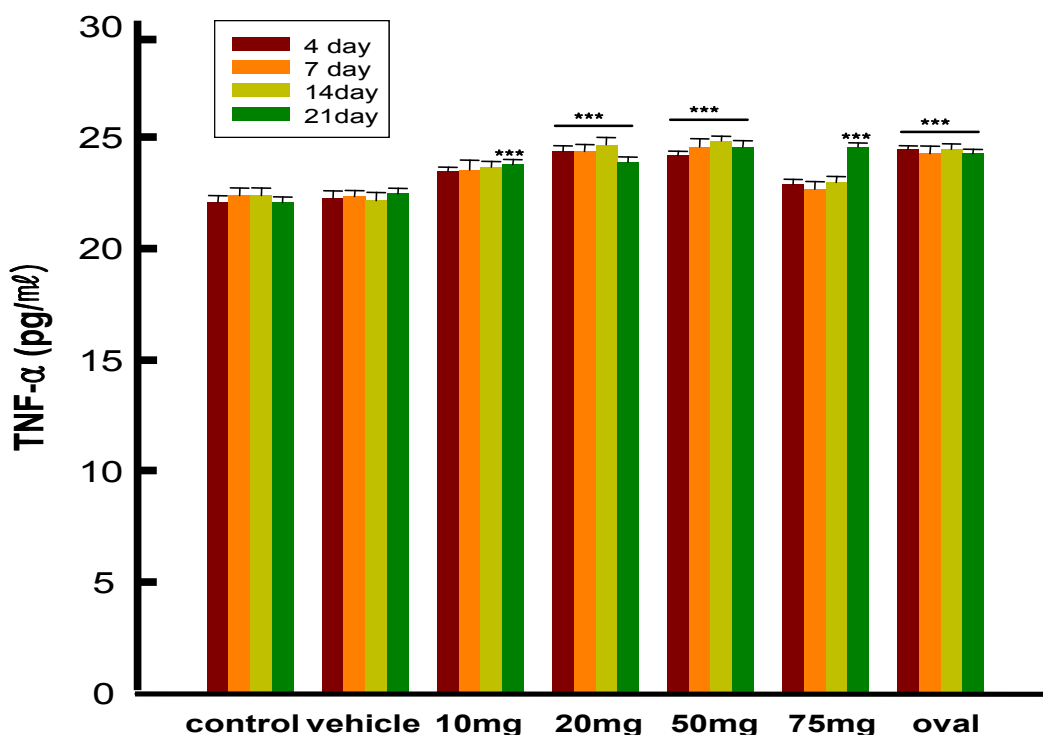


그림 38. Effects of placental extract on the secretion of TNF- α in mice serum. *** P <0.01.

이상과 같은 연구결과는 돼지 태반 추출물이 생체의 면역시스템을 강화시킬 수 있다는 간접적인 증거를 제시하고 있다. 따라서 향후 태반 추출물을 직접 돼지의 자돈에 급여하여 자돈의 면역증강에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기로 하였다. 이를 위하여 태반 추출물을 80°C에서 추출하고 추출된 추출물을 동결건조하는 일련의 제조공정을 거쳐 확보하고, (주) 고려산업에서 태반 추출물이 각 0%, 0.1%, 0.3%, 0.5%가 함유된 이유자돈 사료 시제품을 제작하여 자돈의 면역증강 실험에 사용하였다.

제 7 절 돼지 태반 추출물의 사료화 공정 개발

1. 태반 추출물의 사료 첨가시 안전성 확보

가. 자돈 폐사율

이유 후 젖떼기 사료에 첨가제로서 태반추출물의 효과를 알아보기 위해 이유 직후 젖떼기 자돈(3주령) 200마리를 각 50마리씩 4개의 군으로 분류하였다. 4개의 군은 태반추출물을 첨가하지 않은 control군, 태반 추출물을 0.1%, 0.3%, 0.5% 첨가한 군으로 정하고, 3주간 자유급식으로 실험을 실시하여 폐사율을 측정하였다(표 7). 태반추출물을 첨가하지 않은 control 군에서 실험 1주차에 1마리의 폐사를 기록한 이후 모든 군에서 추가적인 폐사는 일어나지 않았다. 따라서 태반 추출물이 일반 자돈 사료에 첨가되어도 폐사와 같은 현상을 발생시키지 않는다는 것을 시사하고 있다.

<표 7> 태반 추출물 첨가에 따른 자돈의 폐사수

사료	1주차	2주차	3주차
Control(0%)	1	0	0
태반추출물 0.1% 첨가	0	0	0
태반추출물 0.3% 첨가	0	0	0
태반추출물 0.5% 첨가	0	0	0

나. 태반 추출물 내 감염성 바이러스의 존재 유무 확인

태반 추출물 내 유효 감염성 바이러스의 존재유무를 확인하기 위해 태반추출물을 DNA 검출용 lysis buffer에 용해한 후 Porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) virus와 Circovirus의 primer를 제작한 후 PCR 방법으로 해당 바이러스의 존재 유무를 확인하였다. PRRS와 Circovirus의 검출용 primer는 충북 위생연구소의 바이러스 검출 매뉴얼에 따라 제작하였다(표 8).

<표 8> Primer sets of PRRS and Circovirus

Virus	Primer	Size
PRRS	F: 5'-ATAACAACGGCAAGCAG-3'	297bp
	R: 5'-CAGTGTAACCTTATCCTCCCA-3'	
Circovirus	F: 5-ACCAGCGCACTTCGCAG-3	887bp
	R: 5-TAATCCTCCGATAGAGAGC-3	
	F: 5-TGAGTACCTTGTTGGAGAGC-3	469bp
	R: 5-TAATCCTCCGATAGAGAGC-3	

PCR 결과 태반 추출물에는 PRRS와 Circovirus의 감염은 확인되지 않았다(그림 39). 이는 태반 추출물 제작과정이 먼저 80℃ 열수 추출로 고열멸균과정이 1차로 시행되고, 이어서 동결건조라는 저온멸균과정이 2차로 수행됨에 따라 두 번의 고온 및 저온 멸균 과정을 거치면서 세균이나 바이러스에 대해 안전성을 확보한 것으로 시사된다.

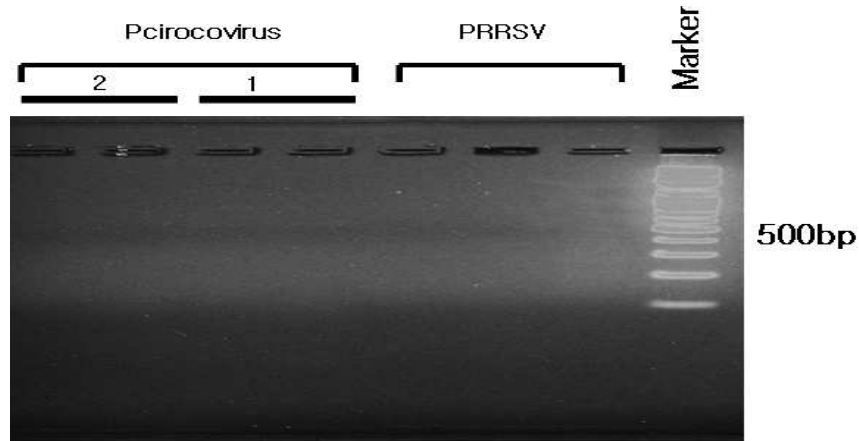


그림39. Detection of Pcirocovirus and PRRS virus by polymerase chain reaction

2. 최적의 액상 및 펠렛 사료 첨가제 시제품 제작

태반추출물이 직접 자돈에서 어떠한 면역증강 작용을 알아보기 위해 (주)고려산업에서 본 연구단이 제조한 태반추출물을 이용하여 0.1%, 0.3%, 0.5%의 시제품 사료를 제작하여 이후의 실험에 사용하였다. 사진은 (주)고려산업에서 제작한 시제품 태반추출물 첨가사료의 사진이다(그림 40).



그림 40. Prototype of placental extracts containing feeds

3. 사료 및 첨가제 병용 투여 시 소화생리 및 흡수율 측정

태반 추출물의 사료 첨가시 사료의 소화흡수율을 측정하기 위해 일반사료 급여군 5마리 (control), 0.1%, 0.3%, 0.5% 첨가군 각 5마리에 각각의 사료를 급여한 후 3일 동안의 소화 흡수율을 측정하였다.

가. 태반 추출물 함유 사료의 소화흡수율

일반사료와 일반사료와 태반 추출물이 0.1%, 0.3%, 0.5% 함유된 사료를 돼지에게 급여한 후 소화기내 흡수율을 규명한 결과 3일 동안 약 80%에 가까운 높은 흡수율을 보여 주었다. 특히 태반 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 사료가 일반 사료 급여한 것보다 조금 더 좋은 흡수율을 보이는 것이 관찰되었다(그림 41). 따라서 아래의 다양한 농도의 태반 추출물이 함유되어 있는 사료가 일반 사료와 마찬가지로 돼지가 소화시키고, 흡수하여 영양소로 사용하는 데에는 아무런 문제점을 보이지 않음이 시사되었다.

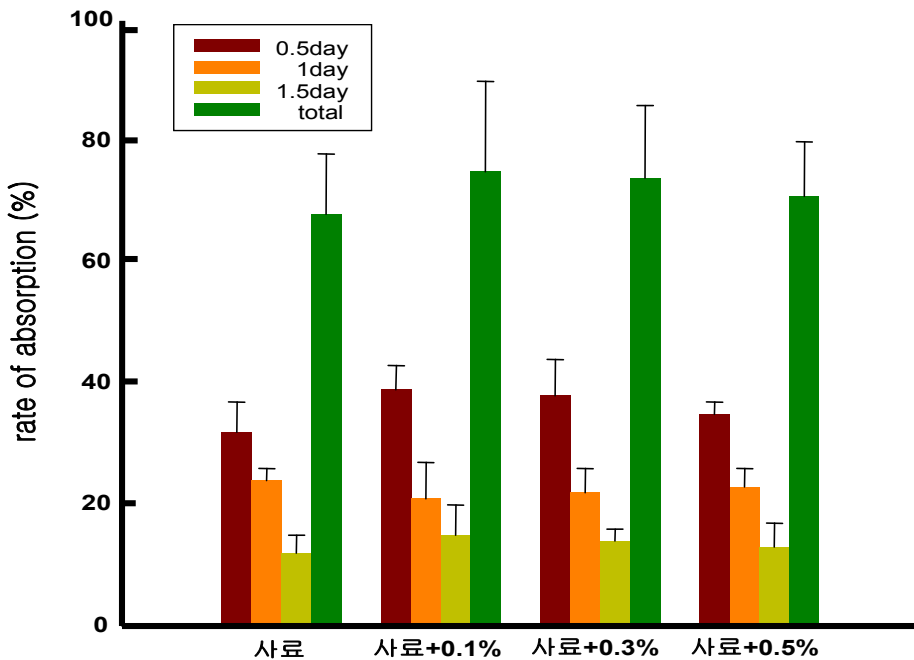


그림 41. Absorption rate of different concentration of placental extract containing feeds

나. 장관별 소화흡수능력

일반사료와 태반 추출물이 0.1%, 0.3%, 0.5% 함유된 사료를 돼지에게 급여한 후 각 장관별 소화흡수 능력을 측정한 결과 소장, 위, 대장의 용적은 비슷하였으나 태반 추출물을 0.1% 함유한 사료가 소장 에서 일반 사료급여 보다 상대적으로 높게 나타났다(그림 42). 다른 처리군들도 일반사료를 급여한 것과 비슷한 소화 흡수 능력을 보여 주었다. 이는 태반추출물이 소장에서 대부분 직접 흡수되고, 바로 면역증강 작용에 이용될 수 있음을 시사하고 있다.

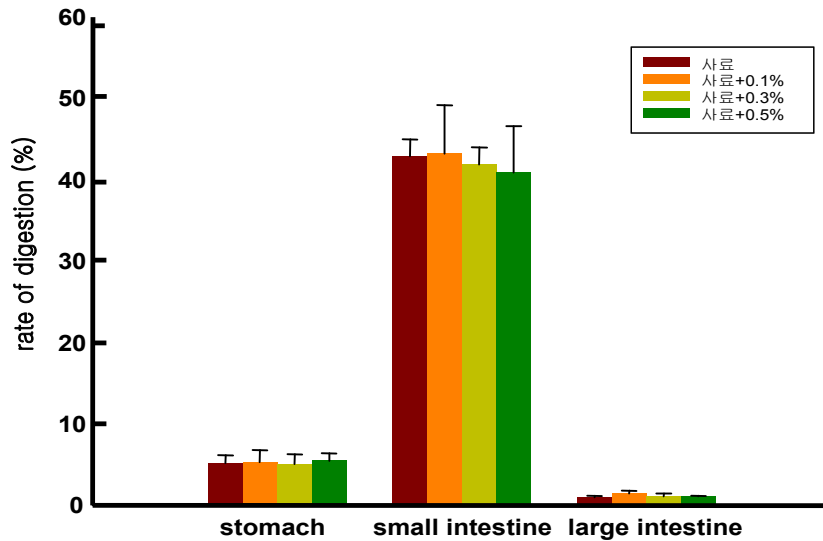


그림 42. Digestion rate of different concentration of placental extract containing feeds

4. 사료첨가제의 최적 및 장기 보존 방법 규명

태반 추출물을 25℃, 4℃, -20℃, -70℃ 의 다양한 온도에서 1, 2, 3 개월 동안 보관한 후 일정량의 사료를 LB media에 침지한 후 18시간 배양하여 검출된 세균의 농도를 UV 스펙트로메터를 이용하여 측정하였다. 분석 결과 -70℃에서 보관한 추출물의 세균 농도가 가장 적은 것으로 나타났고, -20℃에서 약 2.5%를 나타내었다(그림 43). 하지만 4℃와 25℃에서 보관한 태반추출물의 경우 세균 오염이 보관기간에 비례하여 상승하는 것으로 나타났다. 본 연구결과를 토대로 태반 추출물의 장기 보관은 최소 -20℃ 이하에서 하는 것이 권장된다고 할 수 있다.

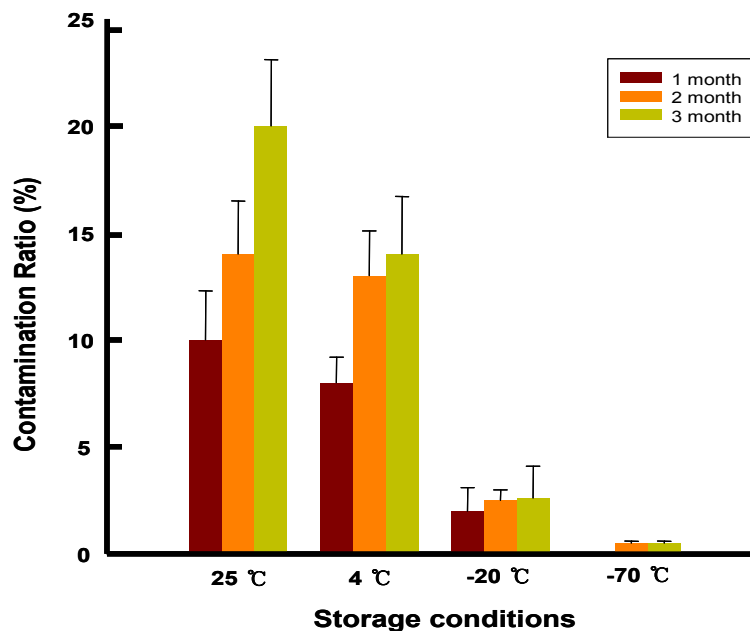


그림 43. Contamination rate of placental extracts of long-term storage

제 8 절 돼지 태반 추출물 함유 시제품 사료의 자돈 면역 증강 작용 규명 (제1차 시험)

이유 후 젓떼기 사료의 첨가제로서 태반추출물의 효과를 알아보기 위해 이유 직후 젓떼기 자돈(3주령) 200마리를 각 50마리씩 4개의 군으로 분류하여 충청북도 소재의 양돈사육장에서 실시하였다. 4개의 군은 태반추출물을 첨가하지 않은 control군, 태반 추출물을 0.1%, 0.3%, 0.5% 첨가한 사료를 급여하는 군으로 정하고, 3주간 자유급식을 실시하여 아래의 실험을 진행하였다. 실험이 진행되는 도중 4일차에 감염경로는 정확하지 않으나 전체 돈군에서 Rota virus의 감염이 확인되었다. 부득이하게 이 후 실험은 Rota virus가 감염된 상태에서 진행되었다. 연구의 방향이 약간은 수정되어 원래 정상 자돈에서 태반 추출물의 면역증강 효과를 관찰하기로 한 것을 질병감염이 진행된 자돈의 면역증강 효과 쪽으로 진행하였다. 결과적으로 질병감염에 대한 자돈의 면역증강력과 질병에 대한 억제 효과 규명 연구가 자동으로 수행되었다.

1. 태반 추출물의 농도에 따른 자돈의 체중 변화

각각 0%(control), 0.1%, 0.3%, 0.5% 태반추출물을 첨가한 사료를 급여 후 3주 동안 자돈의 체중을 측정하였다. 측정 결과 추출물이 0.3% 첨가된 사료에서 태반 추출물을 첨가하지 않은 control 군에 비해 약 2~3kg 정도 증체량이 더 나가는 것을 볼 수 있었으며 통계적으로도 유의한 증가를 보여주었고(그림 44), 매우 건강하게 잘 자라는 것을 육안으로 확인 할 수 있었다. 0.5% 첨가군은 대조군 보다 증체가 조금 적었고, 0.1%는 대조군과 거

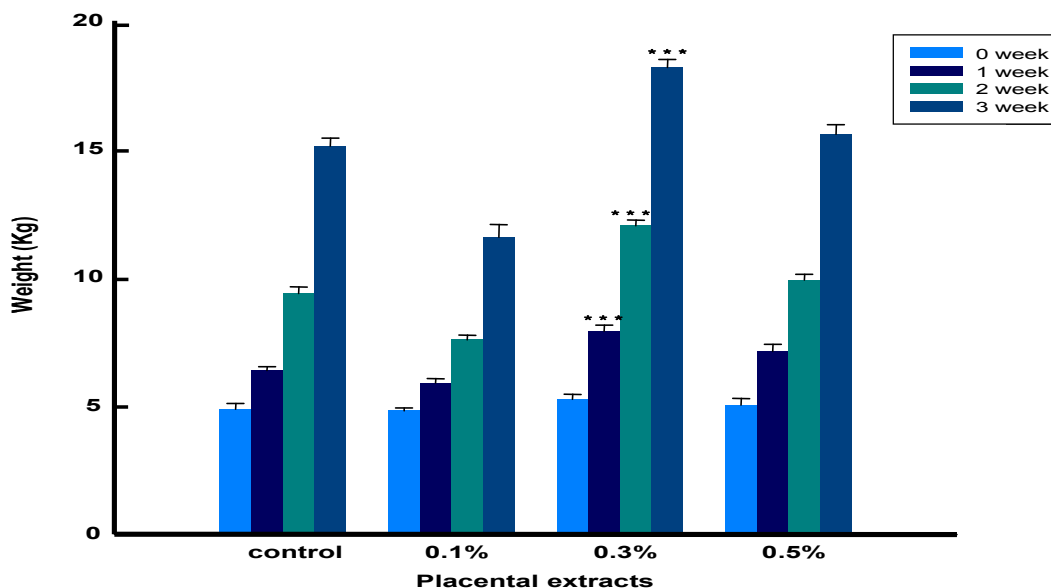


그림 44. Changes of body weight by the feeding of different concentration of placental extracts. *** $P < 0.01$.

의 비슷한 것을 볼 수 있었다. 또한 Rota virus에 의한 설사도 3주 차에는 완전히 정상으로 회복하였다. 결과적으로 아래 연구 결과는 태반 추출물이 0.3% 첨가된 사료를 급여하였을 시 증체량에 더욱 긍정적인 영향을 준다는 것을 시사 하였다.

2. 혈액 중 면역세포 수의 변화

가. 백혈구(White blood cell)

각각 다른 농도의 태반 추출물을 Rota virus에 감염된 이유 자돈에게 급여한 3주 동안 주 1회씩 자돈의 경정맥에서 혈액을 채취한 후 혈액 중 함유되어 있는 백혈구 수치를 조사하였다. 실험기간 동안 통계적으로 유의성 있는 백혈구 수치의 증감은 보이지 않았지만 전반적으로 control군과 처리군에서 비슷한 정도의 백혈구 수치가 유지되는 것을 확인하였다(그림 45).

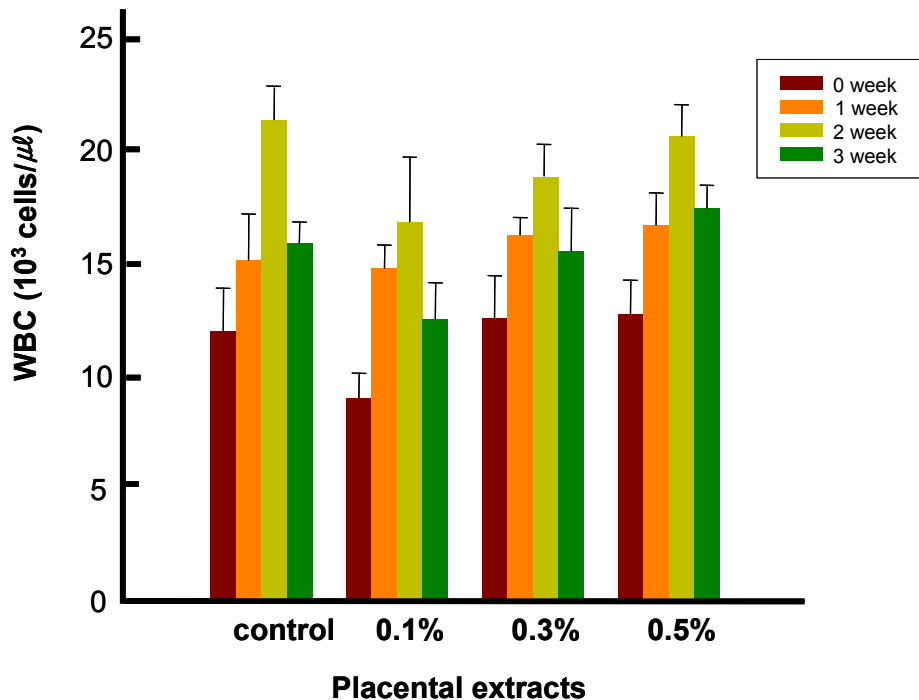


그림 45. Number of white blood cell in piglet fed with placental extracts

3. 혈액 면역세포의 구성성분 변화(Lymphocytes, Granocyte, Monocyte)

가. 호산과립구(Eosinophil)

Eosinophil은 granulocyte의 일종으로 Basophil과 마찬가지로 주로 바이러스와 같은 infectious microorganism에 대한 방어작용을 담당하는 것으로 알려져 있다. 각각의 태반 추출물 함유 사료를 급여한 결과 3주째에 0.1%와 0.3%의 태반추출물을 급여한 처리군에

서 eosinophil 세포의 함량이 control이나 다른 처리군에 비해 유의성 있는 증가를 보여 약 3배 정도의 증가를 나타냈다(그림 46). 이는 0.3% 처리군이 infectious microorganism에 대한 방어능력이 증진되었다는 것을 시사한다.

나. 호염과립구(Basophil)

Basophil은 granulocyte의 일종으로 주로 virus와 같은 infectious microorganism에 대한 방어작용을 담당하고, innate immunity에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 각각의 태반추출물 함유 사료를 급여한 결과 3주째에 0.3%의 태반추출물을 급여한 처리군에서 basophil 세포의 함량이 control이나 다른 처리군에 비해 약 4배 정도 통계적으로 유의한 증가를 보였다(그림 46). 이는 0.3% 처리군이 infectious microorganism에 대한 방어능력이 증진되었다는 것을 시사한다.

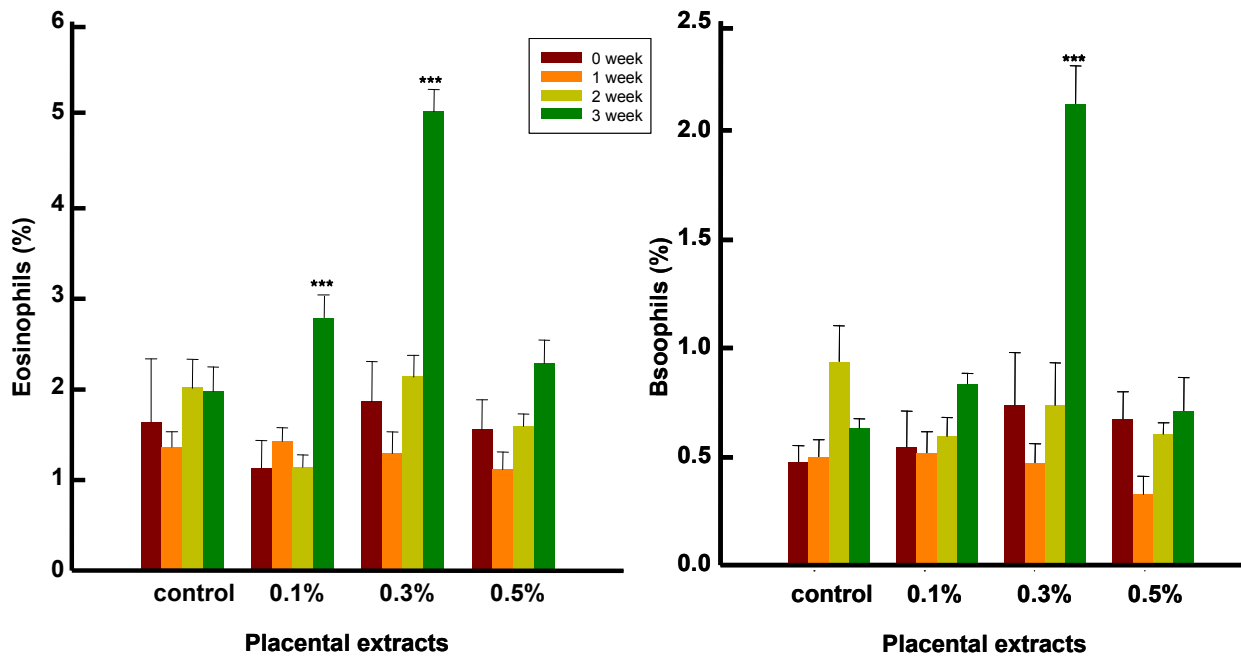


그림 46. Changes of Eosinophil and Basophil composition in white blood cells of piglets fed with placental extracts. *** $P < 0.01$.

다. 중성과립구(Neutrophil)

Neutrophil은 세균이 체내에 침입했을 때 세균을 제거하는 최일선의 방어 작용을 하는 세포로 알려져 있다. 각각 다른 농도의 태반추출물을 처리했을 때 neutrophil의 함량은 control과 비슷한 수준으로 급격한 증가나 감소를 보이지 않았지만 3주째에 0.5% 추출물

을 처리한 군에서 통계적으로 유의성 있는 증가를 보였다(그림 47). 이는 태반추출물이 세균방어 시스템인 neutrophil 생성을 억제하지 않는다는 것을 시사한다.

라. Monocyte

Monocyte는 혈중 면역세포의 중요한 역할을 담당하며, 바이러스 감염 등에 의한 염증 반응에 신속한 대처를 하는 것으로 알려져 있다. 각각 다른 농도의 태반추출물을 자돈에 처리했을 때 monocyte의 함량은 0.3% 처리군에서 약 2주와 3주째에 control이나 다른 처리군에 비해 유의적으로 증가함을 보여주었고, 3주 후에는 control 보다 약 2.5배가 증가하는 것을 보여주고 있다 (그림 47). 이는 태반 추출물이 염증반응을 완화시키는 monocyte의 생성을 촉진하는 것을 시사한다.

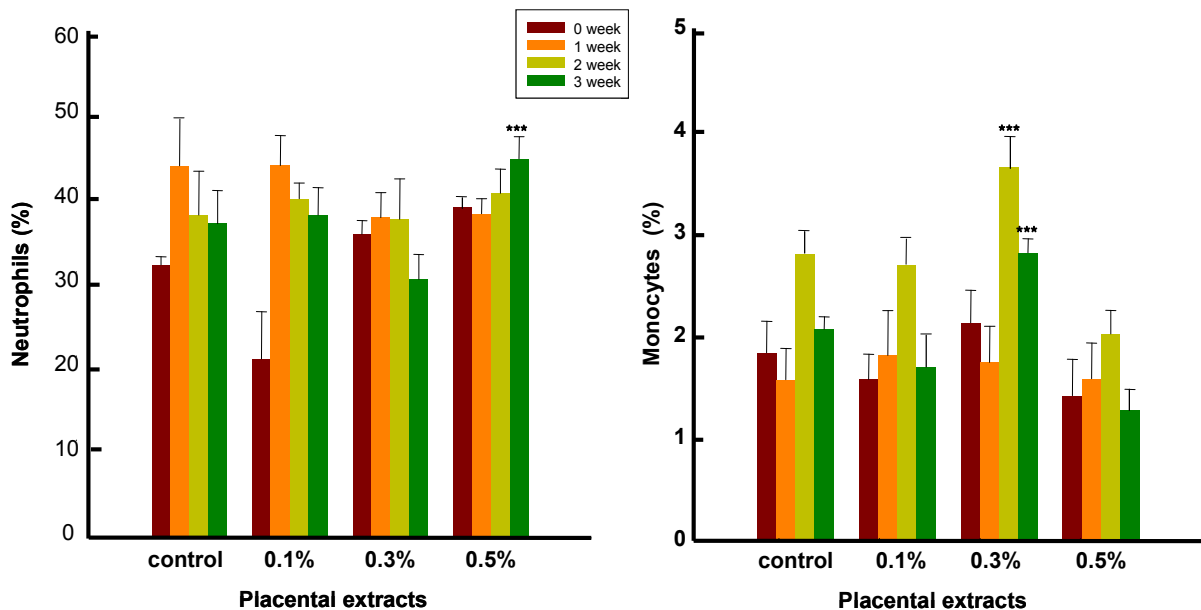


그림 47. Changes of Neutrophil and Monocyte composition in white blood cells of piglets fed with placental extracts. *** $P < 0.01$.

4. 시제품의 자돈 내 면역 세포의 탐식능 향상 효과

다양한 농도별 시제품을 자돈에게 급여한 후 혈액을 수거하고 Ficoll gradient solution을 이용하여 white blood cell을 분리한 후 면역세포 활성을 유도시키는 물질로 알려진 LPS (B lymphocyte)와 ConA(T lymphocyte)를 이용하여 면역세포를 활성화 시켜본 결과 1주차에서 0.3% 시제품을 투여한 군의 white blood cell에서 대조군에 비해 면역 활성도가 높은 것을 확인할 수 있었다 (그림 48). 2주차에서는 전반적으로 대조군에 비해 면역세포의 활성도가 높은 것으로 보이며, 3주차에서는 대조군과 비슷한 수치를 보였다. 전반적으로

1~2주 동안에는 시제품을 급여한 자돈의 혈중 면역세포가 외부의 세균 또는 다른 자극 물질에 대한 민감도가 매우 높은 것으로 사료되며, 이러한 결과로부터 태반추출물 첨가 시제품 사료를 급여한 자돈의 면역세포의 활성도가 높은 것은 질병과 세균으로부터 더 강한 면역 체계를 가질 수 있다는 것을 시사하고 있다.

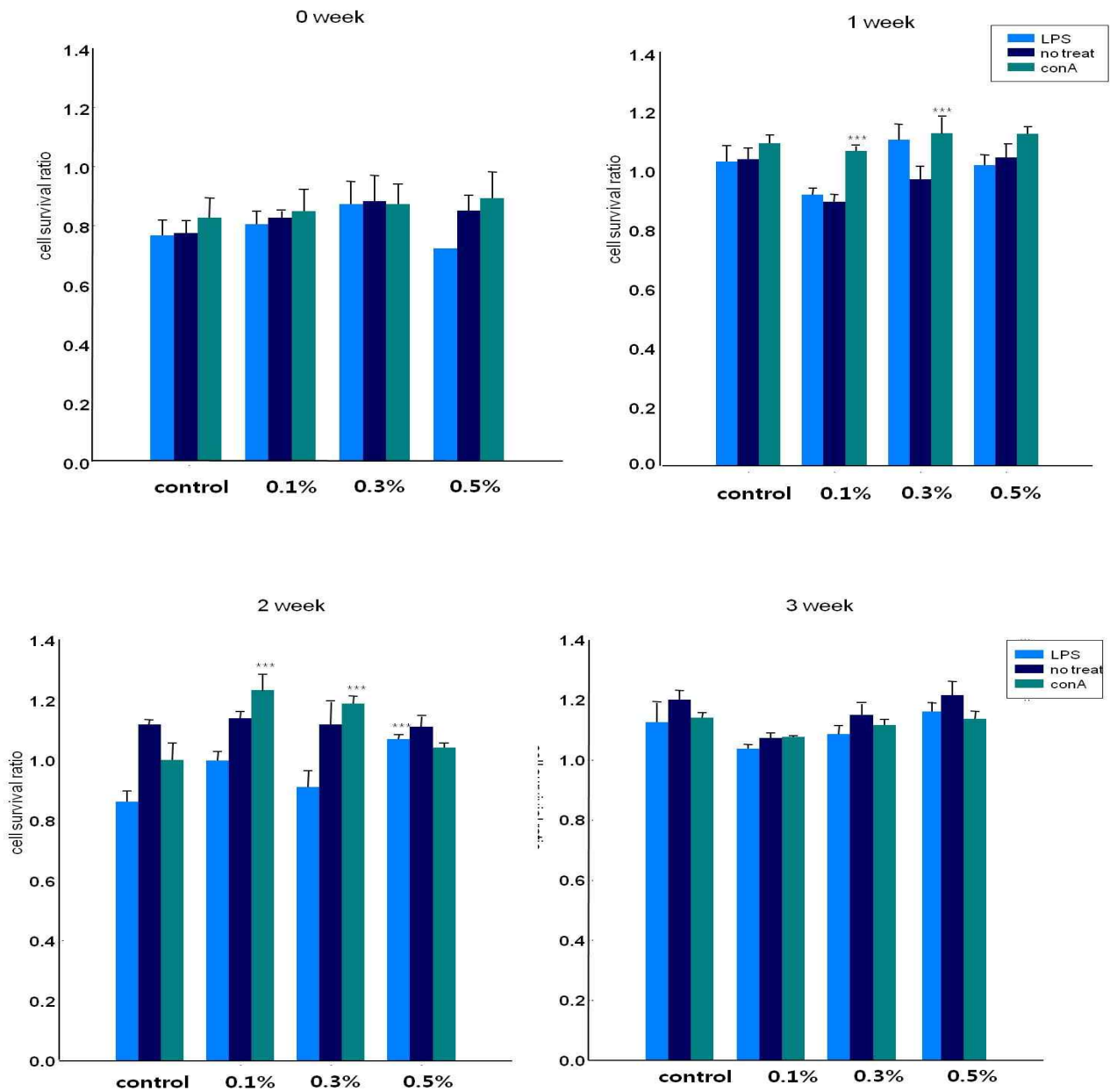


그림 48. Immune activity of white blood cells derived from piglet fed trial product containing placental extracts. *** $P < 0.01$.

5. 시제품의 자돈 체내 면역증강 관련 단백질 인자 활성 규명

가. Immunoglobulin (Ig)G

농도별로 태반 추출물을 함유한 시제품을 실험동물에게 투여한 결과 시간의 경과에 따라 혈중 IgG의 농도가 크게 변하지 않음을 보여주었다. 0.3%가 포함된 시제품을 투여 시 대조군에 비해 조금 높은 IgG의 농도를 보이는 것을 관찰할 수 있다 (그림 49). 혈중 IgG는 autoimmune response을 매개하는 중요한 단백질로 체내에서 좀 더 높은 수치를 보인다는 것은 체내 면역반응이 활발하게 일어 날 수 있다는 것을 의미한다. 하지만 너무 낮은 수치를 보이면 다양한 면역성 저하가 유발되고, 너무 높은 수치를 보이게 되면 이에 반응하여 체내 IgA가 상승되고 이는 역복합체의 생성을 유도하여 신 독성을 유발한다고 알려져 있기 때문에 아래의 결과와 같은 control에 비해 조금 상승된 IgG의 농도는 체내의 면역성 증가에 긍정적인 작용을 할 것으로 사료된다.

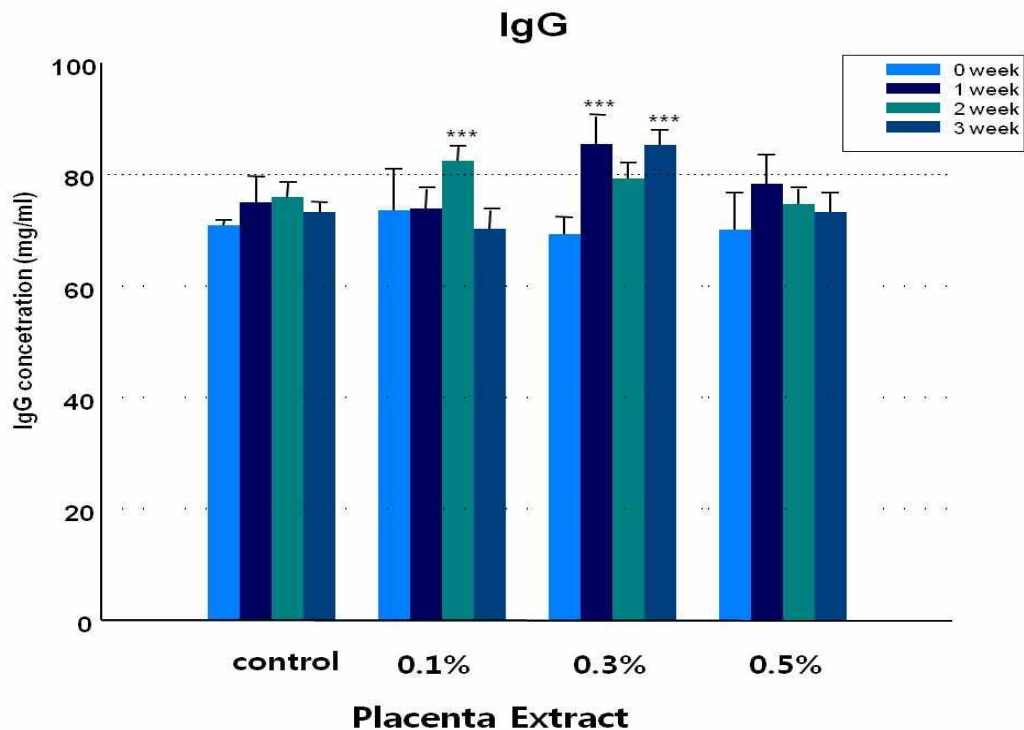


그림 49. Effects of Trial product on the secretion of immunoglobulin G in pig serum. *** $P < 0.01$.

나. Interleukin-1 beta(IL-1 β)

체내 cytokine 중 IL-1 β 는 대표적인 염증관련 cytokine으로써 외부 세균 등의 감염으로부터의 면역방어 물질이며, 또한 면역세포인 macrophage, monocyte, lymphocyte 등을 생산하는데 관여하거나 조절하는 것으로 알려져 있다. 다양한 농도별 추출물을 함유한 시제품을 실험돼지에게 급여 한 후 혈액 내에 IL-1 β 의 농도를 측정 한 결과 0.1%에서는

2주차에 0.3%에서는 3주차에 0.5%에서는 1주차에서 유의적으로 높은 IL-1 β 수치를 나타내었다 (그림 50). 이는 시제품 농도별 특정주차에서 면역 방어 작용을 돕는 IL-1 β 의 증가가 이루어짐을 알 수 있으며, 외부의 질병에 대한 면역 저항성이 높아 질수 있다는 것을 시사한다.

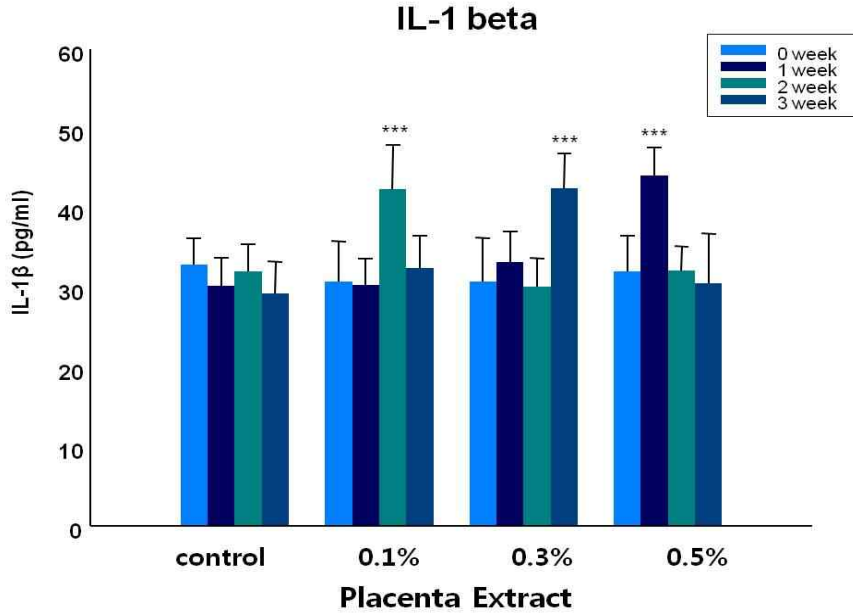


그림 50. Effects of Trial product on the secretion of interlukin-1 beta in pig serum. *** $P < 0.01$.

다. Interferon gamma (IFN- γ)

체내 cytokine 중 interferon- γ 는 면역력 증강의 척도가 되는 cytokine 으로서 면역력이

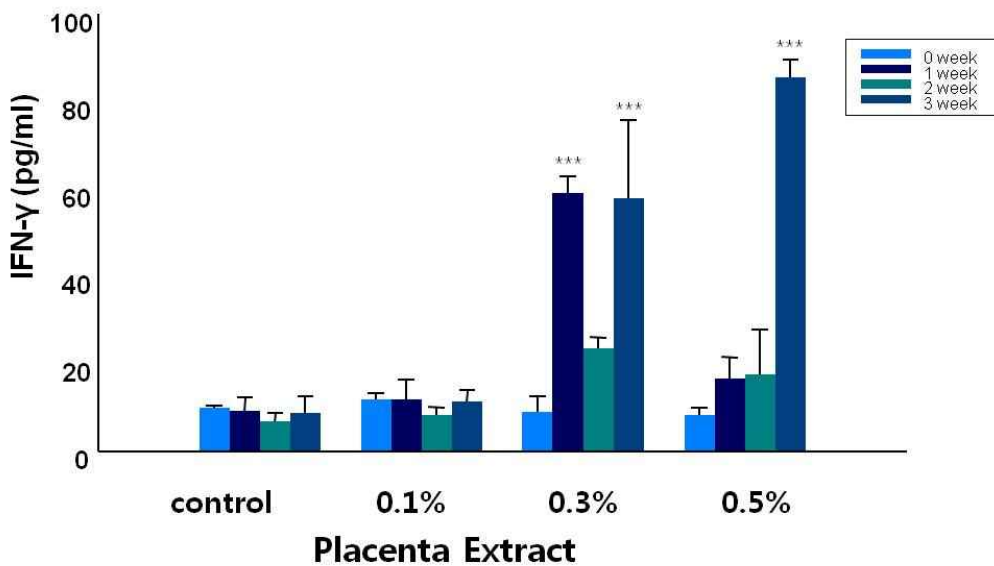


그림 51. Effects of Trial product on the secretion of interferon gamma in pig serum. *** $P < 0.01$.

증가되면 IFN- γ 의 수치도 증가하게 된다. 면역기능이 활성화되면서 IFN- γ 증가하게 된다. 시제품을 투여한 돼지의 혈액 내 interferon- γ 의 수치가 control에 비해 전반적으로 매우 높은 것을 보이며, 특히 0.3%군에서 1주와 3주차에서 대조군과 비교 시 6배가 높고 0.5%에서는 3주차에서 8배 이상 높은 것을 보인다 (그림 51). 이는 시제품을 먹인 결과 체내의 면역력이 증강되었다고 사료된다.

6. 시제품의 면역교란 억제 효과 규명

IgE는 알러지 등과 같은 체내에 면역 불균형이 초래 되었을 때 급격히 증가하는 면역 글로불린으로 알려져 있다. IgE가 상승했다는 것은 체내의 면역시스템이 교란되어 면역력이 저하되었다는 것을 의미하기도 한다. 본 실험에서 다양한 농도의 추출물이 첨가된 시제품을 돼지에게 급여한 후에 혈중 IgE 농도를 확인해 본 결과, 대조군에 비해 조금 높은 값을 보인 0.3%를 제외하고 control값과 비슷한 것을 확인할 수 있었다 (그림 52). 이는 시제품을 급여 시에 면역 불균형을 유도하지는 않는 것으로 사료되어 면역력 저해와는 무관하다는 것을 시사한다.

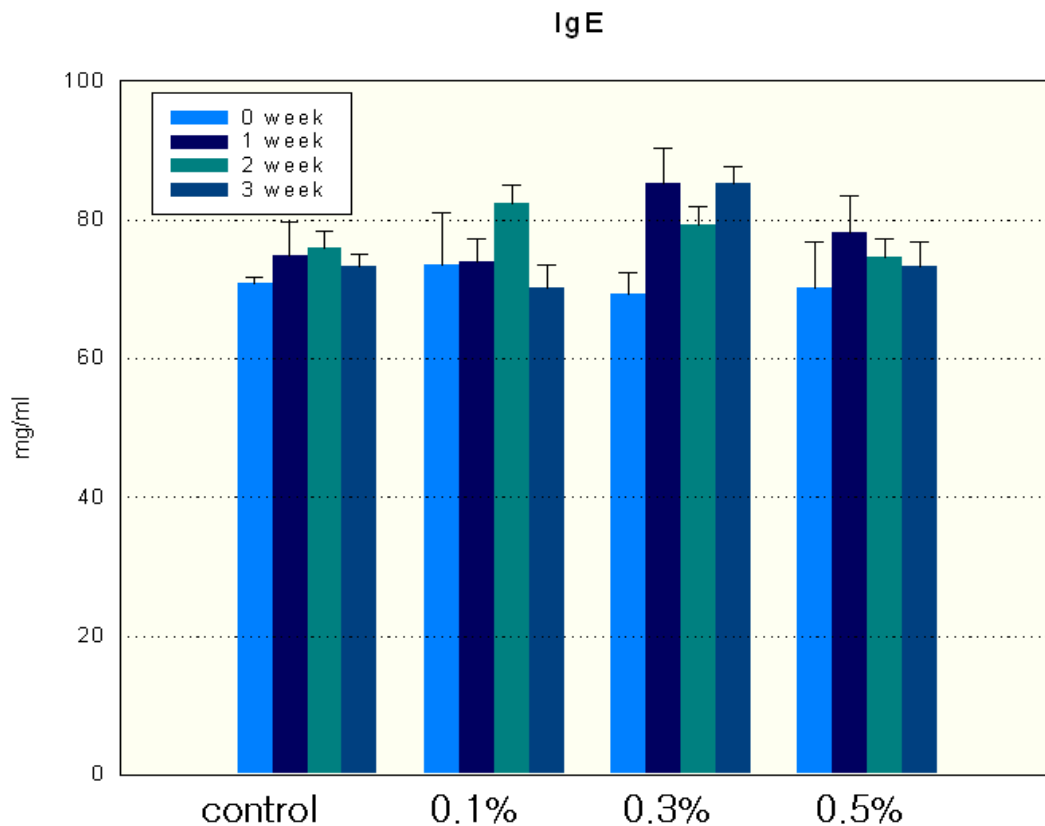


그림 52. Effects of Trial product on the immunoglobulin E in pig serum. *** $P < 0.01$.

제 9 절 돼지 태반 추출물 함유 시제품 사료의 자돈 면역 증강 작용 규명 (제2차 시험)

충북소재의 양돈 사육장에서 수행한 제1차 시험은 실험이 진행되는 도중 Rota virus의 감염이 확인된 상태에서 실험이 진행되었기 때문에 실제로 질병감염에 대한 태반추출물의 면역증강 및 질병억제효과에 대한 연구결과를 도출하였다.

따라서, 정상 자돈에서의 태반 추출물의 면역증강 효과를 관찰하기로 한 원래의 연구결과를 도출하기 위하여 제2차 시험을 경남 함양소재의 양돈장에서 수행하였다.

1. 태반 추출물의 농도에 따른 자돈의 체중 변화

각각 0%(대조구), 0.1%, 0.3%, 0.5% 태반추출물을 첨가한 사료를 급여 후 3주 동안 자돈의 체중을 측정하였다. 측정 결과 태반추출물이 첨가된 사료를 급여한 모든군에서 태반추출물을 첨가 하지 않은 대조군에 비해 체중의 증가 확인되었으며, 특히 0.3%의 태반추출물이 첨가된 사료를 급여한군에서 증체량이 가장 높게 나타났다 (표 9).

표 9. Effects of placental extracts on the body weight of piglet

구분	34일령 (A)		48일령 (B)		55일령 (C)		증체량(kg/두)			일당증체량 (g)		
	총체중	평균체	총체중	평균체	총체중	평균체	B-A	C-B	C-A	B-A	C-B	C-A
대조구	223	8.9	339	13.6	426	17.0	4.6	3.5	8.1	331	497	387
0.1% 첨가군	226	9.0	345	13.8	450	18.0	4.8	4.2	9.0	340	600	427
0.3% 첨가군	221	8.8	342	13.7	447	17.9	4.8	4.2	9.0	346	600	430
0.5% 첨가군	227	9.1	347	13.9	440	17.6	4.8	3.7	8.5	343	531	406

2. 혈액 중 면역세포에 대한 태반추출물의 효과

가. 백혈구(White blood cell)

각각 다른 농도의 태반 추출물을 이유 자돈에게 급여한 3주 동안 주 1회씩 자돈의 경정맥에서 혈액을 채취한 후 혈액 중에 함유되어 있는 백혈구 수치를 조사하였다. 실험기간 동안 통계적으로 유의성 있는 백혈구 수치의 증감은 보이지 않았지만 전반적으로 control군과 처리군에서 비슷한 정도의 백혈구 수치가 유지되는 것을 확인하였다(그림 53).

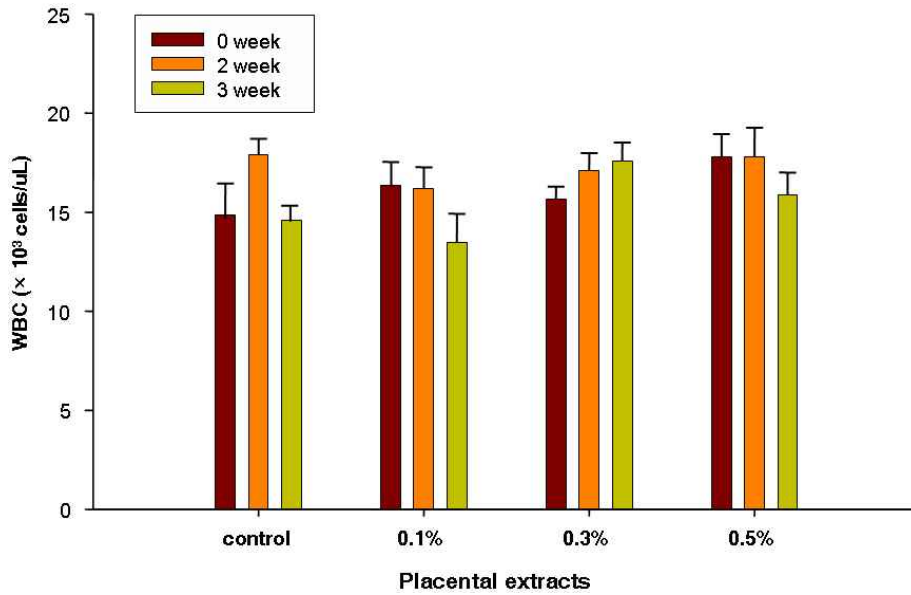


그림 53. Number of white blood cell in piglet fed with placental extracts

3. 혈액 면역세포의 구성성분 변화에 대한 영향평가

가. 호산과립구(Eosinophil)

Eosinophil은 granulocyte의 일종으로 Basophil과 마찬가지로 주로 바이러스와 같은 감염원에 대한 방어작용을 담당하는 것으로 알려져 있다. 각각의 태반추출물 함유 사료를 급여한 결과 유의성 있는 수치의 증감은 보이지 않았지만 전반적으로 control군과 처리군에서 비슷한 정도의 수치가 유지되는 것을 확인할 수 있었다(그림 54).

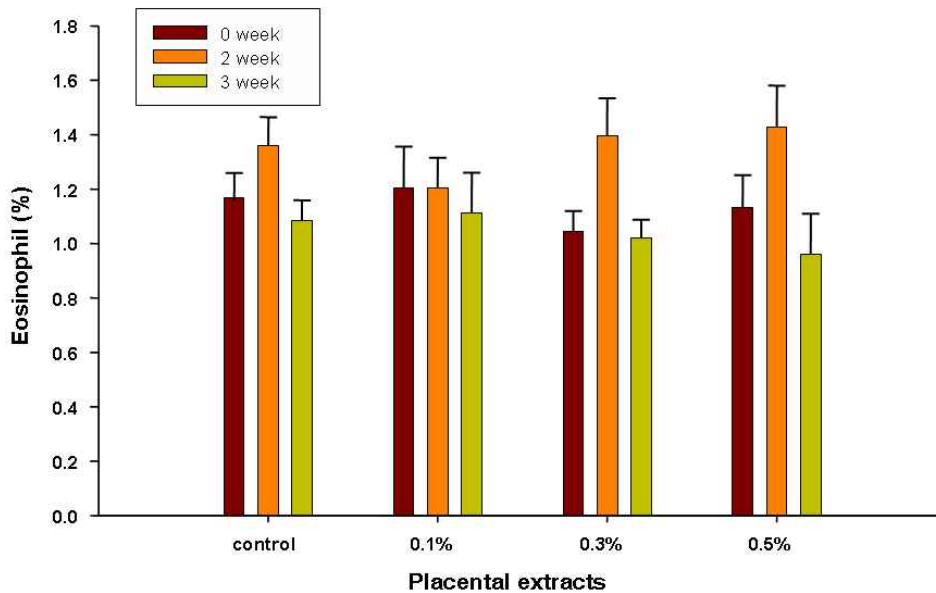


그림 54. Number of Eosinophil in piglet fed with placental extracts

나. 호염과립구(Basophil)

Eosinophil과 마찬가지로 Basophil도 각각의 태반추출물 함유 사료를 급여한 결과 유의성 있는 수치의 증감은 보이지 않았지만 전반적으로 control군과 처리군에서 비슷한 정도의 수치가 유지되는 것을 확인할 수 있었다(그림 55).

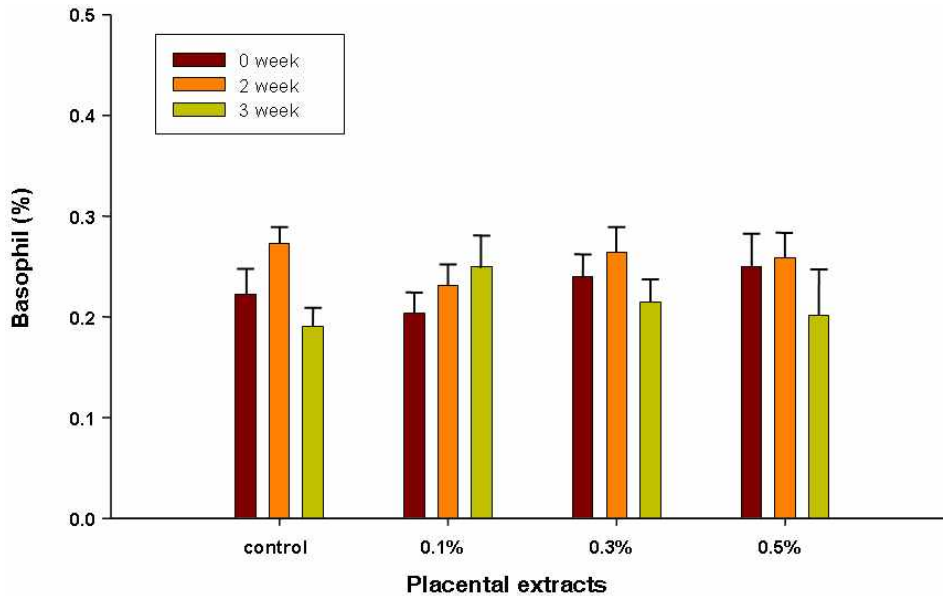


그림 55. Number of Basophil in piglet fed with placental extracts

다. 중성과립구(Neutrophil)

Neutrophil은 세균이 체내에 침입했을 때 세균을 제거하는 최일선의 방어 작용을 하는 세포로 알려져 있다. 각각 다른 농도의 태반추출물을 처리했을때 neutrophil의 함량은 control과 비슷한 수준으로 급격한 증가나 감소를 보이지 않았다 (그림 56).

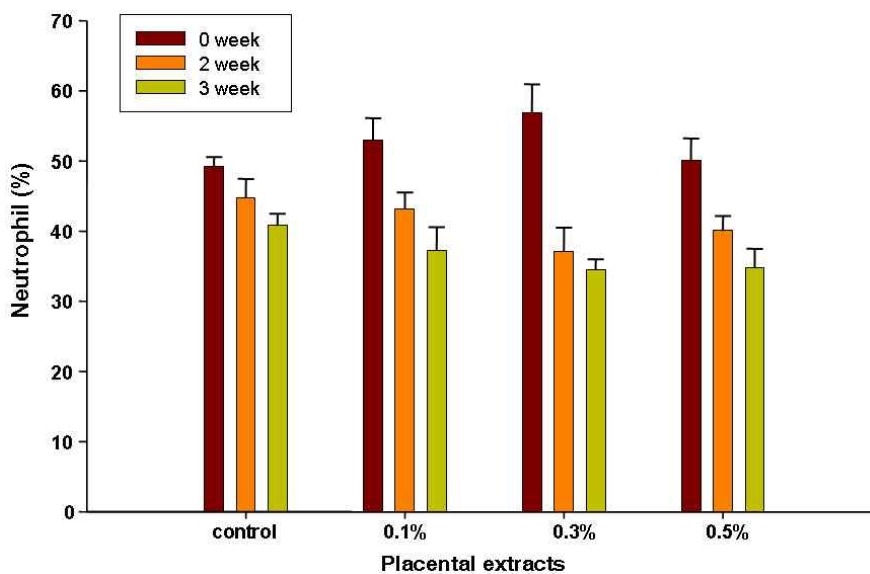


그림 56. Number of Neutrophil in piglet fed with placental extracts

라. Monocyte

Monocyte는 혈중 면역세포의 중요한 역할을 담당하며, 바이러스 감염 등에 의한 염증 반응에 신속한 대처를 하는 것으로 알려져 있다. 각각 다른 농도의 태반추출물을 자돈에 처리했을때 monocyte의 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았다 (그림 57).

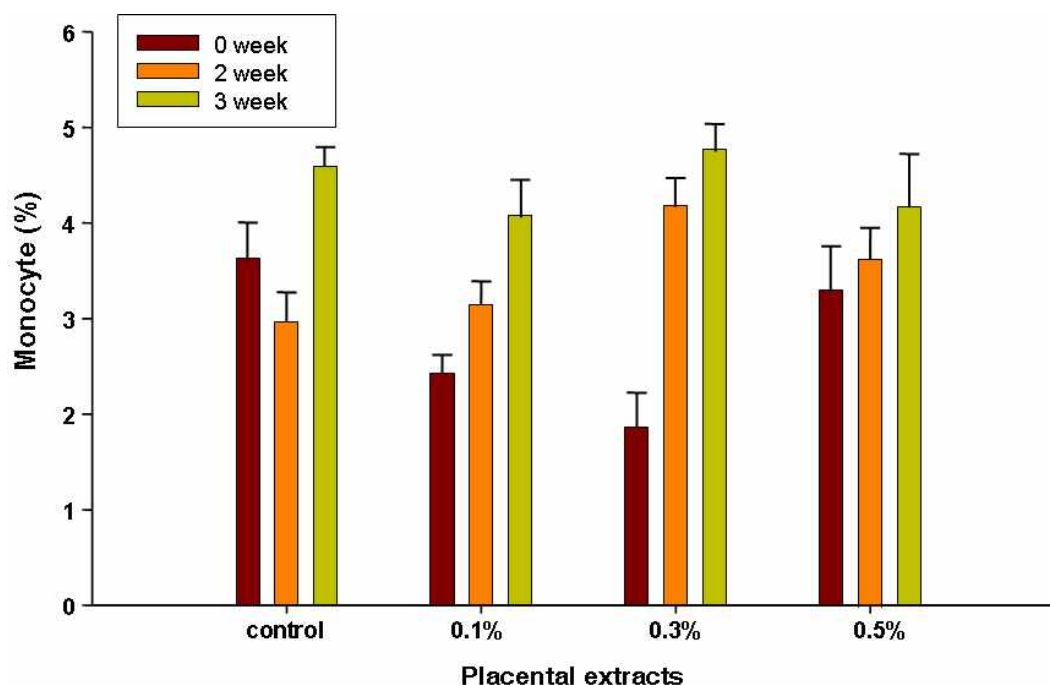


그림 57. Number of Monocyte in piglet fed with placental extracts

4. 시제품의 자돈 체내 면역증강 관련 단백질 인자 활성 규명

가. Interleukin-1 beta(IL-1 β)

체내 cytokine 중 IL-1 β 는 대표적인 염증관련 cytokine으로써 세균 등의 감염으로 부터생체를 방어하는 물질로서 체내에서의 염증반응의 지표라고 할 수 있는데, 이것은 또한 면역세포인 macrophage, monocyte, lymphocyte 등을 생산하는데 관여하거나 조절하는 것으로 알려져 있다. 다양한 농도별 추출물을 함유한 시제품을 실험돼지에게 급여 한 후 혈액 내의 IL-1 β 의 농도를 측정 한 결과 모든군에서 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다 (그림 58). 이러한 결과는 시제품 사양기간동안에 외부로부터의 감염이 발생하지 않았음을 시사하였다.

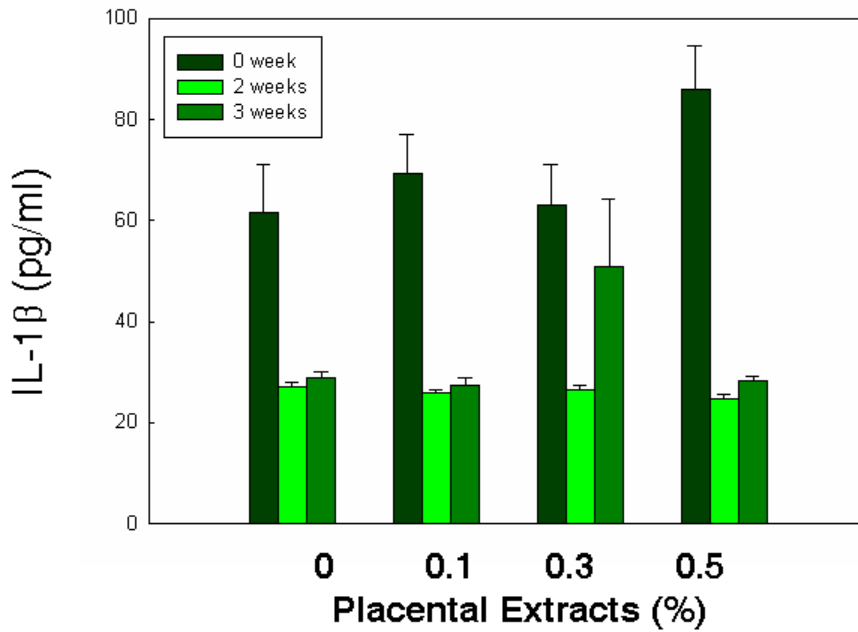


그림 58. Effects of Trial product on the secretion of interleukin-1 beta in pig serum.

나. Interferon gamma (IFN-γ)

면역기능이 활성화되면서 증가되는 사이토카인인 IFN-γ의 분비에 대한 태반추출물 함유 시제품의 효과를 조사한 결과, 돼지의 혈액 내 interferon-γ의 수치가 태반추출물 사양군에서 control과 비교하여 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었다 (그림 59). 이는 시제품을 먹인 결과 체내의 면역력이 증강되었을 가능성을 시사하는 연구결과라 사료된다.

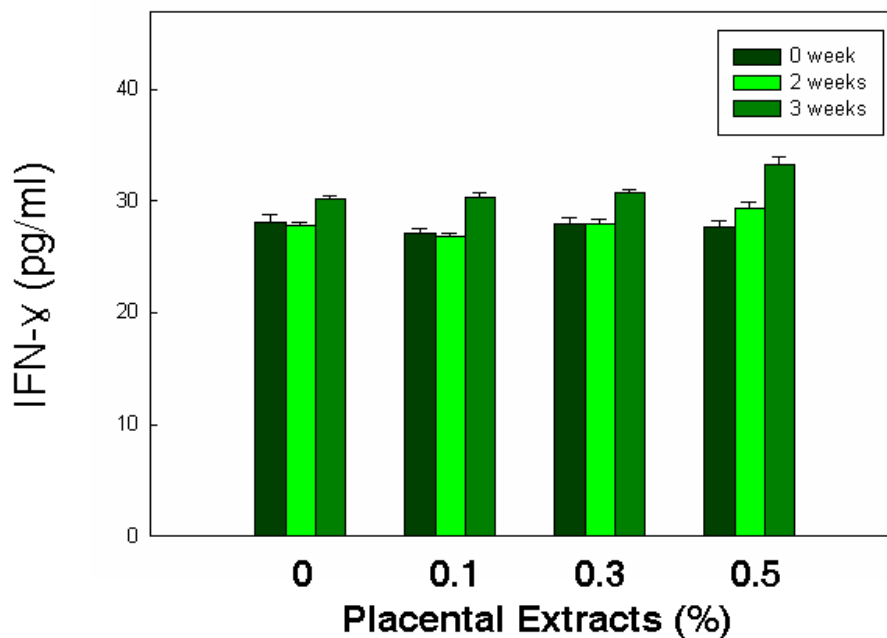


그림 59. Effects of Trial product on the secretion of Interferon gamma in pig serum.

제 10 절 결 론

면역증강에 효과적인 돼지 태반 추출물을 확보하기 위하여 다양한 추출방법으로 태반을 추출한 결과 80 °C 열수추출물이 In vitro 면역세포 활성화에 가장 효율적이라는 것을 확인하여, 향후 전개되는 실험에는 80 °C 열수 추출물을 이용하였다. 생쥐를 이용한 실험동물 모델에서 돼지 태반 추출물은 증체량 향상은 물론 각종 혈액 내의 면역관련 세포들의 농도를 증가시켰으며, 특히 백혈구 세포의 활성도를 향상 시켰다. 면역증강 관련 표지인자인 혈중 IgG의 농도 상승 및 각종 면역증강 관련 사이토카인의 농도를 통계적으로 유의하게 상승 시켜 실험동물 모델에서도 세포 수준과 마찬가지로 80 °C 열수 추출물의 면역증강 효과가 관찰되었다.

태반 추출물의 면역증강 효능을 세포 수준과 실험동물 모델에서 확인한 후 참여기업인 고려산업(주)과 공동으로 시제품을 개발한 후 자돈에서 면역증강 효능 규명과 질병 메카니즘 차단 효과 검증 실험을 실시하였다. 태반 추출물을 각 0.1, 0.3, 0.5% 첨가하여 생산된 시제품을 자돈에 급여한 결과 태반 추출물이 함유된 시제품을 급여한 자돈 군의 성장 체중이 향상되는 것을 확인하였고, 폐사율의 감소도 확인하였다. 또한 자돈의 면역력이 효과적으로 증강되어 각종 혈중 면역세포의 농도 및 면역증강 관련 혈액 단백질의 농도가 증가되는 것을 확인하였다. 또한 시제품을 섭취한 자돈 처리군 에서는 섭취 후 성장단계에서 발생할 수 있는 세균성, 바이러스 성 질병에 대한 저항성도 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구개발과제의 연구를 통해 돼지 태반을 이용한 효율적인 자돈용 면역증강 사료 첨가제의 개발을 완료 하였으며, 관련 연구내용은 3건의 특허와 함께 산업화의 기반을 조성하였다. 따라서, 본 연구 결과는 친환경 녹색 축산 성장 발전에 일조 할 수 있을 것으로 사료된다.

제 4 장 경제성 평가

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구 개발의 목적

우리나라 양돈 산업은 그 동안 전업화 및 계열화를 통하여 대규모로 산업화되었으며, 생산성 향상을 위해 전형적인 가공형·공장형 축산으로 수입곡물 위주의 배합사료 의존 형태로 발전 되어 왔다. 이로 인하여 수입개방과 미국을 비롯한 EU 등의 국가들과의 FTA협정, 국제 곡물가격의 상승, 가축분뇨 문제, 콜레라, 구제역, PRRS, PRDC, PMWS, PED 등 가축질병의 발생과 만연, 이로 인한 폐사율 상승 등 숱한 문제들로 인하여 축산물 생산환경이 매우 어려운 실정이다.

이러한 현실적인 문제를 해결하기위한 일환으로, 질병예방, 영양보충, 성장촉진을 통한 양돈 농가의 생산성 증대를 위해 사료첨가제는 그 동안 사용량과 사용 범위가 증가되어 왔다. 그러나 항생제 사용의 증가는 무분별한 남용과 과다 사용으로 인하여 축산식품 내 잔류, 내성 증가, 슈퍼 박테리아 출현 등의 부작용 등이 나타났다.

EU를 비롯한 다수의 국가에서는 항생제 사용을 단계적으로 규제하고 있고, 우리나라에서도 축산식품의 안전성에 대한 소비자 관심이 증대하면서 정부는 2005년부터 단계적으로 배합사료에 첨가되는 항생제 종류를 감축시켜 왔으며, 오는 2011년 하반기부터는 전면 금지가 될 예정이다. 따라서 항생제의 사용을 줄이면서 면역력 강화 및 생산성 향상을 위한 대체 물질들이 계속적으로 연구개발되고 있다.

일반적인 항생제 대체물로 생균제, 효소제, 식물추출물, 면역증강물질 등이 제시되고 있다. 특히 2009년도 국립축산과학원의 돼지 사양기술개발 연구에서는 육성비육돈에 생균제를 급여할 경우 일당증체량이 무항생제 급여할 경우에 비해 8%, 항생제를 급여할 경우에 비해 4% 증가하였고, 장내 유익 미생물과 항체(IgA)가 증가하여 면역력 또한 향상됨을 확인하였다.

본 연구는 돼지태반 추출물을 이용한 면역증강물질을 통해서 면역증강효과와 자돈 폐사율 저하, 증체량 증가 등 그 경제성을 분석하여 태반유래 사료 첨가 대체제의 개발 및 보급으로 인하여 발생하는 비용 및 편익을 추정하여 경제적 타당성을 규명하는데 그 목적이 있다.

2. 연구개발의 필요성

일반적인 사료첨가제 개발 연구는 첨가물질 및 대체제의 개발 및 추출방법, 제조기술 및 효능의 평가 등을 실험을 통하여 규명하려는 연구가 대부분이며, 이와 관련하여 경제성을 분석하여 경제적 타당성을 찾는 연구는 활발하지 못하다. (표 12)의 농림수산식품기술기획평가원의 사료첨가제와 관련한 연구과제들을 살펴보면, 사료첨가제 및 대체물질의 개발 등의 연구과제는 활발히 진행되는 반면, 여기에 따른 사회경제적 분석을 통하여 사료첨가제 및 대체제 개발의 타당성 및 규모를 측정하는 연구는 전무한 실정이다. 새로운 기술의 도입 단계 이전에 경제성 평가를 실시하는 것은, 신기술의 잠재력 및 시장 규모 등을 추정

하여 보급화에 도움이 되고 산업으로서의 가치를 가늠해본다는 측면에서 충분한 가치가 있다고 하겠다.

표 12. 사료첨가제 관련 연구 과제

연구 분야	연구 과제명	책임자	연구 기관	종료 연도
동물자원/생산	식물성에스트로젠 유사효능을 갖는 천연추출물을 이용한 거세우 성장 및 육질개선을 위한 기능성 사료첨가제 개발	김재수	(주)내츄럴엔도텍	2009
동물자원/생산	항균성 유기산 대량생산에 의한 항생제 대체 사료첨가제의 개발	성수일	(주)바이오토피아	2009
동물자원/생산	Soltl B를이용한 PMWS 예방 및 곰팡이 억제용 사료첨가제 개발	정연권	(주)서봉 바이오베스텍	2009
농림 기자재	사료첨가용 항생제 대체제 소재 발굴 및 효과검정과 항생제 전이율 저감을 위한 연구	백인기	중앙대학교	2008
농림 기자재	생약으로부터 사료첨가용 항생제 대체물질 개발 연구	이봉덕	충남대학교	2008
농림 기자재	한국산 겨우살이를 이용한 조류독감 억제용 기능성 사료첨가제의 개발	황성구	한경대학교	2008
축산	жат송이를 이용한 축사환경개선제 및 사료첨가제 개발에 관한 연구	고용균	강원대학교	2006
축산	산삼배양액의 효과규명 및 이를 이용한 사료첨가제 개발	박상열	전북대학교	2005
축산	고수준 Thr, Trp 함유 효모 사료첨가제 개발	이봉덕	충남대학교	2004
생명공학	수용성 fructan 생산기술 및 이를 이용한 새로운 기능성 식품 및 사료첨가제 개발	장병일	(주)리얼바이오텍	2004
축산	철분 강화 사료첨가제 및 철분 강화 계육과 돈육 생산기술 개발	정대균	(주)RNA	2004
축산	왕암게르마늄흑운모를 이용한 사료첨가제 개발	정연권	(주)서봉 바이오베스텍	2004
축산	해조류 중 갈조류를 이용한 면역기능성 사료첨가제 개발연구	강창원	건국대학교	2003
축산	토코페롤과 카로티노이드계 성분을 함유한 산란계용 사료첨가제 개발	노승권	(주)유진사이언스	2003
생명공학	사료첨가용 항생제 타이로신 생산 균주개발 및 공업화	양호석	(주)제일화학 연구소	2003
축산	Myctophid 어종에 함유된 wax esters를 이용한 사료첨가제 개발	여영근	경북대학교	2003
축산	복합생균제 피복기술에 의한 양돈용 사료첨가제 개발	황광연	고려대학교	2003
축산	사료의 유기태인 이용성 증진을 위한 새로운 사료첨가제 개발	양창근	대한제당(주) 중앙연구소	2002

자료: 농림수산식품기술기획평가원

제 2 절 연구개발의 내용과 범위

1. 소비자조사를 통한 돼지태반유래 사료첨가제의 사회적 편익 추정

항생제 대체제로서의 돼지태반유래 사료첨가제에 대한 사회적 편익을 소비자 조사를 통하여 추정한다.

제 3 절 연구개발수행 내용 및 결과

1. 사회적 편익 추정

가. 연구 방법

(1) 가상가치평가법을 이용한 사회적 편익 추정

(가) 비시장재화의 가치를 추정하는 방법

- ① 직접방법: 편익을 제공받는 대상자들에게 면접이나 우편조사를 통하여 그 편익의 가치를 어느 정도로 여기고 있는지 화폐단위로 질문하는 방법이다(가상가치평가법, CVM).
- ② 간접방법: 특정한 편익의 반대급부로 간주할 수 있는 비용 혹은 그 편익과 관련있는 경제수치를 이용하여 가치를 유추하는 방법이다(여행비용법, 방지비용법, 대체비용법, 기회비용법, 잠재가격법).

(나) 가상가치평가법(CVM : Contingent Valuation Method)

공공시설의 입지나 정책 시행 등 환경에 미치는 영향을 화폐적가치로 평가하기 위해서 시장자료를 구할 수도 없고 대리시장을 통한 간접적인 분석도 어려운 경우, 가상의 시장을 설정하고 설문조사를 통해 영향을 받게 되는 사람들에게 환경악화의 방지를 위하여 혹은 환경개선을 위한 최대지불용의액수(Willingness to Pay, WTP)를 직접 질문하는 방법이다.

(다) CVM의 장점 및 한계

- ① 의의: 환경재나 공공재와 같은 비시장재에 대한 가치측정에 있어 CVM의 핵심은 대상이 되는 재화에 대한 가상시장을 구축하는 것이다.
- ② CVM 평가 과정
 - ㉠ 대상이 되는 비시장재의 수량과 질, 위치와 시간적 특성 등을 시나리오를 통하

여 자세하게 묘사한다.

- ㉔ 지불수단 등 가상시장에서 운영되는 규칙이 시나리오를 통해 묘사되고 그에 대한 응답자들의 지불의사액(WTP)이 어느 정도인지 언급하도록 한다.
- ㉕ 응답자들에 의해 구해진 정보를 바탕으로 WTP를 도출해낸 방법에 따라 편익을 도출한다.

③ CVM의 장점

- ㉖ CVM은 시장을 이용한 방법으로는 추정할 수 없는 가치를 추정해 낼 수 있는 유용한 방법이다.
- ㉗ CVM은 편익의 범주와 측정대상이 되는 재화에 대해 폭넓은 유연성을 가진다. 설득력 있는 시나리오가 되기 위한 중요한 제약 내에서 CVM의 연구자는 가치화될 재화의 다양한 형태와 공급조건 등을 고려하여 가치를 추정할 수 있으며, 이는 현재의 제도적 제약이나 재화의 공급수준에 의해 제한받지 않는다.
- ㉘ CVM은 시점과 불확실성에 관한 문제이다.
 - 미래의 상태가 알려지기 전에 개인이 재화로부터 기대하는 효용은 미래 상태가 확실해진 후의 그 효용과는 다르다.
 - 편익 추정의 목적을 위해서는 사전적 시점이 가장 적절한 것으로 간주한다.
 - CVM을 이용할 경우의 주요 장점 중의 하나는 참가자들이 그들의 결정과정에서 불확실성을 고려하므로 사전적 시점의 후생척도와 부합한다는 점이다.

④ CVM의 한계

개인이 실제로 행한 행위를 분석하여 비시장재의 가치를 추정하지 않고 가상적인 상황을 만들어 이 상황 하에서 개인이 행할 행위를 질문하게 하는 방식을 취하기 때문에 이 과정에서 출발점 편이(Bias), 정보 편이, 지불수단 편이 등의 발생할 수 있다. 이런 이유로 CVM을 사용하여 비시장재의 가치를 추정할 경우 설득력 있고 의미 있는 시나리오의 작성을 통해 설문지의 작성, 설문지의 시행, 사후분석과정에 세심한 주의가 필요하다.

(2) 분석 모형의 설계

항생제 대체제로서의 돼지태반유래 사료첨가제를 이용하였을 경우에 대한 최대 지불 의사액은 정부의 검역, 방역 제도 등에 대한 인지도 및 강화 필요성과 밀접한 관련이 있을 것이며, 구입 빈도, 응답자의 성별, 연령, 가족 수, 소득수준, 학력수준에 의해 영향을 받을 것이라는 연구가설을 토대로 분석모형을 설계한다. 분석모형은,

$$\text{Max } U(X, D; S)$$

$$\text{s.t. } PX + PD = I$$

여기서, X = a set of all goods other than animal diseases

D = animal diseases

PX, PD = prices of X and D

I = income

S = a set of socioeconomic and demographic characteristics

이럴 경우, WTP 함수는,

$$WTP = f(P_x, PD, d, I; S)$$

WTP 추정액은 다음과 같다.

$$WTP = XB + e$$

여기서,

X = independent variable vector; B = coefficients; e = iid error term with (0, σ).

실증적인 WTP 함수는 다음과 같다.

$$WTP = f(Frq, Know, Need, Sex, Age, Family, INC, Edu)$$

여기서, WTP = 소비자가 지불하고자 하는 최대지불의사액

Frq = 돼지고기 구입빈도

Know = 검역/방역 제도에 대한 인지도

Need = 검역/방역 제도 강화 필요성

Sex = 응답자의 성별

Age = 응답자의 연령

Family = 응답자의 가족 수

Inc = 응답자의 가구당 월평균 소득

Edu = 응답자의 교육수준

이 모형을 근거로 최대지불의사액(WTP)을 종속변수로 설정하고 구입 빈도 및 제도의 인지도, 필요성, 인구통계적 특성인 성별, 연령, 가족수, 소득, 교육수준 등을 독립변수로 하여 다중회귀분석을 실시한다.

나. 소비자 설문 조사의 설계

태반유래 사료첨가제의 사회적 편익을 조건부 가상가치평가법(CVM)으로 추정하고자 분석모형을 토대로 하여 소비자 설문 조사를 설계하였다.

인구통계적 변수, 소비자 구매행동 변수, 소비자 선택속성 변수, 추가지불의사금액 추정의 내용으로 설문조사를 설계하였다.

인구통계적 변수에는 설문조사 응답자의 인구통계적 특성의 문항들로서 성별, 교육수준, 연령, 가족수, 월평균소득이 설문 항목으로 구성되었다.

소비자 구매행동 변수는 소비자가 돼지고기 구매와 관련된 문항들로서 돼지고기 구입 빈도, 구매량, 국내산과 수입산 구입비중, 선호 부위, 구매이유 및 구매처와 선호 육류의

설문 항목으로 구성되었다(표 36).

소비자 선택 속성 변수는 소비자가 돼지고기를 구매할 때 생각하는 중요도를 기준으로 안전성문제와 질병 발생시 구매 변화 및 구매량 변화, 안전성 및 방역시스템 인지도와 강화 필요 여부를 설문 항목으로 구성하였다.

추가지불의사금액의 항목은 안전성 및 방역시스템에 대한 추가지불의사금액 추정과 항생제 대체제의 추가지불의사금액 추정 항목으로 구성하였다. 추가지불의사금액의 수준은 돼지고기 가격이 10,000원/600g이라고 가정하였을 때, 세금의 형태로 추가가 된다는 가정 하에 결정하도록 하였다.

표 36. 설문조사의 설계 및 내용

특성	설문 내용	비고
인구 통계적 변수	성별	명목형 순서형 척도
	교육수준	
	연령	
	가족수	
	소득	
소비자 구매행동 변수	돼지고기 구입 빈도	명목형 척도
	돼지고기 구매량	
	국내산 돼지고기 구입비중	
	돼지고기 구매 선호 부위	
	돼지고기 구매 이유	
	돼지고기 주구매처	
	선호 육류	
소비자 선택 속성	국내산 돼지고기 안전성	리커트5점 척도
	수입산 돼지고기 안전성	
	가축질병 발생시 돼지고기 구매량 변화	
	질병발생시 감소되는 구매량	
	안전성 및 방역시스템 인지도	
	안전성 및 방역시스템 강화 필요여부	
추가지불의사금액	안전성 및 방역 시스템 추가지불의사	개방형질문법
	안전성 및 방역 시스템 추가지불의사 금액	
	항생제 대체제 추가지불의사	
	항생제 대체제 추가지불의사 금액	

다. 설문조사 내용

본 연구를 실시하기 위하여 서울에 거주하며 돼지고기 구매경험이 있는 20세 이상의 소비자를 대상으로 2010년 5월 서울의 한 대형마트에서 설문조사를 실시하였다.

직접설문지를 배부하여 작성하도록 하였으며, 설문조사보조원이 보충 설명과 부정확한 기재내용을 보완하도록 하였다.

총 248부의 설문지가 회수되었는데, 이 중 문제가 있다고 판단되는 16부의 설문지를 제외하고 232부의 설문지를 분석에 이용하였다.

(1) 인구통계적 특성

(가) 성별

구분	여	남	합계
응답수	176	56	232
%	75.9	24.1	100.0

설문지 응답자 중 176명(75.9%)이 여성이었으며 56명(24.1%)이 남성으로 나타났다. 설문조사 대상자가 돼지고기를 구매한 경험이 있는 20세 이상의 소비자이고, 설문조사 장소가 대형마트였던 관계로 주부들이 대상자에 많이 포함되어 여성의 비율이 높은 것으로 보여 진다.

(나) 학력

구분	중졸	고졸	전문대졸	대졸	대학원졸 이상	합계
응답수	4	73	32	107	16	232
%	1.7	31.5	13.8	46.1	6.9	100.0

학력의 경우 대졸이상이 약 123명(53%)으로 나타났으며 고졸73명(31.5%), 전문대졸 32명(13.8%)의 순으로 나타났다.

(다) 연령

구분	20세 이하	20~30세	30~40세	40~50세	50~60세	60세 이상	합계	평균
응답수	1	24	43	72	70	22	232	47.0
%	0.4	10.3	18.5	31.0	30.2	9.5	100.0	

연령의 40~50세가 72명(31.0%)으로 가장 많았고, 50~60세가 70명(30.2%), 30~40세가 43명(18.5%)의 순으로 나타났다. 최소 20세에서 최대 73세까지의 다양한 연령분포를 보였다.

(라) 가족 수

구분	1명	2명	3명	4명	5명	6명	7명	합계	평균
응답수	5	20	57	116	22	8	4	232	3.7
%	2.2	8.6	24.6	50.0	9.5	3.4	1.7	100.0	

가족 수의 경우 4인 가족이 116명(50%)로 가장 많았고, 3인 가족 57명(24.6%), 5인 가족 22명(9.5%), 2인 가족 20명(8.6%)의 순으로 나타났다.

(마) 소득

구분	무응답	100만원 미만	100~200만원	200~300만원	300~400만원	400~500만원	500만원 이상	합계
응답수	4	2	29	55	53	44	45	232
%	1.7	0.9	12.5	23.7	22.8	19.0	19.4	100.0

월평균 가구 소득의 경우 200~300만원이 55명(23.7%)로 가장 많았고, 300~400만원 53명(22.8%), 500만원 이상 45명(19.4%), 400~500만원 44명(19.0%)의 순으로 나타났다.

(2) 소비자 행동 변수

(가) 돼지고기 구입 빈도

구분	주1회	주2회	주3회	주4회	월3회	월2회	월1회	합계
응답수	89	55	12	2	20	24	30	232
%	38.4	23.7	5.2	0.9	8.6	10.3	12.9	100.0

돼지고기를 구입하는 빈도를 묻는 질문에는 주 1회 구매하는 응답자가 89명(38.4%)으로 가장 많았고, 주 2회 구매한다는 응답자가 55명(23.7%), 월 1회 구매한다는 응답자가 30명(12.9%), 월 2회 구매한다는 응답자가 24명(10.3%) 순으로 나타났다.

(나) 1회 돼지고기 구매시 구매량

구분	0.3kg이하	0.3~0.6kg	0.6~1.2kg	1.2~1.8kg	1.8~2.4kg	2.4kg 이상	합계	평균(kg)
응답수	1	84	99	25	18	5	232	1.1
%	0.4	36.2	42.7	10.8	7.8	2.2	100.0	

돼지고기를 구매할 때 구매량이 얼마나 되는지를 묻는 질문에는 0.6~1.2kg 구매한다는 응답자가 99명(42.7%)로 가장 많았다. 0.3~0.6kg 구매한다는 응답자가 84명(36.2%)로 나타났는데, 일반적으로 600g 1근을 기준으로 구매를 하기 때문에 반근에서 2근 정도를 한번 구매할 때의 구매량으로 나타났다. 평균적인 구매량은 1인당 1.1kg으로 나타났다.

(다) 국내산 돼지고기 구입 비중

구분	50% 이하	50~80%	80~100%	합계	평균
응답수	13	23	196	232	94.0
%	5.6	9.9	84.5	100.0	

(라) 주로 구매하는 돼지고기 부위

구분	삼겹살	목심	등심	안심	갈비	앞다리	합계
응답수	172	52	2	3	1	2	232
%	74.1	22.4	0.9	1.3	0.4	0.9	100.0

주로 구매하는 돼지고기 부위는 어떤 것인지 묻는 질문에는 삼겹살이 172명(74.1%)로 가장 많았고, 목심 52명(22.4%)의 순으로 나타났으며, 삼겹살과 목심이 주로 구매하는 부위로 나타났다.

(마) 돼지고기 구입 이유

구분	무응답	돼지고기 특유의 맛이 좋아서	건강 및 영양보충을 위하여	요리가 간편하고 다양해서	손쉽게 구매할 수 있어서	가격이 적당해서	위생안전을 믿을 수 있어서	합계
응답수	2	89	64	35	14	27	1	232
%	0.9	38.4	27.6	15.1	6.0	11.6	0.4	100.0

돼지고기를 구입하는 이유는 무엇인지 묻는 질문에는 돼지고기 특유의 맛이 좋아서라는 응답이 89명(38.4%)으로 가장 많았으며, 건강 및 영양보충을 위하여 구입한다는 응답이 64명(27.6%), 요리가 간편하고 다양해서 구입한다는 의견이 35명(15.1)의 순으로 나타났다.

(바) 돼지고기 주 구매처

구분	정육점	대형할인매장	백화점	합계
응답수	37	180	15	232
%	15.9	77.6	6.5	100.0

돼지고기 구매시 주로 구매하는 곳은 어디인지 묻는 질문에는 대형할인매장이 180명(77.6%)로 가장 많았으며 정육점(소매점) 37명(15.9%), 백화점 15명(6.5%)의 순으로 나타났다.

(사) 선호 육류

구분	돼지고기	쇠고기	닭고기	합계
응답수	151	59	22	232
%	65.1	25.4	9.5	100.0

선호하는 육류는 어떤 것인지 묻는 질문에는 돼지고기가 151명(65.1%)으로 가장 높게 나왔으며 쇠고기 59명(25.4%), 닭고기 22명(9.5%)의 순으로 나타났다.

(3) 소비자 선택 속성

(가) 국내산 돼지고기의 안전성

구분	매우 안전함	안전함	보통	불안함	매우 불안함	합계
응답수	20	80	76	48	8	232
%	8.6	34.5	32.8	20.7	3.4	100.0

국내산 돼지고기의 안전성을 묻는 질문에는 안전하다고 응답한 응답자가 80명(34.5%)으로 가장 많았고, 보통이라고 응답한 응답자가 76명(32.8%), 불안하다고 응답한 응답자가 48명(20.7%)의 순으로 나타났다. 100명(43.1%)의 응답자는 국내산 돼지고기는 매우 안전하다는 응답을 포함하여 안전하다는 생각하고 있고, 56명은(24.1%) 불안하다고 생각하는 것으로 나타났다.

(나) 수입산 돼지고기의 안전성

구분	무응답	매우 안전함	안전함	보통	불안함	매우 불안함	합계
응답수	3	0	9	67	84	69	232
%	1.3	0.0	3.9	28.9	36.2	29.7	100.0

수입산 돼지고기의 안전성을 묻는 질문에는 불안하다고 응답한 응답자가 84명(36.2%), 매우 불안하다고 응답한 응답자가 69명(29.7%)로 나타나 153명(66%)는 수입산 돼지고기의 안전성에 대해 불안하게 생각하고 있는 것으로 나타났다.

(다) 가축질병 발생시 돼지고기 소비량 변화

구분	크게 줄인다	줄인다	평상시와 같다	늘린다	크게 늘린다	합계
응답수	26	104	97	4	1	232
%	11.2	44.8	41.8	1.7	0.4	100.0

최근 구제역을 비롯하여 가축질병이 지속적으로 발생되고 있는데, 이렇게 가축질병이 발생했을 때 돼지고기 소비량의 변화는 어떤지 묻는 질문에 줄인다와 크게 줄인다고 응답한 응답자가 130명(56%), 평상시와 같다고 응답한 응답자가 97명(41.8%)으로 나타나 가축질병 발생되면 상대적으로 소비량을 줄이겠다는 응답자가 많은 것으로 나타났다.

(라) 가축질병 발생시 돼지고기 소비량을 줄일 경우 구매량 변화

구분	구매 안함	25%	절반	75%	평상시 수준	합계
응답수	34	32	54	8	2	130
%	26.2	24.6	41.5	6.2	1.5	100.0

그렇다면 소비를 줄이겠다고 응답한 130명의 응답자는 어느 정도까지 소비량을 줄일 것인지를 묻는 질문에 50% 수준으로 줄이겠다고 응답한 응답자가 54명(41.5%)으로 가장 많았고, 아예 구매하지 않겠다고 응답한 응답자가 34명(26.2%), 25% 수준으로 줄이겠다고 응답한 응답자가 32명(24.6%)으로 나타나 질병 발생 시 소비를 줄이게 된다면 최소 50% 이상의 수준까지 그 소비량을 줄이는 것으로 나타났다.

(마) 정부의 가축질병 방역시스템의 인지도

구분	잘 알고 있다	조금 알고 있다	보통	잘 모른다	모른다	합계
응답수	31	81	49	62	9	232
%	13.4	34.9	21.1	26.7	3.9	100.0

정부의 가축질병 방역시스템에 대하여 알고 있는지를 묻는 질문에는 잘 알고 있다와 조금 알고 있다고 응답한 응답자가 112명(48.3%)으로 가장 많았고, 71명(30.6%)은 잘 모르거나 모르

(표 37)과 같이 가축질병 방역시스템 강화에 대해 설명을 한 이후에 추가지불의사를 물어보고 의향이 있는 경우에 추가지불의사 금액을 답하도록 하였다.

(가) 추가 지불 의사

구분	있다	없다	합계
응답수	134	98	232
%	57.8	42.2	100.0

돼지고기 가격에 세금의 형태로 추가로 지불할 의사가 있다고 응답한 응답자가 134명(57.8%)으로 나타났고, 또한 지불할 의사가 없다고 응답한 응답자는 98명(42.2%)으로 나타나 절반이 이상이 가축질병 방역시스템 강화에 대한 추가 지불 의사를 보이고 있다.

(나) 추가 지불 의사 금액

구분	100원	300원	500원	700원	1,000원	1,500원	2,000원	2,500원	3,000원	합계
응답수	41	37	28	2	20	1	2	1	2	134
%	30.6	27.6	20.9	1.5	14.9	0.7	1.5	0.7	1.5	100.0
평균										
482.09원/600g										

추가 지불의사 금액은, 추가 지불 의사가 있는 134명의 경우 돼지고기 가격이 10,000원/600g이라고 가정할 때 평균 482.09원/600g을 지불할 의사가 있는 것으로 나타났다. 이는 돼지고기 가격이 평균 600g에 10,482.09원이 된다고 해도 기꺼이 지불하고 구매를 하겠다는 것으로 볼 수 있다.

(다) 추가 지불 의사가 없는 이유

구분	정부가 부담해야 한다	관련자나 단체가 해결해야 한다	경제적 여유가 없다	합계
응답수	55	31	12	98
%	56.1	31.6	12.2	100.0

추가 지불 의사가 없는 98명의 응답자들에게 그 이유를 묻는 질문에는 정부가 부담해야 한다고 응답한 응답자가 55명(56.1%)으로 가장 많았고, 관련자나 단체가 해결해야 한다는 응답이 31명(31.6%), 경제적 여유의 부재가 12명(12.2%)의 순으로 나타났다.

(나) 추가 지불 의사

구분	있다	없다	합계
응답수	150	82	232
%	64.7	35.3	100.0

구매할 의사가 있고, 브랜드나 세금의 형태로 추가 지불 의사가 있는지 물어보는 질문에는 150명(64.7%)이 있다고 응답하였고, 82명(35.3%)은 의사가 없는 것으로 나타났다.

(다) 추가 지불 의사 금액

구분	100원	300원	500원	700원	1,000원	1,500원	2,000원	2,500원	3,000원	합계
응답수	38	47	22	4	29	1	2	0	7	150
%	25.3	31.3	14.7	2.7	19.3	0.7	1.3	0.0	4.7	100.0
평균										
581.33원/600g										

브랜드나 세금의 형태로 추가 지불 의사가 있는 150명의 응답자들 중 돼지고기 가격이 10,000원/600g일 경우에 어느 정도 더 지불할 수 있는지 금액을 물어보는 질문에는 평균 581.33원/600g으로 나타났다. 이는 평균적으로 가격이 10,581.33원/600g 으로 오르더라도 기꺼이 지불할 의사가 있다는 것을 나타내는 것이다.

(라) 추가 지불 의사가 없는 이유

구분	정부가 부담	관련자나 단체가 해결	경제적 여유가 없음	합계
응답수	42	27	13	82
%	51.2	32.9	15.9	100.0

추가로 지불할 의사가 없는 82명을 대상으로 이유를 물어보는 질문에는 정부가 부담해야 한다는 응답이 42명(51.2%) 가장 많았고, 관련자나 단체가 해결해야 한다는 응답이 27명(32.9%), 경제적 여유가 없다는 응답이 13명(15.9%)로 나타났다.

마. 돼지태반유래 사료첨가제 이용의 사회경제적 가치 분석

(1) 경제성 분석 모형

사전적인 경제적 분석은 해당사업을 시행함으로써 추가적으로 발생하는, 다시 말하면 사업기간동안 해당사업을 시행했을 때(with case)와 시행하지 않았을 때(without case) 차이가 나는 항목별 경제적 비용과 경제적 편익을 일정 할인율로 할인, 그 현재 가치의 합계를 비교하여 사업시행의 타당성여부를 판단하는 것이다.

이때 비용과 편익은 공익관점에서 해당사업이 불러일으킬 수 있는 가시적·비가시적 비용 및 편익을 모두 포함한다. 많이 이용되는 분석방법은 (표 39)와 같다.

순현재 가치법은 대규모의 초기투자에 따라 일정기간 동안 예상되는 수익의 현재가치와 초기투자액을 비교하는 방식이다. 내부수익률은 투자의 결과로 미래에 발생이 예상되는 편익과 비용을 할인율로 할인하여 얻은 편익의 현재가와 비용의 현재가가 동일해지는 할인율을 계산하여 기준(예: 대출이자율)과 비교하는 방법이다. 비용편익비율은 투자결과로 미래에 예상되는 편익과 비용을 할인율로 할인하여 얻은 현재가치 비율로 계산하는 방식이다(표 28). 여기서는 비용편익비율 방식을 이용한다.

표 39. 경제성 분석방법

분석 방법		특 징	판 정 기 준
순현재가치법 (NPV)	$NPV = \sum_{t=0}^n \frac{B_t - C_t}{(1+i)^t}$ B _t : t년도 편익 흐름 C _t : t년도 비용 흐름 i : 사회적 할인율 n : 투자사업기간	·투자의 결과로 미래에 발생이 예상되는 편익과 비용을 할인율로 할인하여 얻은 편익의 현재가와 비용의 현재가의 차이·할인율 기준 : 대출이자 수준	·순현재가치가 0보다 크면 투자 가치가 있으며, 그 값이 클수록 수익성이 높음.
내부수익율법 (IRR)	$\sum_{t=0}^n \frac{B_t}{(1+i)^t} = \sum_{t=0}^n \frac{C_t}{(1+i)^t}$ B _t : t년도 편익 흐름 C _t : t년도 비용 흐름 i : 사회적 할인율 n : 투자사업기간	·투자의 결과로 미래에 발생이 예상되는 편익과 비용을 할인율로 할인하여 얻은 편익의 현재가와 비용의 현재가가 동일해지는 할인율을 통해 투자안의 경제성을 평가하는 방법	·기준 할인율보다 높을수록 수익성이 좋음.
비용편익비율 (BCR)	$BCR = \frac{\sum_{t=0}^n \frac{B_t}{(1+i)^t}}{\sum_{t=0}^n \frac{C_t}{(1+i)^t}}$ B _t : t년도 편익 흐름 C _t : t년도 비용 흐름 i : 사회적 할인율 n : 투자사업 기간	·투자의 결과로 미래에 발생이 예상되는 편익과 미래에 유출이 예상되는 비용을 할인율로 할인하여 얻은 현재가로 나눈 것임.	·지수가 1보다 크면 수익성이 있는 것이며 그 값이 클수록 수익성이 높은 것을 나타냄.
투자회수기간 (Pay-Back Period)		·투자에 소요되는 자금을 그 투자안의 현금흐름으로부터 회수하는데 걸리는 기간	·기간의 장·단기 ·사업주체의 목표 ·현실적 조건
수익성 지수		·할인율로 할인된 현금유입의 현재가를 현금유출의 현재가로 나눈 값	·지수가 1보다 크면 투자안 채택

(2) 추가지불액을 통한 사회적 편익 추정

앞서 살펴 본 설문조사 결과, 국내 소비자의 국내산 돼지고기 선택속성에서, 응답자의 절반 이상이 돼지고기를 선호하고, 국내산 돼지고기 대해서 가장 큰 비율로 안전하다는 태도를 보이고, 수입산 돼지고기에 대해서는 상당히 불안하다는 인식을 하고 있다. 특히 가축질병에 대한 태도는, 질병발생 시 돼지고기 소비는 민감하게 변하는데,

이는 안전성에 대한 신뢰가 무너질 때 예상되는 소비자의 반응이기도 하다.

추가지불액을 통한 사회적 편익, 즉 연간 총 가치추정액은 다음의 식을 통하여 추정할 수 있다.

$$\text{연간 총 가치추정액} = \text{평균지불의사금액} \times \text{연간생산량} \times \text{지불의사율}$$

정부의 가축방역 프로그램으로 인해 돼지고기 안전성 확보 및 가축(돼지) 질병 방역 효과를 갖는 다고 할 때, 소비자조사 결과 소비자들의 최대지불의사금액은 돼지고기 600g 당 482.09원으로 나타났고, 지불의사율은 57.8%이다. 이를 이용하여 2008년 국내 돼지고기 생산량을 기준으로[제4절 양돈산업의 현황], 사회전체적인 가치로 환산할 경우 정부의 가축질병에 대한 방역시스템은 약 3,292억원의 사회적 가치를 갖는 것으로 계측되었다(표 40).

또한 돼지태반유래 사료첨가제가 항생제 대체 효과를 갖는 다고 할 때, 소비자들의 최대지불의사금액은 돼지고기 600g 당 581.33원으로 나타났다. 지불의사율은 64.7%이었으며, 2008년 국내 돼지고기 생산량을 기준으로 한 돼지태반유래 사료첨가제 이용의 사회적 가치는 약 4,444억원으로 계측되었다.

표 40. 사회적 편익

구분	안전성 확보 및 가축질병 방역 효과	항생제 대체제 사용 효과
평균지불의사금액, 원/600g	482.09	581.33
국내생산량, 톤	709,000	709,000
지불의사율, %	57.8	64.7
사회적 편익 추정액, 원	329,267,710,960	444,447,540,240

주: 국내생산량은 2008년 기준

(3) 비용 추정액

양돈사료의 항생제 첨가비용을 산출하기 위하여 A사료의 항생제 첨가비용 내역을 조사한 결과는 다음 표와 같다(표 41).

표 41. 양돈사료의 항생제 첨가비용(A사료)

사용 중인 항생제 kg당 산술평균단가, 원	15,417
전체 사료내 kg당 항생제 첨가 비율, %	0.007

이를 2008년 국내 양돈사료생산량을 기준으로 분석하면 항생제 투여비용은 약 57억원으로 계측되었다.

$$\begin{aligned}
\text{양돈사료 항생제 첨가비용} &= 2008\text{년 양돈사료 총생산량(톤)} \times \text{첨가비율}(0.007\%) \times \text{항} \\
&\text{생제 단가}(15,417\text{원/kg}) \\
&= 5,306,988(\text{톤}) \times 0.007\% \times 15,471,000\text{원} \\
&= 5,727,248,380\text{원}
\end{aligned}$$

(4) 비용편익 분석결과 및 해석

비용편익 분석결과에 대한 판단기준 및 해석은 다음과 같다.

$$\begin{aligned}
\text{B/C비율 (BCR)} : \text{B/C} &\geq 1 && \text{경제적 타당성이 있음} \\
&< 1 && \text{경제적 타당성이 없음}
\end{aligned}$$

제 4 절 결론

돼지태반유래 사료첨가제의 경제성 분석을 위하여 앞서 계측된 편익과 비용 간의 비용편익 비율(BCR)은 약 78로서 경제적 타당성이 충분히 있는 것으로 나타났다.

양돈사료에서 항생제는 주로 새끼돼지에 한정하여 첨가급여하거나 일부 육성돼지에게도 급여하고 있다. 그러나 앞서 언급한 바와 같이 향후 항생제급여가 금지될 경우 양돈사료의 항생제 첨가비용은 비용절감효과에 따라 이는 편익으로 간주되어야 할 것이다. 이럴 경우 돼지태반유래 사료첨가제의 사회경제적 편익은 좀 더 증가하고, 생산자와 소비자 모두의 후생이 증가할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 돼지태반유래 사료첨가제의 항생제 대체체로서 이의 사회경제적 그리고 산업적 대체효과를 살피고자 하였다. 앞서 살펴 본 바와 같이, 축산용 항생제 사용량은 정부의 항생제 사용 감축정책으로 크게 감소하고 있고, 사용량은 모든 축종에서 감소하고 특히 돼지의 경우는 전년 대비 2009년도에는 약20%가 감소하였다. 그러나 항생제대체제나 기타 첨가제 산업의 규모는, 항생제 대체제인 효소제, 생균제 등의 사용이 증가하고는 있지만, 아직 미미한 수준으로 앞선 분석에서 크게 다루어지지 않은 항생제대체제 이용에 따른 비용도 미미한 수준일 것으로 예상된다. 결국 항생제 대체에 따른 사회경제적 편익은 크게 다르지 않고 여전히 클 것으로 예상된다.

이 연구와 관련하여, 추후 계속되어질 분야는, 사료첨가제 산업에 대한 기초자료를 마련하고, 이 산업의 구조와 시장에 대한 전반적인 조사가 필요하다. 이와 함께 하나의 대체체로서 태반의 생산, 유통, 처리 과정에 대한 실태 및 문제, 단계별 비용 및 마진, 그리고 사료회사 및 양돈농장 단위에서의 돼지태반유래 사료첨가제에 대한 태도, 이러한 시장의 규모 및 전망 등에 대해 보다 면밀한 조사연구가 필요하다.

제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 평가의 착안점 및 달성도

구분	연도	평가의 착안점 및 기준	가중치	달성도(%)
1차 년도	2007	태반성분의 추출·분획 기술 개발	35 %	100
		태반성분의 면역증강효능 규명	30 %	100
		태반유래 면역증강물질의 발굴	35 %	100
2차 년도	2008	돼지 태반 성분추출물의 분획	30 %	100
		돼지 태반 추출물의 약리기전 규명	30 %	100
		돼지 태반 추출물의 사료 재료화 공정개발	40 %	100
3차 년도	2009	돼지 태반 유래 기능성 추출물의 대량생산 공정 방법 확립	25 %	100
		돼지태반유래 사료첨가제의 질병저항성 효과 검증	25 %	100
		돼지 태반 유래 사료첨가제의 제품화 및 시제품 개발	50 %	100
최종 평가		태반성분의 추출·분획 기술 개발	25 %	100
		태반 유래 면역증강제의 개발	25 %	100
		돼지태반유래 사료첨가제의 개발	50 %	100

제 2 절 관련분야 기술발전의 기여도

1. 본 연구를 수행함으로써 동물생명공학 기술의 발전에 기여하였다.
2. 또한, 본 연구는 신규 동물자원의 이용기술을 확보할 수 있는 기반 기술을 도출할 수 있는 기술적 비전을 제시하였다.
3. 본 연구를 통하여 얻은 기술은 양돈기술의 발전으로 연결되어 양돈산업의 국제적 우위를 점할 수 있는 기술력을 확보할 수 있다.
4. 한편, 면역증강제 관련 연구분야는 현재 전 세계적으로 많은 연구가 다양한 생물자원을 이용하여 진행되고 있는 분야로, 관련분야의 기술력확보는 물론, 학문연구에 크게 기여하였다고 사료된다.
5. 본 연구과제의 수행에는 분자생물학 및 생화학적인 기법이 근간을 이루고 있으므로 본 연구에 관여하는 연구자에게 다양한 연구능력을 습득할 수 있는 기회를 부여함으로써 BT산업을 포함한 국가산업에 공헌할 수 있는 연구인력의 양성에 일조하였다고 사료된다.
6. 양돈농가의 애로 기술을 해결할 수 있는 새로운 패러다임을 제시함으로써 친환경 양돈 기술의 개발에 기여하였다.
7. 개발된 기술의 이전을 통해 관련 산업체의 공정 기술 개발과 발전에 기여 하였다.

제 6 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화·산업화 계획

1. (주) 고려산업과 협의하여 기술이전을 실시할 구체적인 계획을 가지고 있고, 현재 기술 이전에 대한 협의가 진행 중에 있음.
2. 기술이전 후 (주)고려산업은 본 과제의 연구책임자와 관련 연구원으로 구성된 자문단을 통해 보다 구체적인 산업화 실행계획과 효능 향상 추가 연구를 진행할 계획을 가지고 있음.

제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

1. (주) 고려산업과 기술이전이 완료되고, 추가 지적재산권 확보가 완료된 시점에서 (사)양돈협회, 양돈관련 소모임, 축산신문 등을 이용하여 자돈 면역 증강제와 항생제 대체제로서의 돼지 태반 추출물의 효능을 지속적으로 교육, 지도, 홍보할 예정임.
2. 양돈산업분야 뿐만 아니라 기타 다른 축종에도 적용 가능한 연구 결과를 도출하여 국내 축산 전반에 기술을 확산 시킬 예정임.

제 3 절 지식재산권 확보계획

1. 특허 등 연구개발성과
 - 가. 특허출원성과

구분	특허명	출원인	출원국	출원번호	출원연도
1	열처리를 이용한 태반추출물의 제조방법	경상대학교 산학협력단	대한민국	10-2008-0042025	2008
2	면역증강에 효과적인 돼지 태반 추출물을 유효성분으로 하는 사료첨가제	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-0104765	2009
3	돈 태반 추출물이 첨가된 사료 및 이의 제조방법	경상대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0056338	2010

2. 향후의 지식재산권 확보계획

가. 현재 본 연구과제를 통해 3건의 태반 추출물 관련 특허를 확보하고 있으며, 향 후 (주) 고려산업과 협의 하에 배타적인 지적재산권을 확보하여 궁극적으로 다른 축종은 물론 인체에 활용할 수 있는 고부가가치의 제약산업분야를 비롯한 BT산업체에 기술을 이전할 계획임.

제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

1. 돼지태반추출물의 약리효능 증강 및 면역증강 성분을 계속 발굴 연구하여 사료첨가 목적 이외에도 인체에 활용할 수 있는 성분을 분리 확보하는 연구를 진행할 계획임.
2. 또한, 돼지태반추출물이 돼지뿐 만 아니라 다른 축종의 면역력 향상에는 어떠한 영향을 미치는지 연구할 계획임.

제 7 장 참고문헌

1. Sang-Uk Kim,, Jin-Gu No1, Sang-Sin Jo, Ji-Yeong Jung. A study of reduction effects of stillbirth and mortality rates in pigs by medicinal herbs supplementation in sow. *Korean J Vet Serv* 33(1) : 81~87 (2010)
2. Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest.* 120(4):1016-1025 (2010)
3. Parolini O, Alviano F, Bergwerf I, Boraschi D, De Bari C, De Waele P, Dominici M, Evangelista M, Falk W, Hennerbichler S, Hess DC, Lanzoni G, Liu B, Marongiu F, McGuckin C, Mohr S, Nolli ML, Ofir R, Ponsaerts P, Romagnoli L, Solomon A, Soncini M, Strom S, Surbek D, Venkatachalam S, Wolbank S, Zeisberger S, Zeitlin A, Zisch A, Borlongan CV. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev.* 19(2):143-154 (2010).
4. Faber JJ, Anderson DF. The placenta in the integrated physiology of fetal volume control. *Int J Dev Biol.* 54(2-3):391-396 (2010).
5. Kauffman P, Burton G. Anatomy and genes of the placenta in the physiology of reproduction. 2nd adn. (Ed) Knobil E, Neill JD. New York : Raven Press Ltd. pp. 411 - 484 (1994).
6. Nair B, Elmore AR. Final report on the safety assessment of human placental protein, hydrolyzed human placental protein, human placental enzymes, human placental lipids, human umbilical extract, placental protein, hydrolyzed placental protein, placental enzymes, placental lipids, and umbilical extract. *Int J Toxicol.* 21 Suppl 1:81-91 (2002).
7. Seo TB, Han IS, Yoon JH, Seol IC, Kim YS, Jo HK, An JJ, Hong KE, Seo YB, Kim DH, Park SK, Yang DC, Namgung U. Growth-promoting activity of Hominis Placenta extract on regenerating sciatic nerve. *Acta Pharmacol Sin.* 27(1):50-58 (2006).
8. Georgieva R, Stefanov D, Fichorova R, Dimitrova E. Effects of the whole extract and the chromatographic fractions of the pig placenta on lymphocyte proliferation and humoral immune response. *Theriogenology.* 44(4):539-551 (1995).
9. MUZHNAI D. Comparative immunoelectrophoretic study of proteins in the placenta and in fetal blood serum. *Biull Eksp Biol Med.* 55:50-53 (1963).
10. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15:323-350 (1997).
11. Wong JM, Billiar TR. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharmacol.* 34:155-170 (1995).

12. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: regulation subserves function. *Curr Top Microbiol Immunol.* 196:1-4 (1995).
13. Chakraborty PD, Bhattacharyya D, Pal S, Ali N. In vitro induction of nitric oxide by mouse peritoneal macrophages treated with human placental extract. *Int Immunopharmacol.* 6(1):100-107 (2006).
14. Fadeel B, Kagan VE. Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils: regulation by reactive oxygen species. *Redox Rep.* 8(3):143-150 (2003).
15. Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med.* 166(12 Pt 2):S4-8 (2002).
16. Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol.* 50(10):1535-1542 (1995).
17. Seibert K, Masferrer J, Zhang Y, Gregory S, Olson G, Hauser S, Leahy K, Perkins W, Isakson P. Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl.* 46:41-50 (1995).
18. Chang KC, Paek KS, Kim HJ, Lee YS, Yabe-Nishimura C, Seo HG. Substrate-induced up-regulation of aldose reductase by methylglyoxal, a reactive oxoaldehyde elevated in diabetes. *Mol Pharmacol.* 61(5):1184-1191 (2002).
19. Kang ES, Kim GH, Woo IS, Kim HJ, Eun SY, Ham SA, Jin H, Kim MY, Park MH, Kim HJ, Chang KC, Lee JH, Kim JH, Yabe-Nishimura C, Seo HG. Down-regulation of aldose reductase renders J774A.1 cells more susceptible to acrolein- or hydrogen peroxide-induced cell death. *Free Radic Res.* 42(11-12):930-938 (2008).
20. Eggert M, Seeck U, Semmler M, Maass U, Dietmann S, Schulz M, Dotzlaw H, Neeck G. An evaluation of anti-TNF-alpha-therapy in patients with ankylosing spondylitis: imbalanced activation of NF kappa B subunits in lymphocytes and modulation of serum cortisol concentration. *Rheumatol Int.* 27(9):841-846 (2007).
21. Zhou YY, Zeng YY, Huang XY, Song B. Effects of Hesperetin on cell activation and proliferation of murine T lymphocytes in vitro. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 25(4):315-318 (2009).
22. Jamali A, Bamdad T, Soleimanjahi H, Pakdel FG, Arefian E. Acute morphine administration reduces white blood cells' capability to induce innate resistance against HSV-1 infection in BALB/c mice. *Neuroimmunomodulation.* 14(1):16-23 (2007).
23. Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev.* 226:219-233 (2008).
24. Le JM, Vilcek J. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest.* 61(6):588-602 (1989).

25. Coclet-Ninin J, Dayer JM, Burger D. Interferon-beta not only inhibits interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but stimulates interleukin-1 receptor antagonist production in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur Cytokine Netw.* 8(4):345-349 (1997).
26. Miller CH, Maher SG, Young HA. Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci.* 1182:69-79 (2009).
27. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem.* 202(1):3-14 (1991).
28. Kochert F, Krim G, Leke L, Kremp O, Risbourg B. Tumor necrosis factor (TNF-alpha)--cachectin. Physiological and pathological aspects. *Arch Fr Pediatr.* 48(9):647-656 (1991).

주 의

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