

발간등록번호

11-1543000-000245-01

한국산 봉독(Korean bee venom)을 주원료로 한
산업동물(소, 돼지, 가금류)의 질병 예방 및 치료제 개발

(The development of prophylactic and therapeutic agent for
disease of industrial animals (calf, pig, poultry) using Korean
bee venom as a main component.)

전남대학교 수의과대학

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한국산 봉독(Korean bee venom)을 주원료로 한 산업동물(소, 돼지, 가금류)의 질병 예방 및 치료제 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

년 월 일

주관연구기관명 : 전 남 대 학 교

주관연구책임자 : 서 국 현

연 구 원 : 김 선 득

연 구 원 : 조 인 영

연 구 원 : 박 준 영

세부연구기관명 : 전 남 대 학 교

세부연구책임자 : 이 봉 주

연 구 원 : 정 복 기

연 구 원 : 이 진 아

연 구 원 : 김 태 훈

제 1 협동연구기관명 : (주) 프로테옴텍

제 1 협동연구책임자 : 김 유 삼

연 구 원 : 김 범 준

연 구 원 : 이 용 주

제 2 협동연구기관명 : 충 남 대 학 교

제 2 협동연구책임자 : 조 정 원

연 구 원 : 박 민 호

연 구 원 : 나 영 국

제 3 협동연구기관명 : (주) 비센

제 3 협동연구책임자 : 박 진 규

연 구 원 : 전 중 운

연 구 원 : 현 풍 미

연 구 원 : 문 정 초

요 약 문

I. 제 목

한국산 봉독(Korean bee venom)을 주원료로 한 산업동물(소, 돼지, 가금류)의 질병 예방 및 치료제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 최근 가축전염병 발생증가로 인한 경제적 손실의 증가 및 항생제 사용규제로 인한 친환경의 항생제 대체제 개발과 기술의 보급이 시급함.
- 생 벌침은 기존에 산업동물의 질병치료제 및 면역증강 용도로 사용되어 왔지만 산업적으로 제품화에 적용하기에는 여러가지 어려움이 따르므로 건조봉독을 이용한 산업동물용 질병예방 및 치료제 개발이 필요함.
- 건조봉독의 면역활성 효능과 세균 또는 바이러스의 인공감염에 대한 항병력 효과를 검증하여 가축의 면역증강 및 전염병 예방제품으로 개발하기 위함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 봉독 가축질병치료제의 면역활성 효능검증
 - 가. 봉독의 성분별 안정화된 제형의 효능 비교
 - 나. 닭에서 봉독치료제의 면역 및 사양 효과규명
 - 다. 돼지에서 봉독치료제의 면역효과 규명
 - 라. 송아지에서 봉독치료제의 면역효과 규명
 - 마. 돼지에서 서방형 봉독치료제의 면역효과 규명
2. 봉독 가축질병치료제의 항병력 효과 검증
 - 가. 봉독을 이용한 닭의 세균성(살모넬라) 장염예방 및 치료 효과 검증
 - 나. 봉독을 이용한 돼지의 세균성(살모넬라) 장염 예방 및 치료효과 검증
 - 다. 봉독을 이용한 돼지의 PCV2와 PRRS 질환 예방 및 치료효과 검증
 - 라. 봉독을 이용한 송아지의 세균성(대장균, 살모넬라) 및 바이러스성(로타바이러스, 코로나바이러스)설사 치료 효과 검증
 - 마. 서방형 봉독을 이용한 돼지의 세균성(살모넬라) 장염 예방 및 치료효과 검증
3. 유효성분의 물리화학적 성질 규명 및 지표성분의 보존 방법 개발
 - 가. 봉독유효성분의 물리화학적 성질 규명
 - 나. 지표성분의 보존 방법 개발
 - 다. 안정성 시험
 - 라. 공동연구자들에 대한 분석업무 지원

4. 봉독의 spray 제제개발과 마이크로캡슐화를 통한 서방형 제제개발
 - 가. 봉독제형 제조를 위한 제조환경에 따른 안정성 측정
 - 나. 봉독 spray 제형 연구
 - 다. 봉독 spray 제형의 안정성 평가
 - 라. 봉독 봉입된 서방형 입자 연구 및 평가
5. 봉독 가축질병치료 및 예방제의 제품화
 - 가. 봉독채취기 개량
 - 나. 제품의 기시법 확립
 - 다. 시제품제작
 - 라. 제품등록

IV. 연구개발결과

1. 봉독 가축질병치료제의 면역활성 효능검증
 - 가. 봉독의 성분별 안정화된 제형의 효능 비교
 - 마우스에 봉독을 피하, 근육, 점안의 방식으로 적용한 결과 점안으로 수지봉독을 투여한 경우, $CD4^+/CD8^+$ 세포 비율의 증가와 라이소자임 활성의 유의성 있는 증가를 확인 할 수 있었다.
 - 마우스에 봉독을 점안, 피하, 근육 투여 후에 간독성은 발생하지 않았음을 확인하였다.
 - 나. 닭에서 봉독치료제의 면역 효과규명
 - 닭에 스프레이 형식으로 적용하였을 때 대조군에 비해 비장에서 $CD4^+:CD8^+$ T 세포 비율의 유의적인 증가, IL-18과 IFN- γ 의 상대적인 발현정도의 증가, 라이소자임의 활성이 유의적으로 증가함을 확인 할 수 있었다.
 - 다. 돼지에서 봉독치료제의 면역효과 규명
 - 봉독을 이유자돈의 주둥이 부위와 미근부에 주사한 군에서 대조군에 비해 체중 증가, 혈중 라이소자임의 활성 증가, $CD4^+/CD8^+$ ratio의 증가 및 IFN-gamma level의 증가에 유의적인 효과를 확인하였음.
 - 이유자돈에서 면역증강 효과는 봉독 1회 주사 시 최대 7일까지 그 효과가 지속되었다.
 - 라. 송아지에서 봉독치료제의 면역효과 규명
 - 봉독을 송아지 피하 접종군에서는 대조군에 비해 혈중 라이소자임의 활성 증가, IL-12 및 IFN-gamma level의 증가에 유의적인 효과가 있었음.
 - 송아지의 면역증강 효과는 정제 봉독 1회 주사 시 최대 12일까지 그 효과가 지속되었음.
 - 마. 돼지에서 서방형 봉독치료제의 면역효과 규명
 - 서방형 봉독 미근부 부위 접종군은 대조군에 비해 $CD4^+/CD8^+$ ratio의 증가 및

IFN-gamma level의 증가, IL-12 level의 증가, IL-4 level의 감소에 유의적인 효과가 있는 것을 확인하였다.

- 이러한 효과는 일반 봉독의 경우 최대 7일까지만 그 효과가 지속됐으나, 서방봉독의 경우 최대 14일까지 그 효과가 지속되어 일반봉독에 비해 더 오랫동안 면역증강효과를 나타내는 것을 확인하였음.

2. 봉독 가축질병치료제의 항병력 효과 검증

가. 봉독을 이용한 닭의 세균성(살모넬라) 장염예방 및 치료 효과 검증

- 봉독을 스프레이한 닭에 살모넬라를 공격 접종한 후, 면역지표들이 활성화 되었으며 병변의 감소 및 살모넬라 분리 및 분비가 감소됨을 확인함
- 봉독 처치군에서는 체중의 증가, 폐사율의 감소, 살모넬라에 의한 병변 정도의 감소, 간, 비장, F낭에의 살모넬라분리율의 감소를 확인하였음
- 비장에서 $CD4^+ : CD8^+$ T 세포 비율의 유의적인 증가, IL-18과 IFN- γ 의 상대적인 발현정도의 증가, 라이소자임의 활성이 유의적으로 증가함을 확인하였음

나. 봉독을 이용한 돼지의 세균성(살모넬라) 장염 예방 및 치료효과 검증

- 봉독을 이유자돈에 피하에 투여 후, 살모넬라에 인공 감염 시켰을 때 대조군에 비해 분변의 설사 정도나 세균의 수 (분변, 회장, 장간막림프절)가 감소함을 확인하였음.
- 면역학적으로 IFN- γ 의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인 할 수 있었음.

다. 봉독을 이용한 돼지의 소모성 바이러스(PCV-2와 PRRS) 질환 예방 및 치료효과 검증

- 봉독을 이유자돈의 주둥이 부위와 미근부에 투여한 후 PCV2와 PRRS 바이러스를 공격 접종 하였을 때, 대조군에 비해 혈중 라이소자임의 활성 증가, $CD4^+ / CD8^+$ ratio의 증가 및 IFN-gamma 및 IL-1 β level의 증가에 유의적인 효과가 있었음.
- 특히 미근부 주사군의 경우 혈중 또는 표적 장기인 폐, 림프절, 편도, 가슴샘에서 PRRSV수가 유의적으로 감소하였음.

라. 봉독을 이용한 송아지의 세균성(대장균, 살모넬라) 및 바이러스성(로타바이러스, 코로나바이러스) 설사 치료 효과 검증

- 봉독을 송아지 피하에 투여후 살모넬라, 용혈성 대장균 및 소로타바이러스, 소코로나바이러스를 공격 접종 하였을 때, 봉독을 주사한 군에서 대조군에 비해 IFN-gamma 및 IL-12 level의 증가와 같은 면역학적 지표의 증가를 확인 할 수 있었음.
- 대조군에 비해 봉독 투여군에서 분변의 수분함량이 감소하였으며 분변 내 접종한 병원체의 배출량이 감소하였음.

마. 서방형 봉독을 이용한 돼지의 세균성(살모넬라) 장염 예방 및 치료효과 검증

- 서방형 봉독을 이유자돈 미근부에 투여한 후에 살모넬라를 공격 접종 하였을 때, 서방봉독 투여군에서 대조군에 비해 항병능과 관련된 여러 가지 지표들이 활성화되었음.

- 설사정도의 감소 및 IFN-gamma level의 증가, IL-12 level의 증가, IL-4 level의 감소, 분변 및 표적 장기에서의 살모넬라수 감소에 유의적인 효과가 있었음.
- 일반봉독 투여군에 비교하여 서방형 봉독 투여군에서 항병능력이 더 효과적으로 강화되는 것을 확인하였음.

3. 유효성분의 물리화학적 성질 규명 및 지표성분의 보존 방법 개발

- SDS-PAGE, 2차원 전기영동, isoelectric focusing 분석법을 수행하여 건조봉독과 생봉독의 protein profile을 비교하였음.
- 주요 봉독 단백질로 알려진 hyaluronidase, phospholipase A2 및 melittin의 함량 변화를 전기영동법으로 분석할 경우, 유의한 차이를 보이지 않았음.
- 상기 3종류의 서로 다른 전기영동법을 이용하여 봉독단백질을 분리하고 주요 단백질 114종을 질량분석법으로 분석하여 102개의 단백질을 동정하였음.
- 생봉독 특이 단백질을 ESI-LC-MS/MS를 이용하여 질량분석법으로 분석한 결과, serine carboxylpeptidase, venom dipeptidyl peptidase 4, carboxylesterase-6, venom serine protease 34는 생봉독에만 존재하는 단백질이었으며, 이들에 의한 봉독의 가수분해가 발생함을 시사하고 있음.
- 이를 해결하기 위해 나노구조체에 의한 단백질의 분해 억제 방법을 고안하였음.
- 모델시스템과는 달리 나노구조체를 활용한 봉독의 안정화방법은 만족할 만한 효과를 얻지 못하였음.
- 건조봉독과 생봉독에 대한 pH 안정성 실험 결과, 봉독의 채집 및 정제과정에서 시료의 pH를 3 내지 4로 유지시키면 봉독단백질의 가수분해를 억제할 수 있음을 확인하였음.
- 4종류의 액상제형에 대해 각각 3로트에 대한 장기보존시험, 가속시험, 가속시험을 수행하였음.
- RP-HPLC에 의한 안정성 시험시료의 분석 결과, 제형2의 안정성이 가장 높았으며, 제형1의 안정성이 가장 낮았음.
- SDS-PAGE, 2차원 전기영동, isoelectric focusing, RP-HPLC, SEC-HPLC, 단백질 정량법을 개발하였으며, 제2협동, 제3협동과제의 연구과정 중 발생한 단백질의 물리화학적 제반 문제들에 대한 정보제공,
- 미지의 단백질에 대한 동정 및 분석지원업무를 지속적으로 수행하였음.

4. 봉독의 spray 제제개발과 마이크로캡슐화를 통한 서방형 제제개발

가. 봉독제형 제조를 위한 제조환경에 따른 안정성 측정

- 멜리틴 함량이 약 52% 나옴. 총 10분간 약 5%의 멜리틴 함량 감소가 일어남. dichloromethane (MC)에 봉독을 넣으면 멜리틴 농도 감소가 나타남. Sonication과 유기용매(dichloromethane)에 대한 단백질 함량 감소 나타남. 멜리틴의 경우 원래 함량 (40~50%) 값이 증류수에서 얻어졌으며 산성조건(0.1N HCl)에서는 거의 비슷한 값이 얻어졌으나 염기성 조건(0.1N NaOH)에서는 93%이상 감소한 값이 얻어졌음. 멜리틴은 산성 용액에서 안정. 염기성에서는 불안정. 봉독은 50, 70, 100% 에탄올에는 불용성이었다. 대부분의 첨가제들에서

봉독 내 멜리틴 함량의 변화는 거의 없었다. 고 농도 봉독 용액은 희석과 filtering에 대해 영향을 받지 않는다. 4°C, 차광 조건에서 28일 까지는 봉독 내 멜리틴 함량 변화가 없음. 4°C, 차광 조건에서 28일 이후 봉독 내 멜리틴 함량은 감소하기 시작.

나. 봉독 spray 제형 연구

- 모든 제형은 봉독 농도 10 mg/ml를 목표로 4개의 제형 (Formular 1,2,3,4)을 제조하였음.
- Formular 1은 고분자인 HPMC를 주 기제로 하여 제조하였음.
- Formular 2는 과당과 포도당을 점조제로 사용하여 제조하였음.
- Formular 3은 Formular 1과 2를 접목하여 제조하였음.
- Formular 4는 sucrose를 고농도로 사용하여 제조하였음.

다. 봉독 spray 제형의 안정성 평가

- 각각의 실험의 실행 시간은 0일, 1주, 2주, 4주, 8주로 하였다.
- 멜리틴 함량 실험: 2달의 기간 동안 각 제형들의 멜리틴 함량은 거의 변화가 없었다.
- 용제 및 제형 pH: 봉독을 제외한 용제의 pH는 전부다 pH 6이하의 산성으로 유지되었다.
- 용제 및 제형 점도: 순수 봉독 용액과 F 1 제형의 점도는 거의 변화가 없다. F 2~4 제형의 점도가 2 주가 지난 뒤 유의한 감소를 나타내었다.
- 납·비소 한도 시험: 납 시험은 장기보존시험기간 동안 5ppm 미만으로 적합하였다. 비소 시험은 장기보존시험기간 동안 3ppm 미만으로 적합하였다.
- 중금속 시험: 모든 제형에 중금속이 없다는 것으로 판단됨.
- 미생물 한도 시험: 생균수 시험 (일반세균)에서는 시험 기간 중 어느 페트리접시에서도 일반세균의 군집이 발견되지 않았다. 생균수 시험 (진균)에서는 시험 기간 중 어느 페트리접시에서도 진균의 군집이 발견되지 않았다. 특정 미생물 시험 (녹농균, 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균)에서는 시험 기간 중 어느 페트리접시에서도 특정미생물의 군집이 발견되지 않았다.
- SDS-PAGE를 이용한 봉독 내 멜리틴과 phospholipase A2: 시험기간 동안 각각의 제형에서 봉독의 가장 많은 함량을 차지하는 phospholipase A 2와 melittin을 각 제형에서 함유하고 있는 것을 확인할 수 있었다.
- 멜리틴 용출 시험: Formular 1은 2달간 서방출의 경향을 보여주었다. 이것은 HPMC에 의한 점도 증진의 효과로 판단됨. Fomulation 2, 3, 4는 10분 안에 대부분의 봉독이 용출되는 것이 관찰되었다. 제형의 삼투압이 높아 빠른 확산과 용출에 의한 결과라 판단됨.
- MTT test를 이용한 세포 독성 시험: 봉독이 포함되지 않은 용제에서만 세포독성을 살펴보면 F 2 제형이 다른 제형들 보다 세포독성이 적다고 판단됨.

라. 봉독 봉입된 서방형 입자 연구

- Sucrose를 사용한 입자가 사용하지 않은 입자보다 봉입률이 조금 높았다.
- Sucrose에 의한 봉입률 상승 효과는 sucrose가 입자 제조 과정 동안 membrane bilayer의 파괴를 막는 membrane protecting 효과를 갖기 때문에 발생한다고 판단됨.
- Sucrose를 사용한 입자는 90% 이상의 yield값을 가졌다.
- 지금까지 실행된 실험을 전체적으로 보면 둘 다 높은 yield 값을 가졌다고 판단됨.

- VC 1과 VC 2 비슷한 drug loading 값을 가졌다.
- 이것은 VC 1이 봉입률도 높지만 yield값도 높아서 drug loading을 계산하는 공식에서 분모, 분자 모두 커서 발생한 결과라 판단됨.
- 이 최적화된 PLGA 입자는 전남대로 보내어져 동물실험이 진행되어 3~4주 정도 봉독의 효능을 나타낸 다는 것을 확인하였다.

5. 봉독 가축질병치료 및 예방제의 제품화

- 일체형 봉독 채집 장치를 제작하여 봉독을 대량 생산하였으며 이로부터 새롭게 얻은 봉독의 성분들을 분리 동정하여 구명하였음.
- 기존의 개발된 봉독은 주성분인 melittin만을 지표로 하여 제품화 하였지만 (주)비센은 봉독의 수용성 물질과 지용성물질을 일정비율 함유하는 봉독(수지봉독)을 제조하여 이 원료로부터 특별히 동물의 면역기능을 증강시키는 분획을 선정하였으며, 봉독의 성분들에 대한 분석방법을 확립하였음.
- 특별히, 기존에는 시도되지 않았던 봉독의 비 단백질 분획으로부터 지용성 물질들인 11(Z)-eicosen-1-ol, dinonyl phthalate, Chrysin 및 Pinocembrin 등의 구조를 동정하여 규명하였음. 그 밖에 봉독 효소들의 활성 측정을 통해 봉독의 생물활성 검정을 위한 기시법을 확립하였음.
- 육계의 면역기능을 활성화 시켜 항병력을 갖는 제품을 제조하기 위하여 산제의 형태의 시제품을 제작하여 임상시험 신청단계에 있으며 제품은 가금류의 면역증강제 “아피치스”로 시판하기 위해 상표등록 되었음.
- 닭 이외의 돼지(아피돈스) 및 소(아피우스)에 대한 상표출원도 완료되었음.
- 그 밖에 소, 돼지 등의 면역증강제로서 PLGA코팅 제제에 대한 제품등록을 위한 추가적인 시험(사양시험 등)은 현재 많은 비용이 발생될 것으로 추정 되어 이를 별도로 수행 할 수 있는 방법을 모색 중임.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 제 1협동과제의 연구성과로 특허 봉독단백질의 안정성 증진방법(출원번호 10-2013-0095787)를 출원하였음.
- 제 2협동과제의 연구 성과로 '봉독을 함유한 생분해성 고분자 미립구 및 이의 제조방법'에 대한 특허를 출원(출원번호: 10-2013-0097353)하였으며 2012년 춘계약학회(제주) 및 추계약학회(서울)에서 “Preparation and characterization of melittin-loaded gelatin nanoparticles microspheres made by nanoprecipitation” 과 “Preparation and Characterization of bee venom Loaded Microparticles by Precipitation” 라는 제목의 연구결과를 발표하였음. 또한 더욱 진행된 연구결과를 2013년 춘계약학회 (순천)에서 Preparation and characterization of bee-venom-loaded PLGA nano/Microparticle라는 제목의 연구결과를 발표하였음.
- 제 3협동과제의 연구 성과를 바탕으로 특허 등록 일벌의 생물학적 공격성을 유도하여 다량의 봉독을 효율적으로 채집 할 수 있도록 하는 봉독채집기로 특허출원(출원번호 10-2012-0066198) 및 등록(KP10-1240291)하였으며, 면역증강 봉독조성물 및 그제조방

법(10-2010-0130671), 증체율 및 면역기능이 향상된 봉독조성물(10-2012-0069221), 면역증강, 염증치료 및 통증치료용 수지봉독과 이를 이용한 비경구 투여용 조성물 및 그 제조방법(출원번호: 10-2012-0065718)에 대한 특허를 출원하였고, 2011년 아르헨티나에서 개최된 세계양봉대회에서 Pulsed electric field(PEF)-treated bee venom has different activities both in vitro and vivo와 Comparison the protein decomposition of honeybee venom in different collecting methods 제목으로 학술 발표함.

- 제 1세부 과제의 연구성과로 Journal of Veterinary Medical Science 저널(SCI급)에 논문을 발표하였음 (논문 제목: Immunoprophylactic Effects of Administering Honeybee (*Apis mellifera*) Venom Spray against *Salmonella Gallinarum* in Broiler Chicks.)
- 현재 SCI급 논문 1편은 투고 중(논문제목: Immunomodulatory effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on pig immune systems and its antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus)에 있으며 그 외 2편은 준비 중에 있어 총 4편의 SCI급 논문이 발표될 예정임.
- 2013년 9월 25일부터 9월 28일까지 대구에서 개최되는 국제축산박람회에 참가하여 본 연구에서 확인된 봉독의 효능을 축산농가에 홍보함으로써 제품출시에 따른 매출로 이어질 수 있도록 준비 중이며 동시에 본 박람회를 통해 축산시장에 대한 규모, 품목, 경쟁제품 등에 대한 정보를 구체적으로 확보하여 마케팅 전략 수립에 활용하였음.
- 2013년 9월 26일부터 10월 4일까지 우크라이나 키예프에서 개최되는 세계양봉대회에 참가하여 지금까지의 연구성과 및 제품화에 대한 전략 수립에 활용하였음.
- 이 과제를 통해 확인한 봉독 스프레이에 의한 닭에서의 면역증강효과와 항병력효과 결과를 이용하여 닭의 면역증강 및 항병력 증강제제 (상품명: 아피칩스)를 개발하여 현재 제품 등록을 진행 중임. 또한 돼지에 적용한 서방형 제제는 지속적인 효과가 유지됨을 확인하였으며, 이 결과를 토대로 차별화 된 제품으로 개발할 계획임.

SUMMARY

I. Title

The development of prophylactic and therapeutic agent for disease of industrial animals (calf, pig, poultry) using Korean bee venom as a main component.

II. Objectives and Requirement of Research and Development

- Recently, economic losses in industrial animal has been raised because of the increase of infectious disease incidence rate. Also, Korean government has been banned of using antibacterial agent to industrial animal from 2012. Therefore, development of prophylactic and therapeutic agent is needed which can substitute antibacterial agent and also, eco-friendly.
- Bee venom has already been demonstrated as prophylactic and therapeutic agent. Thus, development of immune-enhancing and therapeutic agent is needed using bee venom source, which can be applied to industrial animals such as chick, pig, calf.
- For the development of prophylactic and therapeutic agent in industrial animal, analysis of bee venom on immune enhancing effect and antimicrobial and antiviral effect using animal model is needed.

III. Research coverage and scopes

1. Analysis of Korean honey bee venom on immune enhancing effect as a industrial animal therapeutic agent

- A. Comparison of Korean honey bee venom components on immune activation (the prophylactic effects in mouse model)
- B. Analysis of prophylactic and production stimulating effect of honey bee venom on chicks
- C. Analysis of prophylactic effect of Korean honey bee venom on pigs
- D. Analysis of prophylactic effect of Korean honey bee venom on calves
- E. Analysis of prophylactic effect of PLGA coated Korean honey bee venom on pigs

2. Analysis of Korean honey bee venom on antimicrobial and antiviral effect as a industrial animal therapeutic agent

- A. Analysis of the antimicrobial effects of Korean honey bee venom against chick Salmonellosis
- B. Analysis of the antimicrobial effects of Korean honey bee venom against pig Salmonellosis
- C. Analysis of the antiviral effects of Korean honey bee venom against PMWS

related PCV-2 and PRRS virus

- D. Analysis of the antimicrobial and antiviral effects of Korean honey bee venom against PCV-2 and PRRS viral disease
- E. Analysis of the antimicrobial effects of PLGA coated Korean honey bee venom against pig Salmonellosis

3. Stabilization and standardization of honey bee venom protein

- 1. Physicochemical characterization of honey bee venom protein
- 2. Development of storage method for standard compound in honey bee venom
- 3. Stability test
- 4. Protein analysis supporting for co-workers
- 5. Conclusion and discussions

4. Development of spray formulation of bee venom and sustained formulation of bee venom through microencapsulation

- 1. Stability study of bee venom according to the fabrication environment of bee venom formulation
- 2. Studies on the spray formulation of bee venom
- 3. Stability test of spray formulation of bee venom
- 4. Studies on preparation and evaluation of the bee venom-loaded sustained particles

5. Process of Korean Bee Venom for Mass production and Quality Control for the Standardization of manufactures

- 1. Mass production of Korean honey bee venom
- 2. Separation, Purification and Processing of Korean honey bee venom
- 3. Standard methods of examination on Korean honey bee venom
- 4. Formulation of Korean honey bee venom for Spray

IV. Results of Research and Development

1. Analysis of Korean honey bee venom on immune enhancing effect as a industrial animal therapeutic agent

- A. Comparison of Korean honey bee venom components on immune activation (the prophylactic effects in mouse model)
 - Korean bee venom was administrated to mouse as subcutaneous (SC), intramuscular (IM) or ocular way, respectively, and ocular group showed that CD4⁺/CD8⁺ ratio and lysozyme activity were significantly increased compared to those of control group.
 - Liver toxic effect was not observed in SC, IM and ocular group.

B. Analysis of prophylactic and production stimulating effect of Korean honey bee venom on chicks

- Korean honey bee venom was administrated using spray method to chicks and significant increase was observed in CD4⁺/CD8⁺ ratio, relative mRNA expression level of IL-18 and IFN- γ and lysozyme activity.

C. Analysis of prophylactic effect of honey bee venom on pigs

- Korean honey bee venom was administrated as snout and tail base route in pig and significant increase was observed in body weight, CD4⁺/CD8⁺ ratio, relative mRNA expression level of IFN- γ and lysozyme activity.

D. Analysis of prophylactic effect of Korean honey bee venom on calves

- Korean honey bee venom was administrated as subcutaneous way to neck region in calves. Significant increase was observed in relative mRNA expression level of IFN- γ and lysozyme activity.

E. Analysis of prophylactic effect of PLGA coated Korean honey bee venom on pigs

- PLGA coated Korean honey bee venom and non-PLGA coated Korean honey bee venom were injected to tail base region, which is the optimal injection route for bee venom as revealed in former study, in pig for the demonstration of immune boosting effect.
- Significant increase was observed in CD4⁺/CD8⁺ ratio and relative mRNA expression level of IL-12 and IFN- γ , and also, relative mRNA level of IL-4 was markedly decrease in bee venom injection group.
- These immune enhancing effect prolonged until 14 days after injection of PLGA Korean honey bee venom in pigs. While, immune enhancing effect persisted only 7 days in non-PLGA Korean honey bee venom group.

2. Analysis of Korean honey bee venom on antimicrobial and antiviral effect as a industrial animal therapeutic agent

A. Analysis of the antimicrobial effects of honey bee venom against chick Salmonellosis

- Korean bee venom was administrated using spray method to broiler chicks and then *Salmonella* Gallinarum was infected via oral route. After the infection, a variety of immunological and antimicrobial status was evaluated. Significant increase was observed in body weight, CD4⁺/CD8⁺ ratio, relative mRNA expression level of IL-18 and IFN- γ and lysozyme activity.
- Also, mortality rate, clinical symptoms and bacterial counts in liver, spleen

and bursa were also markedly decreased in bee venom spray group.

- B. Analysis of the antimicrobial effects of honey bee venom against pig Salmonellosis
- Korean honey bee venom was injected to pig and then *Salmonella* Typhimurim was infected via oral route. After the infection, a variety of immunological and antimicrobial status was evaluated.
 - Significant increase was observed in relative mRNA expression level of IFN- γ . Also, severity of diarrhea and bacterial counts in feces, ileum and mesenteric lymph node were also markedly decreased in bee venom group.
- C. Analysis of the antiviral effects of honey bee venom against porcine postweaning multisystem wasting syndrome (PMWS) related porcine circovirus type 2(PCV-2) and porcine reproductive and respiratory(PRRS) virus
- Korean honey bee venom was administrated as three separate way, snout, neck, and tail base route to pig, and then PMWS related PCV-2 and PRRS virus were infected via respiratory route.
 - Significant increase was observed in body weight, CD4⁺/CD8⁺ ratio, relative mRNA expression level of IL-1 β and IFN- γ and lysozyme activity in snout group and tail base group.
 - The PRRSV and PCV2 viral titer were also highly reduced in lung, bronchial lymph node, thymus and tonsil.
 - Therefore, snout and tail base route is the best way to injection of Korean honey bee venom in pigs for the acquirement of immune enhancing effect and anti-viral effect.
- D. Analysis of the antimicrobial and antiviral effects of Koran honey bee venom against bacterial pathogen (Enterohemolytic *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium) and viral pathogen (bovine rota virus and bovine corona virus) in calves
- Korean honey bee venom was administrated as subcutaneous way to neck region in calves, and then bacterial pathogen (Enterohemolytic *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium) and viral pathogen (bovine rota virus and bovine corona virus) were infected via oral route.
 - Significant increase was observed in IL-12 and IFN- γ . Also, severity of diarrhea and bacterial counts and viral titer in feces were also markedly decreased in bee venom group.
- E. Analysis of the antimicrobial effects of PLGA coated bee venom against pig

Salmonellosis

- PLGA coated Korean honey bee venom and non-PLGA coated Korean honey bee venom were injected to tail base region, which is the optimal injection route for bee venom as revealed in former study, and then *Salmonella* Typhimurim was infected via oral route.
- Significant increase was observed in CD4⁺/CD8⁺ ratio and relative mRNA expression level of IL-12 and IFN- γ , and also, relative mRNA level of IL-4 was markedly decrease in bee venom injection group.
- Also, severity of diarrhea, bacterial counts in feces and *Salmonella* target organ, such as liver, spleen and cecum were also markedly decreased in PLGA coated Korean honey bee venom group. While, non-PLGA bee venom group only showed partial immune enhancing effect and anti-microbial effect compared to PLGA coated bee venom group.
- Therefore, PLGA coated bee venom might more better candidate for the therapeutic agent for the anti-Salmonellosis and other microbial diseases.

3. Stabilization and standardization of Korean honey bee venom protein

A. Physicochemical characterization of bee venom protein

- Physico-chemical properties of bee venom proteins have been characterized in order to minimize the inactivation and loss of functional molecules in bee venom during the preparation and purification.
- The 3 different types of electrophoretic methods, SDS-PAGE, isoelectric focusing and 2-dimensional electrophoresis, had been performed and optimized to compare the protein profiles between naive and dried bee venom.
- The levels of major proteins of bee venom, hyaluronidase, phospholipase A2 and melittin, have not been significantly changed during dry and purification process.
- Total 114 protein spot have been analyzed by LC-MS/MS, which identified 102 proteins successfully.
- The function of naive bee venom-specific protein have been searched, which could lead us to develop novel preparation and purification methods for extended stability. The data have shown that several kinds of protease, serine carboxypeptidase, venom dipeptidyl peptidase 4, carboxylesterase-6, and venom serine protease 34, were found exclusively in naive bee venom, which implied those protease could digest and/or inactivate the bee venom proteins during the preparation and purification process.

B. Development of storage method for standard compound in bee venom

- To setup the method for validation of standard compound, SDS-PAGE,

RP-HPLC, and SEC-HPLC (Size Exclusion chromatography HPLC) were carried out. The inhibition method for protein degradation using nano-structural molecules have been devised, which worked at model system composed of trypsin and bovine serum albumin. However, it did not successfully inhibit the proteolysis of bee venom protein.

- The incubation of naive bee venom in neutral pH led to change slightly the protein profile on SDS-PAGE, which might be caused by some proteases. We have proposed the improved methods for preparation and purification process of bee venom, carried out at slightly acidic pH to block protease activity.

C. Stability test

- The stability tests for 4 different formulations of bee venom product have been performed on the basis of 'Guideline for stability test of veterinary pharmaceuticals (Animal and Plant Quarantine Agency, Notification No. 2008-15)' to supply the scientific data for establishment of the term of validity.
- RP-HPLC has been run to analyze the melittin contents of sample for long-term test, accelerated test and stress test. The data showed formulation #2 maintained prolonged stability, but formulation #1 elicited poorer stability.

D. Protein analysis supporting for co-workers

- We have also supported our co-workers of Wissen Co. and Chungnam Univ. to analyze physico-chemical properties of bee venom protein and consulted about method of protein analysis and validation during research period.

4. Development of spray formulation of bee venom and sustained formulation of bee venom through microencapsulation

- Stability study of bee venom according to the fabrication environment of bee venom formulation: To figure out the stability of bee venom according to the fabrication condition of bee venom formulation, the effect of organic solvent, sonication and pH was examined. Also, the effects of heat and light were observed.
- Studies on the spray formulation of bee venom: Four kinds of formulation was prepared according to the pharmaceutical excipients. Formulation 1 showed the sustained release profile of melittin.
- Stability test of spray formulation of bee venom: Stability test was processed for 8 weeks. The melittin amount was maintained. pH of the solvent of bee venom was maintained below 6.0. The limit test of lead, arsenic was satisfied

under 5 ppm. The heavy metal test was satisfied. Also, The limit of bacterial test was satisfied.

- Studies on preparation and evaluation of the bee venom-loaded sustained particles: The size of PLGA particles employing sonication method was about 500 nm. But the size of PLGA particles employing homogenization method was about 2 μ m. Zeta-potentials of PLGA particles were negative value. FT-IR results detected that bee venom was completely encapsulated in PLGA by disappearing amine and amide peaks. In addition, bee venom in PLGA particles was not disintegrated and intact by SDS-PAGE analysis. The release of bee venom showed a sustained profile during 1 month through in vitro release study. These bee venom-loaded PLGA particles could resolve patient inconvenience with the remarkable advantage of reduced number of injections.

5. Process of Korean Bee Venom for Mass production and Quality Control for the Standardization of manufactures

- Wissen newly manufactured all-in-one device for collecting bee venom (BV), and separation, identification, and characterization of the active ingredients from the fresh natural bee venom were carried out by way of producing bee venom in bulk.
- In contrast to the existing products containing BV ingredients which have been commercialized on the basis of mellitin content as a sole index compound, the specialized form of BV containing water & lipid-soluble ingredients has been manufactured, and the BV fraction reinforcing immune function has been selected and its quantitative analytical methods have also been manifested and established.
- Particularly, the lipid-soluble ingredients such as 11(Z)-eicosen-1-ol, Chrysin, and Pinocembrin were isolated from the non-protein BV fraction which has never been studied, and their chemical structures were identified. Also, the standard analytical methods for determining biological activities of BV by assaying the enzyme activities such as HAase (hyaluronidase), PLA2 (Phospholipase A2) etc. were established.
- The powder-prototype with enhancing immune activities has been manufactured and its clinical protocol is going to be submitted to NVRQS (National Veterinary Research and Quarantine Service). For commercialization, it was registered as the trade mark "Api Chicks ", immuno-potentiator for poultry.
- Besides this, the trade marks, 'Api Dons' for pigs, 'Api Woos' for oxen, were applied for registration. In addition, the trade mark registration of PLGA-coating immuno-potentiator for oxen and pigs requires more other tests which are expected to cost-consuming procedure, thus we are considering about the possibilities for separate research activities.

V. Application of Developed Techniques

- Two patent, Enhancement of stability in bee venom protein(patent number: 10-2013-0095787)' and 'Immune enhancing effect of bee venom product and its production method (patent number: 10-2012-0065718)' , were applied on the basis of experimental results of 1st cooperation project.
- The patent of 'Bee venom containing biodegradable polymer and its production method (patent number: 10-2013-0097353)' was applied on the basis of experimental results of 2nd cooperation project.
- The paper of 'Immunoprophylactic Effects of Administering Honeybee (*Apis mellifera*) Venom Spray against *Salmonella Gallinarum* in Broiler Chicks.' was published in Journal of Veterinary Medical Science (SCI journal) on the basis of experimental results of 1st particular project.
- Now, we are submitting the one paper, 'Immunomodulatory effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on pig immune systems and its antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus' , and preparing the submission about the 2 articles.
- We are registering a new product about immune and antimicrobial ability enhancer in chicks (product name: Apichicks) on the basis of experimental results of immune enhancing effect and therapeutic effect in chicks through the bee venom spray method.
- Also, we confirmed that the prolonged effect of PLGA coated bee venom in pigs, and plan to develop the innovative product on the basis of experimental results.
- We' re going to attend to 'Korea International Livestock Expo 2013' in Daegu, Korea on 25, Sep ~ 28, Sep and promote the efficacy of bee venom on the basis of present experimental results. Also, we plan to collect the information about the market scales, product list, and competitive product in this Expo, and then establish the marketing strategy concretely.
- We plan to participate the 'Apimondia International Apicultural Congress' in Kiev, Ukraine and present about our research results.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	21
Chapter 2. Present status of the technical development	23
Chapter 3. Materials, methods, and results	24
Part 1. Analysis of Korean honey bee venom on immune enhancing effect as a industrial animal therapeutic agent	24
1. Purpose of the study	24
2. Comparison of Korean honey bee venom components on immune activation (the prophylactic effects in mouse model).....	24
3. Analysis of prophylactic and production stimulating effect of honey bee venom on chicks	39
4. Analysis of prophylactic effect of Korean honey bee venom on pigs	60
5. Analysis of prophylactic effect of Korean honey bee venom on calves	68
6. Analysis of prophylactic effect of PLGA coated Korean honey bee venom on pigs	72
Part 2. Analysis of Korean honey bee venom on antimicrobial and antiviral effect as a industrial animal therapeutic agent	79
1. Purpose of the study	79
2. Analysis of the antimicrobial effects of Korean honey bee venom against chick Salmonellosis	79
3. Analysis of the antimicrobial effects of Korean honey bee venom against pig Salmonellosis	101
4. Analysis of the antiviral effects of Korean honey bee venom against PMWS related PCV-2 and PRRS virus	113
5. Analysis of the antimicrobial and antiviral effects of Korean honey bee venom against PCV-2 and PRRS viral disease	127
6. Analysis of the antimicrobial effects of PLGA coated Korean honey bee venom against pig Salmonellosis	138
Part 3. Stabilization and standardization of honey bee venom protein	148
1. Physicochemical characterization of honey bee venom protein	148
2. Development of storage method for standard compound in honey bee venom	160
3. Stability test	164
4. Protein analysis supporting for co-workers	172
5. Conclusion and discussions	176
Part 4. Development of spray formulation and sustained formulation of bee venom through microencapsulation	178

1. Stability study of bee venom according to the fabrication environment of bee venom formulation	178
2. Studies on the spray formulation of bee venom	187
3. Stability test of spray formulation of bee venom	189
4. Studies on preparation and evaluation of the bee venom-loaded sustained particles	211
 Part 5. Process of Korean Bee Venom for Mass production and Quality	
Control for the Standardization of manufactures	230
1. Mass production of Korean honey bee venom	230
2. Separation, Purification and Processing of Korean honey bee venom	236
3. Standard methods of examination on Korean honey bee venom	242
4. Formulation of Korean honey bee venom for Spray	256
 Chapter 4. Achievements and contributions of research and development	 261
Chapter 5. Application of research and development	262
Chapter 6. International scientific and technical reference materials	269
Chapter 7. List of registered research equipments	270
Chapter 8. References	271

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절 봉독을 이용한 가축치료제의 면역활성 효능 검증	24
1. 연구목표	24
2. 정제봉독의 안정화된 제형의 효능비교(마우스).....	24
3. 닭에서 봉독치료제의 면역 및 사양 효과규명	39
4. 돼지에서 봉독치료제의 면역효과 규명	60
5. 정제봉독의 투여에 따른 송아지에서의 면역증강효과	68
6. 서방형 봉독 제제의 투여에 따른 돼지에서의 면역 효능 평가	72
제 2 절 봉독을 이용한 가축치료제의 닭, 돼지, 소에서의 세균성 및 바이러스성 질병에 대한 항병력 효과 연구	79
1. 연구목표	79
2. 최종 선별된 정제 수지봉독의 육계에서 면역효능평가 및 수지봉독 분무에 의한 육계에서의 살모넬라 감염증 예방효과	79
3. 돼지에서 최종 선별된 수지봉독의 투여에 따른 살모넬라 감염증 예방효과.....	101
4. PCV2와 PRRSV에 동시에 인공 감염된 이유자돈에서 정제 수지봉독의 예방효과.....	113
5. Bovine rota virus, Bovine corona virus, <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium 혼합 인공감염된 이유자돈에서 정제 수지봉독의 예방효과	127
6. <i>Salmonella</i> Typhimurium에 인공 감염된 이유자돈에서 서방형 봉독제제의 예방효과	138
제 3 절 생봉독 성분의 안정화 및 유효성분들의 규격화	148
1. 봉독유효성분의 물리화학적 성질 규명	148
2. 지표성분의 보존 방법 개발	160
3. 안정성 시험	164
4. 공동연구자들에 대한 분석업무 지원	172
5. 종합결론 및 고찰	176
제 4 절 봉독의 spray 제제개발과 마이크로캡슐화를 통한 서방형 제제개발	178
1. 봉독제형 제조를 위한 제조환경에 따른 안정성 측정	178
2. 봉독 spray 제형 연구	187
3. 봉독 spray 제형의 안정성 평가	189
4. 봉독 봉입된 서방형 입자 연구 및 평가	211
제 5 절 봉독 가축질병치료 및 예방제의 제품화	230
1. 봉독의 대량생산	230
2. 봉독의 분리, 정제 및 전처리	236
3. 봉독(bee venom) 의 기시법 확립	242

4. 봉독제형 개발	256
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	261
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	262
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	269
제 7 장 연구시설·장비 현황	270
제 8 장 참고문헌	271

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 의한 경제적 손실의 증가

최근 축산업은 국민소득 증가와 식생활의 서구화로 비약적인 성장을 하였으나, 최근 가축 전염병이 빈번히 발생하여 큰 문제가 되고 있으며, 국제 교역이 점차 증대되고 밀집사육이 보편화됨에 따라 우리나라에도 가축질병의 발생빈도가 점차 늘어나는 추세로, 가축 질병으로 인한 경제적 손실액은 국내 연간 축산 총생산액(53,112억)의 약 20%인 10,622억원으로 추정하고 있다.

2. 집단사육으로 인한 전염성 질병에 대응할 항병력 감소

국내 축산업은 현재 대규모화 및 전업화 추세로 전환되고 있으며, 이에 따른 사양관리 체계 역시 변화가 이루어지고 있다. 대단위 집단밀집 사육화는 각종 스트레스를 유발하게 되고 이에 따라 면역력의 저하 등을 유발하여 질병발생에 취약하게 되며, 또한 악성 전염병이 발생하면 농장 전체에 걸쳐 만연화 되어 상재질병으로 토착화되어 지속적으로 막대한 경제적 피해가 발생하고 있다. 이러한 점으로 가축사육에 있어서 생산비 절감과 고품질 축산물의 생산을 위하여 질병 발생 원인이 되는 각종 요인제거와 과 질병 발생의 예방기준 설정 등이 요구되고 있으며, 질병저항성 면역물질 개발로 가축 면역력 증대를 통한 질병발생을 억제하는 기술개발이 필요하다.

3. 항생제 사용 억제로 인한 항생제 대체제 개발과 기술의 보급이 시급함

축산분야에서 사용되는 항생제는 가축의 질병 예방 및 생산성 향상을 위하여 주사나 사료는 음수에 혼합하여 급여하는 방식으로 사용되고 있으며, 현재 우리나라의 항생제 사용량은 선진국 대비 약 20 ~ 30배 이상의 많은 양의 항생제를 사용하고 있다. 한편 전 세계적으로 광범위한 항생제 남용과 항생제 과다 사용으로 인하여 축산식품유래 항생제 내성미생물의 발생률이 점차 높아지고 있어, 유럽에서는 2006년에 우리나라는 2011년에 항생제 사료혼합을 전면금지 하기로 하였다. 그러나 질병예방 및 증체율 향상 등을 목적으로 사용한 항생제들의 사용이 불가능 할 경우 증체율 감소 등의 생산성 저하와 각종 질병의 발생으로 인한 손실 등으로 생산비가 증가되어 국제 경쟁력 약화 등 국내 축산업의 경쟁력 약화가 초래될 것이다.

4. 가축질병에 대한 봉독제품의 개발 필요성

최근 소비자들의 의식변화에 따라 고품질의 안전 축산물의 요구가 급증하고 있다. 이러한 환경 변화에 따라 유기축산, 친환경 축산 등 녹색축산에 대한 관심이 높아지고 있으며, 축산 농가에서는 다양한 생균제, 효소제, 유기산제, 생약(식물)추출물, 면역증강제, 베타글루칸

등의 항생제 대체제에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 점으로 외부에서 침입하는 전염성질병의 원인체에 대한 질병저항성 면역물질 개발하여 가축면역력 증대 및 생리활성 물질, 친환경 녹색기술을 통한 항생제 저감 기술 개발 등이 필요하며, 특히 최근 질병치료제 및 면역증가제로 주목을 받고 있는 봉독에 대한 가축질병 예방 및 치료제 개발이 필요하다.

그동안 사용되어 왔던 기존 생봉침은 동물약품으로 산업화가 불가능하기 때문에 정제 봉독을 사용하여 제품을 만들었지만 생봉독의 건조과정에서 초래되는 일부 활성 물질의 소실, 변성 때문에 효능의 안정화에 어려운 문제가 있었다. 현재의 봉독치료 방법을 과학화하여 체계적인 활용법을 구축(건조봉독에는 포함되지 않는 천연 생봉독의 유용 활성성분을 활용할 수 있도록)하여 친환경적이고 항생제 저감을 통한 녹색 축산을 구현하기 위하여 산업동물(소, 돼지, 닭)에 대하여 적용 방법이 간편하면서 안전적이며, 봉독제품이 안정하고 효과적인 신개념의 봉독 치료제의 개발이 필요하다.

또한 국내 축산의 가장 큰 문제가 되는 세균성 및 바이러스에 의한 전염성 질병에 대한 가축용 치료 및 예방제로 사용하기위하여 축종(소, 돼지, 닭)의 특성에 따라 적용할 수 있는 봉독제품의 개발이 필요하다.

제 2 절 연구개발의 최종 목표

- 천연 생봉독에 가깝게 그 구성 유효성분들을 안정화, 규격화 한 한국산 건조봉독을 주성분으로 가공 정제하여 항균 및 면역활성이 현저히 강화된 제품으로 제조, 산업동물(소, 돼지 및 가금류)의 세균 및 바이러스에 의한 전염성 질환에 대한 예방 및 치료제로 개발하고자함.
- 봉독제품의 개발을 위하여 생봉독 성분의 안정화 및 유효성분들의 규격화(표준화)와 안정적인 효능을 유지하는 마이크로캡슐화를 통한 서방형 제제를 개발하고자함.
- 소, 돼지, 닭의 세균 및 바이러스에 의한 전염성 질병의 치료 및 예방제를 개발코자 하며, 닭에서는 분무용 치료제, 돼지와 소에서는 유침과 무침용으로 개발코자 한다.
- 건조봉독의 면역활성 효능과 세균 및 바이러스의 인공감염에 대한 항병력 효과를 검증하여 건조봉독을 이용한 가축의 면역증강제 및 전염병 예방제품을 개발하고자 함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

봉독을 이용한 동물약품은 (주) 삼양애니팜에서 미국산 봉독을 원료로 하여 개관절염 치료제인 아피멜레나 주사제가 유일하게 등록되어 있으며, 가축에 사용되는 봉독은 살아있는 벌을 이용한 생봉독으로 치료하여 효과가 뛰어나다는 임상적인 결과만 도출되었을 뿐 산업적으로는 전혀 이용이 불가능하며, 산업동물용 치료제로 등록된 제품은 전무한 실정임

2. 국외 기술개발 현황

뉴질랜드의 API Health NZ Ltd는 봉독 제품과 관련하여 세계적인 선도 업체이긴 하나 표준화, 또는 질병의 예방 및 치료목표에 맞는 산업화 단계의 연구는 시도하지 않고 있으며 다만 양봉산물의 일부로써 봉독의 용도개발 차원에서 원료를 가공 제품을 생산 판매하는 정도로 아직 기술의 기업화 단계에 이르렀다고 보기는 어려움.



제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 봉독을 이용한 가축치료제의 면역활성 효능 검증

(제 1 세부과제 : 전남대학교 수의과대학 서국현)

1. 연구목표

- 가. 봉독의 성분별 안정화된 제형의 효능 비교
- 나. 닭에서 봉독치료제의 면역 및 사양 효과규명
- 다. 돼지에서 봉독치료제의 면역효과 규명
- 라. 송아지에서 봉독치료제의 면역효과 규명
- 마. 돼지에서 서방형 봉독치료제의 면역효과 규명

2. 정제봉독의 안정화된 제형의 효능비교(마우스)

가. 마우스에서 수지봉독의 점안 투여에 따른 안전성 및 면역효능의 평가

(1) 실험동물

6주령 암컷 ICR 마우스 12마리를 완전 임의로 6수로 구성된 2개군으로 나누었다.

- Group 1 (Control): 용제만을 점안
- Group 2 (LWBV+i): 수지봉독(수지비율 1:0.25) + Hyaluronidase inhibitor

(2) 수지봉독의 투여 농도, 경로, 용량 및 횟수

- 수지봉독의 투여 농도 : 2.1mg/ml
- 수지봉독의 투여 경로 : 점안
- 수지봉독의 투여 용량 : 10ul/each e ye (총 20ul/mouse)
- 수지봉독의 투여 횟수 : 3일 간격으로 총 2회 실시
- 대조군은 수지봉독을 제외한 용제만을 실험군과 동일하게 점안하였다.
- 최종 수지봉독 점안 일일 후에 부검을 실시하여 안전성 평가 및 면역 효능을 평가하였다.

(3) 안전성 평가

(가) *in vivo* 간독성 검사 (Liver function test)

간독성 평가 항목은 총 5가지로 다음과 같다

- Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT; AST), Glutamic pyruvic transaminase (GPT; ALT), Alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase (LDH), Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)

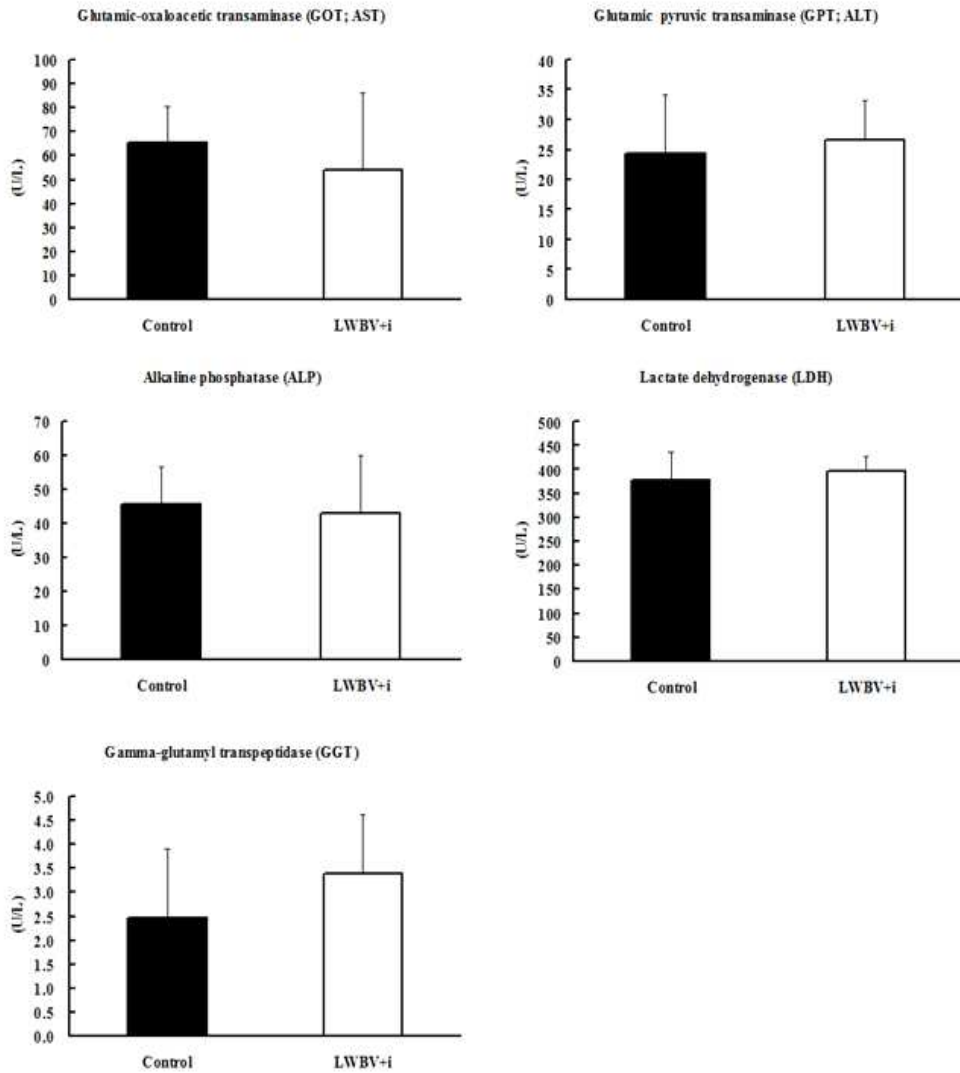


Fig 1.1. 대조군과 수지봉독 점안군의 간효소 지수. 대조군과 수지봉독 점안군의 간효소 지수가 차이가 없음을 확인 할 수 있었다 (P < 0.05).

간독성이나 간세포 파괴시 급격히 증가하는 간효소들의 지수가 대조군과 수지봉독 점안군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 수지 봉독 2회 점안은 간독성을 일으키지 않는다고 하겠다.

(4) 마우스에서 수지봉독 점안의 면역효능평가

(가) 수지봉독 점안 후 마우스의 면역세포 비율 분석

수지봉독 점안 후 마우스 비장에서 림프구 아세포인 CD3⁺ T 세포, CD19⁺ B 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포의 비율을 측정하였다. 결과는 Fig 1.2와 같다. 즉 CD3⁺ T 세포 비율이 약간 증가한 경향을 보였으며, 그 중에서도 CD4⁺ T 세포의 비율이 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다. CD4⁺ T 세포의 증가를 통해 CD4⁺/CD8⁺ 세포 비율 또한 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다.

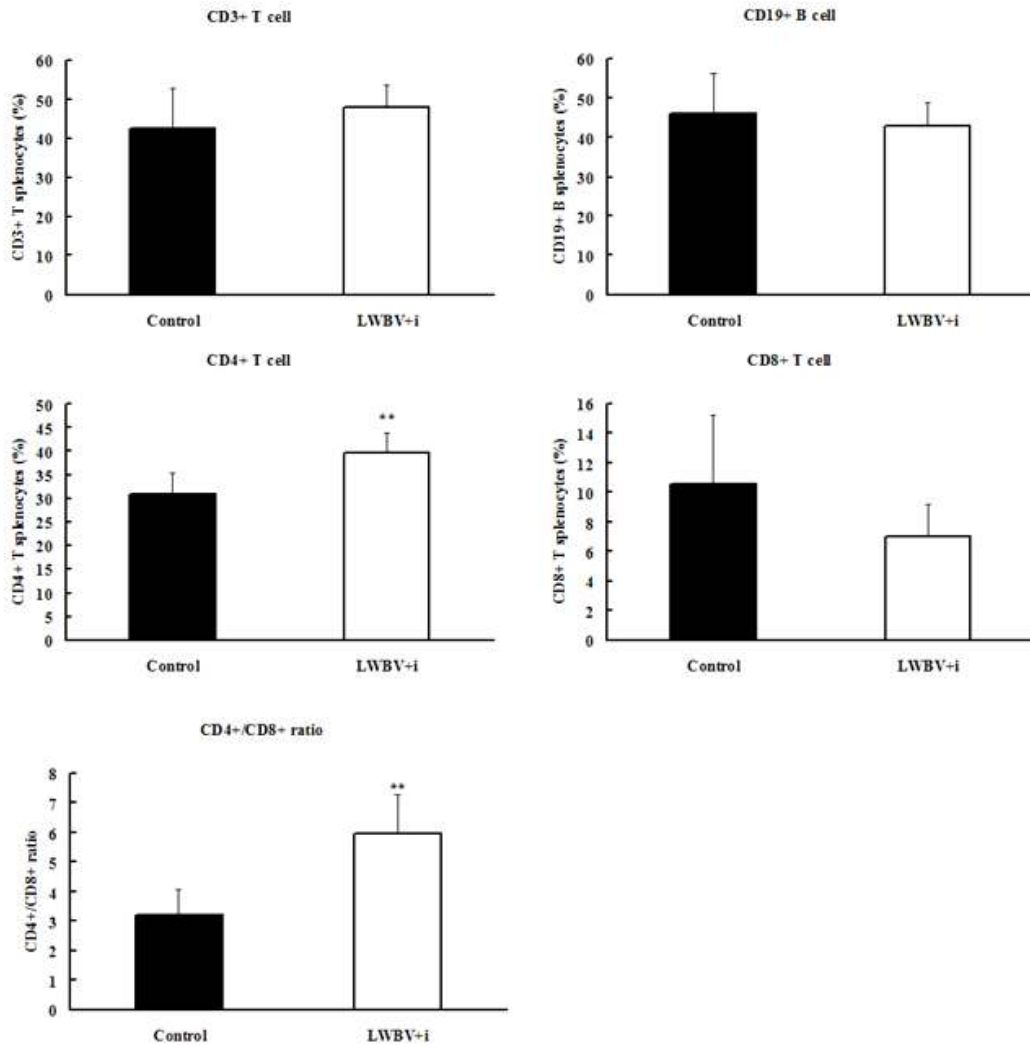


Fig 1.2. 수지봉독 점안 후 마우스의 면역세포 비율 분석. 수지봉독 점안 2회 이후, 마우스 비장에서 CD4+ T 세포의 비율과 CD4+/CD8+ 비율의 유의적인 증가를 확인하였다 ($P < 0.05$).

(나) 마우스 림프구 증식에 있어 수지봉독 점안이 미치는 영향

수지봉독 점안 후 마우스 림프구 증식능을 평가하기 위해, 마우스 비장세포를 채취하여 아무런 자극을 주지 않고 배양한 Non-stimulation, LPS와 함께 배양한 조건 및 ConA와 함께 배양한 조건의 3가지 조건에서 배양을 실시하였다. 그 결과, 어떠한 배양 조건에서도 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

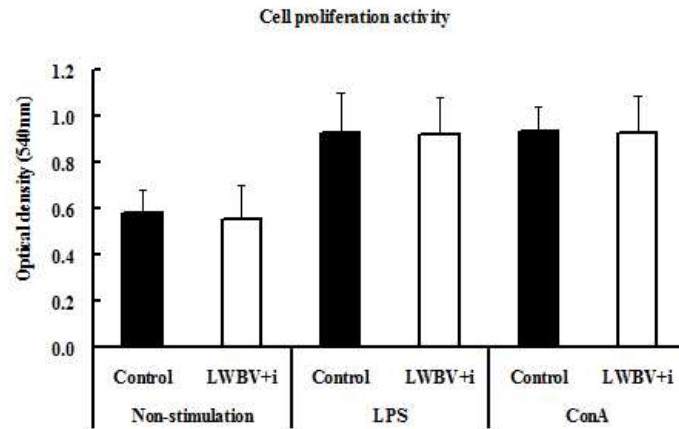


Fig 1.3. 수지봉독 점안에 따른 마우스 림프구 증식능의 평가.

(다) 상대적인 사이토카인 발현 정도에 있어 수지봉독 점안이 미치는 영향

수지봉독 점안 후 마우스 사이토카인의 상대적인 발현의 정도를 평가하기 위해 IL-4, IFN-gamma, TNF-alpha를 Real-time PCR을 이용하여 측정하였다. 그 결과 대조군과 수지봉독 점안 마우스 군에서의 통계적 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

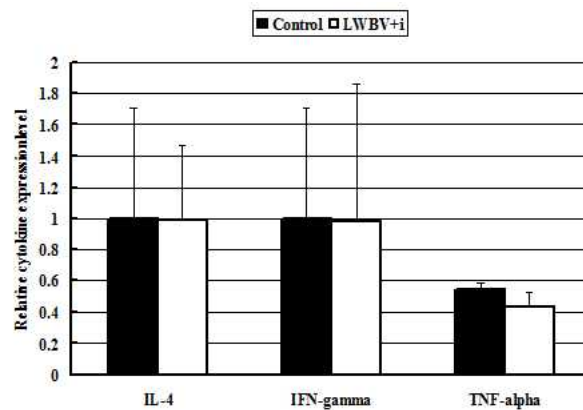


Fig 1.4. 수지봉독 점안에 따른 마우스의 상대적인 사이토카인 발현 정도.

(라) 라이소자임 활성 측정

수지봉독 점안이 마우스의 라이소자임 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 본 연구에서는 수지봉독 2회 점안 이 후 마우스의 혈청에서 라이소자임의 활성을 측정하였다. 측정하는 방법은 Kreukniet et al. (1995)의 방법을 따랐다. 그 결과, 그림 1.5에서 보는 바와 같이 봉독 점안군 (6.92 ± 0.40 ug/ml)에서 대조군 (6.19 ± 0.29 ug/ml)에 비해 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었다 ($P < 0.05$).

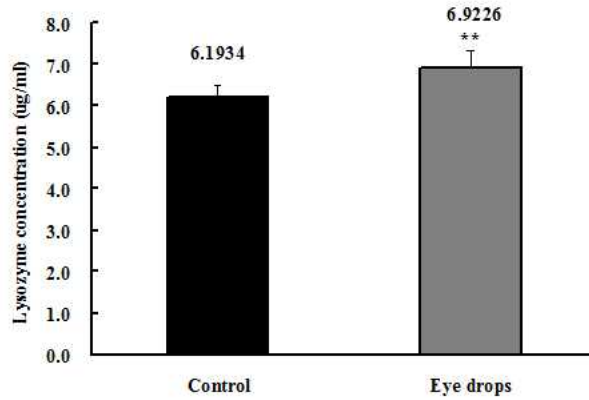


Fig 1.5. 수지봉독 점안에 따른 마우스의 라이소자임 활성 정도.

(마) 백혈구 감별 계산

수지봉독 점안 후 마우스의 말초혈액에서 백혈구의 감별 계산을 실시하였다. 그 결과 그림 6에서 보는 바와 같이 중성호성 백혈구와 산성호성 백혈구의 증가가 확인되었다. 그 중 산성호성 백혈구는 통계적으로 유의성 있게 증가하였다.

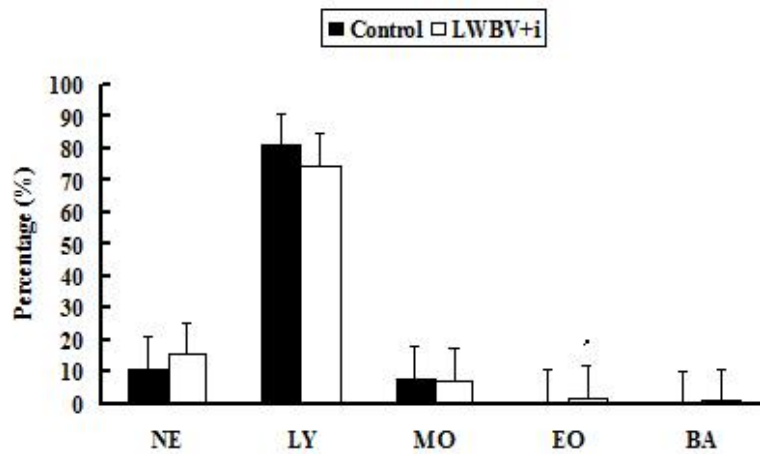


Fig 1.6. 수지봉독 점안에 따른 마우스의 백혈구 감별 계산.

(5) 마우스에서 수지봉독의 점안 투여에 따른 안전성 및 면역효능 평가의 결과 정리

- 수지봉독 점안 투여에 따른 간독성 검사결과, 간손상의 지표 효소들의 수치가 대조군과 다르지 않음을 확인 하였다.
- 수지봉독 점안 투여에 따른 면역효능을 평가한 결과, CD4+/CD8+ 세포 비율과 라이소자임 활성의 유의성 있는 증가를 확인 할 수 있었다. 하지만, 말초혈액내에

호산성백혈구의 비율이 증가하는 것으로 보아 약간의 알러지성 반응이 있는 것으로 사료된다.

나. 마우스에서 수지봉독의 피하 접종에 따른 안전성 및 면역효능 평가

(1) 마우스

- 6주령 암컷 ICR 마우스 12마리
- 군분리 : 12마리를 완전 임의로 6수로 구성된 2개군으로 나누었다.
 - Group 1 (Control): 용제만을 피하접종
 - Group 2 (LWBV+i): 수지봉독(수지비율 1:0.25) + Hyaluronidase inhibitor

(2) 수지봉독의 투여 농도, 경로, 용량 및 횟수

- 수지봉독의 투여 농도: 2.1mg/ml
- 수지봉독의 투여 경로: 피하접종
- 수지봉독의 투여 용량: 100ul/each mouse (총 20ul/mouse)
- 수지봉독의 투여 횟수: 3일 간격으로 총 2회 실시
- 대조군은 수지봉독을 제외한 용제만을 실험군과 동일하게 피하접종 하였다.
 - 최종 수지봉독 피하접종 일일 후에 부검을 실시하여 안전성 평가 및 면역 효능을 평가하였다.

(3) 안전성 평가

(가) *in vivo* 간독성 검사 (Liver function test)

- 간독성 평가 항목은 총 5가지로 다음과 같다
 - Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT; AST), Glutamic pyruvic transaminase (GPT; ALT), Alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase (LDH), Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)

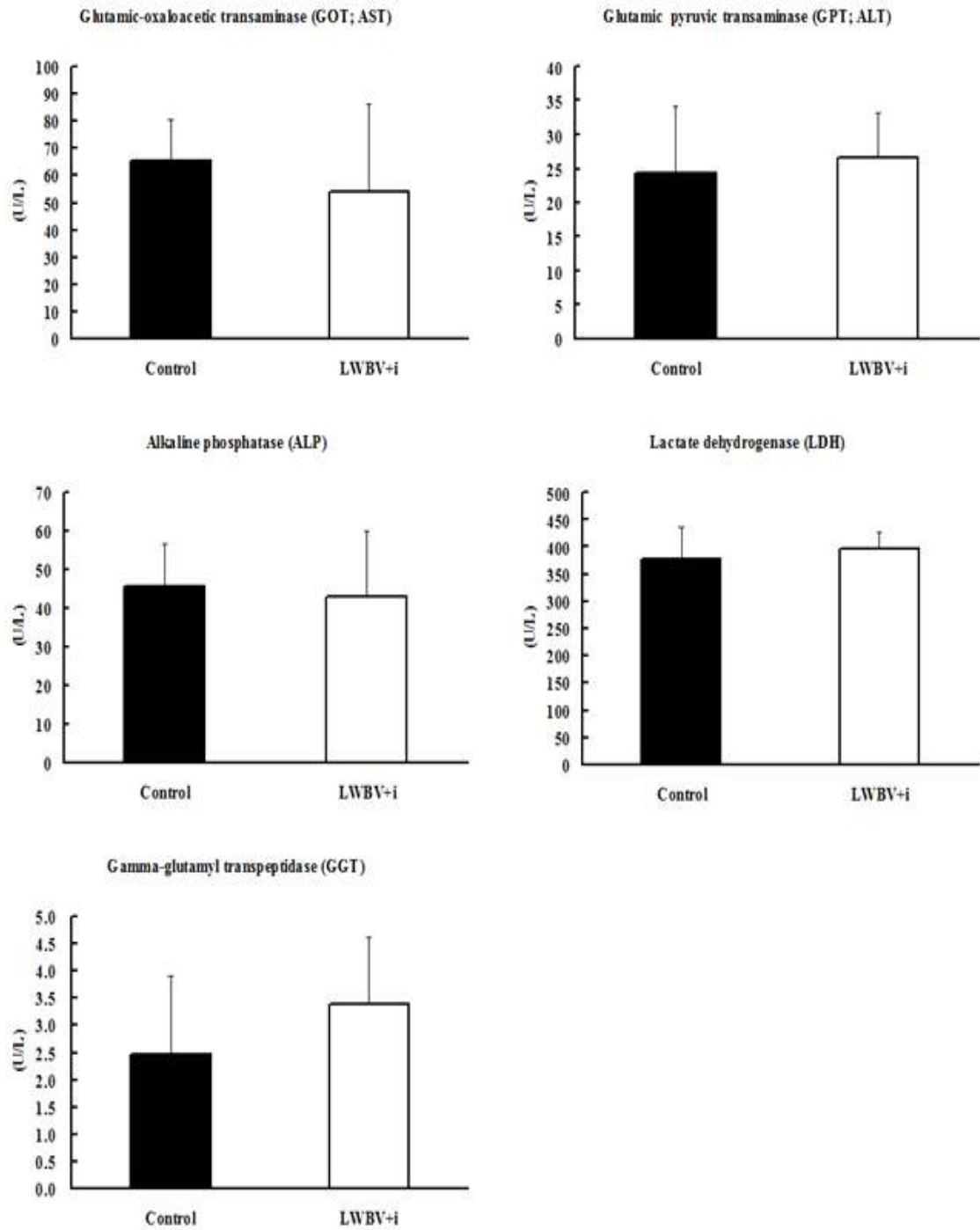


Fig 1.7. 수지붕독 피하 접종에 따른 간효소 지수.

Fig 1.7에서 보듯이, 간독성이나 간세포 파괴 시 급격히 증가하는 간효소들의 지수가 대조군과 수지붕독 피하 접종군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 수지 붕독 2회 피하 접종은 간독성을 일으키지 않는다고 하겠다.

(4) 마우스에서 수지봉독 피하접종의 면역효능평가

(가) 수지봉독 피하 접종 이후 마우스의 면역세포 비율 분석

수지봉독 피하 접종 이 후 마우스 비장에서 림프구 아세포인 CD3⁺ T 세포, CD19⁺ B 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포의 비율을 측정하였다. 결과는 Fig 1.8과 같다. 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

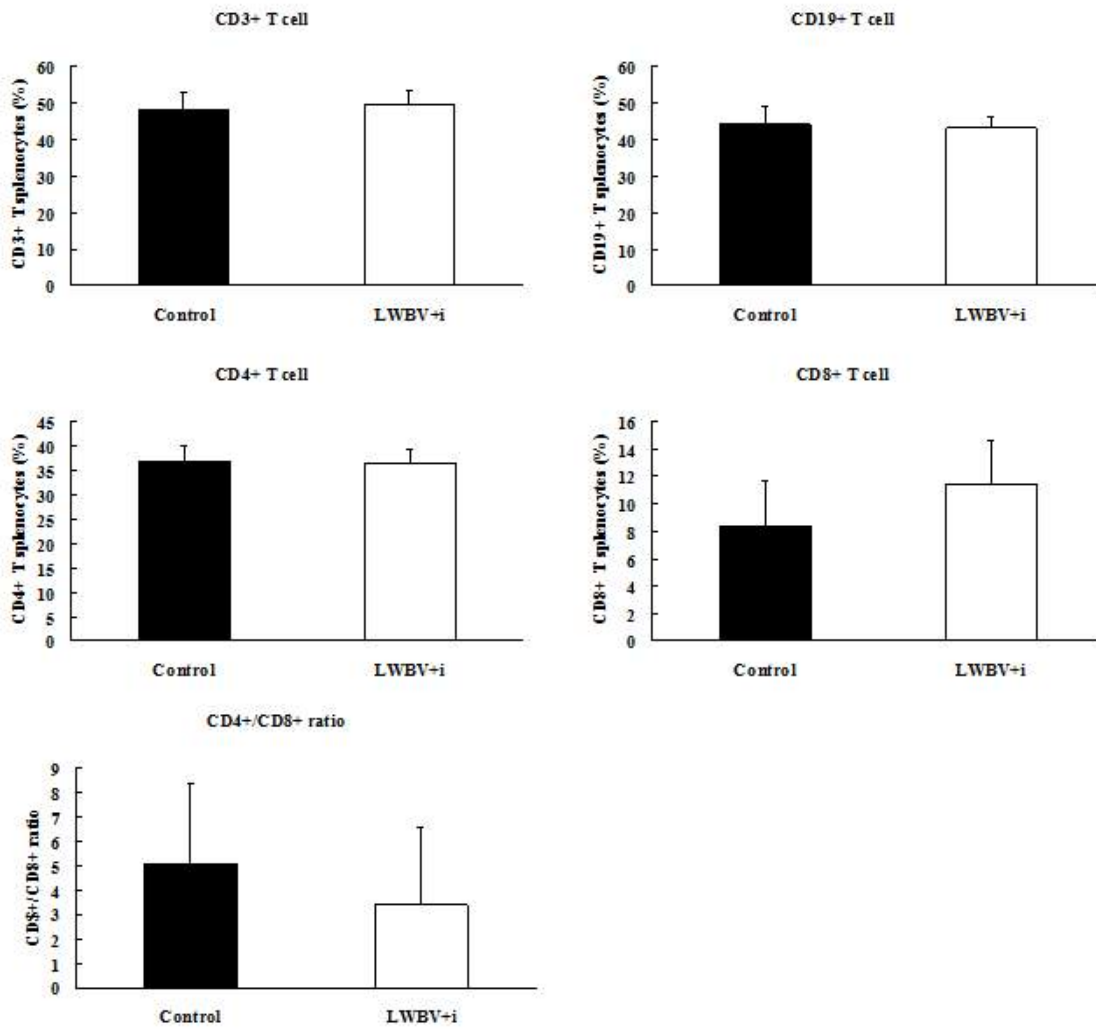


Fig 1.8. 수지봉독 점안 후 마우스의 면역세포 비율 분석.

(나) 수지봉독 피하 접종이 마우스 림프구 증식에 미치는 영향

수지봉독 피하 접종 후 마우스 림프구 증식능을 평가하기 위해, 마우스 비장세포를 채취하여 아무런 자극을 주지 않고 배양한 Non-stimulation, LPS와 함께 배양한 조건 및 ConA와 함께 배양한 조건의 3가지 조건에서 배양을 실시하였다. 그 결과, 어떠한 배양 조건에서도 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

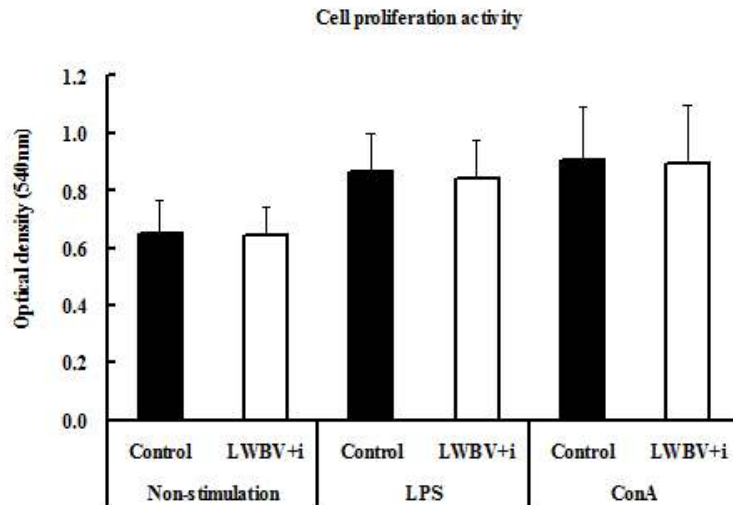


Fig 1.9. 수지봉독 피하 접종에 따른 마우스 림프구 증식능의 평가.

(다) 수지봉독 피하접종이 상대적인 사이토카인 발현 정도에 미치는 영향

수지봉독 피하접종 후 마우스 사이토카인의 상대적인 발현의 정도를 평가하기 위해 IL-4, IFN-gamma, TNF-alpha를 Real-time PCR을 이용하여 측정하였다. 그 결과 대조군과 수지봉독 피하 접종 마우스 군에서의 통계적 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

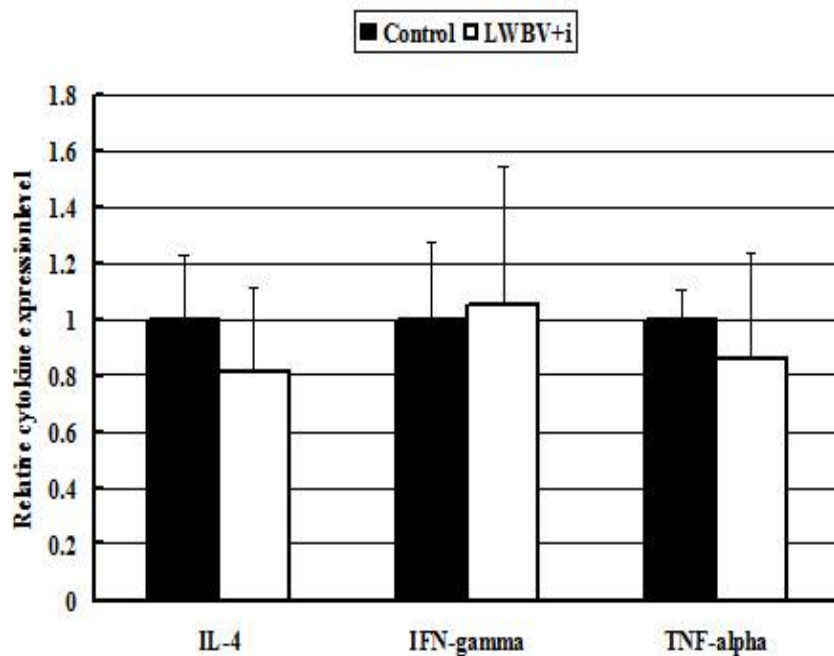


Fig 1.10. 수지봉독 피하접종에 따른 마우스의 상대적인 사이토카인 발현 정도.

(라) 라이소자임 활성 측정

수지봉독 피하접종이 마우스의 라이소자임 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해, 본 연구에서는 수지봉독 2회 점안 이 후 마우스의 혈청에서 라이소자임의 활성을 측정하였다. 측정하는 방법은 Kreukniet et al. (1995)의 방법을 따랐다. 그 결과 대조군과 수지봉독 피하 접종 마우스 군에서의 통계적 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

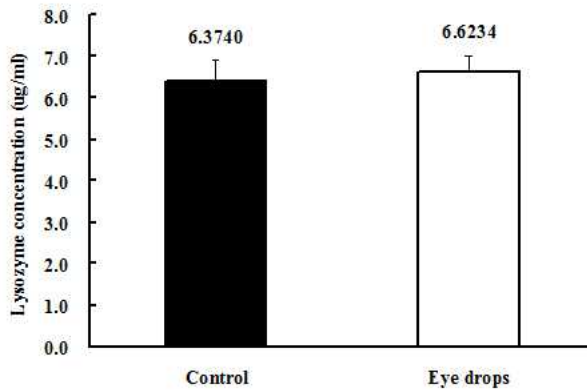


Fig 1.11. 수지봉독 피하 접종에 따른 마우스의 라이소자임 활성 정도.

(마) 백혈구 감별 계산

수지봉독 피하접종 후 마우스의 말초혈액에서 백혈구의 감별 계산을 실시하였다. 그 결과 대조군과 수지봉독 피하 접종 마우스 군에서의 통계적 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

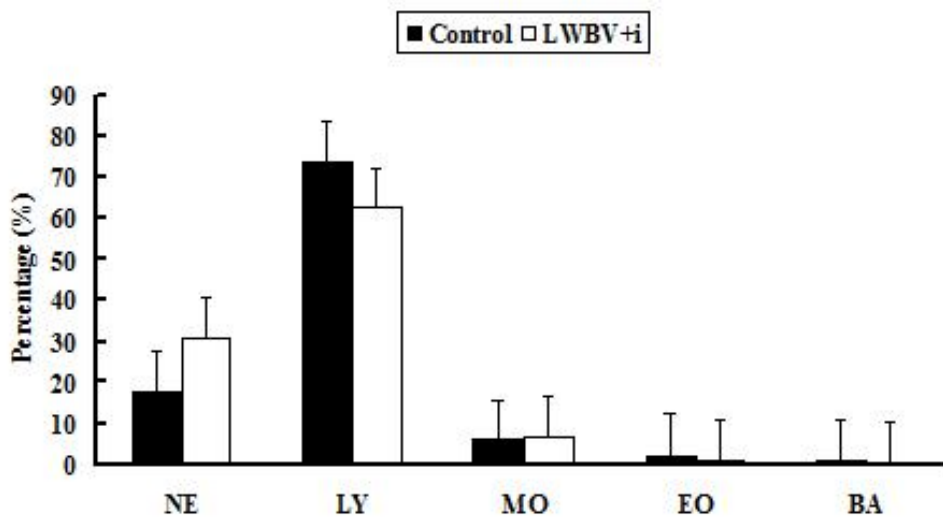


Fig 1.12. 수지봉독 피하 접종에 따른 마우스의 백혈구 감별 계산.

(5) 마우스에서 수지봉독의 피하접종에 따른 안전성 및 면역효능 평가의 결과 정리

- (가) 수지봉독 피하접종 투여에 따른 간독성 검사결과, 간손상의 지표 효소들의 수치가 대조군과 다르지 않음을 확인 하였다.
- (나) 수지봉독 피하접종 투여에 따른 면역효능을 평가한 결과, 전체적으로 대조군과 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다. 하지만, 말초혈액내에 중성호성백혈구의 비율이 증가하는 것으로 보아 약간의 염증성 반응이 있는 것으로 사료된다.

다. 마우스에서 수지봉독의 근육 접종 (주사)에 따른 안전성 및 면역효능 평가

(1) 마우스

- (가) 6주령 암컷 ICR 마우스 12마리
- (나) 군분리 : 12마리를 완전 임의로 6수로 구성된 2개군으로 나누었다.
 - Group 1 (Control): 용제만을 근육접종
 - Group 2 (LWBV+i): 수지봉독(수지비율 1:0.25) + Hyaluronidase inhibitor

(2) 수지봉독의 투여 농도, 경로, 용량 및 횟수

- (가) 수지봉독의 투여 농도: 2.1mg/ml
- (나) 수지봉독의 투여 경로: 근육접종
- (다) 수지봉독의 투여 용량: 100ul/each mouse (총 20ul/mouse)
- (라) 수지봉독의 투여 횟수: 3일 간격으로 총 2회 실시
- (마) 대조군은 수지봉독을 제외한 용제만을 실험군과 동일하게 근육접종하였다.
- (바) 최종 수지봉독 근육접종 일일 후에 부검을 실시하여 안전성 평가 및 면역 효능을 평가하였다.

(3) 안전성 평가

(가) *in vivo* 간독성 검사 (Liver function test)

- 간독성 평가 항목은 총 5가지로 다음과 같다
 - Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT; AST), Glutamic pyruvic transaminase (GPT; ALT), Alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase (LDH), Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)

Fig 1.13에서 보듯이, 간독성이나 간세포 파괴 시 급격히 증가하는 간효소들의 지수가 대조군과 수지봉독 근육 접종군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 수지 봉독 2회 근육 접종은 간독성을 일으키지 않는다고 하겠다.

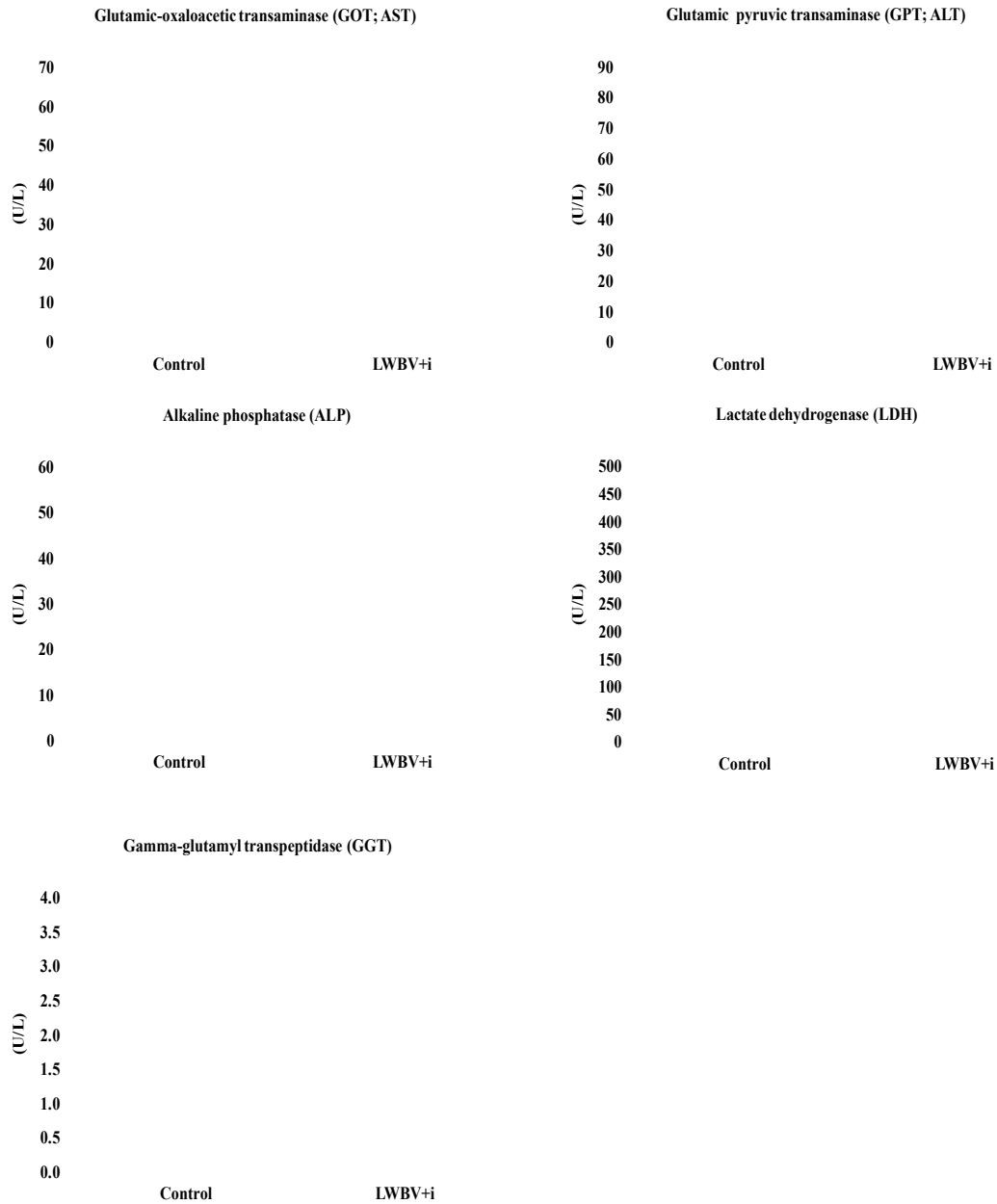


Fig 1.13. 수지봉독 근육 접종에 따른 간효소 지수.

(4) 마우스에서 수지봉독 근육접종후의 면역효능평가

(가) 수지봉독 근육 접종 이후 마우스의 면역세포 비율 분석

수지봉독 근육 접종 이 후 마우스 비장에서 림프구 아세포인 CD3⁺ T 세포, CD19⁺ B 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포의 비율을 측정하였다. 결과는 Fig 1.14와 같다. 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

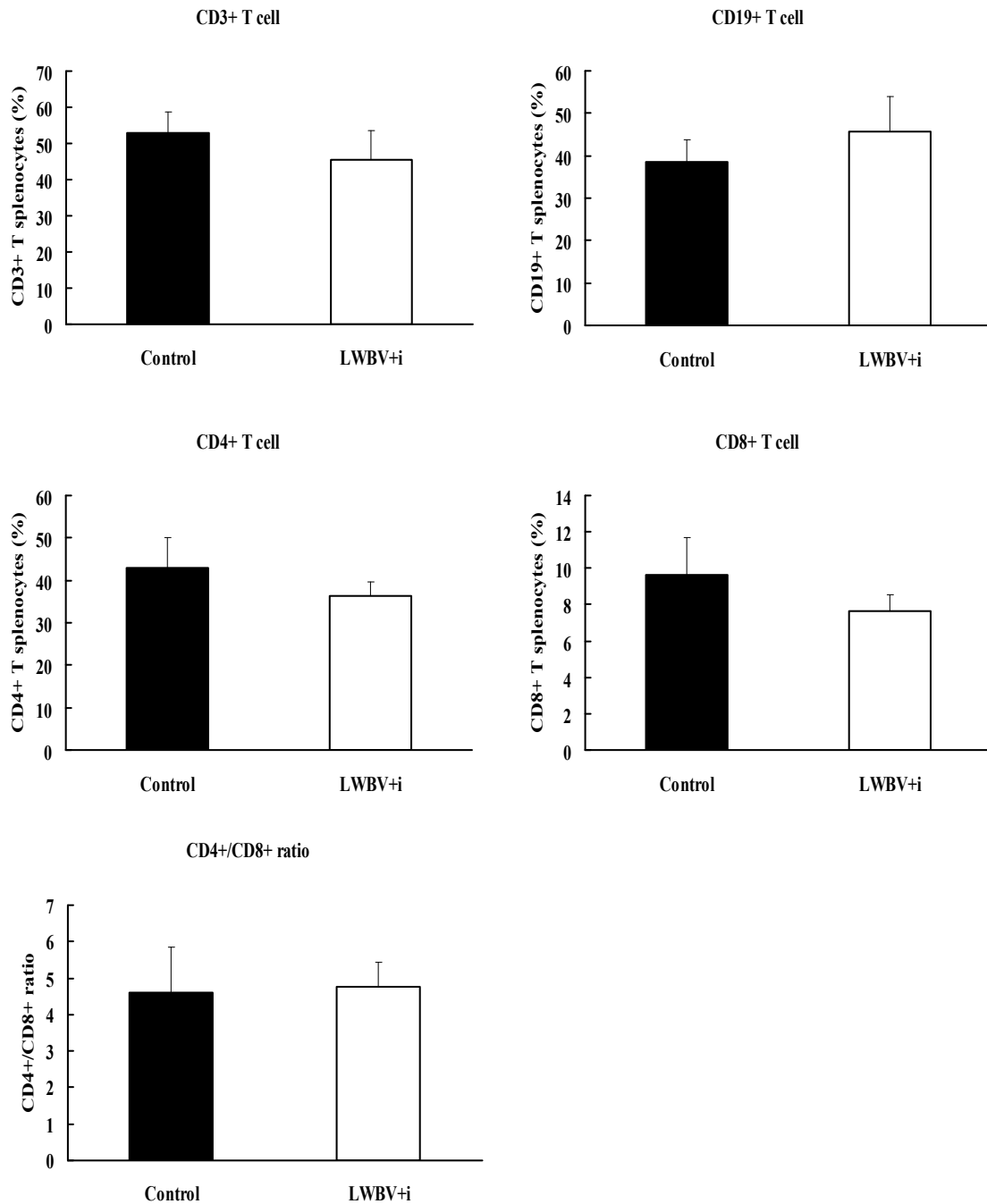


Fig 1.14. 수지봉독 점안 후 마우스의 면역세포 비율 분석.

(나) 수지봉독 근육 접종 이후 마우스 림프구 증식에 미치는 영향

수지봉독 근육 접종 후 마우스 림프구 증식능을 평가하기 위해, 마우스 비장세포를 채취하여 아무런 자극을 주지 않고 배양한 Non-stimulation, LPS와 함께 배양한 조건 및 ConA와 함께 배양한 조건의 3가지 조건에서 배양을 실시하였다. 그 결과, 어떠한 배양 조건에서도 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

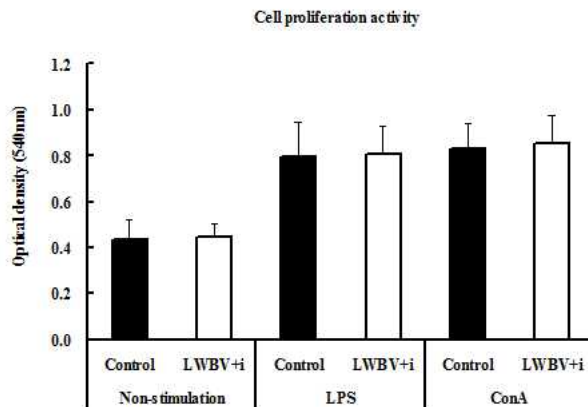


Fig 1.15 수지봉독 근육 접종에 따른 마우스 림프구 증식능의 평가.

(다) 상대적인 사이토카인 발현 정도에 있어 수지봉독 근육접종이 미치는 영향

수지봉독 근육접종 후 마우스 사이토카인의 상대적인 발현의 정도를 평가하기 위해 IL-4, IFN-gamma, TNF-alpha를 Real-time PCR을 이용하여 측정하였다. 그 결과 대조군과 수지봉독 근육 접종 마우스 군에서의 통계적 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

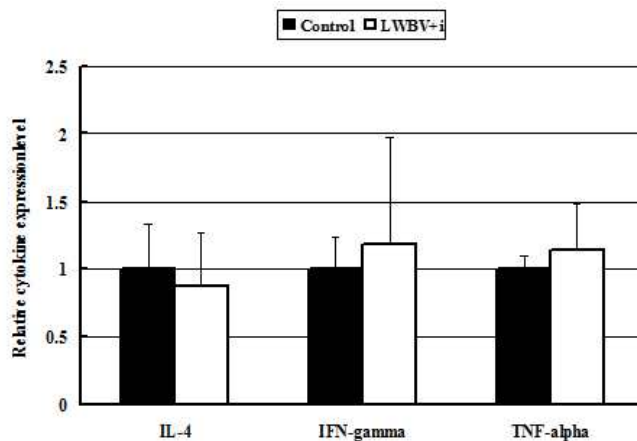


Fig 1.16. 수지봉독 근육접종에 따른 마우스의 상대적인 사이토카인 발현 정도.

(라) 라이소자임 활성 측정

수지봉독 근육접종이후 마우스의 라이소자임 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 본 연구에서는 수지봉독 근육접종 이 후 마우스의 혈청에서 라이소자임의 활성을 측정하였다. 측정하는 방법은 Kreukniet et al. (1995)의 방법을 따랐다. 그 결과 대조군과 수지봉독 근육 접종 마우스 군에서의 통계적 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

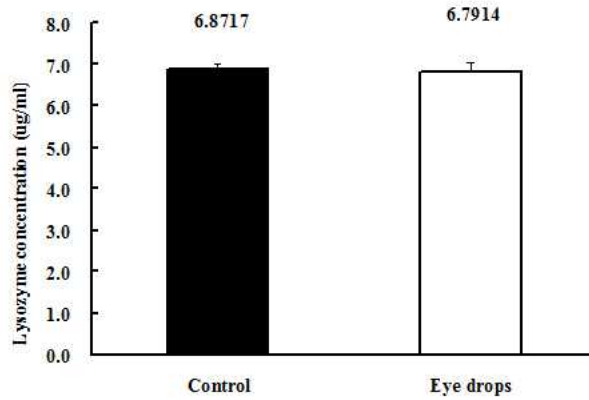


Fig 1.17. 수지봉독 근육 접종에 따른 마우스의 라이소자임 활성 정도.

(마) 백혈구 감별 계산

수지봉독 근육접종 후 마우스의 말초혈액에서 백혈구의 감별 계산을 실시하였다. 그 결과 대조군에 비해 수지봉독 근육 접종 마우스 군에서의 중성호성 백혈구가 유의적으로 증가한 것을 알 수 있었다.

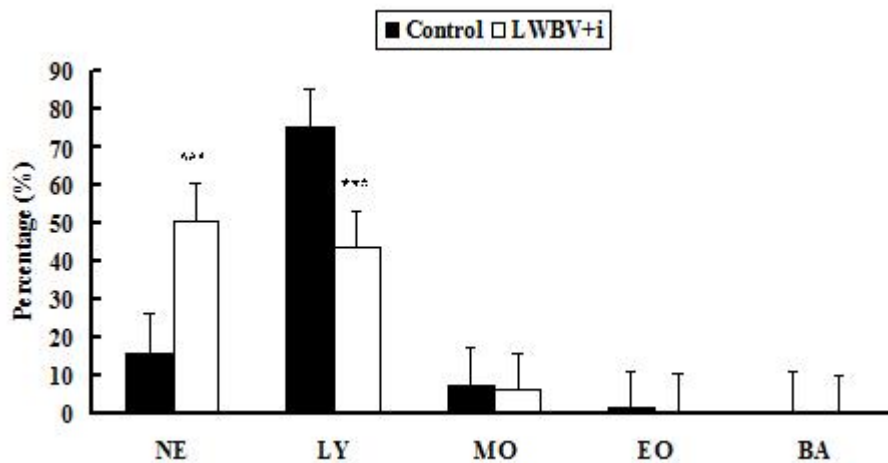


Fig 1.18. 수지봉독 근육 접종에 따른 마우스의 백혈구 감별 계산.

(5) 마우스에서 수지봉독의 근육접종에 따른 안전성 및 면역효능 평가의 결과 정리

- (가) 수지봉독 근육접종 투여에 따른 간독성 검사결과, 간손상의 지표 효소들의 수치가 대조군과 다르지 않음을 확인 하였다.
- (나) 수지봉독 근육접종 투여에 따른 면역효능을 평가한 결과, 전체적으로 대조군과 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다. 하지만, 말초혈액내에 중성호성백혈구의 비율이

증가하는 것으로 보아 약간의 염증성 반응이 있는 것으로 사료된다.

라. 마우스에서 정제 수지봉독의 안전성 및 면역효능 평가의 결론

- (1) 마우스에서 수지봉독의 점안, 피하, 근육 투여 후, 간손상의 지표 효소들의 수치가 대조군과 다르지 않음을 확인하였다. 이러한 결과를 볼 때, 수지봉독의 투여는 간에 손상을 주지 않는 것으로 사료된다. 하지만, 피하나 근육 주사의 경우 약간의 염증성 반응이 보여 졌고, 점안의 경우 약간의 알러지 반응이 보였다.
- (2) 마우스의 면역효능적인 면에서 피하나 근육 주사를 통한 수지봉독의 투여는 큰 효과를 주지 못한데 비해, 점안으로 수지봉독을 투여한 경우, CD4⁺/CD8⁺ 세포 비율과 라이소자임 활성의 유의성 있는 증가를 확인 할 수 있었다.

3. 닭에서 정제 봉독의 면역 및 사양 효과규명

가. 육계에서 봉독의 면역효능 평가

(1) 봉독의 투여경로와 농도에 따른 면역효능 평가 (투여경로와 농도 설정)

- 목적: 정제봉독의 효능을 극대화 할 수 있는 최적의 투여경로와 농도 및 투여 횟수의 설정

(가) 실험동물

- 1일령 육계 (Ross) 100수

(나) 정제봉독의 투여 경로 및 투여 용량

정제봉독의 최적의 투여 경로를 확인하기 위하여 기존의 육계에서 많이 사용되고 있는 피하주사법과 점안법으로 투여 경로를 나누어 실험 설계를 하였다. 투여 용량은 피하주사의 경우 1회 주사 시 100ul씩 주사하였고, 점안법의 경우 1회 점안 시 각 눈당 10ul씩을 투여하였다.

(다) 정제봉독의 투여 횟수

정제봉독의 최적 투여 횟수를 설정하기 위하여 1주일 간격으로 2회 투여하는 군과 4회 투여하는 군으로 실험군을 나누었다. 즉 2회 투여 군은 입사 후 1일과 8일 후 각각의 농도와 투여 경로에 따라 정제봉독의 접종을 실시하였고, 4회 투여 군은 입사 후 1, 8, 15, 22일에 각각의 농도와 투여 경로에 따라 정제봉독의 접종을 실시하였다.

(라) 실험군의 분리

정제봉독의 투여 농도, 경로 및 횟수에 따라 다음과 같이 13군으로 완전임의 배치하였다.

Table 1.1. 정제붕독 투여 경로와 투여 용량 설정을 위한 육계 병아리의 군분리

Group	투여 경로	붕독의 농도	투여 횟수	개체 수
Control		무(無)투여군		17
OL2	점안	저농도 (0.42mg/ml)	2	8
OM2	점안	중농도 (2.10mg/ml)	2	7
OH2	점안	고농도 (8.40mg/ml)	2	7
OL4	점안	저농도 (0.42mg/ml)	4	7
OM4	점안	중농도 (2.10mg/ml)	4	7
OH4	점안	고농도 (8.40mg/ml)	4	6
SL2	피하	저농도 (0.42mg/ml)	2	7
SM2	피하	중농도 (2.10mg/ml)	2	7
SH2	피하	고농도 (8.40mg/ml)	2	7
SL4	피하	저농도 (0.42mg/ml)	4	7
SM4	피하	중농도 (2.10mg/ml)	4	7
SH4	피하	고농도 (8.40mg/ml)	4	7

(마) 체중

4주간 사료와 식수를 자유급여 후 전 개체의 체중을 전자저울로 측정한 결과, 대조군 (무투여군: 841 ± 71g)에 비해 붕독 투여군 모두에서 유의성 있게 체중이 증가하였고, 특히 OM4 (점안을 통한 중농도 4회 투여군: 1114 ± 80g)와 OH4 (점안을 통한 고농도의 4회 투여군: 1117 ± 113g)군에서 평균 체중이 가장 많이 증가하였다.

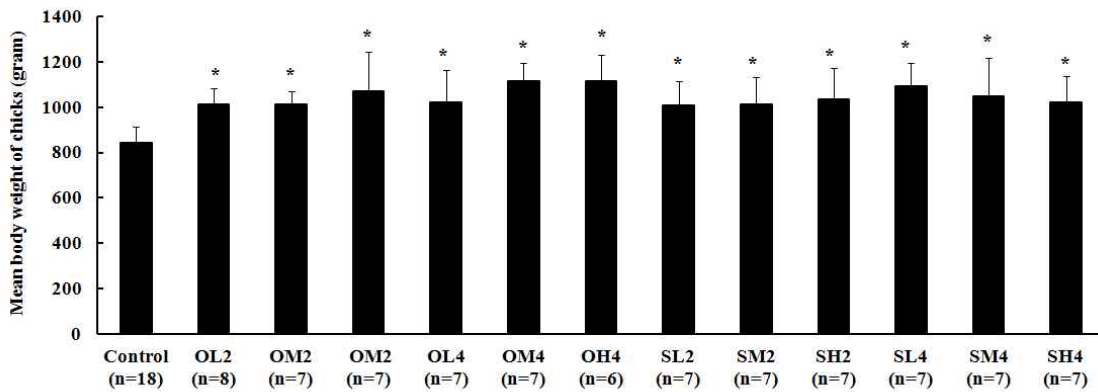


Fig 1.18. 정제붕독 투여에 따른 육계의 체중.

(바) 비장무게

붕독 투여에 따른 육계의 면역장기 (비장) 무게를 측정한 결과, 대조군 (무투여군: 0.968 ± 0.115g)에 비해 점안을 통한 4회 투여군들에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보여주었다. 특히, OH4군 (점안을 통한 고농도 4회 투여군: 1.268 ± 0.228g)에서 유의적으로 증가하였다.

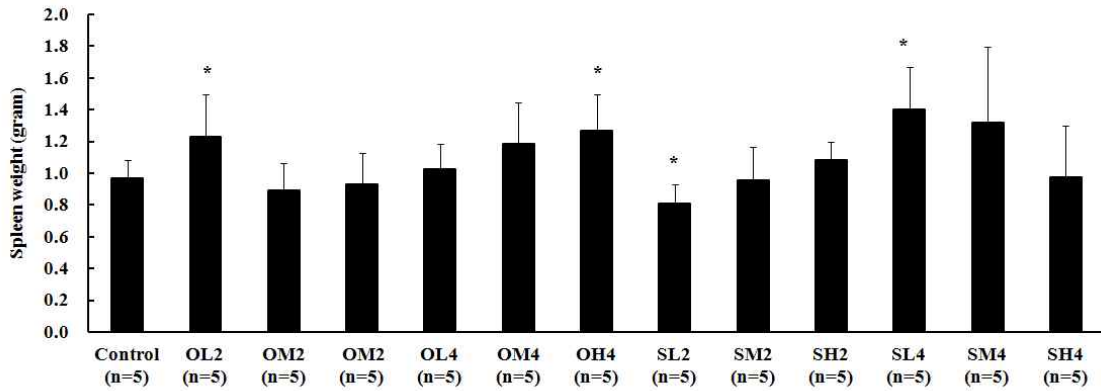
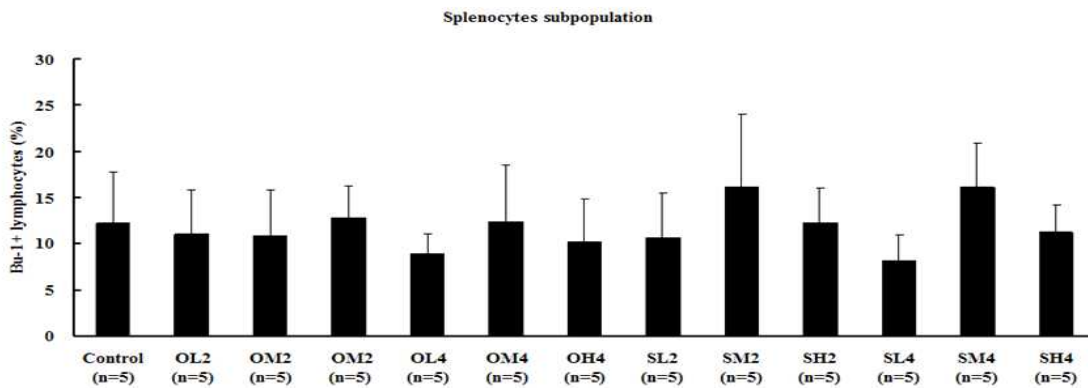


Fig 1.19. 정제봉독 투여에 따른 육체의 비장 무게.

(사) 비장 림프구의 아세포 비율 (Splenoocyte subpopulation)

B 세포와 T 세포의 비율에는 군별 큰 변화가 없었다. CD4⁺ T 세포의 비율에 있어 대조군 (6.80 ± 2.98 %)에 비해 접안을 통한 4회 투여군들 모두에서 증가하는 경향을 보였으며, 특히 OM4 (19.08 ± 4.00%)의 CD4⁺ T 세포 비율이 가장 큰 증가를 보였다. 뿐만 아니라, CD8⁺ T 세포의 비율 또한 대조군 (54.83 ± 11.10 %)에 비해 OM4 (41.41 ± 4.19%)의 비율이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 따라서 CD4⁺/CD8⁺ 세포의 비율을 분석하여 보면, 대조군 (0.13 ± 0.08)에 비해 OM4군 (0.47 ± 0.14)에서 가장 큰 증가를 보인다.



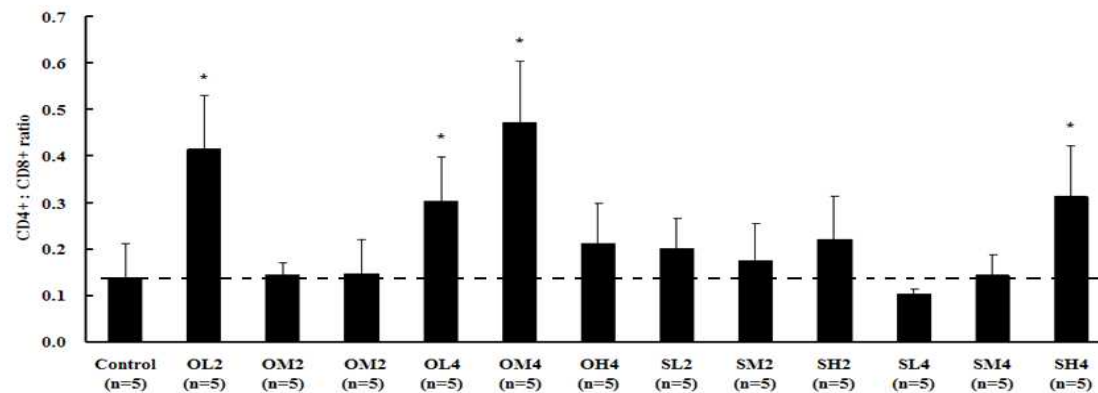
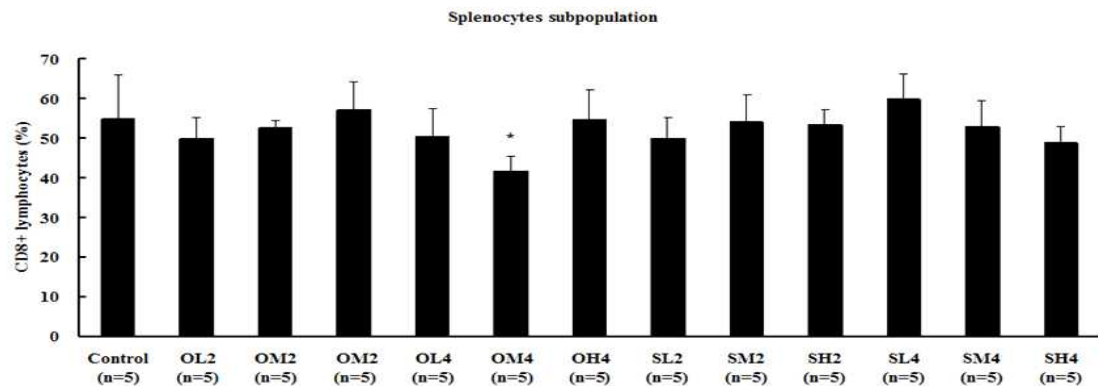
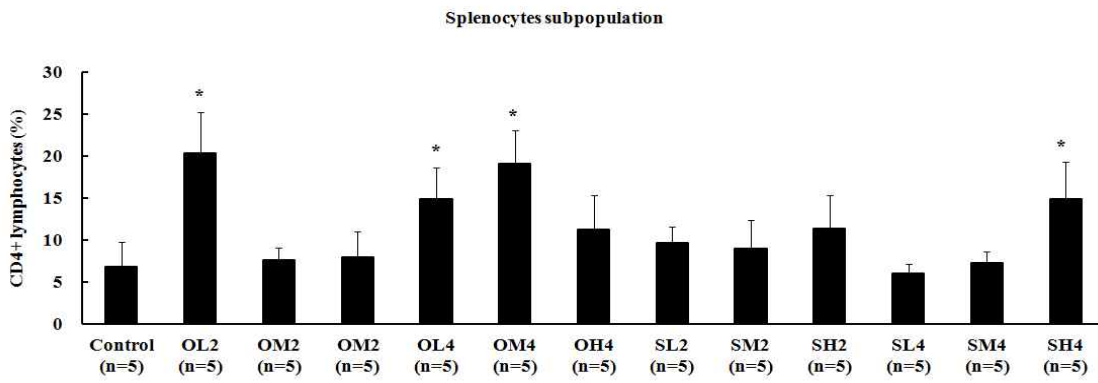
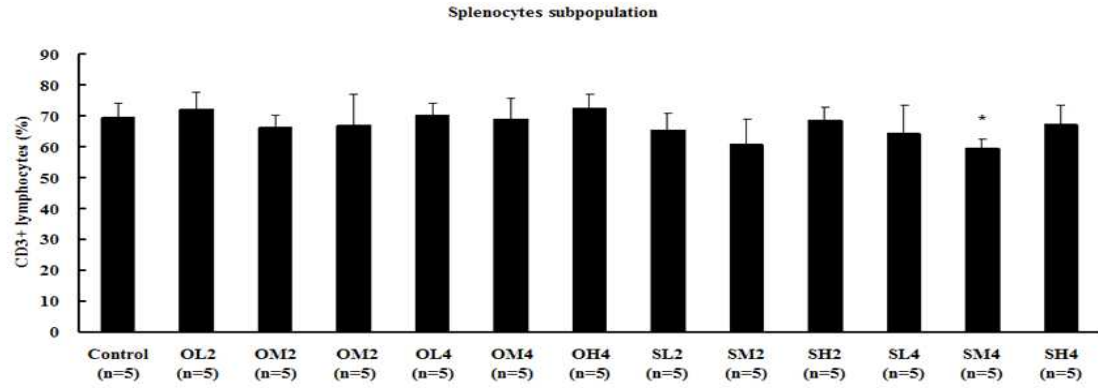


Fig 1.20. 정제봉독 투여에 따른 육계의 비장 아세포의 비율.

(아) 라이소자임 활성 측정

라이소자임은 대식세포나 다형핵 백혈구와 같은 탐식구들에서 주로 분비되며 세균의 벽을 녹이는 항균물질이다(Guo et al., 2004). 정제붕독 분무가 육계 병아리의 라이소자임 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과, 비록 통계적 유의성을 없었으나, 대조군에 비해 12군의 붕독 투여군 모두에서 평균 라이소자임 활성이 증가하는 경향을 보였다.

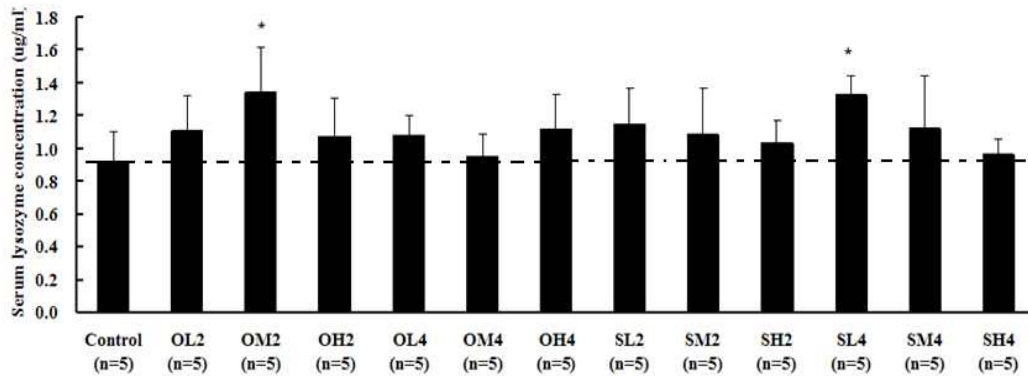


Fig 1.21. 정제붕독 투여에 따른 육계의 라이소자임 활성의 평가.

(자) 상대적 사이토카인 발현의 정도 평가

대조군과 붕독 투여군들의 비장으로부터 RNA를 추출하여 Real-time PCR을 이용하여 사이토카인 (IL-4, IL-18 그리고 IFN-gamma)의 발현능을 측정하였다. Primer sequence는 표 1과 같다 (Cox et al., 2010). 사이토카인 발현 정도에 있어서 대조군과 붕독 투여군들간의 차이가 없었다.

Table 1.2. 닭 사이토카인 측정을 위한 Primers.

Target	Accession no	Nucleotide sequence (5'→3')
GAPDH Forward	NM_204305	CCTAGGATACACAGAGGACCAGGTT
GAPDH Reverse		GGTGGAGGAATGGCTGTCA
IL-4 Forward	NM_001007079	GCTCTCAGTGCCGCTGATG
IL-4 Reverse		GAAACCTCTCCCTGGATGTCAT
IL-18 Forward	NM_204608	AGGTGAAATCTGGCAGTGGAAAT
IL-18 Reverse		TGAAGGCGCGGTGGTTT
IFN-gamma Forward	NM_205149	GCTCCCGATGAACGACTTGA
IFN-gamma Reverse		TGTAAGATGCTGAAGAGTTCATTCG

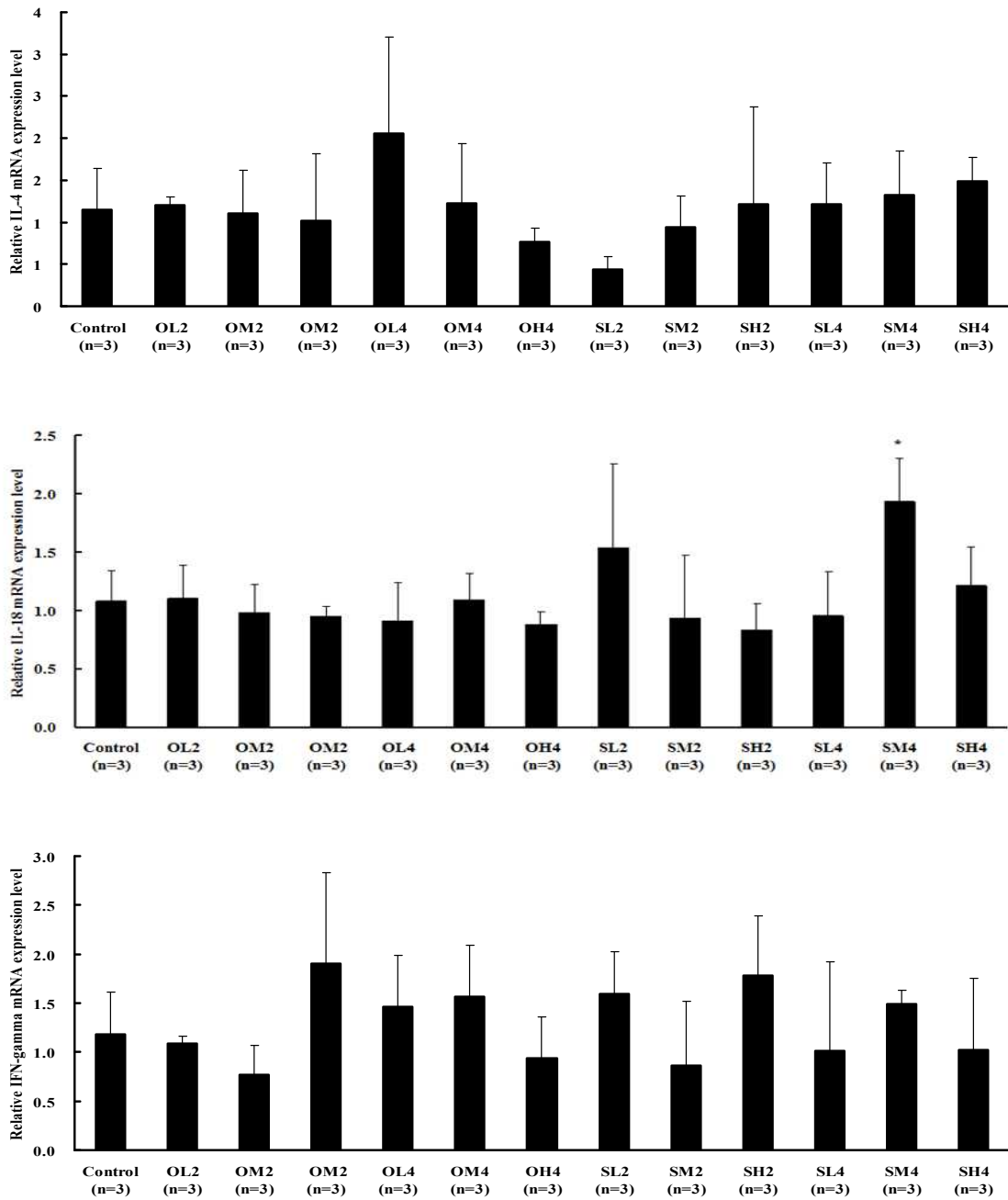


Fig 1.22. 정제봉독 투여에 따른 육계의 사이토카인 발현 정도.

(차) 연구결과 요약

본 실험에서 얻은 결과들 중 의미 있는 것들을 종합하여 보면 다음과 같다.

① 체중

체중 증가에 있어, 봉독을 투여한 모든 군에서 대조군에 비해 현저한 증가를 보였으며, 그 중 점안을 통한 4회 접종 군들에서 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다.

② CD4⁺: CD8⁺ 세포의 비율

육계에서 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포의 비율은 면역의 기능과 반응을 측정하는데 일반적으로 이용되어지는 지표이다. CD4⁺:CD8⁺ 비율이 낮은 상태는 면역 억압성 질병이나 급성 바이러스성 질병에 걸린 개체에서 많이 나타나는 반면 (Chakravarti, 1995), CD4⁺:CD8⁺ 비율이 높은 상태는 육계의 면역이 증강된 경우 많이 보여진다 (Erf et al., 1995). 본 실험에서, 정제봉독을 투여한 대부분의 군에서 CD4⁺/CD8⁺ 세포의 비율이 증가하였으나, 그 중 점안을 통한 중농도 (2.10mg/ml)의 4회 투여군 (OM4)에서 가장 많은 증가를 보였다.

위의 두가지 의미 있는 결과를 종합하여 볼 때, 정제봉독의 투여 경로는 피하보다는 점안이 더 효과적이며, 농도는 중농도 (2.10mg/ml), 투여 횟수는 2회 보다는 4회가 효과적이라는 결론을 얻었다. 이러한 결론을 바탕으로 계속되는 실험들에서는 중농도 (2.10mg/ml)의 정제봉독을 사용하였다

(카) 정제봉독의 투여경로와 농도 설정실험의 결론

- ① 정제봉독의 최적의 투여경로 : 피하주사보다는 점안
- ② 정제봉독의 최적의 투여농도 : 2.10 mg/ml
- ③ 정제봉독의 최적의 투여횟수 : 횟수 의존적 (2회보다는 4회)

(2) 정제봉독의 수용성/지용성 비율과 투여 경로 (점안과 분무)에 따른 면역효능평가

(가) 목적

- ① 정제봉독의 효능을 극대화 할 수 있는 최적의 수용성/지용성 비율 설정
- ② 점안식 투여방법의 경우 농가에서 사용하기에 어려움이 있으므로 이를 해결하고자 점안식 투여 법과 분무식 투여법에 따른 정제봉독의 효능을 비교 평가하고자 한다.

(나) 실험동물

- 1일령 육계 (Ross) 94수

(다) 정제봉독의 농도, 지용성 함량 및 실험군 분류

- ① 투여농도 : 이전 실험에서 가장 좋은 효과를 보여 주었던 2.1mg/ml으로 일괄투여
- ② 수용성과 지용성의 비율: 1:1, 1:0.5, 1:0.25, 1: 0.125
- ③ 투여방법 : 점안식과 분무식으로 구분

Table 1.3. 정제봉독의 투여방법 및 지용성 함량 설정을 위한 육계 병아리의 실험군 분리.

Group	투여방법	수용성과 지용성의 비율	개체 수
Control		무(無)투여군	10
O1	점안	1:1	10
O2	점안	1:0.5	11
O3	점안	1:0.25	10
O4	점안	1:0.125	10
S1	분무	1:1	11
S2	분무	1:0.5	11
S3	분무	1:0.25	11
S4	분무	1:0.125	10

(라) 정제봉독의 투여량과 투여 횟수

- ① 점안: 10ul/each eye (20ul/each chick)
- ② 분무: 5ml/10 chicks
- ③ 2일령에 단회 투여 후 18일 후 부검을 실시하여 분석을 실시하였다.



Fig 1.23. 육계 병아리에 정제봉독을 점안 (좌)과 분무 (우) 방식으로 투여하는 모습.

(마) 체중

봉독 투여에 따른 육계의 체중 증가를 비교 분석하기 위해, 18일간 사료와 식수를 자유급여 하였다. 전 개체의 체중을 전자저울로 측정된 결과 대조군을 포함한 모든 실험군에서 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다.

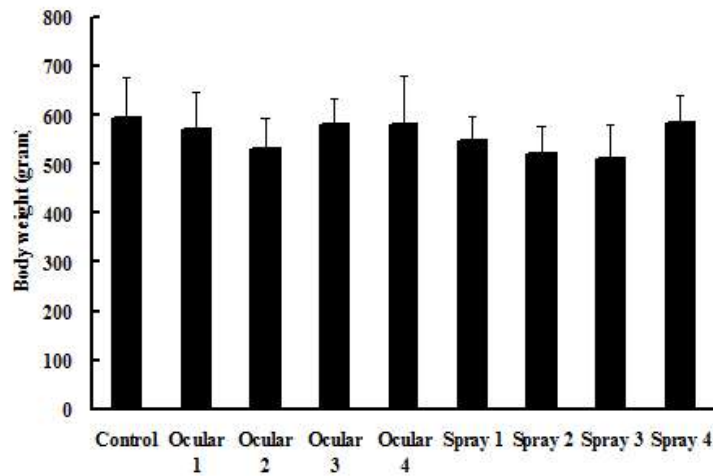


Fig 1.24. 정제봉독 점안과 분무방식에 따른 육계의 체중.

(바) 비장 무게

봉독 투여에 따른 육계의 면역장기 (비장) 무게를 측정하였다. 각 군당 5수씩 부검을 실시하였으며, 비장 무게를 측정한 결과 군별로 유의적인 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

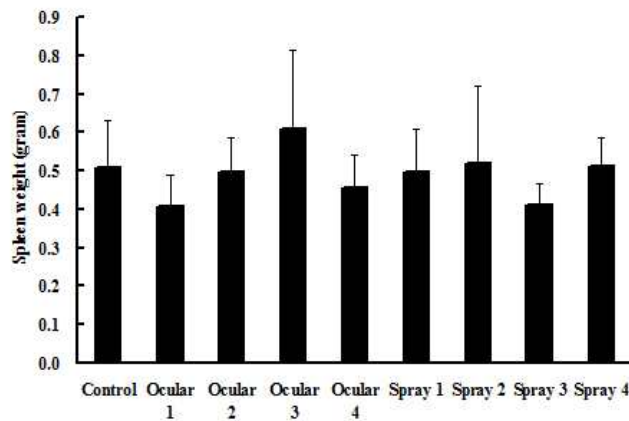


Fig 1.25. 정제봉독 점안과 분무방식에 따른 육계의 비장 무게.

(사) 라이소자임 활성 측정

혈액 내 라이소자임 활성을 측정한 결과 대조군 (9.113 ± 1.118)에 비해 분무 3군 (11.870 ± 0.446)에서 유의적인 증가를 보였다.

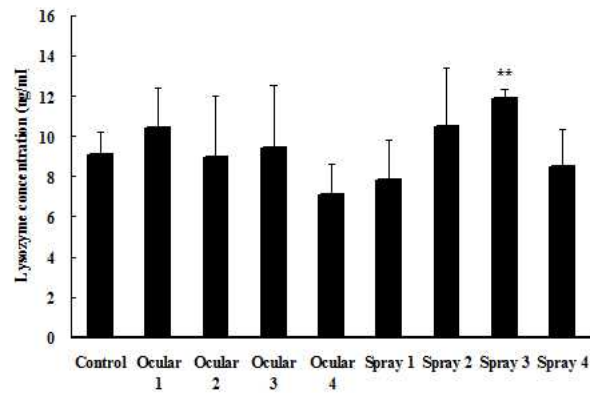


Fig 1.26. 정제봉독 투여에 따른 육계의 라이소자임 활성의 평가.

(아) 상대적 사이토카인 발현의 정도 평가

대조군과 봉독 투여군들의 비장으로부터 RNA를 추출하여 Real-time PCR을 이용하여 사이토카인 (IL-18 그리고 IFN-gamma)의 발현능을 측정하였다. 사이토카인 발현 정도에 있어서 대조군과 봉독 투여군들간의 차이가 없었다.

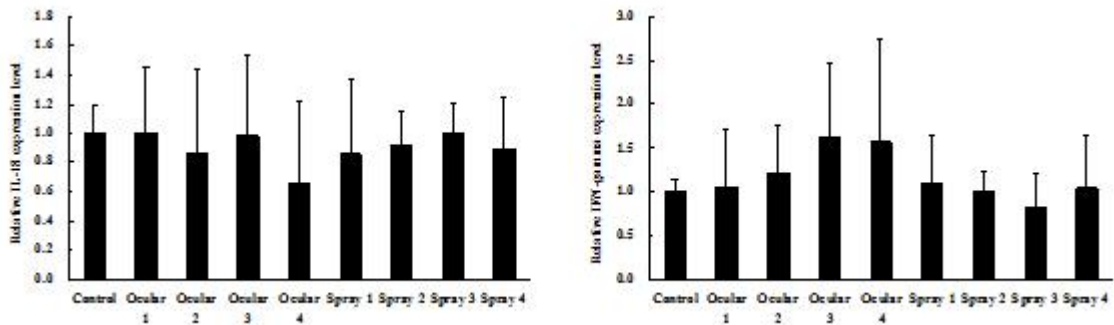


Fig 1.27. 정제봉독 투여에 따른 육계의 사이토카인 발현 정도.

(자) 비장 림프구의 아세포 비율 (Splenocyte subpopulation)

B cell과 T cell의 비율에는 군별 큰 변화가 없었다. 하지만, CD4⁺/CD8⁺ 비율은 대조군 (0.827 ± 0.210)에 비해 분무 3군 (1.358 ± 0.225)에서 유의적인 증가를 보인다.

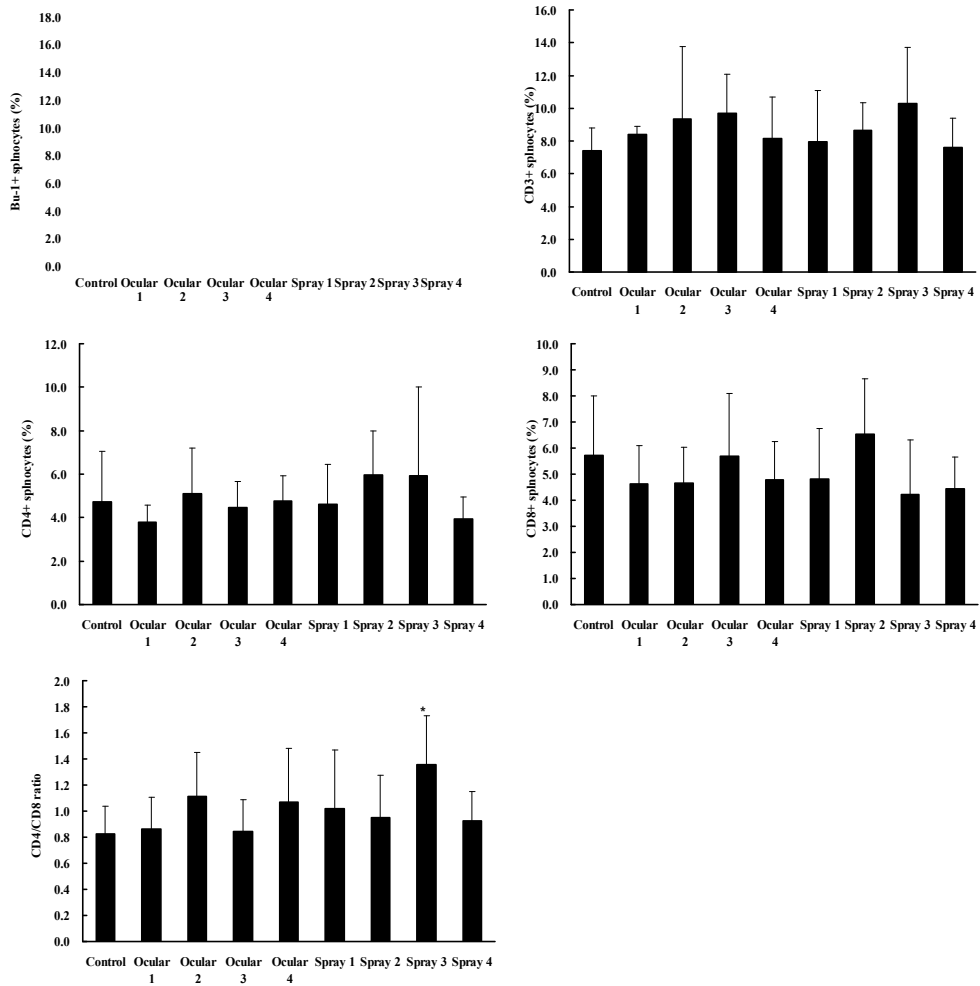


Fig 1.28. 정제봉독 투여에 따른 육계의 비장 아세포의 비율.

(자) 림프구 증식능 평가

림프구의 증식능은 mitogen 무첨가시, 각 군에서 차이를 보이지 않았다. 뿐만 아니라, LPS (B cell mitogen)와 ConA (T cell mitogen)로 자극 시에도 각 군별 유의적인 차이를 보이지 않았다.

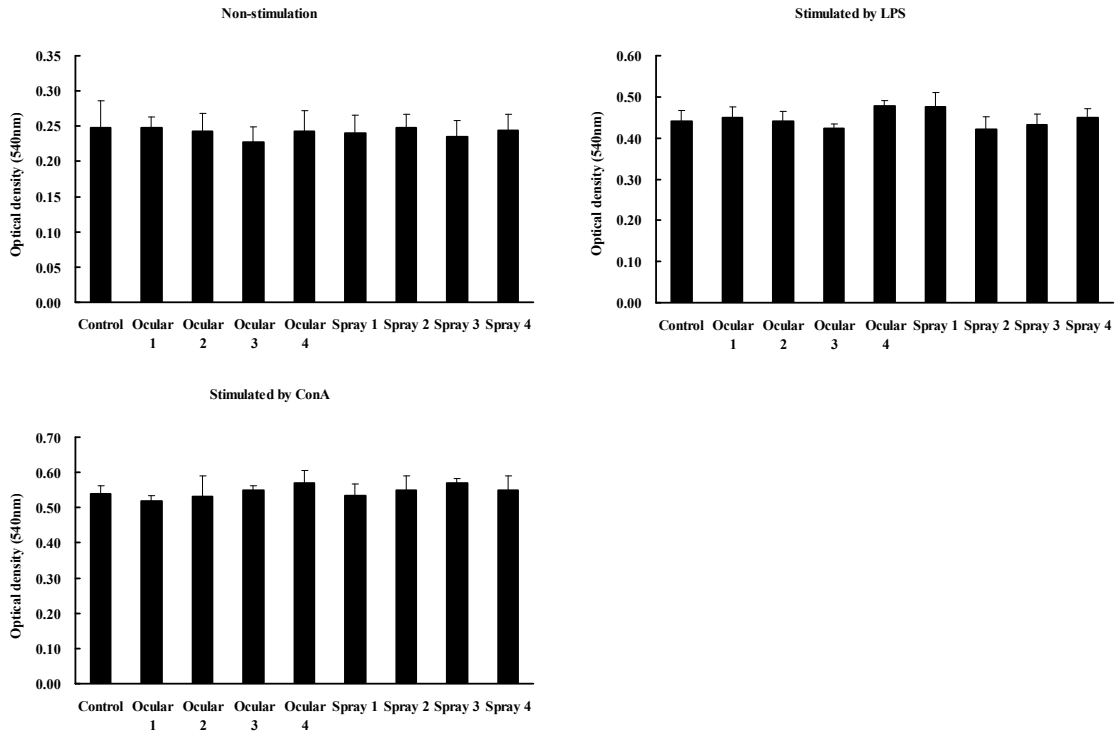


Fig 1.29. 정제봉독 투여에 따른 육계의 림프구 증식능 평가.

(차) 연구결과 요약

본 실험에서 얻은 결과들 중 의미 있는 것들을 종합하여 보면 다음과 같다.

- ① 비장 CD4⁺/CD8⁺ T cell의 비율 : 일반적인 면역 상태의 주요 요소 중의 하나인 CD4⁺/CD8⁺ 세포 비율을 보면 대조군 (0.827 ± 0.210)에 비해 분무 3군 (1.358 ± 0.225)에서 유의적인 증가를 보인다.
- ② 혈중 라이소자임 활성 정도 : 대식세포에서 주로 분비되는 세균벽 파괴 효소인 라이소자임의 농도를 측정된 결과, 대조군 (9.113 ± 1.118)에 비해 분무 3군 (11.870 ± 0.446)에서 유의적인 증가를 보인다.
- ③ 위의 두 가지 의미 있는 결과를 종합하여 볼 때, 정제봉독의 투여 경로는 점안보다는 분무 방식이 더 효과적이며, 정제봉독의 수용성/지용성 비율이 0.25인 것이 효과적이라는 결론을 얻었다. 이러한 결론을 바탕으로 계속되는 실험들에서는 중농도 (2.10mg/ml)의 지용성 함량이 0.25인 정제봉독 즉 수지봉독을 분무 방식을 통해 수행하도록 하였다.

(가) 정제봉독의 지용성 함량과 투여방식 설정실험의 결론

- ① 정제봉독의 최적의 투여경로 : 점안보다는 분무방식
- ② 정제봉독의 최적의 수용성/지용성 비율 : 1:0.25 (정제봉독의 수/지비율; 수지봉독)
(이후로 정제봉독을 수지봉독(lipid-water bee venom)이라함.)
- ③ 정제봉독의 최적의 농도: 2.10mg/ml

(3) 수지봉독 (lipid-water bee venom; LWBV)의 고전압 펄스 처리 (pulsed electric field treatment; PEF)에 따른 육계의 면역력에 미치는 영향

(가) 목적

- ① 수지봉독의 효능에 고전압 펄스 처리가 미치는 영향을 알아보고자 한다.
- ② 2010년과 2011년식 수지봉독의 차이를 알아보고자 한다.
- ③ 수지봉독의 수용성과 지용성 비율에 따른 차이를 이전 실험에 이어 확증하고자 한다.

(나) 실험동물

- 1일령 육계 (Ross) 98수를 완전임으로 14수로 구성된 7개 군으로 나눔.

(다) 수지 봉독 처리군별 봉독의 농도, 구성 및 분무량

각각의 시료는 용제를 사용하여 2.1mg/ml (중농도)의 농도로 제조하여 분무를 실시하였다. 처리군별 분무한 수지봉독의 구성과 분무량은 아래 표와 같다. 수지봉독의 분무는 1일령에 실시하였으며, 부검은 분무 후 19일 (20일령)에 실시하였다.

Table 1.4. 수지봉독 처리군별 봉독의 구성과 농도 및 분무량.

처리군	시료	총분무량	마리당 분무량
Control	용제만 분무	9ml	0.643ml
Group 1	2010년 LWBV (1:0.25)	9ml	0.643ml
Group 2	2011년 LWBV (1:1)	9ml	0.643ml
Group 3	2011년 LWBV (1:0.25)	9ml	0.643ml
Group 4	PEF처리 2010년 LWBV (1:0.25)	9ml	0.643ml
Group 5	PEF처리 2011년 LWBV (1:1)	9ml	0.643ml
Group 6	PEF처리 2011년 LWBV (1:0.25)	9ml	0.643ml

※ LWBV (lipid-water Beevenom, 수지봉독); PEF (Pulsed electric field treatment; 고전압 펄스 처리); ()안의 숫자는 봉독의 수용성과 지용성 비율을 의미한다.



Fig 1.30. 육계 병아리에 수지붕독을 분무하는 모습.

(라) 림프구 증식능 평가

림프구의 증식능은 mitogen 무첨가시, 각 군에서 차이를 보이지 않았다. 뿐만 아니라, LPS (B cell mitogen)와 ConA (T cell mitogen)로 자극 시에도 각 군별 유의적인 차이를 보이지 않았다.

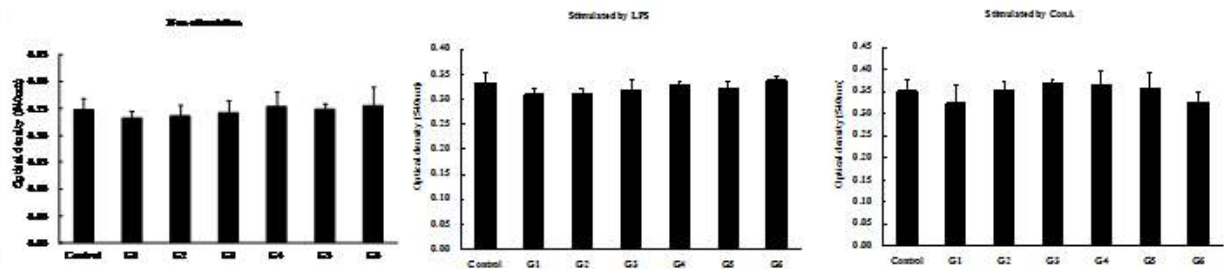


Fig 1.31. 수지붕독 투여에 따른 육계의 림프구 증식능 평가.

(마) 비장에서 T 림프구 아세포 비율

비록 CD8⁺ T cell의 비율은 각 군에서 유의적인 변화가 없었으나, CD4⁺ T cell의 비율이 대조군 (7.86 ± 5.70)에 비해 Group 3 (29.63 ± 5.31)에서 유의적으로 증가하였다.

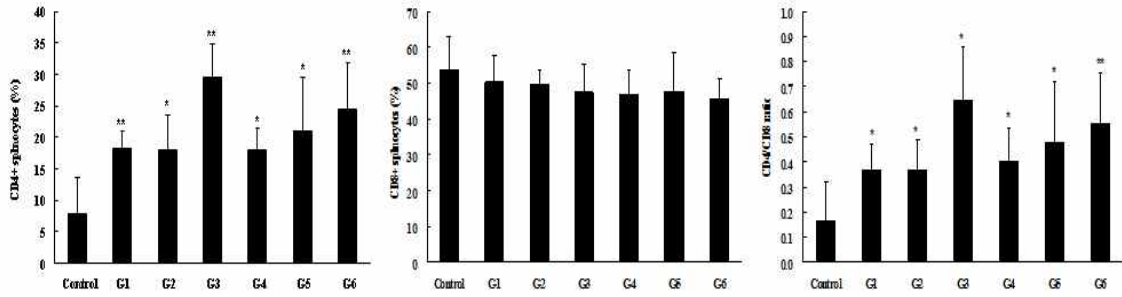


Fig 1.32. 수지봉독 투여에 따른 육계의 비장 T 림프구 아세포의 비율 변화.

(바) 연구결과 요약 및 결론

CD4⁺/CD8⁺ 세포 비율이 대조군 (7.86 ± 5.70)에 비해 Group 3 (29.63 ± 5.31)에서 유의적으로 증가하였다. 따라서, 2011년산의 수용성/지용성 비율이 1:0.25인 PEF처리를 하지 않은 수지봉독이 가장 효과적인 것으로 사료된다. 이러한 결론을 바탕으로 계속되는 실험들에서는 중농도 (2.10mg/ml)의 수용성/지용성 비율이 1:0.25인 PEF처리를 하지 않은 수지봉독을 분무 방식을 통해 수행하도록 하였다. 본 실험을 통해 수용성/지용성 비율이 1:0.25인 수지봉독이 효과적인 것을 한 번 더 확인 할 수 있었다.

○ 지금까지의 결과를 토대로 정제봉독중 육계의 면역력에 가장 효과적인 것은 다음과 같다.

- 정제봉독의 최적의 농도 : 2.10mg/ml
- 정제봉독의 최적의 투여경로 : 분무방식
- 정제봉독의 최적의 수용성/지용성 비율 : 1:0.25
- 정제봉독의 PEF처리 유무 : PEF 비처리
- 정제봉독의 생산년도에 따른 면역활성이 다르게 나타날 수 있음을 확인하였음

(4) 수지봉독에 Gelatin-encapsulation과 Hyaluronidase inhibitor의 첨가유무에 따른 육계의 면역력에 미치는 영향

(가) 목적

- ① 수지봉독의 효능에 Gelatin-encapsulation이 미치는 영향을 알아보고자 한다.
 - 육계에서 수지봉독의 Gelatin-encapsulation을 통한 서방형제제의 가능성을 시험하고자함.

② 수지봉독의 효능에 Hyaluronidase inhibitor이 미치는 영향을 알아보고자 한다.

- 수지봉독 중 수용성과 지용성 비율이 1:0.25인 것이 육계의 면역력에 가장효과 적이었
는데, 이 비율의 수지봉독에서 Hyaluronidase의 활성이 다른 비율의 수지봉독에 비해
월등이 낮음을 제 3협동연구기관에서 밝혀냈다. 따라서 본 실험에서는 Hyaluronidase
inhibitor를 처리가 수지봉독효능 (육계의 면역력에 미치는 영향)에 어떠한 영향을 주는
지를 알아보고자 하였다.

(나) 실험동물 및 수지봉독 분무

1일령 육계 (Ross) 100수를 들여와 하루동안 계류 후, 2일령 육계 병아리를 완전
임의로 5개 군으로 나누었다. 군의 구성과 군당 개체 수 및 체중은 아래 표와 같다.

Table 1.5. 실험군의 구성과 실험 개시 체중 (2일령).

처리군	마리 수	총 무게 (kg)	마리당 체중 (g)
Control (용제)	20	1.25	62.50
Group 1 (EnBV)	20	1.20	60.00
Group 2 (EnBV+i)	19	1.25	65.79
Group 3 (LWBV)	20	1.20	60.00
Group 4 (LWBV+i)	20	1.25	62.50

(다) 수지봉독 처리 군별 봉독의 농도, 구성 및 분무량

2.1mg/ml의 농도의 수지봉독을 아래와 같은 구성으로 총 2회 (생후 2일령과 5일령)에
각각 군당 30ml씩을 분무하였다. 최종분무 후 3일째에 부검을 실시하였다.

Table 1.6. 수지봉독 처리군별 봉독의 구성과 분무량.

처리군	시료	1회 분무량
Control	용제만 분무	30ml
Group 1	EnBV(Encapsulated BeeVenom)	30ml
Group 2	EnBV(Encapsulated BeeVenom)+ Hyaluronidase inhibitor	30ml
Group 3	LWBV (수지봉독, 수지비율 1:0.25)	30ml
Group 4	LWBV (수지봉독, 수지비율 1:0.25)+ Hyaluronidase inhibitor	30ml



Fig 1.33. 육계 병아리에 수지봉독을 분무하는 모습.

(라) 체중

5일령과 8일령 병아리의 각 처리군 군별 전체의 체중을 측정하였으며, 각 처리군의 개체 수로 나누어 평균을 아래 그림과 같이 나타내었다. 육계의 평균 체중이 Group 4 (수지비율이 1:0.25인 Gelatin-encapsulation이 되지 않으면서 Hyaluronidase inhibitor가 처리된 군)에서 가장 높게 나타났다.

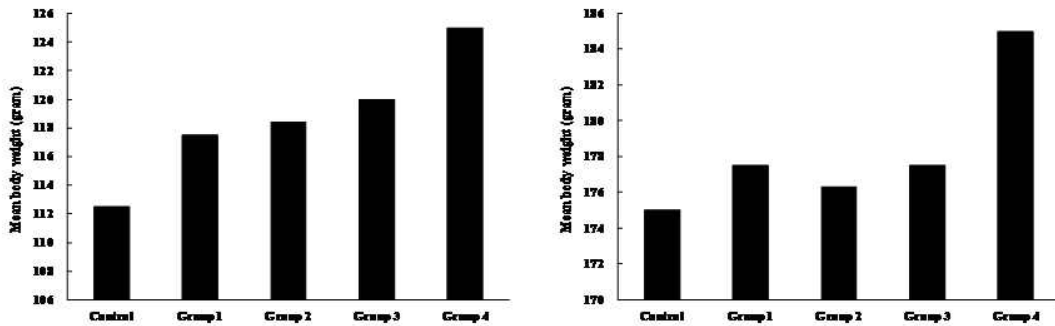


Fig 1.34. 수지봉독 분무에 따른 5일령(좌)과 8일령(우) 육계 병아리의 체중.

(사) 연구결과 요약 및 결론

체중의 증가와 $CD4^+/CD8^+$ 세포 비율이 대조군에 비해 Group 4에서 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과를 보면, 1:0.25의 수지비율의 Gelatin-encapsulation이 되지 않고 Hyaluronidase inhibitor가 첨가된 수지봉독의 분무가 육계의 증체 및 면역력 증강에 유효한 것으로 사료된다.

○ 지금까지의 결과를 토대로 최종적으로 선별된 수지봉독의 구성은 다음과 같다.

- 정제봉독의 최적의 농도 : 2.10mg/ml

- 정제봉독의 최적의 투여경로 : 분무방식
- 정제봉독의 최적의 수용성/지용성 비율 : 1:0.25
- 정제봉독의 PEF처리 유무 : PEF 비처리
- 정제봉독의 Gelatin-encapsulation처리 유무 : 비 Gelatin-encapsulation처리
- 정제봉독의 Hyaluronidase inhibitor첨가 유무 : Hyaluronidase inhibitor첨가

나. 최종 선별된 정제 수지봉독의 육계에서 안전성 및 육질에 미치는 영향의 평가

(1) 목적

- (가) 최종적으로 선별된 수지봉독을 육계 병아리에 수지봉독의 분무가 육계의 간독성과 육질에 미치는 효과를 평가한다.
 - (나) 최종적으로 선별된 수지봉독의 육계에서의 안전성 (간독성)을 평가한다.
 - (다) 최종적으로 선별된 수지봉독의 육계의 육질에 미치는 영향을 평가한다.
- ※ 위의 3가지 목적을 적합하게 실험을 하기 위해 수지봉독을 육계 병아리에 3회 스프레이 이후 에 평가를 실시하였다.

(2) 실험동물

육계 (Ross broiler) 병아리 (1일령) 총 100수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였다. 입사 후 완전 임의로 25수씩 4군으로 나누었으며, 사료와 물을 자유급여하였다. 사육장내의 온도는 28-30°C로 유지시켰으며, 외부공기의 유입을 차단을 위해 후드를 통해서만 환기를 실시하였다.

○ 군 분리 (각 군당 25수)

- Group 1 (Control) : 용제만 분무
- Group 2 (LWBV+i) : 수지봉독(수지비율 1:0.25) + Hyaluronidase inhibitor

(3) 정제봉독의 분무

본 실험에서 사용한 봉독은 이전 실험들의 결과를 바탕으로 최종적으로 선택된 수지봉독 (LWBV, Lipid Water Bee Venom 수지비율 1:0.25)에 Hyaluronidase inhibitor를 첨가한(LWBV+i) 액상봉독으로써 LWBV+i의 농도는 2.1mg/ml이었고 분무 횟수는 1주일 간격으로 3, 9, 15일령에 각 1회씩 총 3회 실시하였으며, 분무량은 육계 병아리의 성장에 맞추어 1차 분무 시 30ml, 2차 분무 시 60ml, 3차 분무 시 90ml씩을 분무하였다.

대조군은 수지봉독을 제외한 용제만을 실험군과 동일한량으로 분무하였다.

(4) 최종적으로 선별된 수지봉독의 육계에서의 안전성 평가

최종 수지봉독 분무 1일 후, 각 군당 완전 임의로 10수씩 부검하여 간독성 평가에 사용하였다. *in vivo* 간독성 검사 (Liver function test) 평가 항목은 총 5가지로 다음과 같다.

- Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT; AST), Glutamic pyruvic transaminase (GPT; ALT), Alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase (LDH), Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)

그 결과 대조군과 수지봉독 점안군의 간효소 지수가 차이가 없음을 확인($P < 0.05$) 하였으며 이는 간독성이 없음을 의미한다.

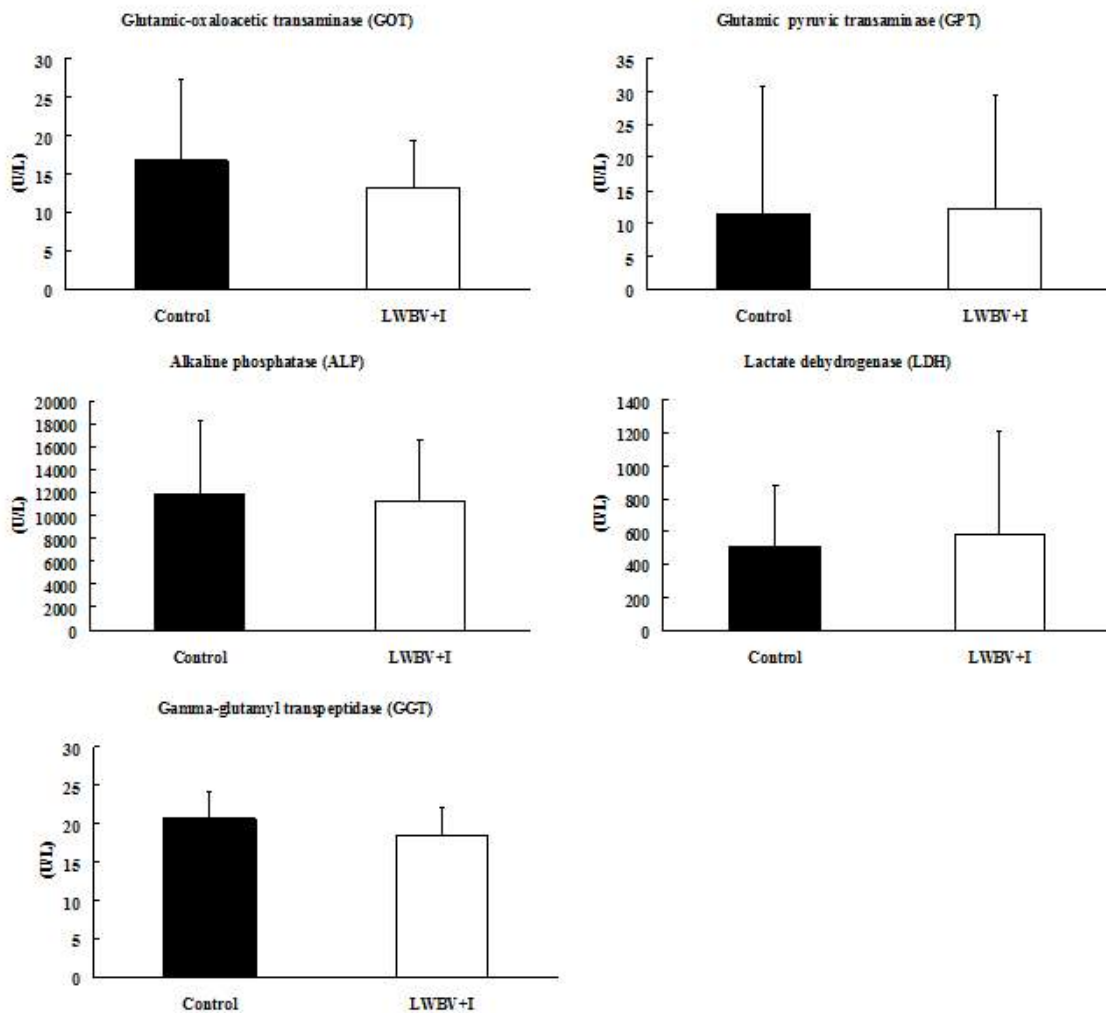


Fig 1.37. 대조군과 수지봉독 점안군의 간효소 지수.

(5) 최종적으로 선별된 수지봉독의 육계에서의 육질 평가

최종 수지봉독 분무 1일 후, 각 군당 완전 임의로 10수씩 부검하여 육계의 육질 평가에 사용하였다. 육질 평가항목은 8가지로 일반성분(수분, 지방, 단백질, 회분)과 전단력, 가열감량, 보수력 및 pH이며, 평가방법은 다음과 같으며, 대조군과 수지봉독 분무군간의 차이를 확인 할 수 없었다.

(가) 가열감량 : 시료를 원형의 일정한 모양으로 정형 (250 ± 50 g)하여 polyethylene bag에 넣어 80°C Water bath에 넣고 물속에 완전히 잠기도록 한 후 40분간 가열한 후, 20분간 수냉하여 시료의 표면 물기를 닦아내고 전자저울로 시료의 무게를 측정하여 구하였다.

(나) 전단력: 가열감량을 측정한 후 근섬유 방향과 평행하게 직경 0.5 inch의 코아로 시료를 채취한 다음 전단력 측정기(warner-Bratzler shear meter)로 전단력을 측정하였다.

(다) 보수력: 시료 300mg의 육을 취해서 여과지 위에 놓은 후 두개의 조임 나사가 달린 plexi-glass판 위로 일정한 힘으로 윗판 나사를 조여서 육에 압력을 가하고, 정확히 5분후 나사를 풀어서 고기로부터 나온 수분의 면적(T)과 육의 면적(M)을 planimeter를 이용 하여 구하고 보수성 공식에 따라 보수성을 측정하였다.

$$\text{보수성(\%)} = \text{육의 면적(M)}/\text{수분의 면적(T:총면적)}$$

(라) pH : 세절육 10 g에 증류수 90mL을 가하고, homogenizer (NS-50, Japan)로 10,000 rpm에서 1분간 균질한 후, pH meter (ATI 370, Orion Research Inc, USA)기를 이용하여 측정하였다.

이상의 실험을 한 결과 봉독을 처치한 닭과 대조군의 닭에서 육질에서는 유의적인 결과를 얻지 못하였다.

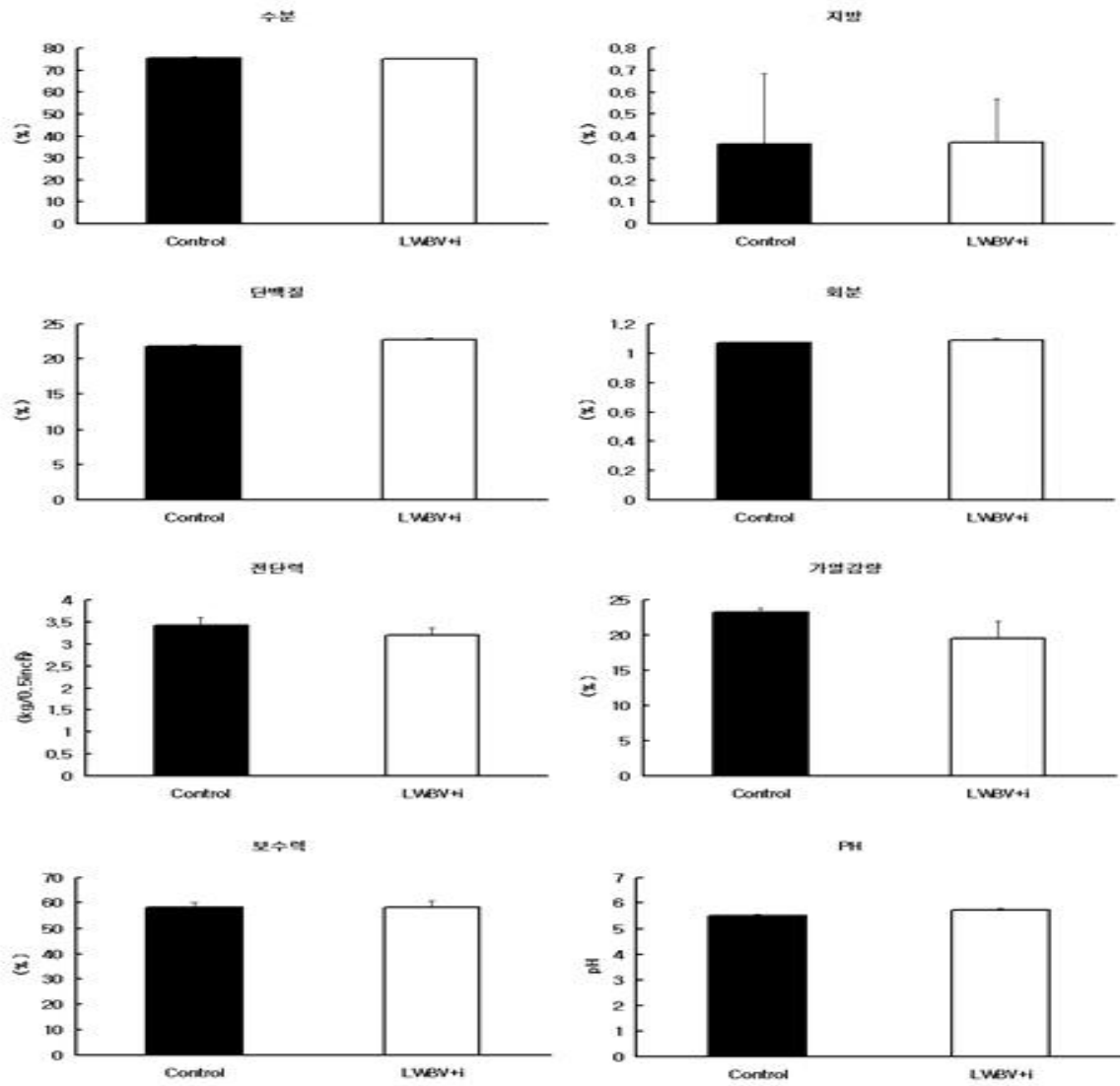


Fig 1.38. 수지봉독 분무에 따른 육계의 육질평가.

4. 돼지에서 봉독치료제의 면역효과 규명

가. 정제봉독의 적정 투여농도 및 투여방법에 따른 돼지에서의 면역증강효과

(1) 실험 목적

정제 수지봉독의 돼지에서 면역효능을 평가하고, 정제봉독의 효능을 극대화 할 수 있는 최적의 투여경로를 설정한다.

(2) 실험동물

이유자돈 (3주령) 20수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였으며, 입사 후에는 완전 임의로 5수씩 4군으로 나누었다.

(3) 수지봉독의 주사 부위에 따른 군 분리

본 실험에서 사용한 봉독은 수지봉독 (LWBV, Lipid Water Bee Venom)에 Hyaluronidase inhibitor를 첨가한 (LWBV+i) 액상봉독으로써 LWBV+i의 농도는 2.1mg/ml이었다. 주사는 0.1ml의 부피를 총 1회 (입사 후 3일차) 실시하였고 주사 부위에 따른 군의 분리는 다음과 같다. 군 당 마리수는 5수이다.

- Group 1: 대조군 (무처치 대조군; Control)
- Group 2: 주둥이부위 주사군 (Snout)
- Group 3: 등쪽 목부위 주사군 (Neck)
- Group 4: 미근부 (Tail base)

봉독 주사 시 사용한 바늘과 각 처리군에 따른 주사부위의 모습은 아래 사진과 같다(Fig 1.39).



Fig 1.39 봉독 주사에 사용한 주사바늘과 각 처리군에 따른 주사부위의 모습.

(4) 체중 변화

봉독 주사 이 후, 1주일간격으로 체중을 측정을 한 결과 주둥이 부위 주사군에서 대조군에 비해 4주령과 5주령시기에 유의적으로 체중이 증가함을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, 미근부 주사군에서도 봉독 접종 1주 후인 4주령시기에 유의적으로 체중이 증가함을 알 수 있었다. 하지만, 등쪽 목부위 주사군에서는 대조군과 체중 변화를 확인 할 수 없었다. 따라서 체중변화에 있어서는 정제 수지봉독의 주둥이 부위 주사와 미근부 주사가 대조군에 비해 유의적으로 효과가 있는 것으로 사료된다 (Fig 1.40).

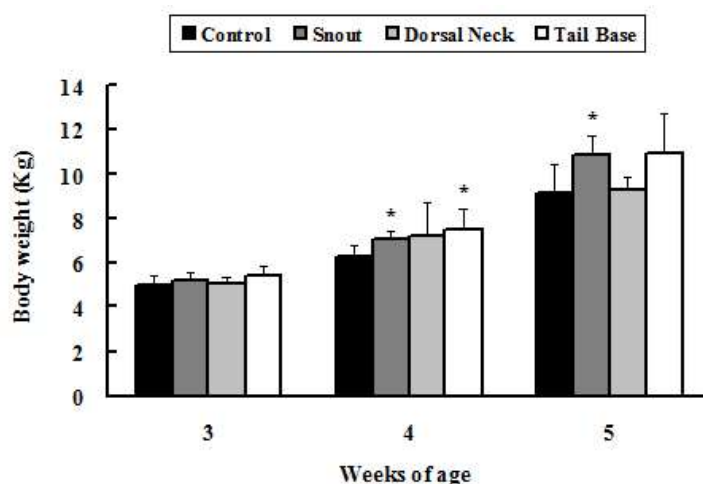


Fig 1.40. 정제 수지봉독 주사에 따른 이유자돈의 체중 변화.

(5) 혈중 라이소자임 활성 측정

봉독 주사전과 봉독 주사 후 1일, 4일, 7일, 12일에 각 대조군과 실험군의 전 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 혈청을 분리하여 혈청 내 라이소자임 활성을 측정하였다. 그 결과 수지 봉독 주사 전과 주사 후 1일 후까지는 각 군별 차이를 확인 할 수 없었으나, 4일과 7일 후의 혈청 중 라이소자임의 활성이 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보임을 확인 할 수 있었다 (Fig 1.41).

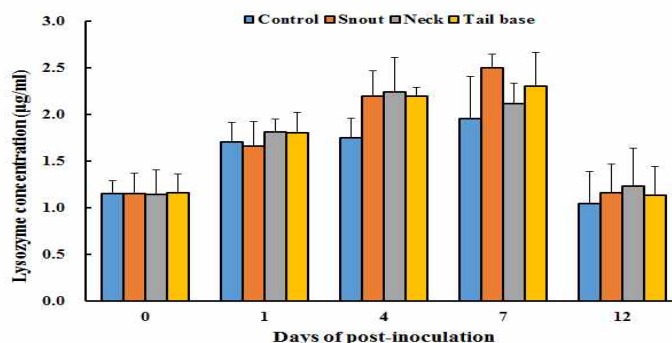


Fig 1.41. 수지 봉독 주사 전후의 날짜별 혈청 내 라이소자임 활성 평가.

(6) 백혈구 감별 계산

봉독 주사 전과 봉독 주사 후 1일, 4일, 7일, 12일에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 백혈구 감별 계산을 실시하였다. 그 결과 봉독 주사전후로 군별 유의적인 차이가 없음을 확인 하였다 (Fig 1.42).

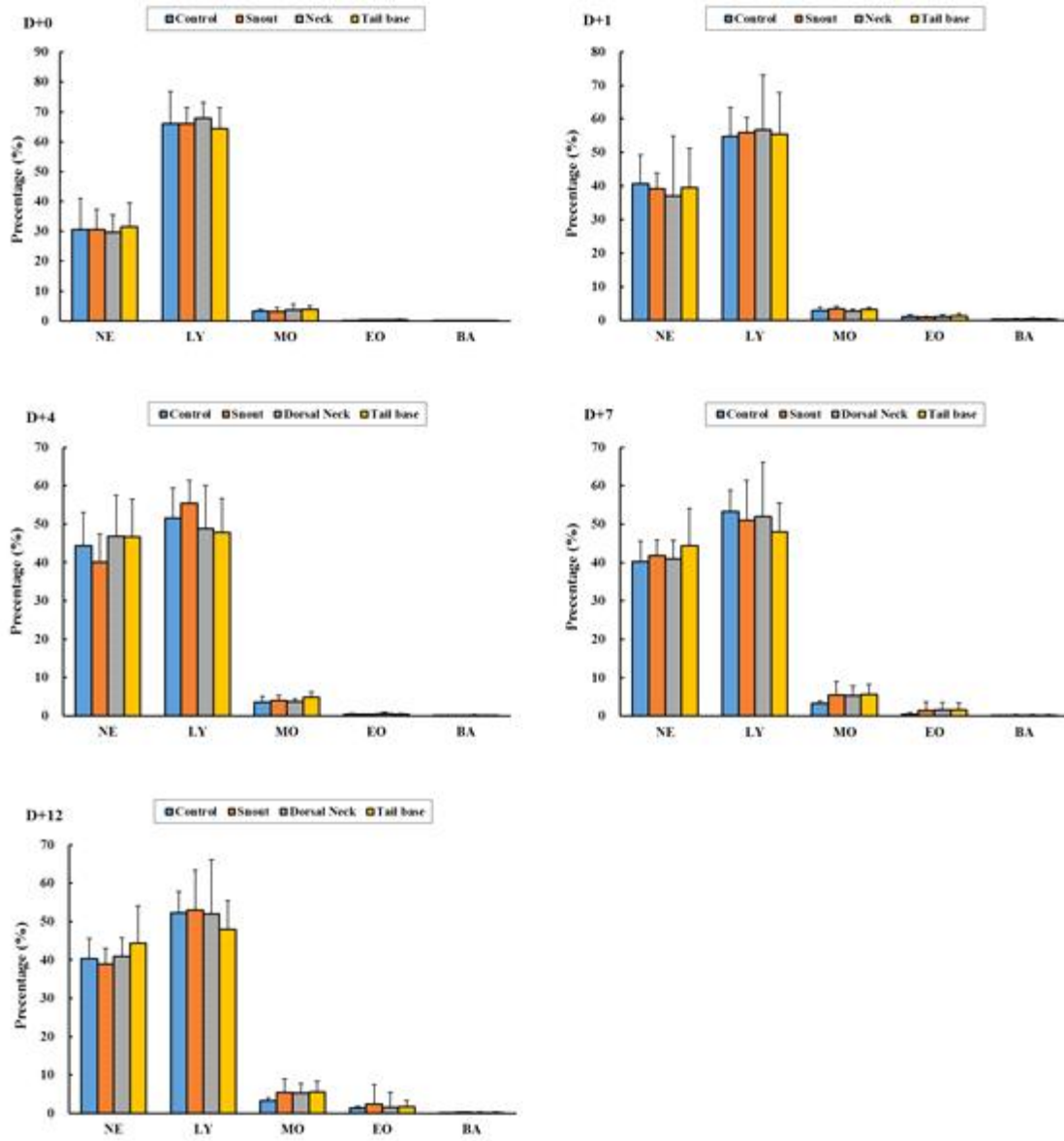
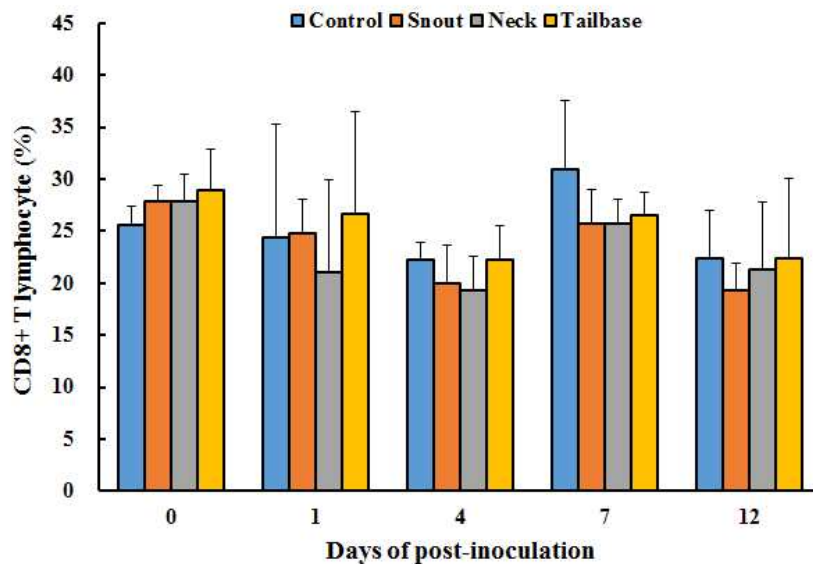
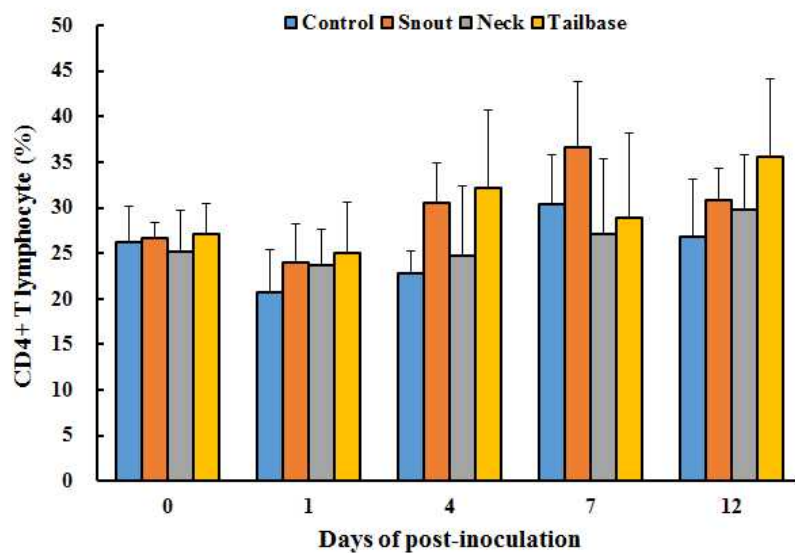


Fig 1.42. 수지 봉독 주사에 따른 이유자돈의 백혈구 감별 계산.

(7) 말초 혈액 중 T 림프구 아세포의 비율 변화

봉독 주사전과 봉독 주사 후 1일, 4일, 7일, 12일에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 T 림프구의 아세포 비율을 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 봉독 주사 전과 주사 1일 후에는 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 군별로 별다른 차이를 보이지 않았다. 하지만 봉독 주사 4일후에는 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 유의성 있게 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, 7일 후에도 주둥이 부위 주사군에서는 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 계속 유의성 있게 높게 유지됨을 확인할 수 있었다. 봉독 주사 12일 후에는 이러한 경향이 사라지고 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 군별로 차이가 없어짐을 확인할 수 있었다 (Fig 1.43).



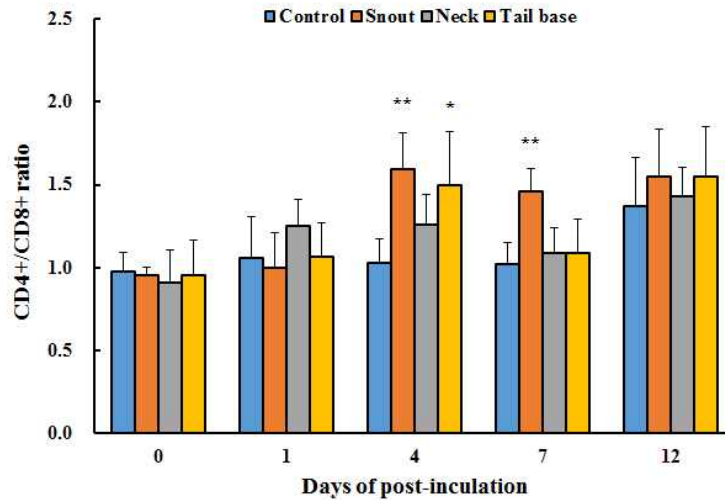


Fig 1.43. 수지 봉독 주사에 따른 이유자돈의 T림프구 아세포 비율의 변화. 봉독 주사 4, 7일후에 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 CD4⁺/CD8⁺ ratio가 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다.

(8) 상대적인 사이토카인 발현능 평가

봉독 주사전과 봉독 주사 후 1일, 4일, 7일, 12일에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 림프구를 분리한 후 RNA를 추출하고, 추출한 RNA를 다시 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA를 template로 사용하여 Real-time PCR 방법을 통해 IFN- γ , TNF- α , IL-1 β cytokine의 상대적 발현 정도를 측정하였다. Real-time PCR의 수행은 MyiQTM real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하였다.

그 결과, IFN- γ level은 봉독 주사전과 봉독 주사 1일 후까지는 군별로 별다른 차이를 나타내지 않았다. 하지만, 봉독 주사 4일과 8일 후 대조군에 비해 모든 봉독 주사군의 IFN- γ level이 증가함을 확인할 수 있었으며, 특히 주둥이 부위 봉독 주사군과 미근부 봉독 주사군에서 유의적인 증가를 확인할 수 있었다. 모든 봉독 주사군에서는 이러한 경향이 봉독 주사 8일 후까지 유지가 되었으나, 주사 12일 후에는 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 또한 TNF- α level과 IL-1 β level의 경우 봉독 주사 전보다 봉독 주사 후에 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지는 않았다.

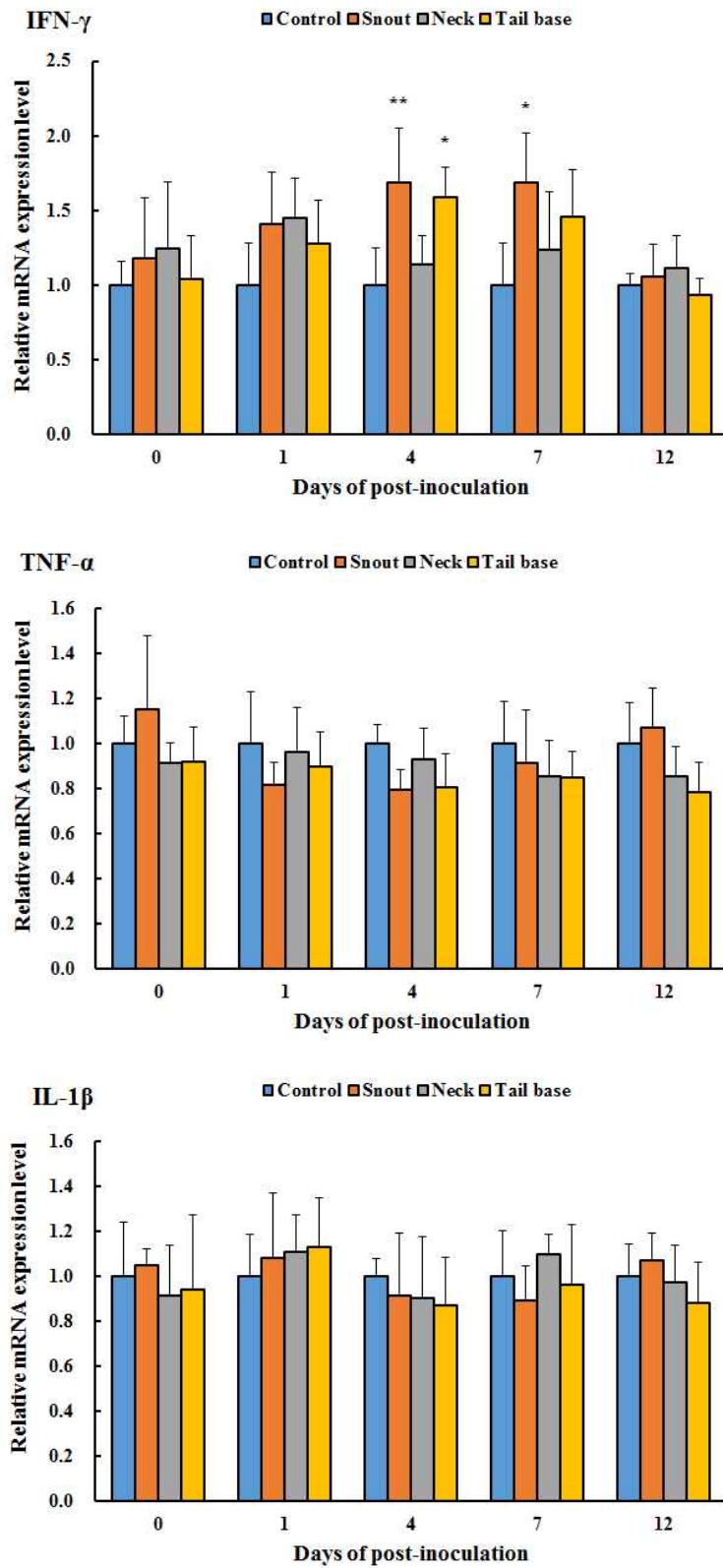


Fig 1.44. 수지 봉독 주사에 따른 이유자돈의 상대적 사이토카인 발현능의 변화. 봉독 주사 4, 7일후에 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 IFN- γ level이 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다.

(9) 정제 수지봉독의 돼지에서 면역효능평가의 주요 결과의 종합

(가) 체중의 증가 확인

정제 수지봉독을 주둥이 부위에 주사한 군에서 대조군에 비해 4주령과 5주령의 시기에 체중이 유의적으로 증가함을 확인 할 수 있었다. 미근부에 주사한 군에서도 대조군에 비해 4주령에 체중의 증가가 있음을 확인하였다. 따라서 이유 자돈의 체중 증가에 있어서 정제 수지봉독을 주둥이 부위에 주사하는 것이 효과적이라는 결론을 얻었다.

(나) 라이소자임 활성의 증가 확인

라이소자임은 대식세포나 T 림프구에서 생산되며, 세균 벽을 파괴함으로써 살균력을 지니는 물질이다. 이 물질이 많이 분비되는 것은 그 만큼 생체의 방어력이 상승하는 것을 의미하는 것이라고 하겠다. 본 연구에서는 수지 봉독 주사전과 봉독 주사 1일 후까지는 각 군별 차이를 확인 할 수 없었으나, 4일과 7일 후의 혈청 중 라이소자임의 활성이 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보임을 확인 할 수 있었다.

(다) CD4⁺/CD8⁺ ratio의 증가

봉독 주사 4일 후의 말초혈액에서 대조군에 비해 주둥이 부위 봉독 주사군과 미근부 봉독 주사군의 CD4⁺/CD8⁺ ratio가 증가함을 확인 할 수 있었으며, 이러한 경향은 봉독 접종 7일 후까지 유지가 되었다. 하지만, 이러한 자극은 접종 후 7일까지 유지되다가 12일 후에는 그 수치가 감소하여 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 따라서 봉독 자극에 의한 CD4⁺/CD8⁺ ratio의 증가는 주둥이 부위 또는 미근부에 봉독을 주사할 때 그 효과가 크게 나타나며, 이러한 자극 효과는 최장 7일까지 지속되는 것으로 생각된다.

(라) IFN-gamma level의 증가

IFN-gamma는 T helper type 1 cell에서 분비되는 사이토카인으로 대표적인 면역증강 사이토카인으로 알려져 있다. 봉독 주사 4일 후의 말초혈액에서 대조군에 비해 모든 봉독 주사군의 IFN-gamma level이 증가함을 확인 할 수 있었으며, 특히 주둥이 부위 봉독 주사군과 미근부 봉독 주사군에서 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, 모든 봉독 주사군에서 이러한 경향이 봉독 주사 7일 후까지 유지가 되었으나, 봉독 주사 12일 후에는 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 따라서 봉독 주사 4일 후에는 말초혈액 내의 IFN-gamma level이 유의적으로 증가하는 것으로 보이며, 이러한 경향이 접종 후 7일차까지 유지되는 것으로 생각된다.

(마) 최종 결론

정제 수지 봉독을 이유자돈에 주사 시, 주둥이 부위에 주사한 군과 미근부에 주사한 군에서 대조군에 비해 여러 가지 면역지표들이 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 체중 증가, 혈중 라이소자임의 활성 증가, CD4⁺/CD8⁺ ratio의 증가 및 IFN-gamma

level의 증가에 유의적인 효과가 있는 것으로 생각되며, 이러한 효과는 정제 봉독 1회 주사 시 최대 7일까지 그 효과가 지속됐으나, 12일 이상의 효과를 보장하지는 못하는 것으로 사료된다.

따라서 주둥이 또는 미근부에 봉독 주사 시 면역 증강 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각되나, 주둥이의 경우 돼지에게 접종 시 보정이 쉽지 않아 돼지에 쉽게 적용할 수 없는 단점이 있는 반면 미근부 접종의 경우 주둥이에 비해 용이하게 돼지에게 봉독을 적용할 수 있었다. 따라서 돼지에 봉독 주사 시 미근부를 이용한 투여 방식이 최적의 투여경로로 생각된다.

5. 정제봉독의 투여에 따른 송아지에서의 면역증강효과

가. 실험 목적

정제 수지봉독의 송아지에서 면역효능평가를 위해 수지봉독을 송아지에 주사 후 면역학적 변화를 조사하였다.

나. 실험동물

송아지 (2주령) 6수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였으며, 입사 후에는 완전 임의로 3수씩 2군으로 나누었다.

다. 수지봉독의 피하 주사에 따른 군 분리

본 실험에서 사용한 봉독은 수지봉독 (LWBV, Lipid Water Bee Venom)에 Hyaluronidase inhibitor를 첨가한 (LWBV+i) 액상봉독으로써 LWBV+i의 농도는 2.1mg/ml이었다. 주사는 1ml의 부피를 총 1회 (입사 후 1일차) 목 부위 피하주사 하였다.

- Group 1: 대조군 (용제만을 주사, control군)
- Group 2: 실험군 (정제 수지봉독을 피하 주사, Bee venom군)



Fig 1.45. 사육장의 모습

라. 혈중 라이소자임 활성 측정

봉독 주사전과 봉독 주사 후 4, 8, 12일에 대조군과 실험군의 모든 송아지의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 혈청을 분리하여 혈청 내 라이소자임 활성을 측정하였다. 그 결과 수지 봉독 주사 전에는 혈중 라이소자임 활성에 변화가 없었으나, 봉독 주사 4일 후에는 대조군에 비해 봉독 주사군의 라이소자임 활성이 유의성 있게 증가하였으며, 8일차까지 이러한 경향이 유지되었다. 봉독 주사 후 12일 후에는 이러한 경향이 소실되어 각 군별 차이를 확인 할 수 없었다 (Fig 1.46).

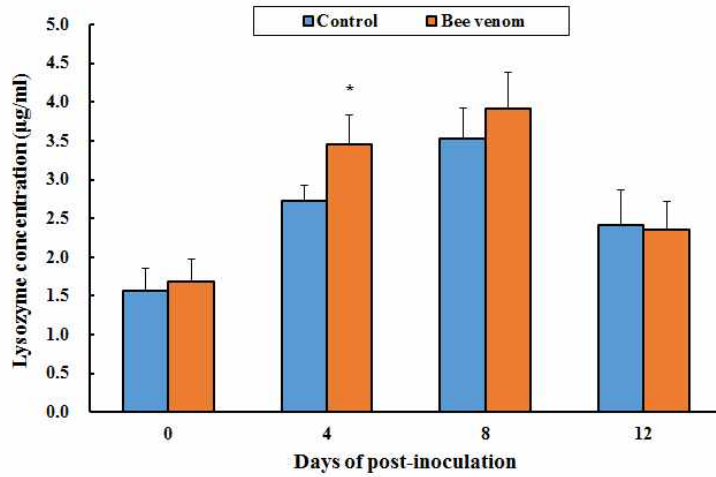


Fig 1.46. 정제 수지 봉독의 주사가 송아지의 혈중 라이소자임에 미치는 영향.

마. 백혈구 감별 계산

봉독 주사 후 12일에 대조군과 실험군의 모든 송아지의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 백혈구 감별 계산을 실시하였다. 그 결과 정제 수지 봉독 피하 접종 군과 대조군간의 별다른 차이점을 확인할 수 없었다 (Fig 1.47).

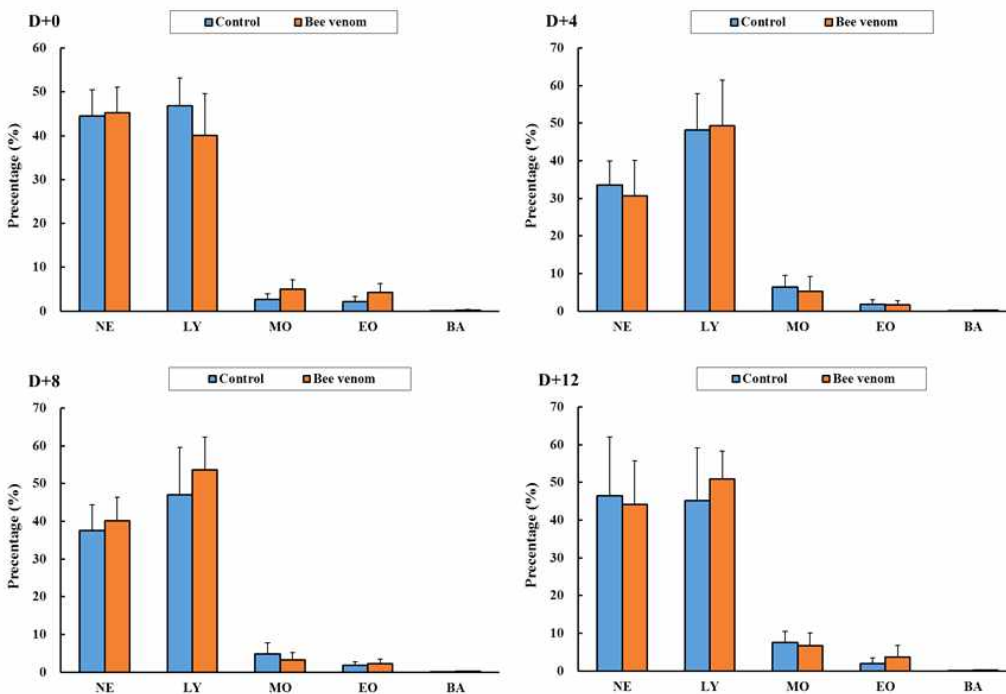
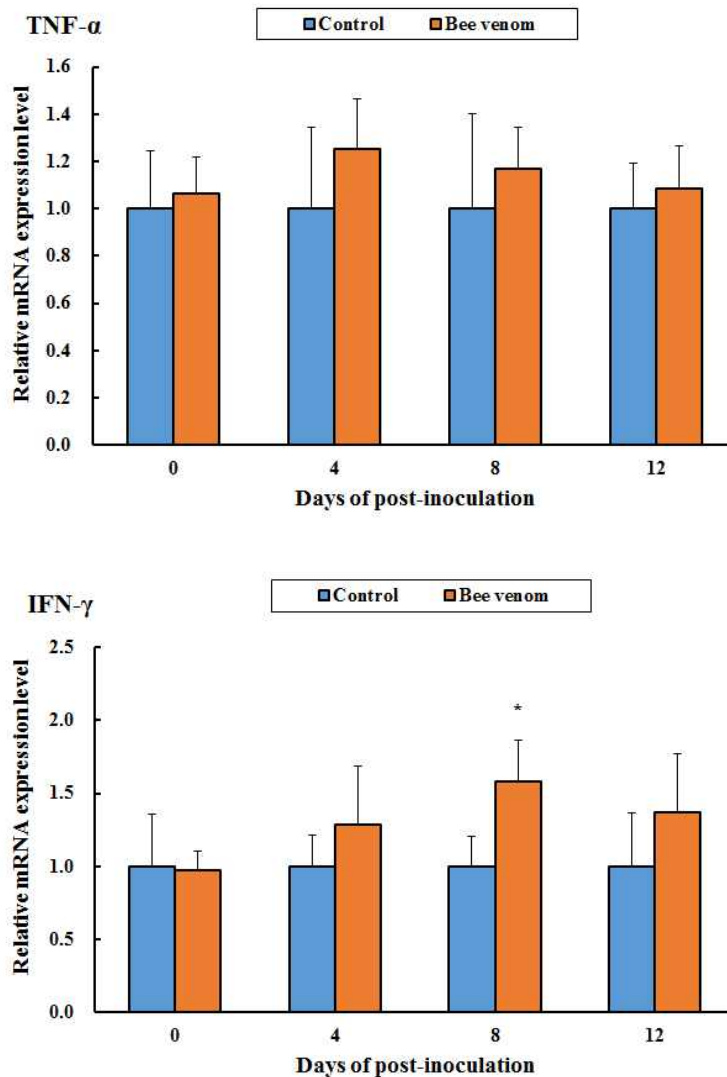


Fig 1.47. 정제 수지 봉독의 피하주사가 송아지의 백혈구 감별 계산에 미치는 영향.

바. 상대적인 사이토카인 발현능 평가

봉독 주사전과 봉독 주사 후 4, 8, 12일에 대조군과 실험군의 모든 송아지의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 이로부터 림프구를 분리한 후 RNA를 추출하여 이를 이용해 real-time PCR을 실시하였다.

그 결과, $TNF-\alpha$ level의 경우 봉독 주사 후 대조군에 비해 봉독 주사군이 약간 증가하는 경향을 보였으나 별다른 유의성은 나타내지 않았다. 또한 $IFN-\gamma$ level은 봉독 주사 후 12일차까지 대조군에 비해 봉독 주사군에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 특히 봉독접종 8일차에서 통계적으로 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 IL-12 level의 경우도 봉독주사 후 대조군에 비해 증가하였으며, 특히 봉독 주사 4일차에 대조군에 비해 모든 봉독 주사군에서 IL-12 level의 유의적인 증가를 확인할 수 있었다 (Fig 1.48).



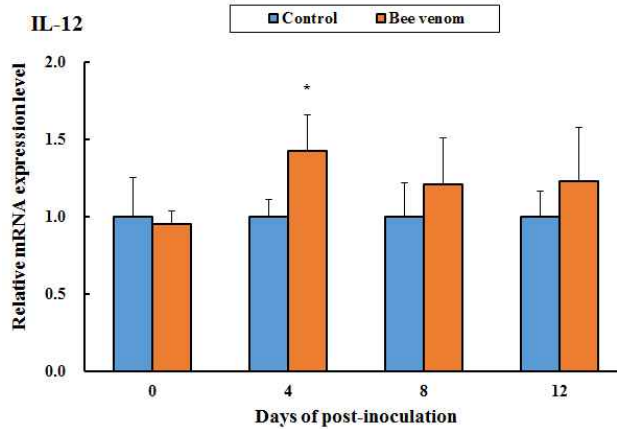


Fig 1.48. 수지 봉독 주사에 따른 송아지의 상대적 사이토카인 발현능의 변화. 봉독 주사 4, 7일후에 봉독 주사군의 IFN- γ level 및 IL-12 level이 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다.

사. 정제 수지봉독의 송아지에서 면역효능평가의 주요 결과의 종합

(1) 라이소자임 활성

라이소자임은 대식세포나 T 림프구에서 생산되며, 세균 벽을 파괴함으로써 살균력을 지니는 물질로, 라이소자임이 많이 분비되는 것은 그 만큼 생체의 방어력이 상승하는 것을 의미하는 것이라고 하겠다. 본 연구에서는 수지 봉독 주사 전에 비해 봉독 주사 4일후와 8일 후의 혈청 중 라이소자임의 활성이 봉독 주사군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보임을 확인 할 수 있었다.

(2) IFN-gamma level 및 IL-12 level

봉독 주사 후 4일차에 봉독 주사군의 IL-12 level이 대조군에 비해 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었고, IFN-gamma level 역시 봉독 접종 8일 후에 대조군에 비해 봉독 주사군에서 유의적으로 증가함을 확인 할 수 있었는데, 이러한 경향은 봉독 주사 12일 후까지 유지가 되었다. 따라서 봉독 주사 4일 후부터 말초혈액 내의 IL-12와 IFN-gamma level이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, 이러한 경향이 주사 후 12일차까지 유지되는 것으로 생각된다.

(3) 최종 결론

정제 수지 봉독을 송아지에 주사 시, 대조군에 비해 여러 가지 면역지표들이 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 혈중 라이소자임의 활성 증가, IL-12 및 IFN-gamma level의 증가에 유의적인 효과가 있는 것으로 생각되며, 이러한 효과는 정제 봉독 1회 주사 시 최대 12일까지 그 효과가 지속되는 것으로 생각된다. 따라서 송아지의 목부위에 봉독을 피하 주사 시 위에서 언급한 면역증강효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

6. 서방형 봉독 제제의 투여에 따른 돼지에서의 면역 효능 평가

가. 실험 목적

PLGA로 봉독을 코팅한 서방형 봉독제제의 돼지에서 면역효능을 평가한다.

나. 실험동물

이유자돈 (3주령) 20수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였으며, 입사 후에는 완전 임의로 5수씩 4군으로 나누었다.



Fig 1.49. 돼지 사육장의 모습

다. 시험군 분리

본 실험에서 사용한 봉독은 수지봉독 (LWBV, Lipid Water Bee Venom)을 PLGA nanoparticle로 코팅한 서방형 봉독제제이며 농도는 2.1mg/ml이었다. 봉독 주사는 입사 후 3일차 0.05ml의 부피로 총 1회 실시하였고, 주사 부위는 1차 실험에서 가장 보정이 용이하고 면역학적 효능이 높게 나타난 미근부 부위를 선정하여 실시하였다. 군 분리는 일반봉독과 서방형 봉독제제의 효능을 비교하기 위한 구성으로 설정하였으며, 군 당 마리수는 5수이다.

- Group 1: 대조군 (무처치 대조군; Control군)
- Group 2: PLGA nanoparticle 단독 주사군 (PLGA군)
- Group 3: 일반 봉독제제 주사군 (일반봉독군)
- Group 4: PLGA nanoparticle로 코팅된 봉독제제 주사군 (서방봉독군)



Fig 1.50. 봉독 주사에 사용한 주사바늘과 이를 이용해 미근부에 봉독을 주사하는 모습

라. 체중 변화

일반봉독 및 서방봉독 주사 이 후, 1주일간격으로 체중을 측정을 한 결과, 체중변화에 있어서는 대조군과 PLGA군 및 봉독주사군들간의 유의적인 차이를 확인할 수 없었다 (Fig 1.51).

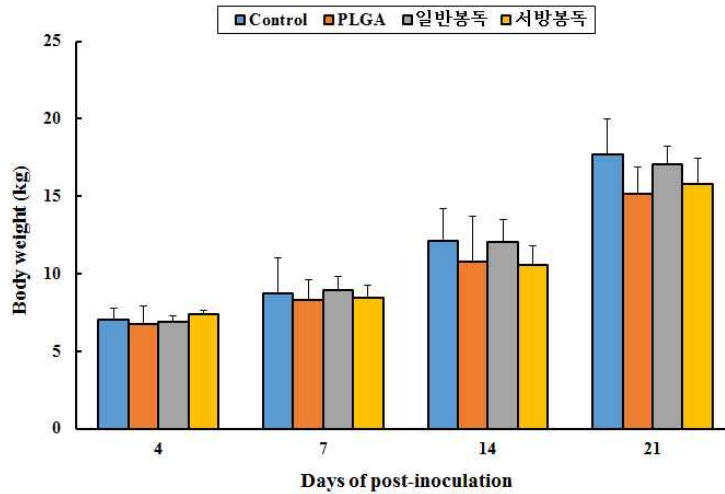


Fig 1.51. 일반 봉독 및 서방봉독 주사에 따른 이유자돈의 체중 변화.

마. 백혈구 감별 계산

일반봉독 및 서방봉독 주사 전과 봉독 주사 후 7일, 14일, 21일에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 백혈구 감별 계산을 실시하였다. 그 결과 봉독 주사 전후로 군별 유의적인 차이가 없음을 확인 할 수 있었다 (Fig 1.52).

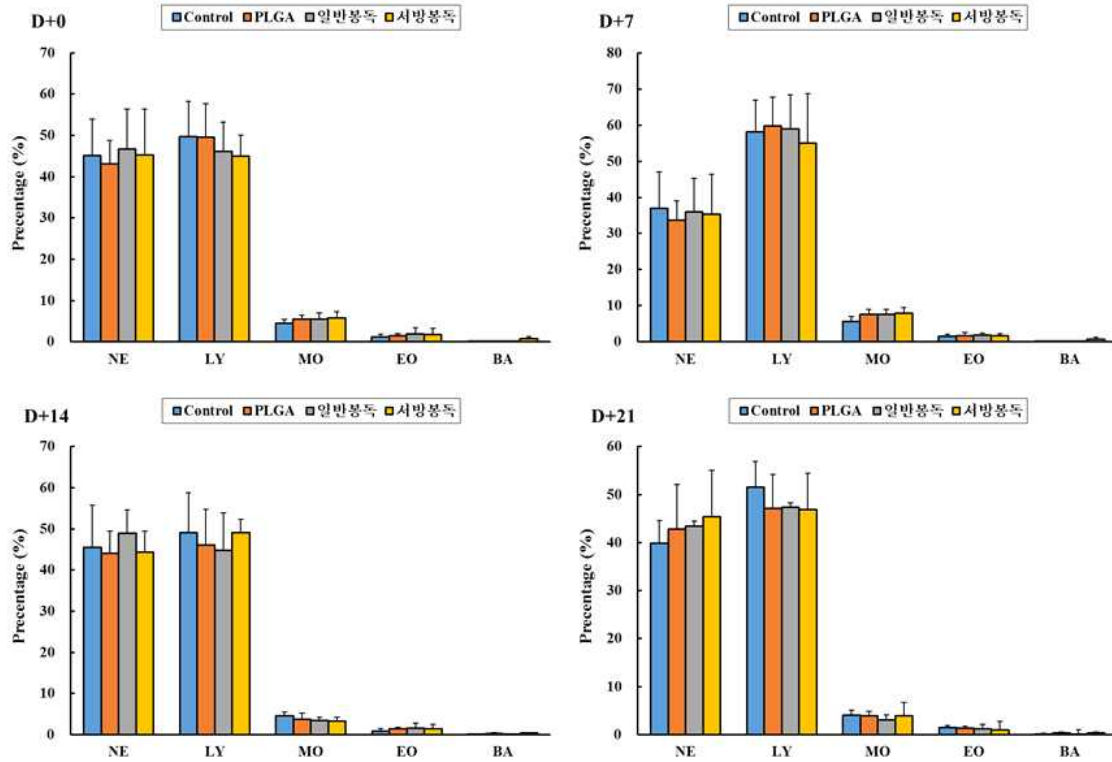


Fig 1.52. 서방봉독 주사에 따른 이유자돈의 백혈구 감별 계산. 봉독 주사 전후의 군별 차이가 없음을 확인할 수 있다.

바. 말초 혈액 중 T 림프구 아세포의 비율 변화

일반봉독 및 서방봉독 주사전과 주사 후 7일, 14일, 21일에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 T 림프구의 아세포 비율을 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 봉독 주사 전에는 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 군별로 별다른 차이를 보이지 않았다. 하지만 봉독 주사 7일후에는 일반봉독군과 서방봉독군의 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 유의성 있게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 봉독 주사 14일 후에는 일반봉독군의 $CD4^+/CD8^+$ ratio는 감소한 반면, 서방봉독군의 $CD4^+/CD8^+$ ratio는 지속적으로 유지되어 통계적으로 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 봉독 주사 21일 후에는 이러한 경향이 사라지고 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 군별로 차이가 없어짐을 확인할 수 있었다 (Fig 1.53). 따라서 일반봉독의 경우 그 효과가 일주일 정도밖에 유지되지 않으나, 서방봉독의 경우 그 효과가 이주일 정도 지속되어 계속적으로 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 증가한 상태가 유지되는 것으로 생각된다 (Fig 1.53).

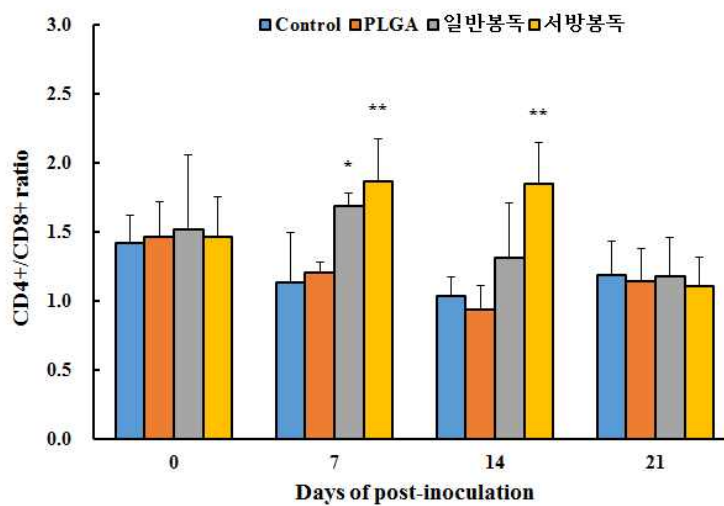
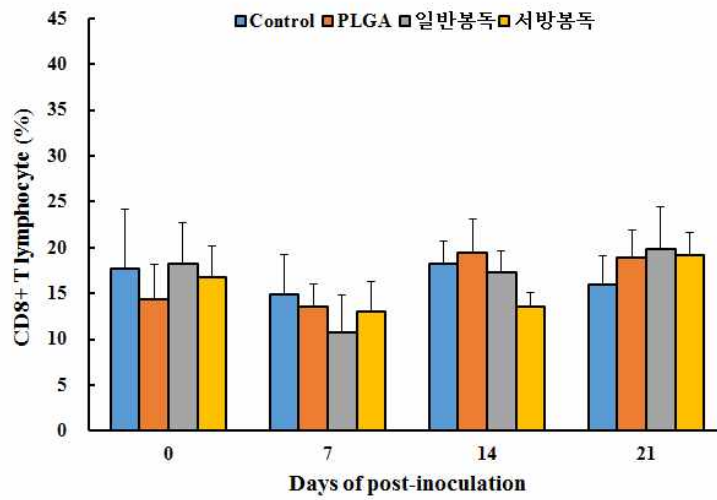
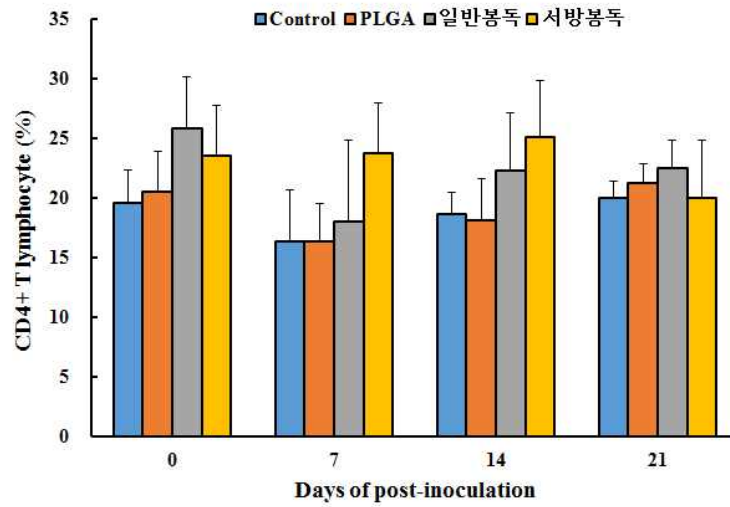
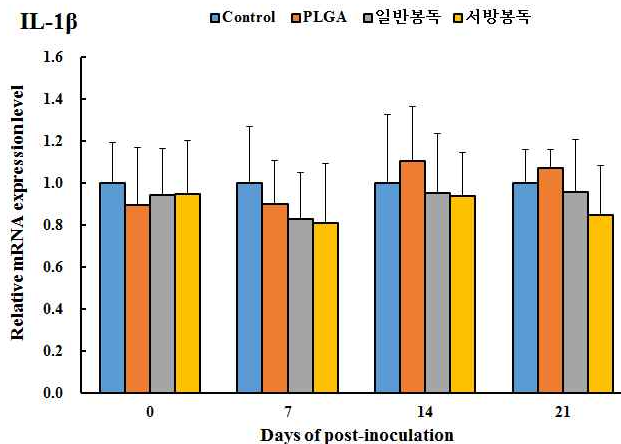
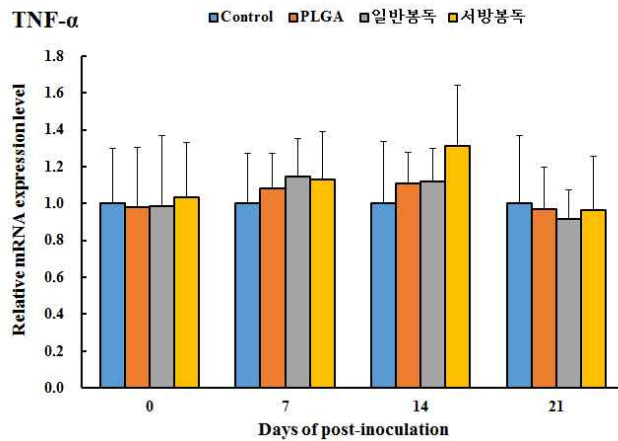


Fig 1.53. 수지 봉독 주사에 따른 이유자돈의 T림프구 아세포 비율의 변화. 봉독 주사 7일후에 일반봉독군과 서방봉독군의 CD4⁺/CD8⁺ ratio가 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었으며, 서방봉독군의 경우 이러한 경향이 14일차까지 유지되었다.

사. 상대적인 사이토카인 발현능 평가

일반봉독 및 서방봉독 주사전과 주사 후 7일, 14일, 21일에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 림프구를 분리한 후 RNA를 추출하고, 추출한 RNA를 다시 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA를 template로 사용하여 Real-time PCR 방법을 통해 IL-4, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β cytokine의 상대적 발현 정도를 측정하였다.

그 결과, TNF- α 의 경우 14일차에 대조군에 비해 서방봉독 주사군에서 약간 증가하는 경향을 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다. IL-1 β 의 경우 봉독 주사 후 일반봉독 및 서방봉독 주사군에서 대조군에 비해 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. IFN- γ 와 IL-12의 경우 봉독 주사 후 일반봉독군과 서방봉독군에서 증가하는 경향을 보였으며, 특히 7일차에서 일반 봉독과 서방봉독 두 군 모두에서 유의적인 증가를 확인할 수 있었다. 하지만 일반봉독군의 경우 봉독 접종 14일 후에는 이러한 경향이 사라지는데 반해, 서방봉독 주사군은 봉독 접종 14일 후에도 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 IFN- γ 와 IL-12 level의 증가를 확인할 수 있었다. 또한 IL-4의 경우 봉독주사 후에 일반봉독 및 서방봉독 주사군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 특히 서방봉독군의 경우 7일차에 통계적으로 유의성 있게 IL-4 level이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



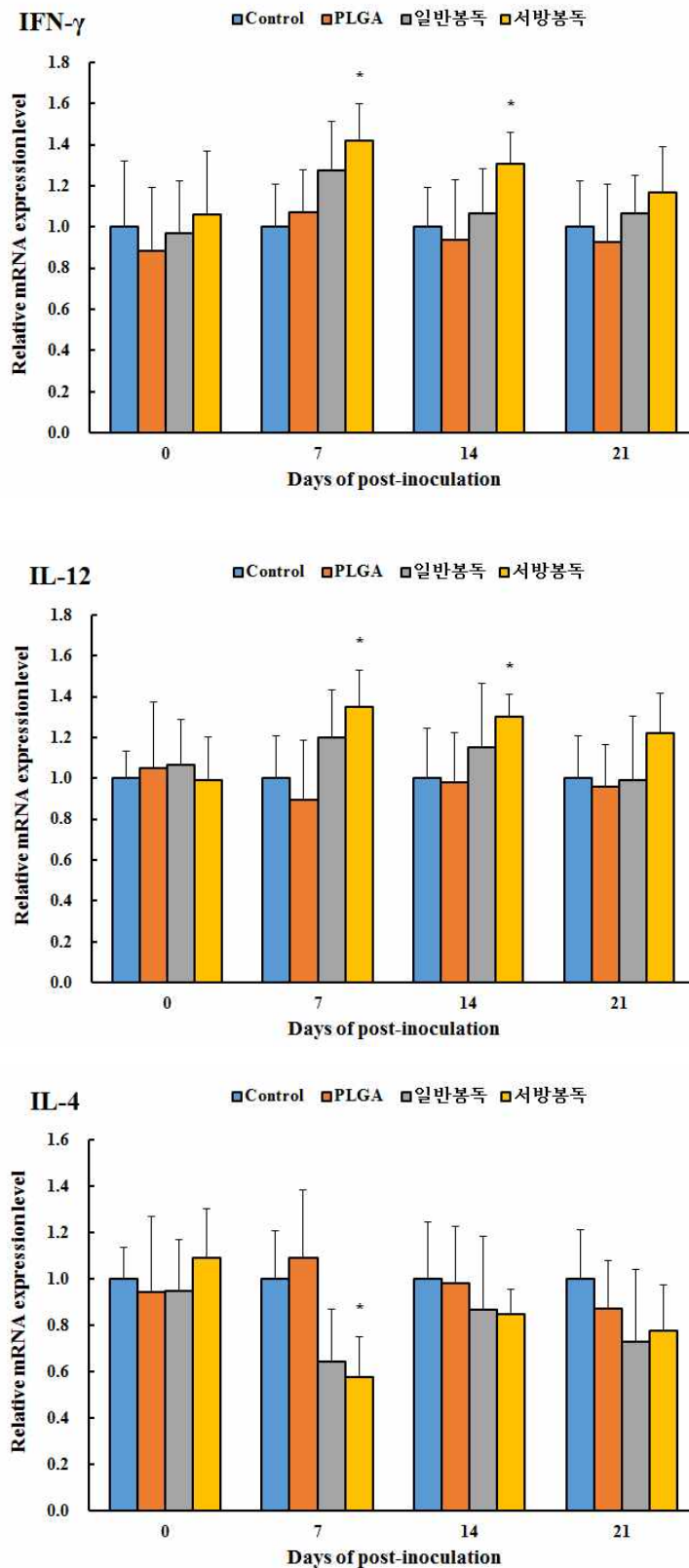


Fig 1.54. 일반 봉독 및 서방봉독 접종에 따른 이유자돈의 상대적 사이토카인 발현능의 변화.

아. 서방형 봉독의 돼지에서 면역효능평가의 주요 결과의 종합

(1) CD4⁺/CD8⁺ ratio의 증가 확인

봉독 주사 7일 후의 말초혈액에서 대조군에 비해 일반봉독 주사군과 서방봉독 주사군의 CD4⁺/CD8⁺ ratio가 유의성 있게 증가함을 확인 할 수 있었다. 하지만 봉독 주사 14일 후에는 일반봉독 주사군의 경우 그 수치가 감소하여 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았으나, 서방봉독 주사군의 경우 이러한 경향이 계속 유지되어 14일차까지 CD4⁺/CD8⁺ ratio가 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 봉독 자극에 의한 CD4⁺/CD8⁺ ratio의 증가는 일반 봉독군의 경우 최대 7일까지 유지되나 서방봉독군의 경우 최대 14일까지 그 효과가 지속되어 일반봉독에 비해 서방봉독이 더 지속적인 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

(2) IFN-gamma level 및 IL-12 level의 증가 확인

IL-12는 주로 대식구에서 분비되는 사이토카인 중 하나로 T helper type 1 cell의 분화를 촉진하여 IFN-gamma의 생성을 증가시키는 사이토카인으로 알려져 있다. 봉독 접종 7일 및 14일 후의 말초혈액에서 대조군에 비해 서방봉독 주사군의 IL-12 level 및 IFN-gamma level이 유의성 있게 증가함을 확인 할 수 있었으며, 이러한 경향은 최대 21일까지 유지되었다. 일반봉독 주사군의 경우 봉독 주사 후 7일차에 IL-12 level 및 IFN-gamma level이 증가하였으나 통계적 유의성을 확인할 수 없었으며, 그 효과가 7일차까지만 지속됨을 확인할 수 있었다. 따라서 일반봉독 또는 서방봉독 주사 시 말초혈액 내의 IL-12와 IFN-gamma level이 증가하나, 그 정도가 서방봉독 주사 시 더 강하게 나타나며, 일반봉독의 경우 이러한 경향이 주사 후 7일차까지만 유지되나 서방봉독의 경우 주사 14일까지 유지되어 일반봉독에 비해 서방봉독 주사 시 더 지속적인 효과를 나타낸다고 생각된다.

(3) IL-4 level의 감소 확인

봉독 주사 7일 후의 말초혈액에서 대조군에 비해 일반봉독 및 서방봉독 주사군의 IL-4 level이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 서방봉독군의 경우 유의성 있게 IL-4 level이 감소함을 확인 할 수 있었다. 따라서 일반봉독 또는 서방봉독 주사 시 말초혈액 내의 IL-4 level이 감소하나, 그 정도가 서방봉독 주사 시 더 강하게 나타나는 것으로 생각된다.

(4) 최종 결론

일반봉독 및 서방봉독을 이유자돈에 주사 시, 특히 서방봉독을 주사한 군에서 대조군에 비해 여러 가지 면역지표들이 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 CD4⁺/CD8⁺ ratio의 증가 및 IFN-gamma level의 증가, IL-12 level의 증가, IL-4 level의 감소에 유의적인 효과가 있는 것으로 생각되며, 이러한 효과는 일반 봉독의 경우 최대 7일까지 그 효과가 지속됐으나, 서방봉독의 경우 최대 14일까지 그 효과가 지속되어 일반봉독에 비해 더 지속적인 면역증강효과를 나타내는 것으로 생각된다.

제 2 절 봉독을 이용한 가축치료제의 닭, 돼지, 소에서의 세균성 및 바이러스성 질병에 대한 항병력 효과 연구

(제 2 세부과제 : 전남대학교 수의과대학 이봉주)

1. 연구목표

- 가. 봉독을 이용한 닭의 세균성(살모넬라) 장염예방 및 치료 효과 검증
- 나. 봉독을 이용한 돼지의 세균성(살모넬라) 장염 예방 및 치료효과 검증
- 다. 봉독을 이용한 돼지의 소모성 바이러스(PCV-2와 PRRS) 질환 예방 및 치료효과 검증
- 라. 봉독을 이용한 송아지의 세균성(대장균, 살모넬라) 및 바이러스성(로타바이러스, 코로나 바이러스) 설사 치료 효과 검증
- 마. 서방형 봉독을 이용한 돼지의 세균성(살모넬라) 장염 예방 및 치료효과 검증

2. 봉독의 육계에서 면역효능평가 및 수지봉독 분무에 의한 육계에서의 살모넬라 감염증 예방효과

가. 실험 목적

- (1) 최종적으로 선별된 수지봉독을 육계 병아리에 3회 스프레이 이후 (*Salmonella Gallinarum* 감염 이전의 상태) 수지봉독의 분무가 육계의 면역력에 미치는 효과를 평가한다.
- (2) 육계에서 수지봉독의 살모넬라 감염증에 대한 항병력효과를 규명한다.

육계에서 수지봉독의 살모넬라에 대한 항병력효과를 규명하기 위해 수지봉독을 육계 병아리에 3회 스프레이 이후, 국내 양계산업에서 가장 큰 문제를 일으키고 있는 *Salmonella enterica* serovar Gallinarum을 농도별 (저농도: 1×10^9 cfu, 중농도: 5×10^9 cfu)로 인공 감염시켰다. 인공감염 전과 후에 면역학적 변화를 조사하였으며, 인공감염 이후에는 항병력능을 평가하였다.

나. 실험동물

육계 (Ross broiler) 병아리 (1일령) 총 100수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였다. 입사 후 완전 임의로 25수씩 4군으로 나누었으며, 사료와 물을 자유급여 하였다. 사육장내의 온도는 28-30°C로 유지시켰으며, 외부공기의 유입을 차단을 위해 후드를 통해서만 환기를 실시하였다. 아래 사진들은 사육장과 각 사육케이지 내부의 모습이다.

○ 군 분리 (각 군당 25수)

- Group 1 (저농도의 *Salmonella* Gallinarum 공격접종을 위한 대조군)
- Group 2 (저농도의 *Salmonella* Gallinarum 공격접종을 위한 봉독 처리군)
- Group 3 (중농도의 *Salmonella* Gallinarum 공격접종을 위한 대조군)
- Group 4 (중농도의 *Salmonella* Gallinarum 공격접종을 위한 봉독 처리군)



Fig 2.1. 육계에서 수지봉독 분무의 면역효능 평가 및 *S. Gallinarum* 인공감염에 대한 항병력능 평가를 위한 병아리의 군분리 및 사육장의 모습.

다. 정제봉독의 분무

본 실험에서 사용한 봉독은 이전 실험들의 결과를 바탕으로 최종적으로 선별된 수지봉독 (LWBV, Lipid Water Bee Venom 수지비율 1:0.25)에 Hyaluronidase inhibitor를 첨가한(LWBV+i) 액상봉독으로써 LWBV+i의 농도는 2.1mg/ml이었고 분무 횟수는 1주일 간격으로 3, 9, 15일령에 각 1회씩 총 3회 실시하였으며, 분무량은 육계 병아리의 성장에 맞추어 각 처리당 [대조군 (n=50) Group 1과 Group 3, 봉독처리군 (n=50) Group 2와 Group 4] 1차 분무 시 30ml, 2차 분무 시 60ml, 3차 분무 시 90ml씩을 분무하였다. 대조군은 수지봉독을 제외한 용제만을 실험군과 동일한량으로 분무하였다. 아래 사진은 분무 시의 모습이다.

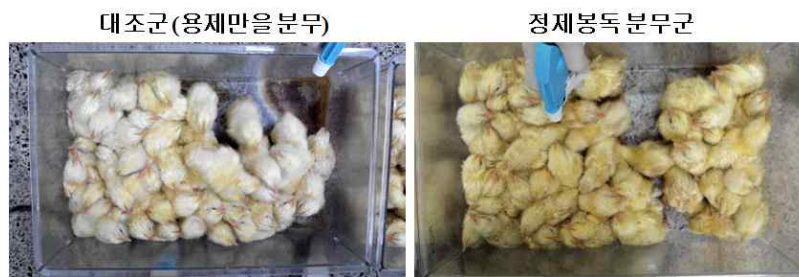


Fig 2.2. 2일령 육계 병아리에게 정제봉독의 1차 분무 모습.

라. 체중변화 (*S. Gallinarum* 공격접종 이전)

체중 측정은 *S. Gallinarum* 공격접종 이전인 3, 9, 15일령에 실시하였다. 대조군인 Group1과 Group3를 합하여 측정하였으며, 봉독 처리군인 Group2와 Group4를 합하여 측정하였다. 측정한 처리구 전체의 무게를 처리구 총 개체 수로 나누어 각 처리구의 개체 당 평균 체중을 구하였다. 그 결과는 아래 Fig 2.3과 같다. 즉, 봉독 스프레이 3회 이후인 15일령의 육계 병아리의 평균 체중을 보면, 봉독 처리구 (305.1 g/chicks)의 평균 체중이 대조구 (294.0 g/chicks)에 비해 마리 당 약 11 gram 정도 증가했음을 알 수 있다.

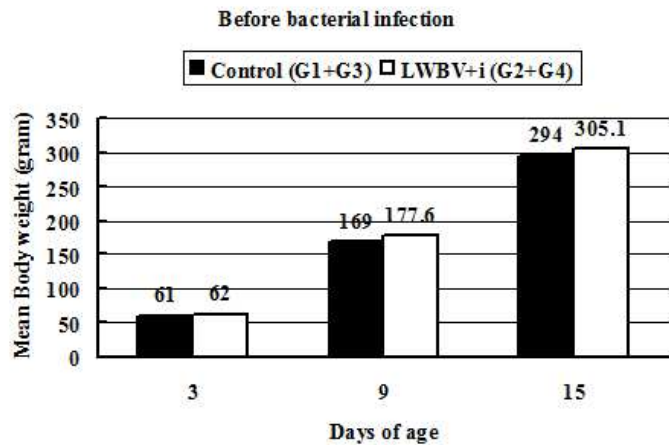


Fig 2.3. *S. Gallinarum* 공격접종 이전의 체중 변화. Control은 봉독을 녹인 용제만을 분무한 구 (Group1과 Group3의 평균 체중)를 의미하며, LWBV+i는 봉독 스프레이를 실시한 구 (Group2와 Group4 평균 체중)를 의미한다.

마. 최종적으로 선별된 수지봉독의 분무가 *S. Gallinarum* 감염 직전의 육계 병아리의 면역상태 비교 분석 실험

수지봉독 3회 분무 이 후, 각 처리군 [대조군 (Group1과 Group3)와 봉독처리군 (Group2과 Group4)]에서 완전 임의로 10마리씩 선택하여 *S. Gallinarum* 감염 직전의 면역상태분석을 위해 사용하였다.

(1) 비장의 무게

수지봉독 3회 분무 이 후, 육계의 중요 면역장기 중의 하나인 비장의 무게를 측정하였다. 그 결과 Fig 2.4에서 볼 수 있듯이, 대조군 (359 ± 63 mg)와 봉독 처리군 (354 ± 70) 사이에 큰 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

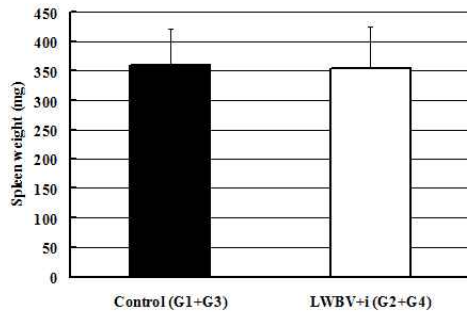


Fig 2.4. *S. Gallinarum* 공격접종 이전, 봉독분무에 따른 면역 장기 (비장)의 무게.

(2) 비장에서 T 림프구 아세포 비율 (T cell subpopulation ratio)

육계에서 $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포의 비율은 면역의 기능과 반응을 측정하는데 일반적으로 이용되어지는 지표이다. $CD4^+ : CD8^+$ 비율이 낮은 상태는 면역 억압성 질병이나 급성 바이러스성 질병에 걸린 개체에서 많이 나타나는 반면, $CD4^+ : CD8^+$ 비율이 높은 상태는 육계의 면역이 증강된 경우 많이 보여진다. 본 연구에서 *S. Gallinarum* 공격접종 이전, 수지봉독 3회 분무 이 후 15일령의 육계 병아리의 비장에서 T 림프구의 아세포인 $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포의 비율을 측정된 결과, Fig 2.5에서 볼 수 있듯이, 봉독 처리구에서 대조구에 비해 $CD4^+$ T 세포의 비율이 증가된 반면, $CD8^+$ T 세포의 비율은 감소되어 $CD4^+ : CD8^+$ 비율이 유의적으로 증가되었음을 알 수 있었다 (Fig 3.5, $P < 0.05$). 이러한 결과는 봉독이 BALB/c 마우스의 $CD4^+$ T 세포증식을 강화한다는 여러 연구자들의 보고와 유사한 결과라고 할 수 있으며, 수지봉독 분무에 따른 높은 $CD4^+ : CD8^+$ 비율은 수지봉독의 분무가 육계의 전반적인 면역 상태를 증진시키는데 도움을 준다고 할 수 있겠다.

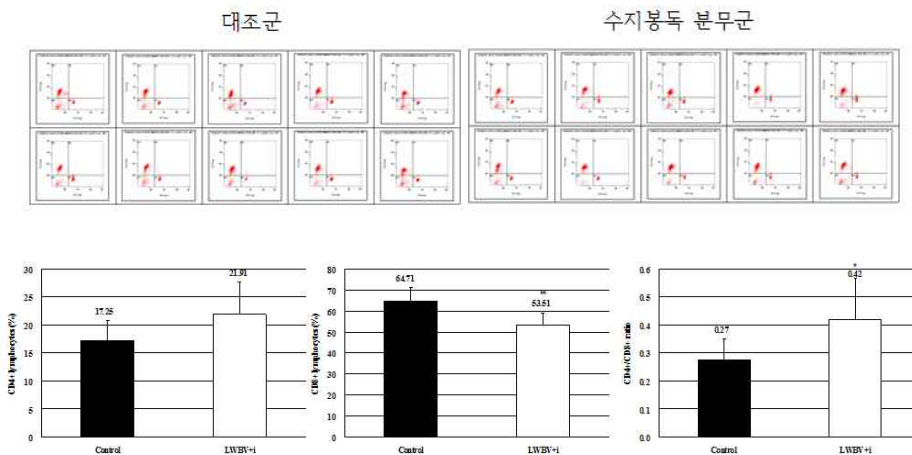


Fig 2.5. *S. Gallinarum* 공격접종 이전, 봉독 분무에 따른 육계 병아리 비장에서 T 림프구 아세포 비율 변화. 수지봉독 3회 분무 1일 후인 15일령의 육계 병아리의 비장에서 $CD4^+ : CD8^+$ T 세포 비율을 측정된 결과임.

(3) 상대적인 사이토카인 발현능 평가

수지봉독 분무가 육계 병아리의 사이토카인 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 *S. Gallinarum* 공격접종 직전, 수지봉독 3회 분무 이 후, 15일령의 육계 병아리의 비장에서 대식세포에서 주로 분비되는 대표적인 사이토카인인 IL-18, T-help 1 세포에서 주로 분비되는 IFN- γ 그리고 T-help 2 세포에서 주로 분비되는 IL-4의 상대적인 발현 정도를 Real-time PCR방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 Fig 2.6에서 보는바와 같이, IL-18과 IFN- γ 의 상대적인 발현정도는 증가하는 경향을 보였으나, IL-4의 상대적인 발현정도는 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 모든 사이토카인 발현의 정도가 통계학적으로 유의적이지는 않았다 ($P > 0.05$). 이 결과는 봉독이 BALB/c 마우스의 IFN- γ 의 발현을 강화한다고 보고한 많은 연구자의 결과와 유사하며, IFN- γ 와 같은 대표적인 항균효과를 가진 사이토카인 발현의 증가는 살모넬라 감염 시에도 큰 도움을 줄 것으로 기대하게 한다.

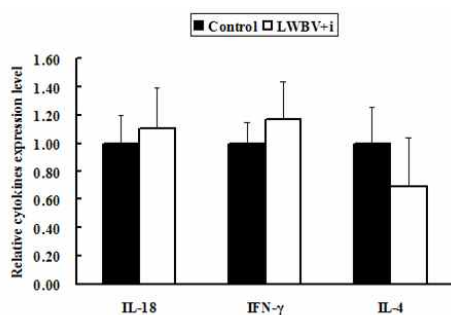


Fig 2.6. 상대적인 사이토카인 발현정도. *S. Gallinarum* 공격접종 이전, 수지봉독 3회 분무 이 후 15일령의 육계 병아리의 비장에서의 사이토카인 발현 정도.

(4) 라이소자임 활성 평가

라이소자임은 대식세포나 다형핵 백혈구와 같은 탐식구들에서 주로 분비되며 세균의 벽을 녹이는 항균물질이다. 수지봉독 분무가 육계 병아리의 라이소자임 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 본 연구에서는 *S. Gallinarum* 공격접종 이전, 수지봉독 3회 분무 이 후 15일령의 육계 병아리의 혈청에서 라이소자임의 활성을 측정하였다. 측정하는 방법은 Kreukniet et al. (1995)의 방법을 따랐다. 그 결과, Fig 2.7에서 보는 바와 같이 봉독 처리구 (2.50 ± 0.35 ug/ml)에서 대조구 (1.45 ± 0.22 ug/ml)에 비해 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었다 ($P < 0.05$).

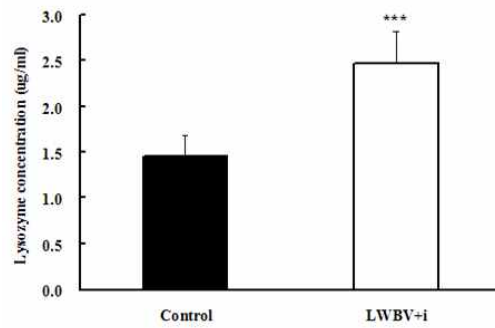


Fig 2.7. *S. Gallinarum* 공격접종 이전, 봉독 분무에 따른 육계 병아리 혈청에서 라이소자임 활성의 측정.

바. *S. Gallinarum* 인공 감염된 육계에서 수지봉독의 항병력 효과

S. Gallinarum 인공 감염 직전의 수지봉독 분무에 의한 면역증강효과 분석의 결과를 보면, 수지봉독 분무는 육계 병아리의 체중을 증가시키는 경향을 보였으며, 비장에서 $CD4^+ : CD8^+$ 세포의 비율의 유의적인 증가와 IL-18과 IFN- γ 의 상대적인 발현정도를 상승, IL-4의 상대적인 발현정도를 감소시키는 경향을 보였다. 뿐만 아니라, 혈청 중 라이소자임의 활성을 증가시켰다. 이러한 결과 중, *S. Gallinarum* 인공 감염에 대한 항병력을 기대하게 하는 결과를 보면, 강력한 항균성 사이토카인인 IFN- γ 의 상대적인 발현정도의 상승과 라이소자임 활성의 유의적인 증가를 들 수 있겠다. 뿐만 아니라, 체중의 증가나 $CD4^+ : CD8^+$ 세포의 비율의 유의적인 증가의 결과 또한 수지봉독 분무가 육계의 전반적인 건강 상태나 면역 상태의 향상에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대하게 한다. 따라서 본 실험에서는 수지봉독 3회 분무 이 후 15일령의 육계 병아리에 *S. Gallinarum*의 공격 접종을 실시하여 수지봉독의 *S. Gallinarum*에 대한 항병력 효과를 평가하였다.

(1) *S. Gallinarum* 인공감염

본 실험에서 육계의 인공감염을 위해 사용한 *S. Gallinarum*의 strain은 SG3001이며, 저농도 (1×10^9 cfu/ml)와 중농도 (5×10^9 cfu/ml)를 각각 사용하였다. 본 실험에서 사용한 *S. Gallinarum*은 병원성 *S. Gallinarum*에 감염된 닭에서 분리한 wild type의 strain으로, 농림축산검역본부로부터 분양받아 사용하였다. 저농도의 *S. Gallinarum*의 공격 접종한 실험구는 주로 면역학적 분석 및 분변으로 분비되는 세균의 수를 측정하는데 이용하였으며, 중농도 (5×10^9 cfu/ml) *S. Gallinarum*의 공격 접종한 실험구는 임상증상과 폐사율을 평가하는데 중점을 두고 실험을 실시하였다. 아래 사진은 *S. Gallinarum*의 구강으로 접종시키는 모습이다.



Fig 2.8. *S. Gallinarum* 인공감염. 수지봉독 3회 분무 이 후 15일령의 육계 병아리에 *S. Gallinarum*을 구강으로 인공감염 시키는 모습.

(2) 저농도 (1×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종한 실험

(가) 균 분리 (각 군당 20 수)

- Group 1 (저농도의 *S. Gallinarum* 공격접종을 위한 대조군)
- Group 2 (저농도의 *S. Gallinarum* 공격접종을 위한 봉독 처리군)
- 두 군은 공격접종 이 후, 3, 7, 10, 14일에 각 군당 5마리씩 완전임의로 선택하여 면역학적 분석 및 기타 세균학적 분석에 사용하였다.

(나) 체중변화 (저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후)

체중 측정은 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 7일과 14일에 실시하였다. 공격 접종 14일 후, 봉독 처리구 (1200 ± 158.1 g/chicks)의 평균 체중이 대조구 (1050.0 ± 135.4 g/chicks)에 비해 마리 당 약 150 gram 정도 증가했음을 알 수 있다. 이러한 결과는 수지봉독의 분무가 육계 병아리에서 저농도의 *S. Gallinarum* 감염 시에 발생할 수 있는 체중 감소를 완화 할 수 있을 것으로 기대된다.

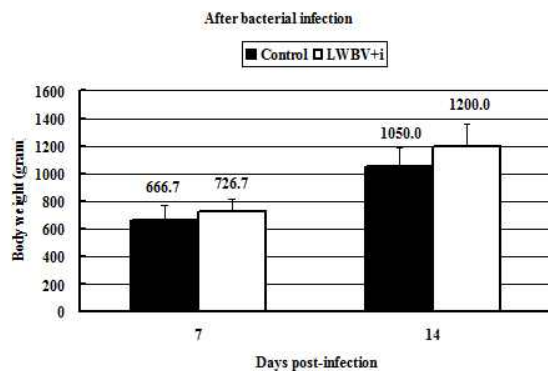
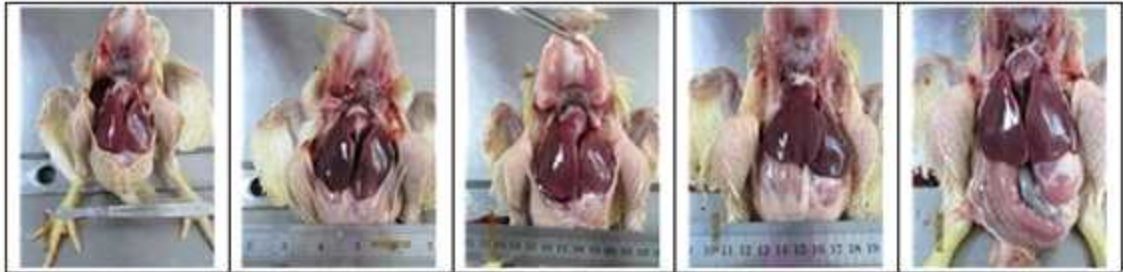


Fig 2.9. 저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후의 체중 변화.

(다) 육안적 부검 소견 (저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후)

○ 공격 접종 3일 후 (D+3)

대조군

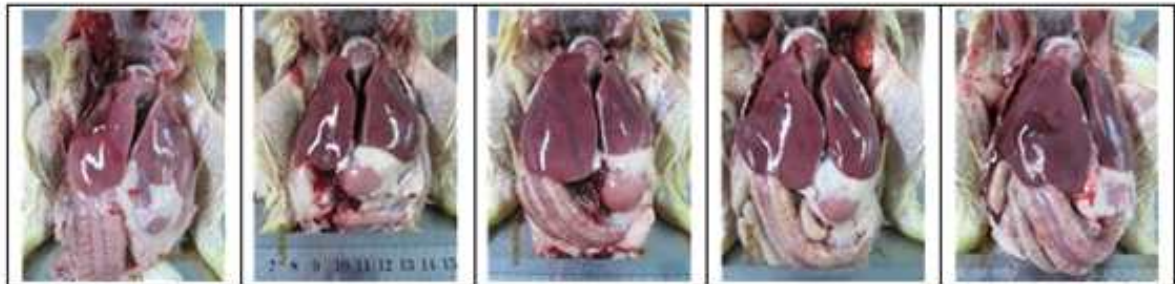


수지봉독 분무군



○ 공격 접종 7일 후 (D+7)

대조군

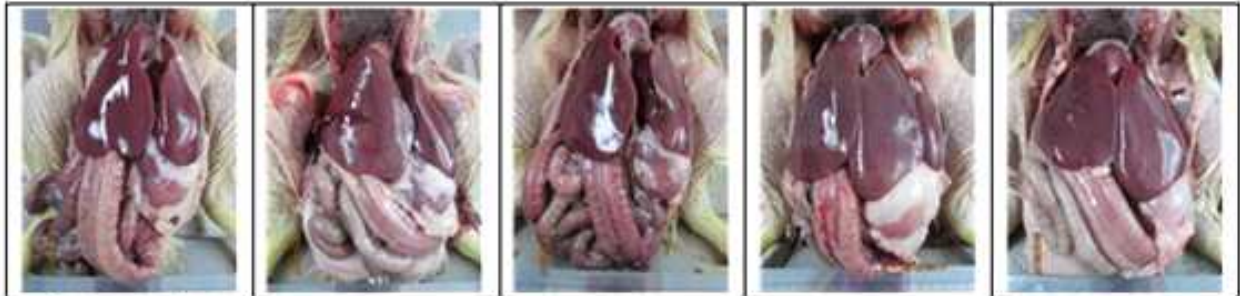


수지봉독 분무군



○ 공격 접종 10일 후 (D+10)

대조군

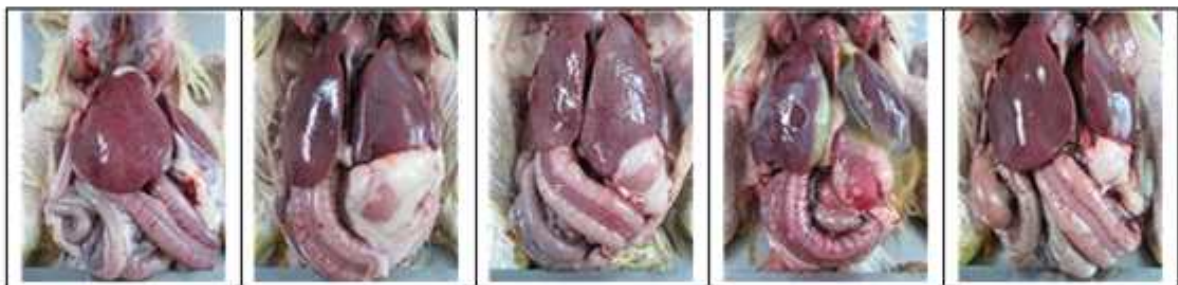


수지봉독 분무군



○ 공격 접종 14일 후 (D+14)

대조군



수지봉독 분무군



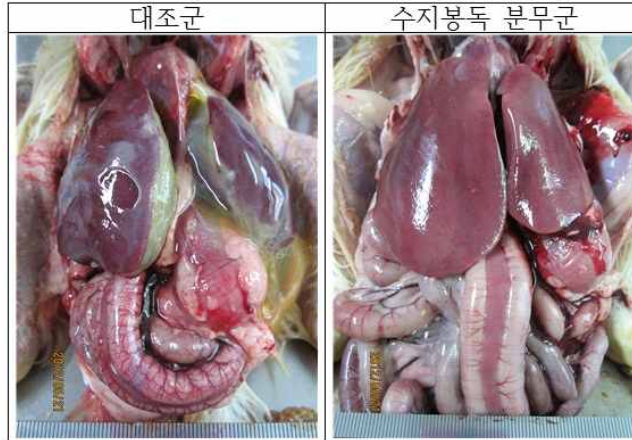


Fig 2.10. 저농도의 *S. Gallinarum* 공격접종 14일 후, 대조군과 수지봉독 분무군의 대표적인 부검사진.

대조군과 수지봉독 분무군 모두에서 저농도의 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 시간에 따라 *S. Gallinarum*의 전형적인 병변인 간과 비장의 종대가 나타났다. 뿐만 아니라, 공격 접종 14일 이후에는 복수와 간주위의 섬유소성 위막형성 및 간과 소장부위에 necrotic foci의 형성을 확인 할 수 있었다. 하지만, 병변의 정도는 수지봉독 분무군이 대조군에 비해 심하지 않았다. 앞의 사진은 대조군과 수지봉독 분무군의 대표적인 부검의 모습이다 (저농도의 *S. Gallinarum* 공격접종 14일 후 부검 소견).

(라) 각 장기에서 세균의 수 (저농도 *S. Gallinarum* 접종 이후)

저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 3, 7, 10, 14일에 각각 간, F낭 및 맹장을 수거하여 *S. Gallinarum*의 수를 측정 하였다. 측정 결과, 비록 전 기간에 걸쳐 통계적으로 유의성있게 차이가 나지는 않았지만, 대조군에 비해 수지봉독 분무군에서 간, F낭 및 맹장 모두에서 *S. Gallinarum*의 수가 감소하였음을 확인 할 수 있었다.

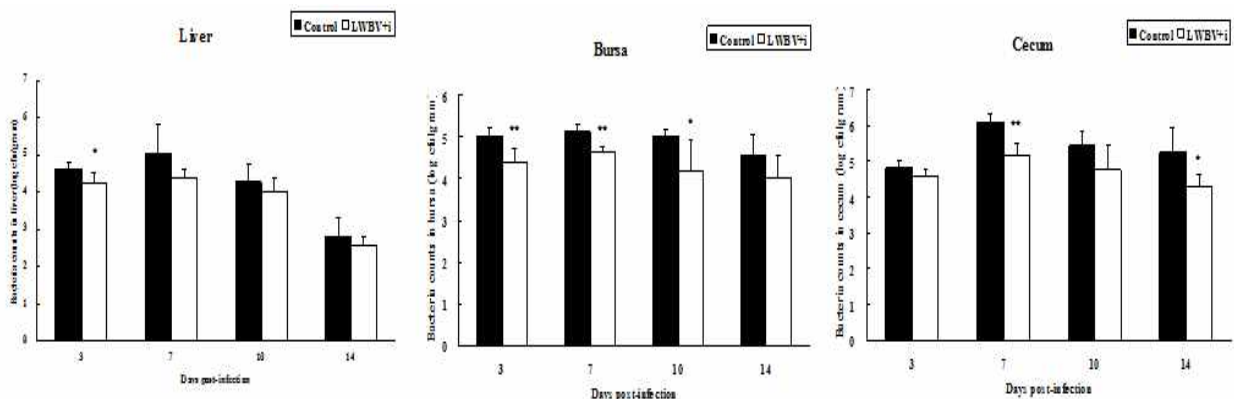


Fig 2.11. 저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 육계 병아리의 간, F낭 및 맹장에서 검출된 세균의 수 (cfu/gram tissues).

(마) 장기의 무게 (저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후)

저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 3, 10, 14일에 각각 간, 비장, F낭의 무게를 측정하였다. 그 결과는 아래 그래프에서 보는 바와 같이, 비록 통계적 유의성은 없었으나, 수지봉독 분무군의 간과 비장이 대조군에 비해 심하지 않은 증대를 보였으며, F낭의 경우에는 약간의 증가를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 수지봉독 분무가 *S. Gallinarum*에 인공 감염된 육계 병아리에서 *S. Gallinarum* 감염의 전형적인 병변인 간과 비장의 증대를 완화시켰다고 할 수 있겠다.

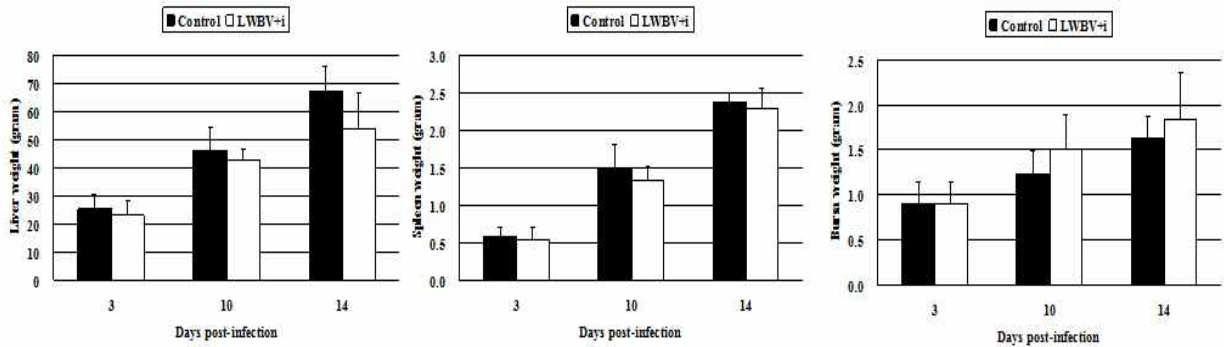


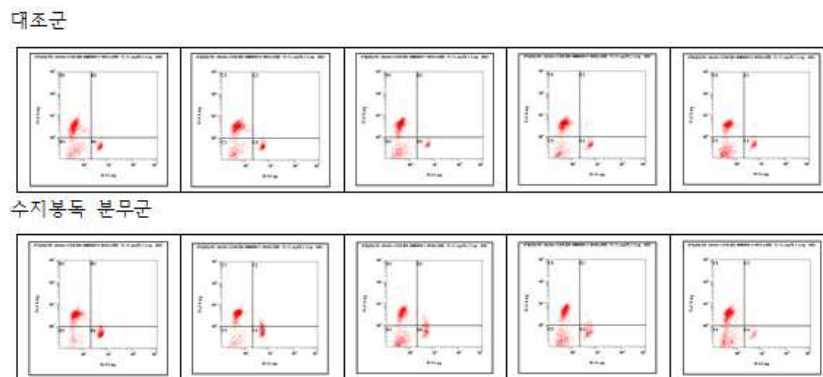
Fig 2.12. 저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 육계 병아리의 장기 (간, 비장, F낭) 무게.

(바) 비장에서 T 림프구 아세포 비율 (저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후)

저농도 *S. Gallinarum*에 인공 감염된 육계에서 수지봉독의 면역학적 역할을 분석하기 위해 저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 3, 7, 10, 14일 비장의 T 림프구 아세포 비율, CD4⁺:CD8⁺ 비율을 측정하였다.

① 저농도 *S. Gallinarum*에 공격 접종 3일 후 (D+3)

S. Gallinarum 공격접종 이 후 3일째, 봉독 분무에 따른 육계 병아리 비장에서 T 림프구 아세포 비율 변화를 분석한 결과, CD4⁺:CD8⁺ T 세포 비율이 봉독 처리구 (0.34 ± 0.05)에서 대조구 (0.24 ± 0.03)에 비해 유의적으로 높음을 알 수 있었다.



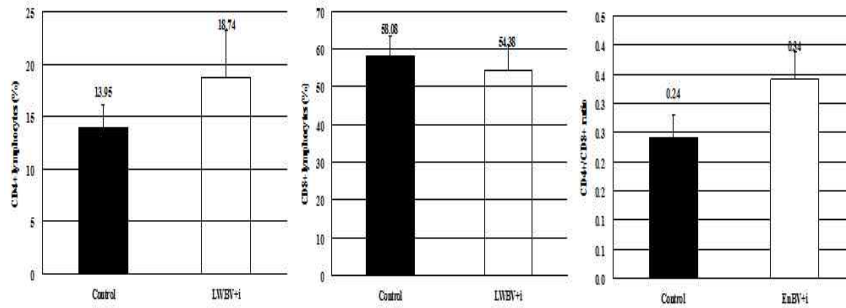
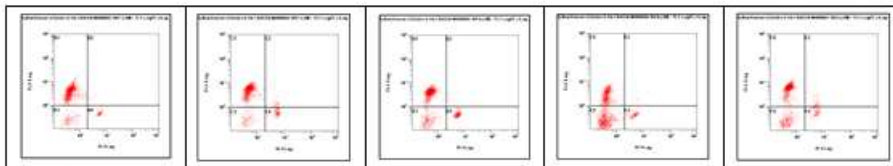


Fig 2.13. *S. Gallinarum* 공격접종 이 후 3일째, 봉독 분무에 따른 육계 병아리 비장에서 T 림프구 아세포 비율 변화.

② 저농도 *S. Gallinarum*에 공격 접종 7일 후 (D+7)

저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후 7일째의 육계 병아리 비장에서 CD4⁺:CD8⁺ T 세포 비율을 측정한 결과, 봉독 처리구 (0.064 ± 0.47)에서 대조구 (0.15 ± 0.06)에 비해 유의적으로 높음을 알 수 있었다 (P < 0.05).

대조군



수지봉독 분무군

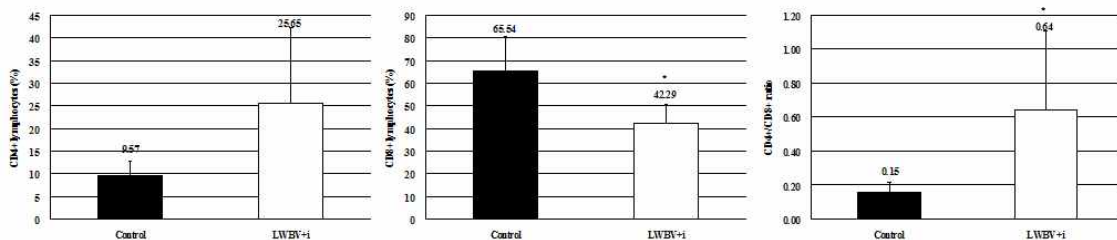
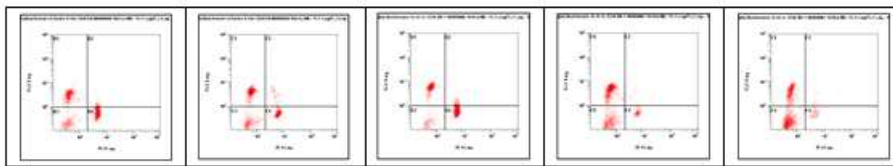


Fig 2.14. *S. Gallinarum* 공격접종 이 후 7일째, 봉독 분무에 따른 육계 병아리 비장에서 T 림프구 아세포 비율 변화.

③ 저농도 *S. Gallinarum*에 공격 접종 10일 후 (D+10)

저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후 10일째의 육계 병아리 비장에서 CD4⁺:CD8⁺ T 세포 비율을 측정된 결과, 봉독 처리구 (0.69 ± 0.25)에서 대조구 (0.50 ± 0.17)에 비해 높은 경향을 보였다. 하지만 통계적 유의성은 없었다 (P > 0.05).

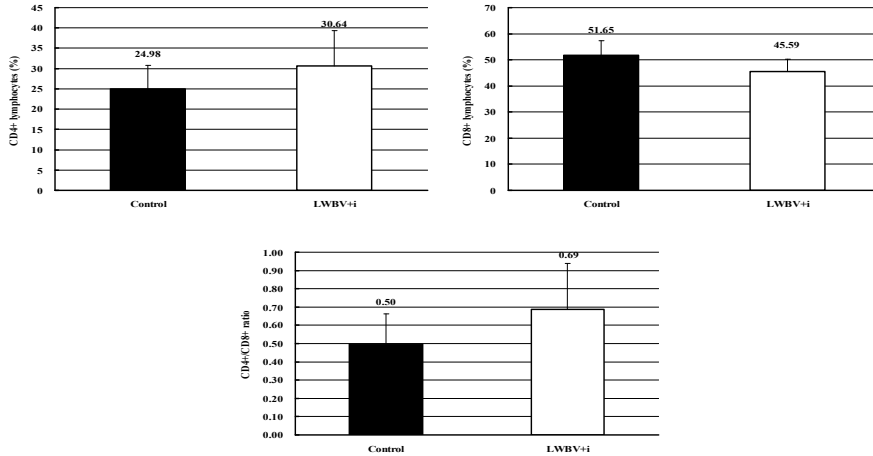
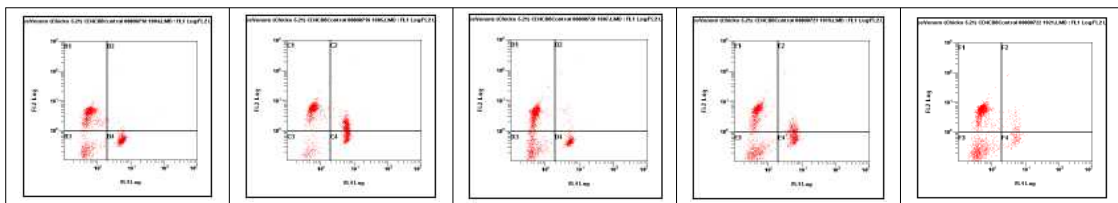


Fig 2.15. *S. Gallinarum* 공격접종 이 후 10일째, 봉독 분무에 따른 육계 병아리 비장에서 T 림프구 아세포 비율 변화.

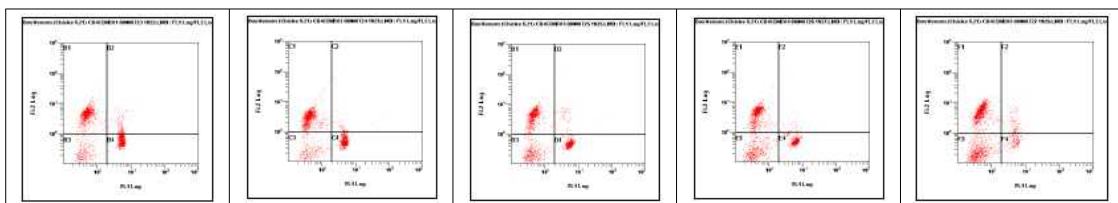
④ 저농도 *S. Gallinarum*에 공격 접종 14일 후 (D+14)

저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후 10일째의 육계 병아리 비장에서 CD4⁺:CD8⁺ T 세포 비율을 측정된 결과, 봉독 처리군 (0.68 ± 0.07)에서 대조군 (0.48 ± 0.11)에 비해 유의적으로 높음을 알 수 있었다 (P < 0.05).

대조군



수지봉독 분무군



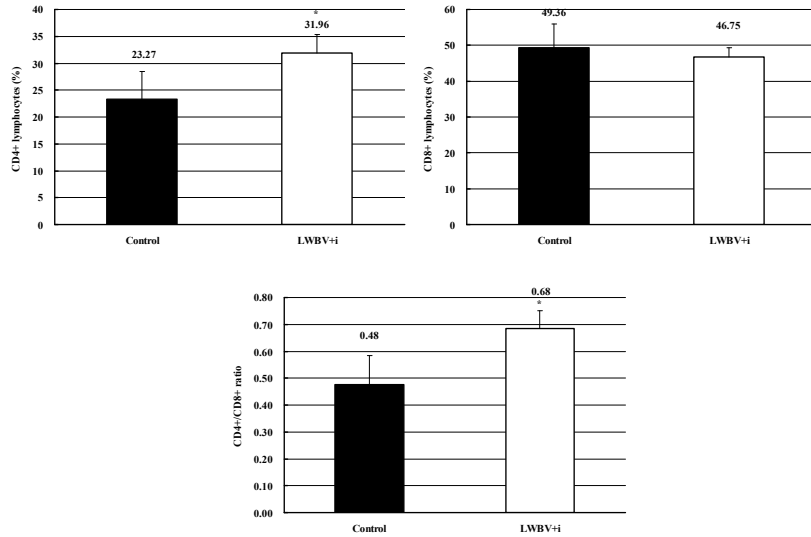


Fig 2.16. *S. Gallinarum* 공격접종 이 후, 봉독 분무에 따른 육계 병아리 비장에서 T 림프구 아세포 비율 변화.

⑤ 저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이 후 CD4⁺:CD8⁺ 비율의 변화

공격접종 이후, 3, 7, 10, 14일에 비장의 CD4⁺:CD8⁺ 비율을 측정한 결과를 종합하여 날짜별로 나타내어보면 아래 Fig 2.17과 같다. 즉, 전 감염 기간에 걸쳐서 수지봉독 분무군의 CD4⁺:CD8⁺ 비율이 대조군에 비해 유의적으로 높음을 알 수 있다. 이러한 결과는 *S. Gallinarum* 공격접종 이 전의 결과와도 동일하며, 육계에서 높은 CD4⁺:CD8⁺ 비율의 의미하는 바가 면역증강과 관련이 깊은 것 (Erf et al., 1995)으로 보아 수지봉독 분무에 따른 높은 CD4⁺:CD8⁺ 비율은 수지봉독의 분무가 육계의 전반적인 면역 상태를 증진시키는데 도움을 줄 뿐만 아니라, *S. Gallinarum*의 감염에 의한 면역 억압이나 억제를 줄여줄 수 있을 것으로 기대된다.

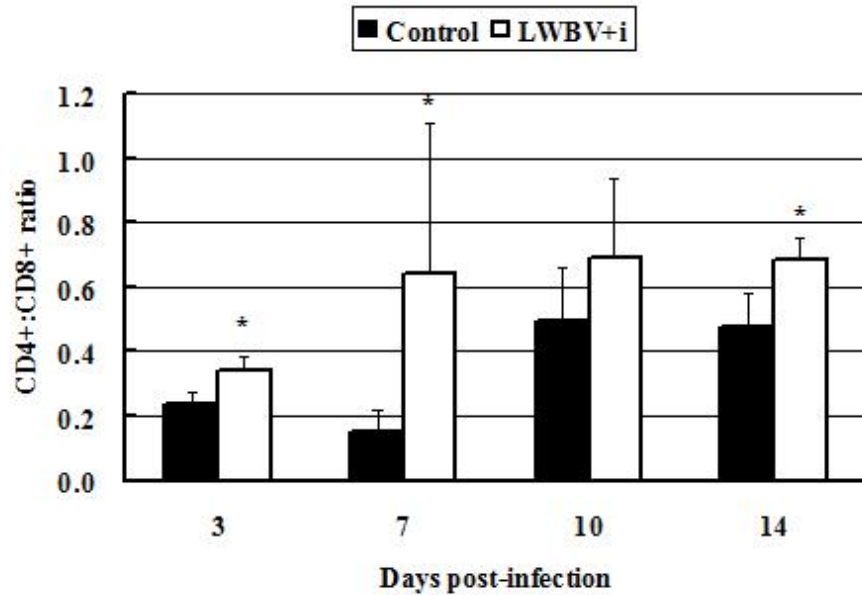


Fig 2.17. 저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이 후 날짜의 흐름에 따른 CD4⁺:CD8⁺ T 세포의 비율의 변화.

(사) 저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이 후, 사이토카인 발현능

수지봉독 분무가 저농도 *S. Gallinarum*에 인공 감염된 육계 병아리의 사이토카인 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 *S. Gallinarum* 공격접종 이 후, 3, 7, 10, 14일에 비장에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 cDNA로 합성하여 template로 사용하여 IL-18, IFN- γ 그리고 IL-4의 상대적인 발현 정도를 Real-time PCR방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 수지봉독 분무군에서 대조군에 비해 IL-18과 IFN- γ 의 발현이 상대적으로 증가된 것을 알 수 있었다. 하지만, IL-4의 발현 정도는 반대로 감소하는 경향을 보여 주었다. 하지만, 통계적 유의성은 어떠한 경우에도 없었다 ($P > 0.05$).

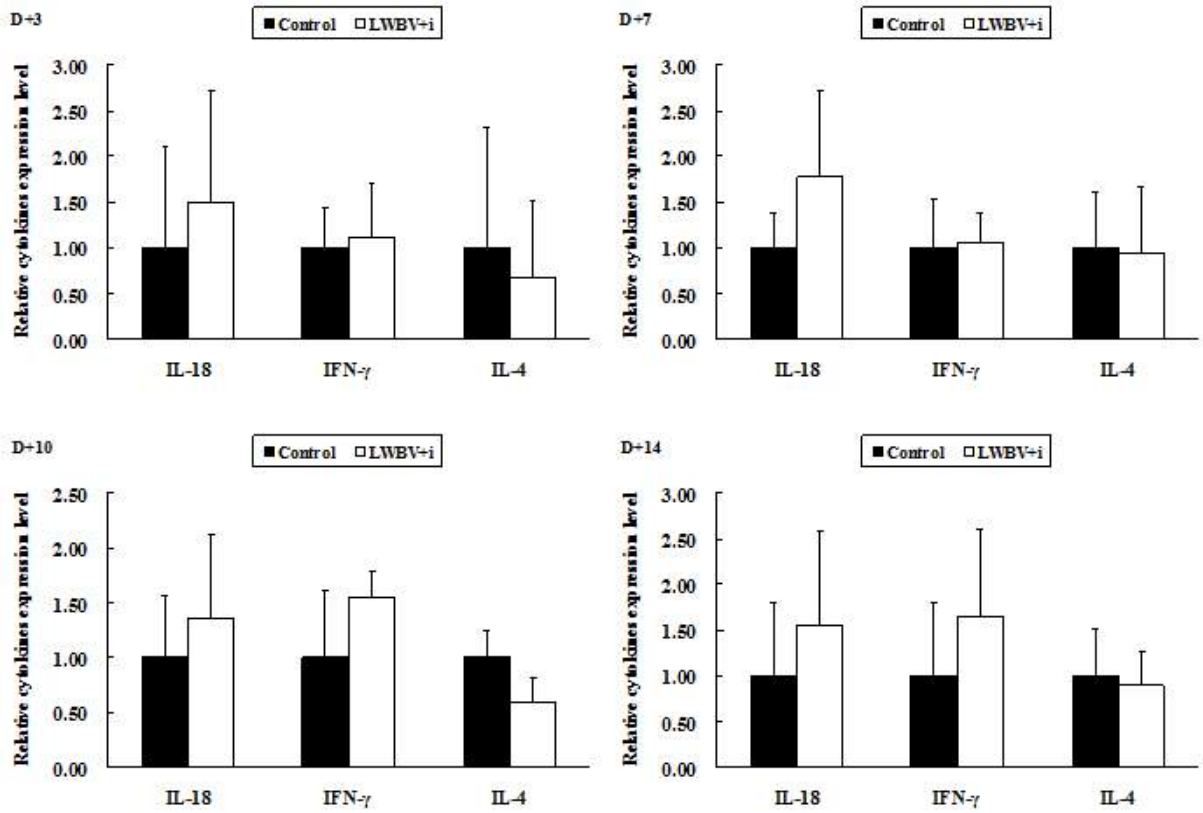


Fig 2.18. 저농도 *S. Gallinarum*에 공격 접종 3, 7, 10, 14일 후, 사이토카인 발현정도.

(아) 라이소자임 활성 평가

수지봉독 분무가 저농도 *Salmonella Gallinarum*에 인공 감염된 육계 병아리의 혈청 내 라이소자임의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 *S. Gallinarum* 공격접종 이 후, 3, 7, 10, 14일에 혈청에서 라이소자임의 활성을 평가하였다. 그 결과, 수지봉독 분무군에서 대조군에 비해 공격 접종 이 후에도 증가된 것을 알 수 있었다. 특히, 접종 후 10일째에는 통계적으로도 유의성 있게 증가됨을 확인 할 수 있었다 ($P < 0.05$).

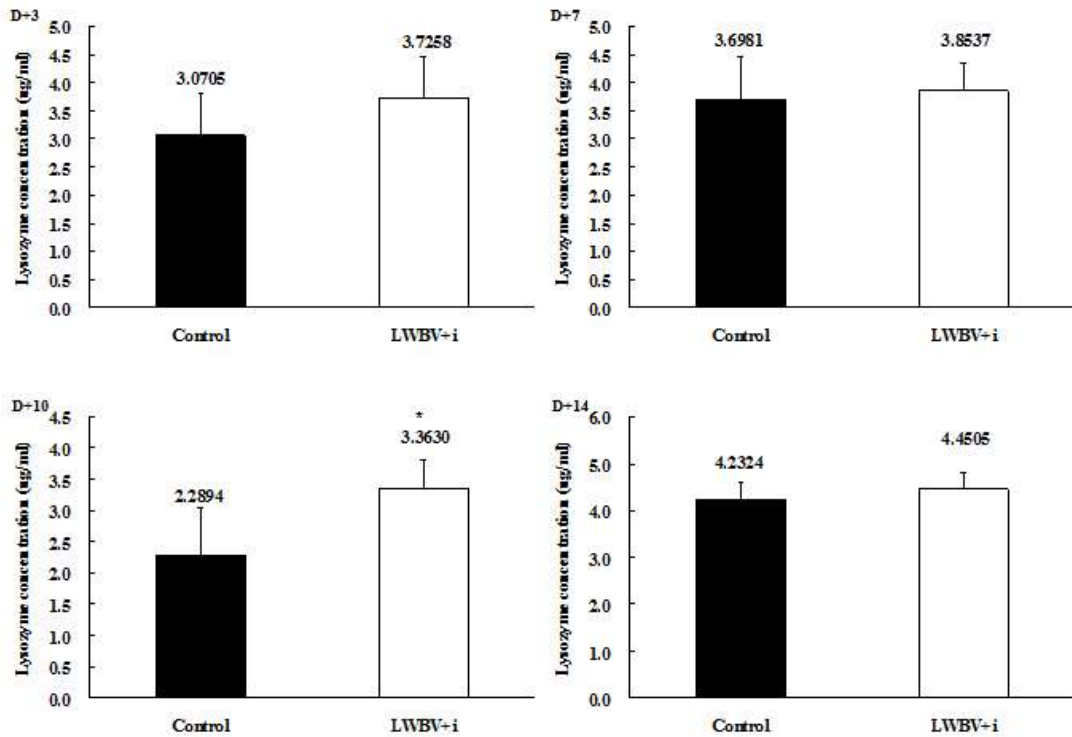


Fig 2.19. 저농도 *S. Gallinarum*에 공격 접종 3, 7, 10, 14일 후, 라이소자임 활성.

(3) 중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종한 실험

(가) 균 분리 (각 군당 20 수)

- Group 3 (저농도의 *S. Gallinarum* 공격접종을 위한 대조군)
- Group 4 (저농도의 *S. Gallinarum* 공격접종을 위한 봉독 처리군)
- 중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후, 임상 증상 평가 및 폐사율을 측정하였다.

(나) 중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이후 생존율

중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후, 대조군에서는 4일째부터 폐사가 발생하기 시작하였다. 하지만, 수지봉독 분무군에서는 7일째가 되어서야 폐사가 발생하기 시작하였다. 최종 생존율은 대조군에서 75% (15/20)이었고, 수지봉독 분무군에서는 85% (17/20)가 생존하였다.

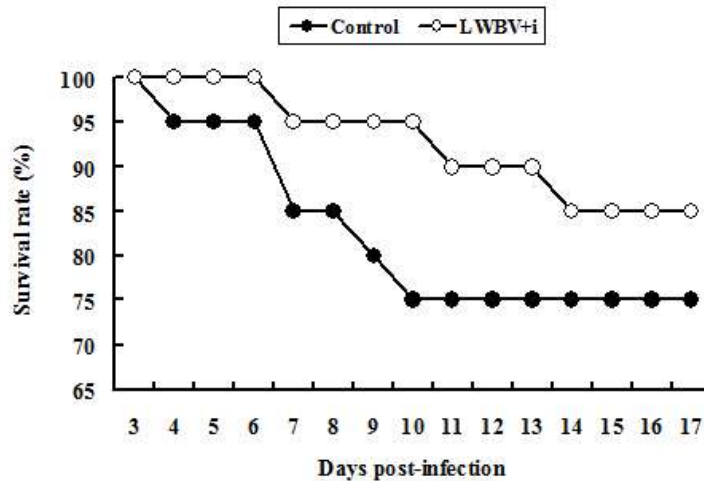


Fig 2.20. 중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후 육계 병아리의 생존율. 그래프에서 보는 바와 같이, 수지봉독 분무군에서 폐사의 발생이 느리게 시작되며, 폐사의 정도 또한 대조군에 비해 줄어든 것을 확인할 수 있다.

(다) 중농도 *S. Gallinarum*의 공격접종 이 후, 생존한 육계 병아리들의 부검 소견

중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후, 17일째에 생존한 육계들의 부검을 실시하였다. 아래 사진은 부검 이 후 각 장기들 (간, 비장, F낭)의 사진이다. 대조군과 수지봉독 분무군 모두에서 *S. Gallinarum*의 전형적인 병변인 간과 비장의 종대가 나타났으며, 간과 소장부위에 necrotic foci의 형성을 확인 할 수 있었다. 저농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 의 부검 소견과 유사하나 약간 심한 정도의 병변을 보였다. 하지만, 병변의 정도는 수지봉독 분무군이 대조군에 비해 심하지 않았다.

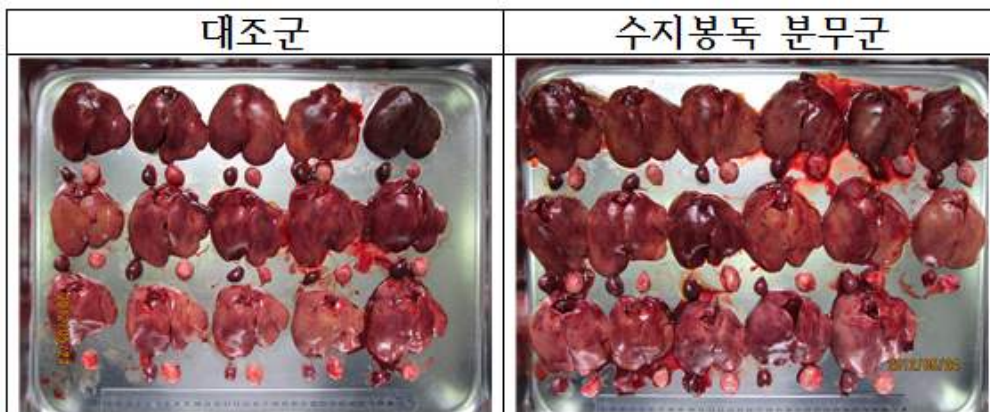


Fig 2.21. 중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후, 17일째 각 장기 (간, 비장, F낭)의 모습. 대조군과 수지봉독 분무군 모두에서 간에서 necrotic foci의 형성을 확인 할 수 있었다.

(라) 체중 및 각 장기의 무게

중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후, 17일째에 생존한 육계들의 체중을 측정한 결과, 수지봉독 분무군 (1335.3 ± 157.9 gram)의 체중이 대조군 (1110.0 ± 133.9 gram)에 비해 유의적으로 증가한 것을 알 수 있었다 ($P < 0.001$). 이는 저농도 (1×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후의 수지봉독 분무군의 체중 증가보다 유의성이 더 높은 결과이다. 하지만, 간, 비장 및 F낭의 체중 100g당의 상대적인 무게를 측정한 결과 대조군과 수지봉독 분무군에서 유의적인 차이가 없었다.

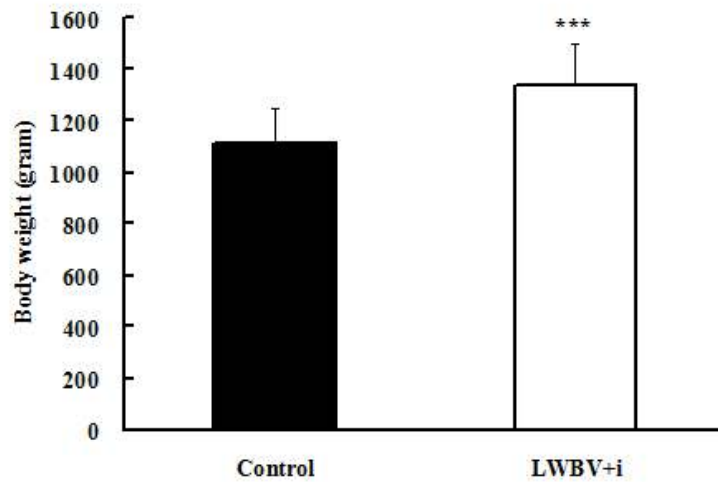


Fig 2.22. 중농도 (5×10^9 cfu/ml) *S. Gallinarum* 공격접종 이후의 체중 변화. 공격 접종 14일 후, 봉독 처리구 (1335.3 ± 157.9 gram)의 평균 체중이 대조구 (1110.0 ± 133.9 g)에 비해 마리 당 약 225 gram이 증가했음을 알 수 있다.

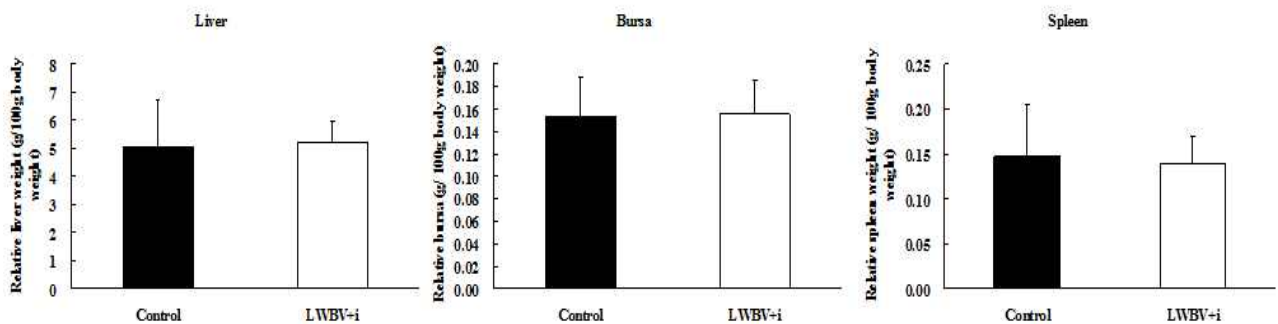


Fig 2.23. 중농도 (5×10^9 cfu/ml) *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 각 장기의 체중 100g에 대한 상대적인 무게

(마) 각 장기에서 세균의 수 (중농도 *S. Gallinarum* 접종 이후)

중농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 17일에 각각 간, F낭 및 맹장을 수거하여 *S. Gallinarum*의 수를 측정 하였다. 측정 결과, 대조군과 수지봉독 분무군간의 차이를 확인할 수 없었다.

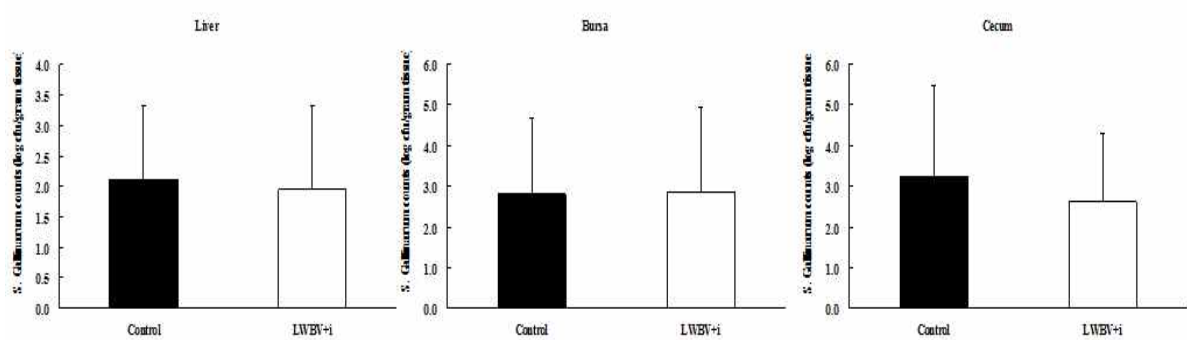


Fig 2.24. 중농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 육계 병아리의 간, F낭 및 맹장에서 검출된 세균의 수 (cfu/gram tissues).

(4) 실험 결과 요약

이 번 실험에서는 육계에서 수지봉독의 살모넬라 감염증에 대한 항병력효과를 규명하기 위해 수행되었다. 육계에서 수지봉독의 살모넬라에 대한 항병력효과를 규명하기 위해 수지봉독을 육계 병아리에 3회 스프레이 이후, *Salmonella enterica* serovar Gallinarum을 농도별 (저농도: 1×10^9 cfu, 중농도: 5×10^9 cfu)로 인공 감염시켰다. 인공감염 전과 후에 면역학적 변화를 조사하였으며, 인공감염 이후에는 항병력능을 평가하였다. 그 내용 중 유의적인 사항만을 요약하면 다음과 같다.

(가) *S. Gallinarum* 인공 감염 이전 수지봉독 분무가 육계병아리의 면역력에 미치는 영향

① 체중

육계 병아리의 증체율에 도움을 주는 경향이 있으나, 생후 15일까지는 그 정도가 통계적으로 유의적이지 않음.

② 비장무게

비장무게에 큰 영향을 주지 않음.

③ 비장에서 T 림프구 아세포 비율

수지봉독 3회 분무 이 후 15일령의 육계 병아리의 비장에서 $CD4^+ : CD8^+$ T 세포 비율을 측정한 결과, 봉독 처리군 (0.42 ± 0.15)에서 대조군 (0.29 ± 0.08)에 비해 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었다 ($P < 0.05$).

④ 상대적인 사이토카인 발현능

수지봉독 3회 분무 이 후 15일령의 육계 병아리의 비장에서 사이토카인의 발현 정도를 측정 한 결과 IL-18과 IFN- γ 의 상대적인 발현정도는 증가하는 경향을 보였으나, IL-4의 상대적인 발현정도는 감소하는 경향을 보였다. 모든 사이토카인 발현의 정도가 통계학적으로 유의적이지는 않았다 ($P > 0.05$).

⑤ 라이소자임 활성 평가

수지봉독 3회 분무 이 후 15일령의 육계 병아리의 혈청에서 라이소자임의 활성을 측정 한 결과, 봉독 처리군 (2.50 ± 0.35 ug/ml)에서 대조군 (1.45 ± 0.22 ug/ml)에 비해 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었다 ($P < 0.05$).

(나) 저농도 (1×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종한 실험

① 체중

공격 접종 14일 후, 봉독 처리군 (1200 ± 158.1 g/chicks)의 평균 체중이 대조군 (1050.0 ± 135.4 g/chicks)에 비해 마리 당 약 150 gram 정도 증가함을 알 수 있었다.

② 육안적 부검 소견

저농도의 *S. Gallinarum* 공격접종 14일 후, 대조군에서 매우 심한 복수와 간주위에 형성된 위막 및 간과 장부위의 충혈과 necrotic foci를 확인할 수 있었으나, 대조적으로 수지봉독 분무군에서는 이러한 소견이 심하지 않았다.

③ 각 장기에서 세균의 수 (저농도 *S. Gallinarum* 접종 이후)

저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 3, 7, 10, 14일에 각각 간, F낭 및 맹장을 수거하여 *S. Gallinarum*의 수를 측정 한 결과, 대조군에 비해 수지봉독 분무군에서 간, F낭 및 맹장 모두에서 *S. Gallinarum*의 수가 감소하였음을 확인 할 수 있었다.

④ 각 장기의 무게 (저농도 *S. Gallinarum* 접종 이후)

저농도 *S. Gallinarum* 공격접종 이후, 대조군과 봉독 처리군 모두에서 간과 비장의 무게가 점점 증가하나, 전 측정 기간에 걸쳐 봉독 처리군에서 간과 비장의 종대가 대조군에 비해 심하지 않음을 알 수 있었다. 이와는 대조적으로 F낭의 무게는 봉독 처리군의 육계에서 증대되었음을 알 수 있었다.

⑤ 비장에서 T 림프구 아세포 비율

S. Gallinarum 공격접종 후 10일째를 제외한 모든 측정 일에서 수지봉독 분무군에서의 $CD4^+ : CD8^+$ T 세포의 비율이 대조군에 비해 유의적으로 높음을 확인 할 수 있다 ($P < 0.05$).

⑥ 상대적인 사이토카인 발현능

저농도 *S. Gallinarum*에 인공 감염된 육계 병아리의 사이토카인 발현의 경향을 보면, 수지봉독 분무군에서 대조군에 비해 IL-18과 IFN- γ 의 발현이 상대적으로 증가된 것을 알 수 있었다. 하지만, IL-4의 발현 정도는 반대로 감소하는 경향을 보여 주었다.

⑦ 라이소자임 활성 평가

저농도 *S. Gallinarum*에 인공 감염된 육계 병아리의 라이소자임 활성의 경향을 보면, 수지봉독 분무군에서 대조군에 비해 공격 접종 이 후에도 증가된 것을 알 수 있었다. 특히, 접종 후 10일째에는 통계적으로도 유의성 있게 증가됨을 확인 할 수 있었다 ($P < 0.05$).

(다) 중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종한 실험

① 생존율

중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후, 대조군에서는 4일째부터 폐사가 발생하기 시작하였다. 하지만, 수지봉독 분무군에서는 7일째가 되어서야 폐사가 발생하기 시작하였다. 최종 생존율은 대조군에서 75% (15/20)이었고, 수지봉독 분무군에서는 85% (17/20)가 생존하였다.

② 부검 소견

대조군과 수지봉독 분무군 모두에서 *S. Gallinarum*의 전형적인 병변인 간과 비장의 종대가 나타났으며, 간과 소장부위에 necrotic foci의 형성을 확인 할 수 있었다. 저농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종의 부검 소견과 유사하나 약간 심한 정도의 병변을 보였다. 하지만, 병변의 정도는 수지봉독 분무군이 대조군에 비해 심하지 않았다.

③ 체중

중농도 (5×10^9 cfu/ml) *S. Gallinarum* 공격접종 이후의 체중 변화. 공격 접종 14일 후, 봉독 처리군 (1335.3 ± 157.9 gram)의 평균 체중이 대조군 (1110.0 ± 133.9 g)에 비해 마리 당 약 225 gram이 더 많이 나감을 알 수 있다.

④ 각 장기의 무게

수지봉독 분무군과 대조군과의 유의적인 차이가 없었다.

⑤ 세균 수

중농도 (5×10^9 cfu/ml)의 *S. Gallinarum*의 공격 접종 이 후 17일째의 각 장기에서의 세균수는 수지봉독 분무군과 대조군과의 유의적인 차이가 없었다.

3. 돼지에서 최종 선별된 수지봉독의 투여에 따른 살모넬라 감염증 예방효과

가. 실험 목적

돼지에서 수지봉독의 살모넬라에 대한 항병력효과를 규명하기 위해 수지봉독을 이유자돈에 2회 투여 후, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium을 구강 접종 (2×10^9 cfu)로 인공 감염시켰다. 인공감염 후에 면역학적 변화를 조사하였으며, 인공감염 이후에는 항병력능을 평가하였다. 그 내용은 다음과 같다.

나. 실험동물

이유자돈 (4주령; 31일령) 총 20수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였다. 입사 후 완전 임의로 5수씩 4군으로 나누었으며, 사료와 물을 자유급여 하였다. 사육장내의 온도는 25°C로 유지시켰으며, 외부공기의 유입을 차단을 위해 후드를 통해서만 환기를 실시하였다. 아래 사진들은 사육장 내부의 모습이다.



Fig 2.25. 돼지 사육장의 모습

다. 수지봉독의 투여방법에 따른 군분리

본 실험에서 사용한 봉독은 수지봉독 (LWBV, Lipid Water Bee Venom)에

Hyaluronidase inhibitor를 첨가한(LWBV+i) 액상봉독으로써 LWBV+i의 농도는 2.1mg/ml이었다. 투여는 총 2회 (40일령과 42일령) 투여하였고 투여방법에 따른 군의 분리는 다음과 같다.

	투여량	투여부위
대조군 (Control)*	1ml	SC
점안군 (Eye drops)	100ul/each eye	Eye drops
주사군 (Needle injection)	1ml	IM
무침군 (Needle-free injection)	1ml	SC

*Control은 무침주사기를 통해 injection을 실시하였다. 무침주사시의 강도는 Green으로 실시하였다.

대조군 (무침을 이용하여 용제만을 투여)



점안군 (수지봉독을 각 눈에 100ul씩 점안)



주사군 (수지봉독 1ml씩을 근육주사)



무침군 (수지봉독 1ml씩을 무침주사)



Fig 2.26. 42일령 자돈에 2차 정제봉독의 투여 모습.

라. *Salmonella* Typhimurium의 인공감염

본 실험에서 돼지의 인공감염을 위해 사용한 *S. Typhimurium*은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받은 ATCC No. 13311 strain이며, ATCC의 인증서를 통해 병원성을 나타내는 strain임을 확인 후, 2×10^9 cfu를 돼지에 경구

접종하였다. 아래 사진은 *S. Typhimurium*의 구강으로 접종시키는 모습이다.



Fig 2.27. *S. Typhimurium* 인공감염. *S. Typhimurium*을 구강으로 인공감염시키는 모습.

(1) 체중변화

입사 이후 4일 (35일령)부터 돼지의 체중을 측정하기 시작 하여, 실험 종료일인 *S. Typhimurium* 공격 접종 7일 후 (57일령)까지 체중을 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 수지봉독 투여군들의 체중이 증가하였으며, 특히 수지봉독 주사군의 체중이 가장 많이 증가하였다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

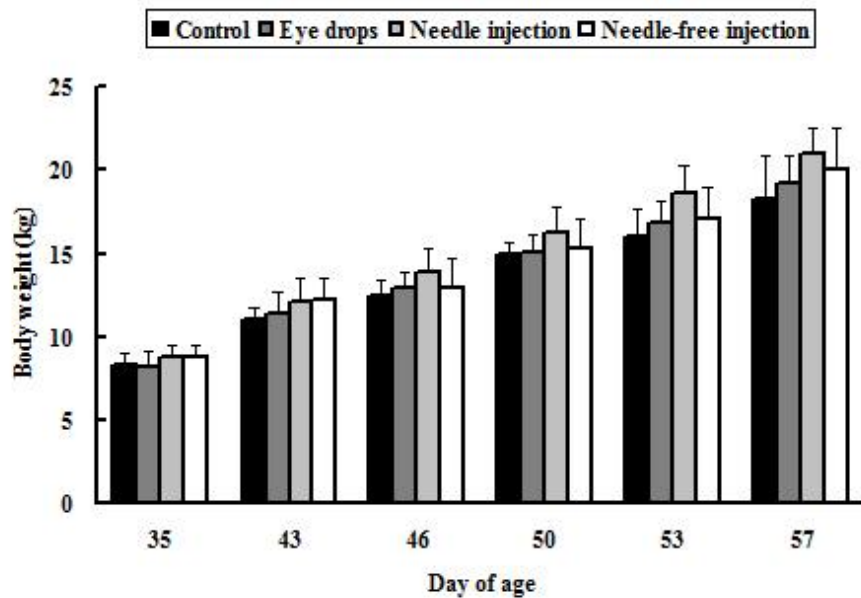


Fig 2.28. 실험 전 기간 동안의 돼지 체중의 변화.

(2) 체온의 변화

S. Typhimurium 인공 감염 직전인 50일령과 인공감염 3일과 7일 후인 53일령과

57일령에 돼지의 직장 체온을 측정하였다. 모든 군에서 인공 감염 이후 3일째에 직장 체온이 상승하였으며, 7일째에는 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 처리군들 사이의 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

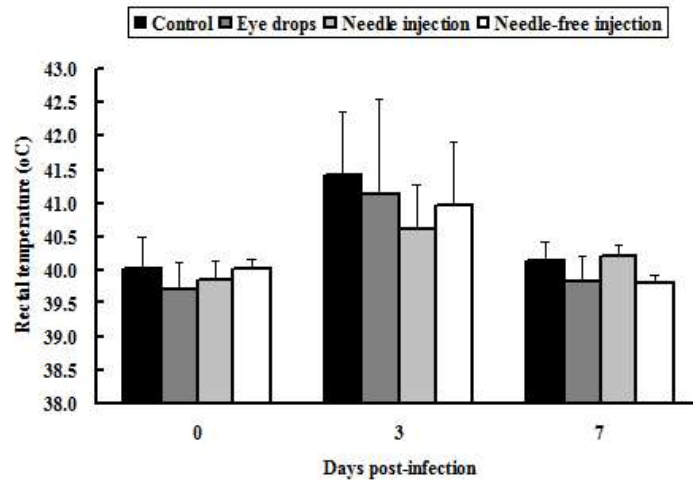


Fig 2.29. *S. Typhimurium* 인공 감염 이후, 돼지의 직장 체온 변화.

(3) 공격 접종 후, 분변의 설사 정도

S. Typhimurium 인공 감염 이후, 돼지의 분변을 수거하여 분변의 설사 정도를 Tanaka (2010) 등의 방법에 따라 점수로 표시하였다. 그 결과, 그림 6에서 보는 바와 같이, 수지봉독 투여 군들에서 분변의 설사 정도가 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

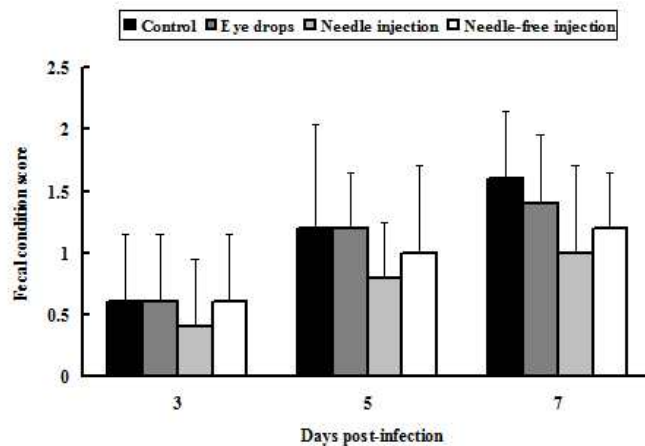


Fig 2.30. *S. Typhimurium* 인공 감염 이후, 돼지의 분변의 설사 정도.

(4) 공격 접종 후, 분변으로 분리되는 세균의 수

공격 접종 이후, 3, 5, 7일째에 분변을 수거하여 분변에서 분리되는 *S.*

Typhimurium의 집락 수를 측정하였다. 그 결과 그림 6에서 보는 바와 같이, 3일째에는 대조군에 비해 모든 봉독 처리군에서 세균의 수가 유의적으로 감소하였으며, 7일째에도 수지봉독 주사군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다 ($P < 0.05$).

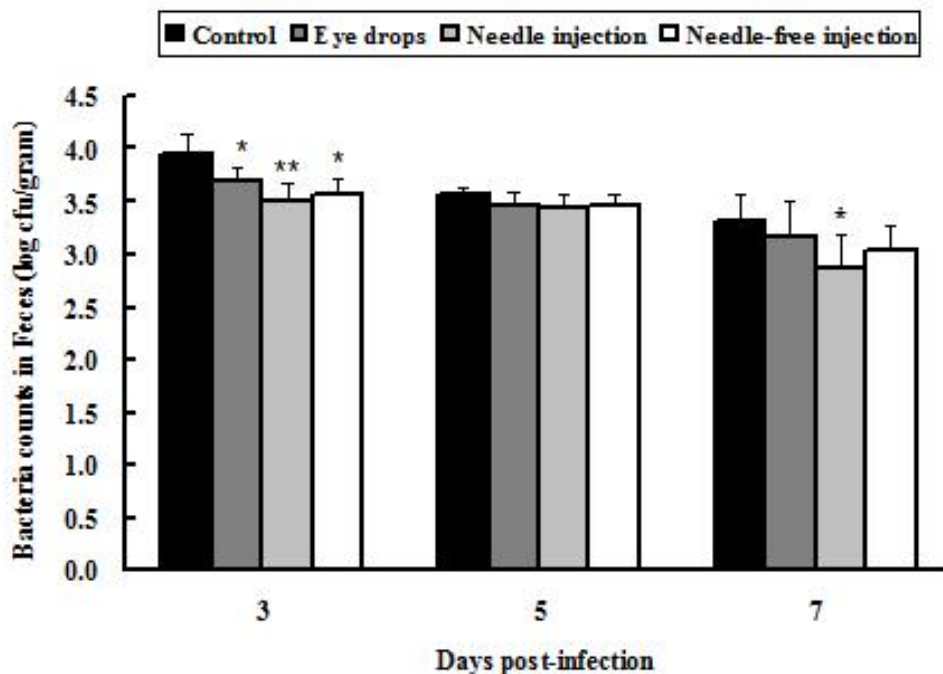


Fig 2.31. *S. Typhimurium* 공격접종 이후, 자돈의 분변으로 분비되는 세균의 수 (cfu/gram feces). 공격 접종 3일 후에는 대조군에 비해 수지봉독 처리군 모두에서 유의적으로 세균의 수가 감소된 것을 확인 할 수 있었으며, 공격 접종 7일 후에도 수지봉독 주사 군에서 대조군에 비해 세균의 수가 유의적으로 감소함을 확인 할 수 있었다 ($P < 0.05$).

(5) 육안적 부검 소견

공격 접종 후 7일째에 모든 돼지를 안락사하여 부검을 실시하였다. 대부분의 감염된 돼지의 소장 특히 공장과 회장 맹장 부위에서 충혈과 necrotic foci를 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 장간막 림프절의 충혈 또한 관찰 할 수 있었다. 대조군에 비해 수지봉독 투여군들에서 이러한 병변의 정도가 심하지 않았으나, 수지봉독 투여군들간의 병변의 심한 정도의 차이는 뚜렷하지 않았다. 다음 사진들은 군별 대표적인 병변의 모습이다.

대조군



수지봉독 점안군



수지봉독 주사군



수지봉독 무침투여군



Fig 2.32. *S. Typhimurium* 공격접종 이후, 장기에서의 부검 소견.

(6) 각 장기에서 세균의 수

S. Typhimurium 공격접종 이후 7일째에 부검을 실시하여 회장과 장간막림프절에서 *S. Typhimurium*의 수를 측정 하였다. 측정 결과, 비록 전 기간에 걸쳐 통계적으로 유의성 있게 차이가 나지는 않았지만, 대조군에 비해 수지봉독 주사와 무침에서 *S. Typhimurium*의 수가 감소하였음을 확인 할 수 있었다.

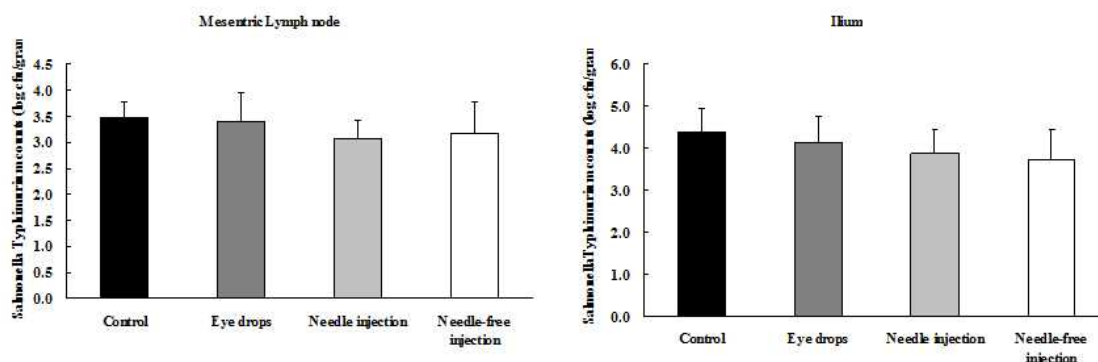


Fig 2.33. *S. Typhimurium* 공격접종 이후, 자돈의 장기는 분포하는 세균의 수 (cfu/gram tissue).

(7) *S. Typhimurium* 공격 접종 이 후, 말초혈액에서 T 림프구 아세포 비율 (T cell subpopulation ratio)

*S. Typhimurium*에 인공 감염된 육계에서 수지봉독의 면역학적 역할을 분석하기 위해 저농도 *S. Typhimurium* 공격접종 이후, 3일 7일 말초혈액의 T 림프구 아세포 비율, CD4⁺:CD8⁺ 비율을 측정하였다.

(가) *S. Typhimurium* 공격접종 이 후 3일째, 수지봉독의 투여 따른 돼지의 말초혈액에서 T 림프구 아세포 비율 변화.

S. Typhimurium 공격접종 이후 3일째의 돼지의 말초혈액에서 CD4⁺:CD8⁺ T 세포 비율을 측정한 결과, 봉독 처리구들에서 대조군에 비해 높아짐을 알 수 있었다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

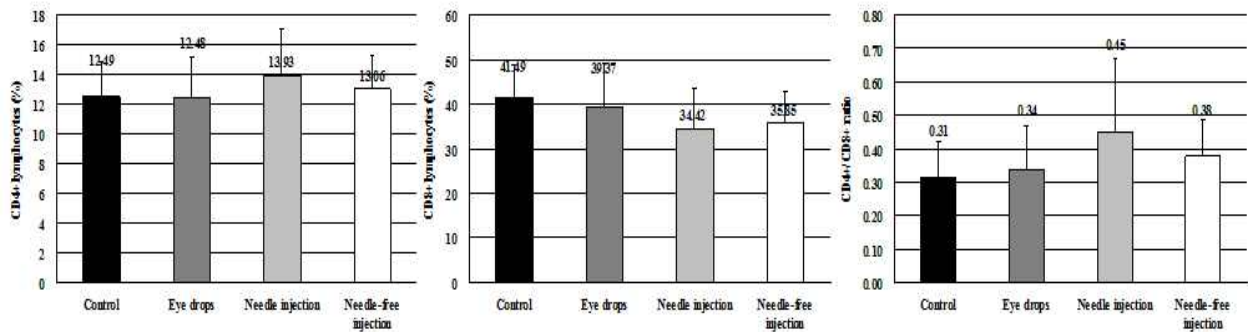


Fig 2.34. *S. Typhimurium* 공격 접종 3일 후 (D+3), 수지봉독의 투여 따른 돼지의 말초혈액에서 T 림프구 아세포 비율 변화.

(나) *S. Typhimurium* 공격접종 이 후 7일째, 수지봉독의 투여 따른 돼지의 말초혈액에서 T 림프구 아세포 비율 변화.

S. Typhimurium 공격접종 이후 7일째의 돼지의 말초혈액에서 CD4⁺:CD8⁺ T 세포 비율을 측정한 결과, 봉독 처리구들에서 대조군에 비해 높아짐을 알 수 있었다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

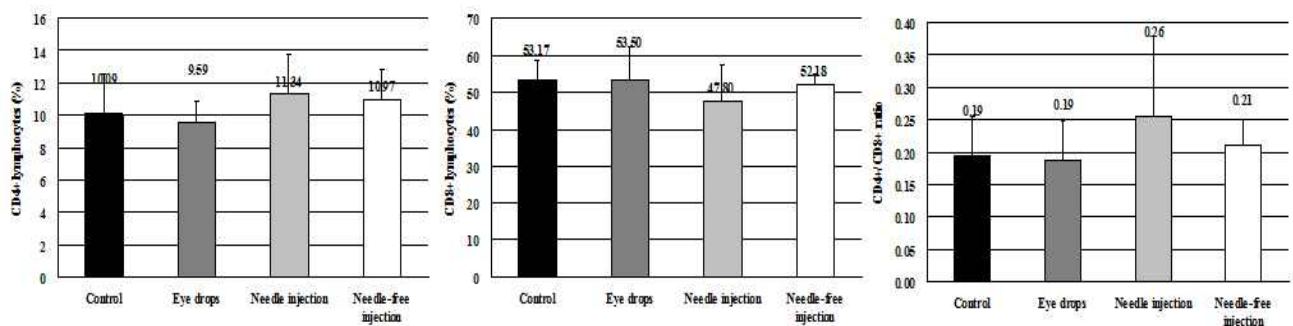


Fig 2.35. *S. Typhimurium* 공격접종 이 후 7일째, 수지봉독의 투여 따른 돼지의 말초혈액에서 T 림프구 아세포 비율 변화.

(다) *S. Typhimurium* 공격접종 이 후, 사이토카인 발현능

수지봉독 분무가 *S. Typhimurium*에 인공 감염된 돼지의 사이토카인 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 *S. Typhimurium* 공격접종 이 후, 7일에 말초혈액에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 cDNA로 합성하여 template로 사용하여 IL-18, IFN- γ 그리고 IL-4의 상대적인 발현 정도를 Real-time PCR방법을 이용하여 측정하였다.

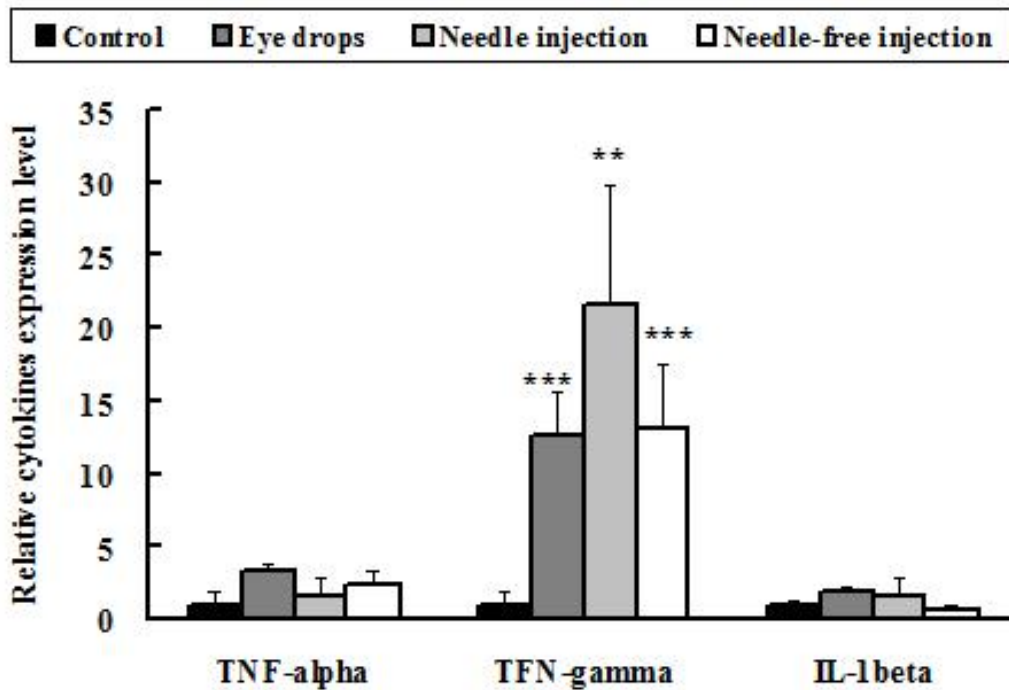


Fig 2.36. *S. Typhimurium*에 공격 접종 7일 후 (D+7) 상대적인 발현의 정도. *S. Typhimurium*에 인공 감염된 돼지의 사이토카인 발현의 경향을 보면, 수지봉독 분무군들에서 대조군에 비해 IFN- γ 의 발현이 상대적으로 유의성 있게 증가된 것을 알 수 있었다 ($P < 0.05$). 하지만, TNF- α 나 IL-4의 발현 정도는 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

(라) 라이소자임 활성 평가

수지봉독 분무가 저농도 *S. Typhimurium*에 인공 감염된 돼지의 혈청 내 라이소자임의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 *S. Typhimurium* 공격접종 이 후, 3일과 7일에 혈청에서 라이소자임의 활성을 평가하였다. *S. Typhimurium*에 인공 감염된 돼지의 라이소자임 활성의 경향을 보면, 수지봉독 분무군에서 대조군에 비해 공격 접종 이 후에 증가된 것을 알 수 있었다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

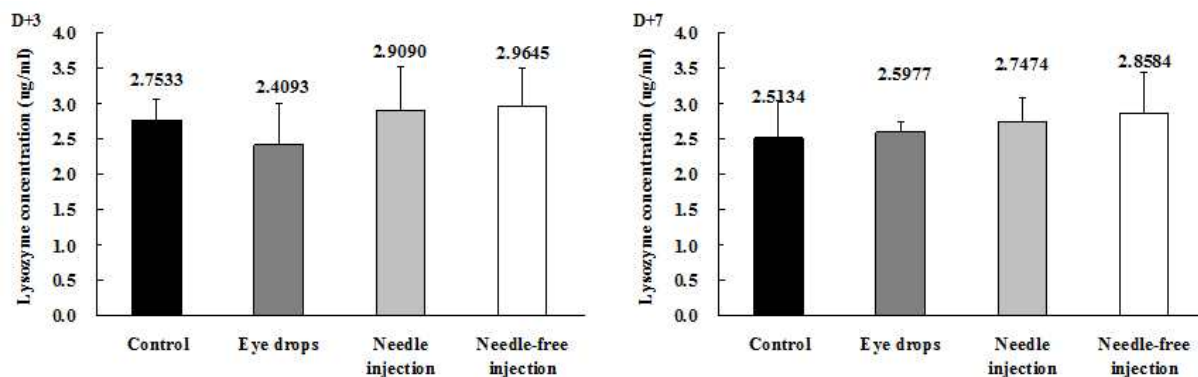


Fig 2.37. *S. Typhimurium*에 공격 접종 3일과 7일 후, 라이소자임 활성 평가.

(마) 백혈구 감별 계산

*S. Typhimurium*에 공격 접종 7일 후, 말초혈액내 백혈구의 감별계산을 실시한 결과 처리군별 유의적인 차이가 없음을 확인하였다 ($P > 0.05$)

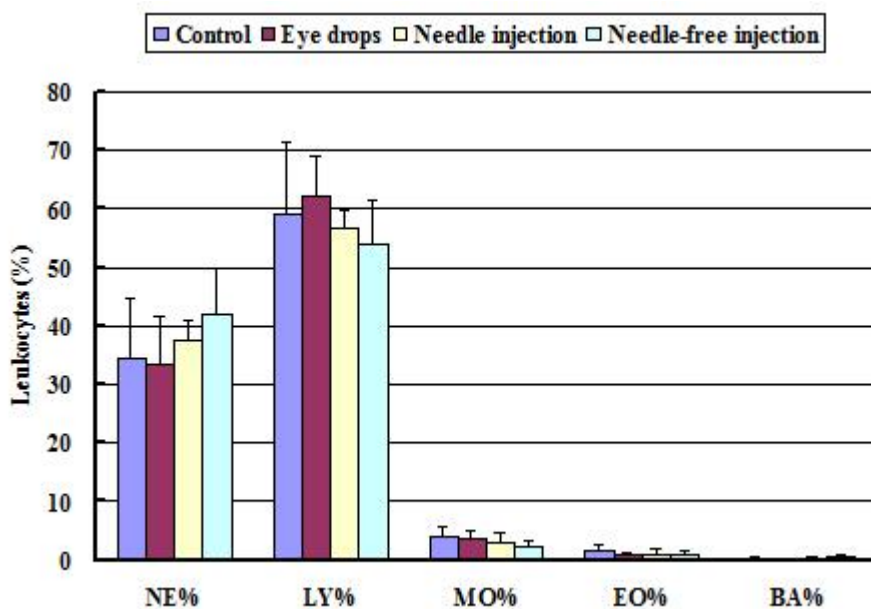


Fig 2.38. *S. Typhimurium*에 공격 접종 7일 후 (D+7).

(바) 돼지에서 수지봉독의 투여에 따른 살모넬라 감염증 예방효과 실험 결과 요약

이 번 실험은 돼지에서 수지봉독의 살모넬라 감염증에 대한 항병력 효과를 규명하기 위해 수행되었다. 특히, 투여 방법에 따른 효과의 차이를 알아보는데 그 목적을 두었다. 돼지에서 수지봉독의 살모넬라에 대한 항병력 효과를 규명하기 위해 수지봉독을

이유자돈에 2회 투여 (점안, 근육주사, 무침주사)이후, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 2×10^9 cfu를 인공 감염시켰다. 인공감염 후의 면역학적 변화 및 인공감염 이후의 항병력능을 평가하였다. 그 내용 중 유의적인 사항만을 요약하면 다음과 같다.

① 체중변화

대조군에 비해 수지봉독 투여군들의 체중이 증가하였으며, 특히 수지봉독 주사군의 체중이 가장 많이 증가하였다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

② 체온의 변화

모든 군에서 인공 감염 이후 3일째에 직장 체온이 상승하였으며, 7일째에는 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 처리군들 사이의 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

③ 공격 접종 후, 분변의 설사 정도

수지봉독 투여 군들에서 분변의 설사 정도가 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

④ 공격 접종 후, 분변으로 분비되는 세균의 수

공격 접종 이 후, 3일째에는 대조군에 비해 모든 봉독 처리군에서 세균의 수가 유의적으로 감소하였으며, 7일째에도 수지봉독 주사군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다 ($P < 0.05$).

⑤ 육안적 부검 소견

대부분의 감염된 돼지의 소장 특히 공장과 회장 맹장 부위에서 충혈과 necrotic foci를 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 장간막림프절의 충혈 또한 관찰 할 수 있었다. 대조군에 비해 수지봉독 투여군들에서 이러한 병변의 정도가 심하지 않았으나, 수지봉독 투여군들간의 병변의 심한 정도의 차이는 뚜렷하지 않았다.

⑥ 각 장기에서 재분리한 살모넬라균의 수

S. Typhimurium 공격접종 이후 7일째에 부검을 실시하여 회장과 장간막림프절에서 *S. Typhimurium*의 수를 측정 하였다. 측정 결과, 비록 전 기간에 걸쳐 통계적으로 유의성있게 차이가 나지는 않았지만, 대조군에 비해 수지봉독 주사와 무침에서 *S. Typhimurium*의 수가 감소하였음을 확인 할 수 있었다.

⑦ 말초혈액에서 T 림프구 아세포 비율 (T cell subpopulation ratio)

S. Typhimurium 공격접종 이후 3과 7일째의 돼지의 말초혈액에서 $CD4^+ : CD8^+$ T 세포 비율을 측정한 결과, 봉독 처리군들에서 대조군에 비해 높아짐을 알 수 있었다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

⑧ *S. Typhimurium* 공격접종 이 후, 사이토카인 발현능

*S. Typhimurium*에 인공 감염된 돼지의 사이토카인 발현의 경향을 보면, 수지봉독 분무군들에서 대조군에 비해 IFN- γ 의 발현이 상대적으로 유의성 있게 증가된 것을 알 수 있었다 ($P < 0.05$). 하지만, TNF- α 나 IL-4의 발현 정도는 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

⑨ 라이소자임 활성화 평가

*S. Typhimurium*에 인공 감염된 돼지의 라이소자임 활성화의 경향을 보면, 수지봉독 분무군에서 대조군에 비해 공격 접종 이 후에 증가된 것을 알 수 있었다. 하지만, 통계적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

⑩ 백혈구 감별 계산

*S. Typhimurium*에 공격 접종 7일 후, 말초혈액내 백혈구의 감별계산을 실시한 결과 처리군별 유의적인 차이가 없음을 확인하였다 ($P > 0.05$).

⑪ 결론

*S. Typhimurium*에 인공 감염 이 후, 수지 봉독 투여 군들에서 대조군에 비해 분변의 설사 정도나 세균의 수 (분변, 회장, 장간막림프절)가 감소함을 확인 하였다. 돼지에서는 육계에서처럼 CD4⁺:CD8⁺ T 세포 비율이나 라이소자임 활성화가 유의적으로 증가하지는 않았지만, 항균 효과가 잘 알려져 있는 IFN- γ 의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 수지봉독 투여 군들에서의 세균의 감소는 IFN- γ 의 발현 증가에 의한 것으로 사료된다.

4. PCV2와 PRRSV에 동시에 인공 감염된 이유자돈에서 정제 수지봉독의 예방효과

가. 실험 목적

PCV2와 PRRSV에 동시에 인공 감염된 이유자돈에서 정제 수지봉독의 예방효과를 규명하고자 면역학적 변화 및 바이러스에 대한 항병능을 평가하고, 정제봉독의 면역능과 항병능을 극대화 할 수 있는 최적의 투여경로를 설정한다.

나. 실험동물

이유자돈 (3주령) 총 20수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였으며, 입사 후 완전 임의로 5수씩 4군으로 나누어 주었다.

다. 수지봉독의 주사 부위에 따른 군 분리

본 실험에서 사용한 봉독은 수지봉독 (LWBV, Lipid Water Bee Venom)에 Hyaluronidase inhibitor를 첨가한 (LWBV+i) 액상봉독으로써 LWBV+i의 농도는 2.1mg/ml이었다. 주사는 0.1ml의 부피를 총 1회 (입사 후 3일차) 실시하였고 주사 부위에 따른 군의 분리는 다음과 같다.

- Group 1: 대조군 (무처치 대조군; Control)
- Group 2: 주둥이부위 주사군 (Snout)
- Group 3: 등쪽 목부위 주사군 (Dorsal Neck)
- Group 4: 미근부 (Tail base)

라. PCV2의 준비 및 바이러스 정량을 위한 Real-time PCR 준비

(1) PCV2 바이러스의 준비

PCV2 바이러스 증식용 세포인 PK-15 cell을 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum)와 2% (v/v) antibiotics가 첨가 되어있는 alpha-MEM 배지를 이용하여 80% monolayer로 배양하였다. 배양된 PK-15 cell의 배양액을 제거 후, 1시간동안 37°C에서 5% CO₂의 조건으로 10분마다 rocking하여 바이러스를 흡착시켰으며, 5일간 배양하여 PCV2를 증식하였다. PCV2가 증식된 세포 플라스크는 3회 얼렸다 녹였다를 반복하였으며, 이를 원심분리하여 상층액만을 회수하였다. 회수한 상층액에 존재하는 PCV2의 정량을 위해서는 Real-time PCR 방법을 실시하였다.

(2) PCV2의 정량을 위한 Real-time PCR법 확립

본 실험에 사용한 PCV2는 국내의 PCV2에 감염되어 병원성을 나타낸 돼지로부터 분리된 야외 분리주로서 농림축산검역본부로부터 분양 받은 것을 사용하였다. 분양 받은 PCV2로부터 viral DNA를 추출하였으며, 이를 template로하여 PCR을 이용한 증폭을 실시하였다. 증폭된 PCR product는 pGEMT-easy vector에 cloning을 실시하였고,

cloning된 vector는 농도 별로 희석 ($10^{10} - 10^4$ PCV2 plasmid copies/ml)하여 주었다. 최종적으로 희석된 vector를 이용하여 Standard curve를 작성하여 바이러스 정량에 사용하였다. PCR과 Real-time PCR을 위해 사용한 primers와 probe의 sequence는 아래 Table 2.1에 정리하였다.

Table 2.1. Sequence of primers and probe designed for the PCV2 PCR and real time PCR

Sequence (5'-3')	
PCV2 Forward Primer (PCR)	CCA GGA GGG CGT TGT GAC
PCV2 Reverse Primer (PCR)	CGC TAC CGT TGG AGA AGG A
PCV2 Forward Primer (Real-time PCR)	CCA GGA GGG CGT TGT GAC
PCV2 Reverse Primer (Real-time PCR)	CGC TAC CGT TGG AGA AGG A
PCV2 Probe (Real-time PCR)	AAT GGC ATC TTC AAC ACC CGC CTC

마. PRRSV의 준비 및 바이러스 정량을 위한 Real-time PCR 준비

(1) PRRS 바이러스의 준비

PRRS 바이러스의 증식용 세포인 MARC-145 cell을 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum)와 2% (v/v) antibiotics가 첨가 되어있는 alpha-MEM 배지를 이용하여 80% monolayer로 배양하였다. 배양된 MARC-145 cell의 배양액을 제거 후, 1시간동안 37°C에서 5% CO₂의 조건으로 10분마다 rocking하여 바이러스를 흡착시켰으며, 3일간 배양하여 PRRSV를 증식하였으며, 증식 이 후에는 확실한 CPE가 형성되는지 여부를 매일 관찰하여 주었다. 3일간 배양한 PRRSV가 증식된 세포 플라스크를 3회 얼렸다 녹였다를 반복하였으며, 이를 원심분리하여 상층액을 회수 하였다. 회수한 상층액에 존재하는 PRRSV의 정량을 위해 Real-time PCR 방법을 사용하였다.

(2) PRRSV의 정량을 위한 Real-time PCR법 확립

본 실험에 사용한 PRRSV는 국내 야외 분리주로서 전남대학교 조경오 교수로부터 분양 받은 것 (PRRSV LMN strain)을 사용하였다. 분양 받은 PRRSV로부터 viral RNA를 추출하였으며, 이를 template로 하여 cDNA를 합성하였으며, 합성된 cDNA를 template로 하여 PCR 방식을 이용한 증폭을 실시하였다. 증폭된 PCR product는 pGEMT-easy vector에 cloning한 후, cloning된 vector는 농도 별로 희석 ($10^{10} - 10^4$ PCV2 plasmid copies/ml)하여 주었다. 최종적으로 희석된 vector를 이용하여 real-time PCR을 이용하여

standard curve를 작성한 후 바이러스 정량에 사용하였다. Viral DNA로부터 DNA 증폭 시 사용한 primers는 아래 Table 2.2과 같으며 Real-time PCR을 위해 사용한 Primers 또한 PCR에 사용했던 것과 동일하다.

Table 2.2 Sequence of primers and probe designed for the PRRSV PCR and real time PCR

	Sequence(5'-3')
PRRS Forward Primer	ATA ACA ACG GCA AGC AG
PRRS Reverse Primer	CAG TGT AAC TTA TCC TCC CA

바. PCV2와 PRRSV의 공격 접종

PCV2와 PRRSV의 혼합 접종은 봉독 접종 2일 후에 실시하였다. 접종 시 PCV2와 PRRSV의 배양액을 혼합하여 이유자돈 한 마리당 20ml씩을 비강으로 접종하였다. 이 때 사용한 접종액 20 ml내의 PCV2의 총량은 1×10^5 copies number이며 PRRSV의 총량은 1×10^6 copies number이다.

사. PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이 후, 면역학적 변화

(1) 혈중 라이소자임 활성 측정

바이러스 혼합 공격 접종 4일 후 (D+4, 정제 수지봉독 주사 6일 후), 7일 후 그리고 12일 후에 혈액을 수거하여 혈중 라이소자임의 활성을 평가하였다. 그 결과 바이러스 혼합접종 4일 이후부터 대조군에 비해 봉독 주사군들의 라이소자임의 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 목부위 주사군에 이러한 경향이 뚜렷했다 (Fig 2.39).

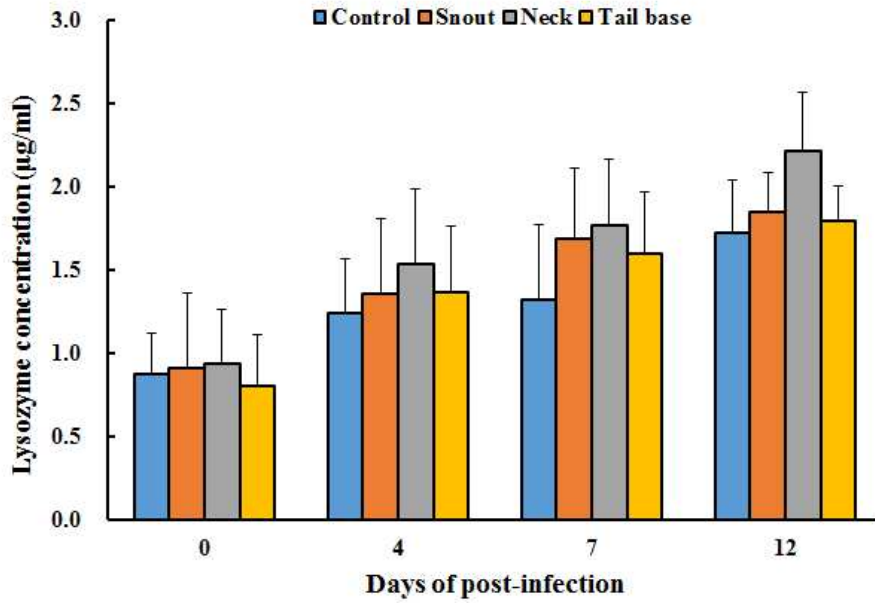


Fig 2.39. PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이후, 날짜별 혈청 내 라이소자임 활성 평가.

(2) 백혈구 감별 계산

바이러스 혼합 공격 접종 4일 후와 7일, 12일 후에 경정맥으로부터 채혈을 실시하여 말초 혈액 내 백혈구 감별 계산을 실시하였다. 그 결과, 공격접종 후에 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 중성호성 백혈구의 비율은 줄어드는 반면 림프구의 비율이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 4일차와 7일차에 이러한 경향이 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 2.40).

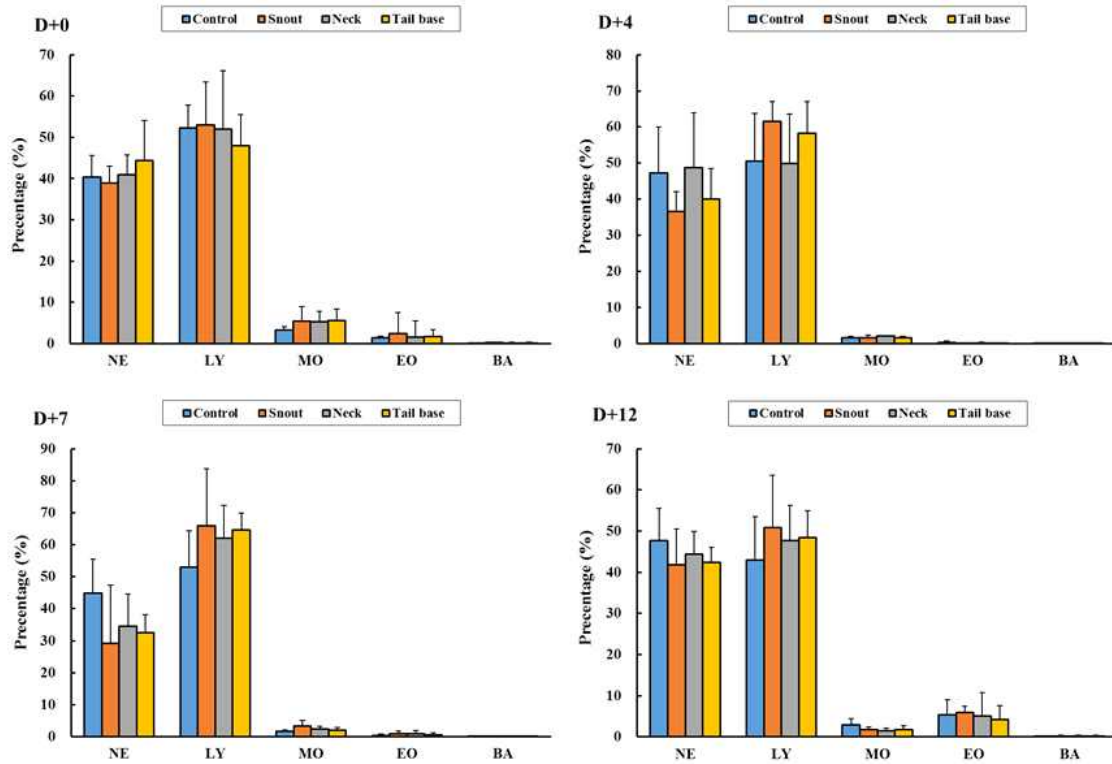
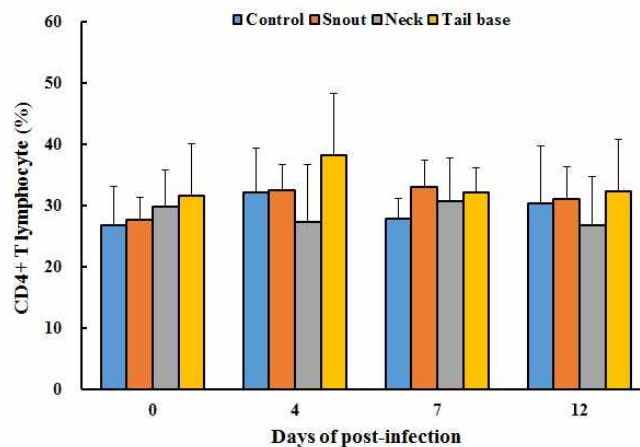


Fig 2.40. PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이 후, 이유 자돈의 백혈구 감별 계산.

(3) 말초 혈액 중 T 림프구 아세포의 비율 변화

PCV2와 PRRSV 혼합 접종 4일후, 7일 그리고, 12일후에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 T 림프구의 아세포 비율을 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 공격 접종 후 전기간에 걸쳐 대조군에 비해 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 증가하는 경향을 보였으며, 특히 공격 접종 4, 7일차에서 미근부 주사군의 $CD4^+/CD8^+$ ratio가 통계적으로 유의성 있게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.



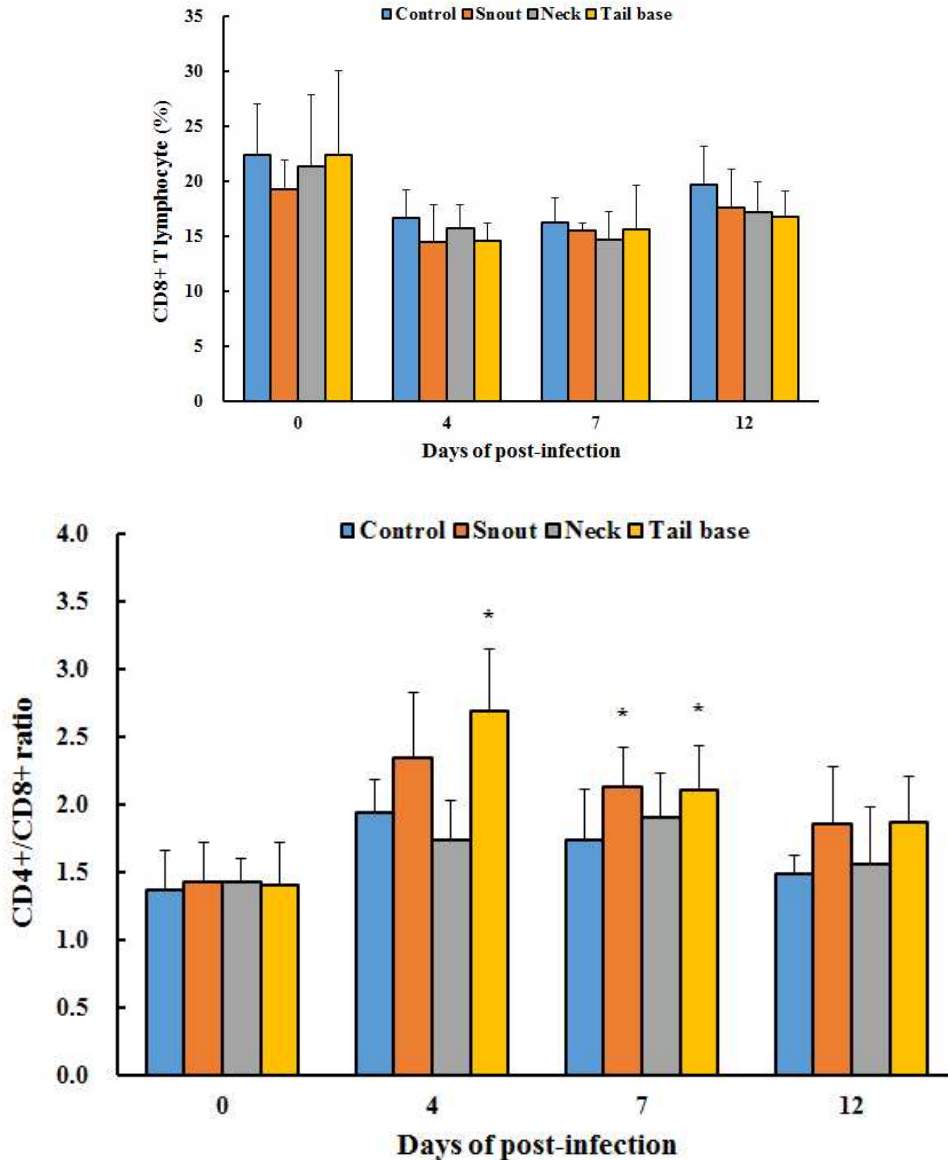
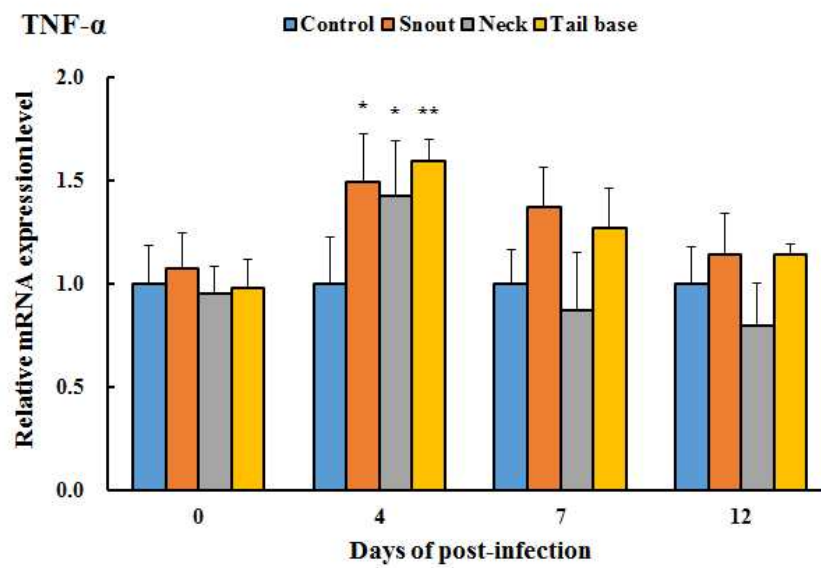
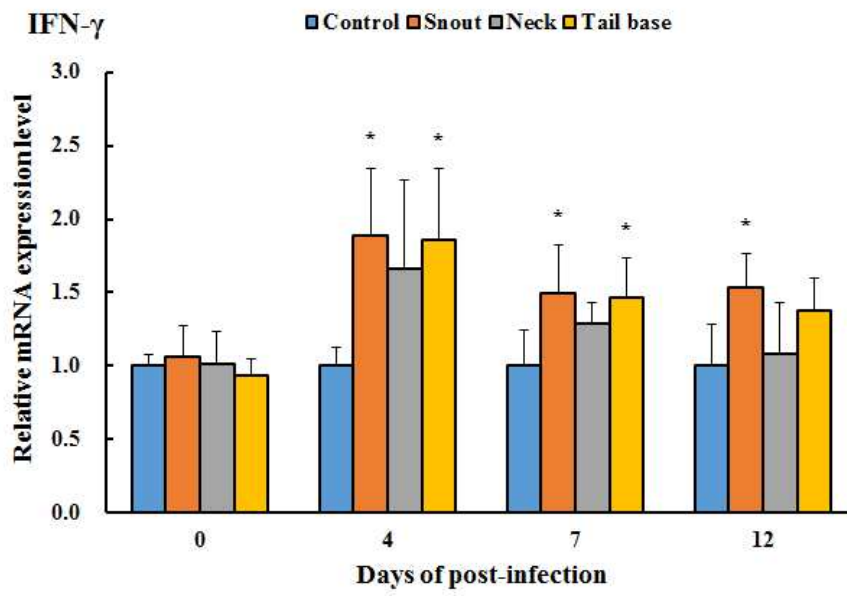


Fig 2.41. PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이 후, 이유 자돈의 말초혈액내 T 림프구 아세포의 비율에 미치는 정제 수지봉독의 영향.

(4) 상대적인 사이토카인 발현능 평가

PCV2와 PRRSV 혼합 접종 4일후, 7일 그리고, 12일후에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 림프구를 분리한 후 RNA를 추출하고, 추출한 RNA를 다시 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA를 template로 사용하여 Real-time PCR 방법을 통해 $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ cytokine의 상대적 발현 정도를 측정하였다. 그 결과, 공격 접종 4일째부터 모든 사이토카인의 수치가 증가하였으며, 특히 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 사이토카인 수치가 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 공격 접종 12일 후까지 지속됐으며, $IFN-\gamma$ level과 $IL-1\beta$ level의 경우 공격 접종 전기간에 걸쳐 대조군에 비해 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군에서 그 수치가 통계적으로 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig 2.42).



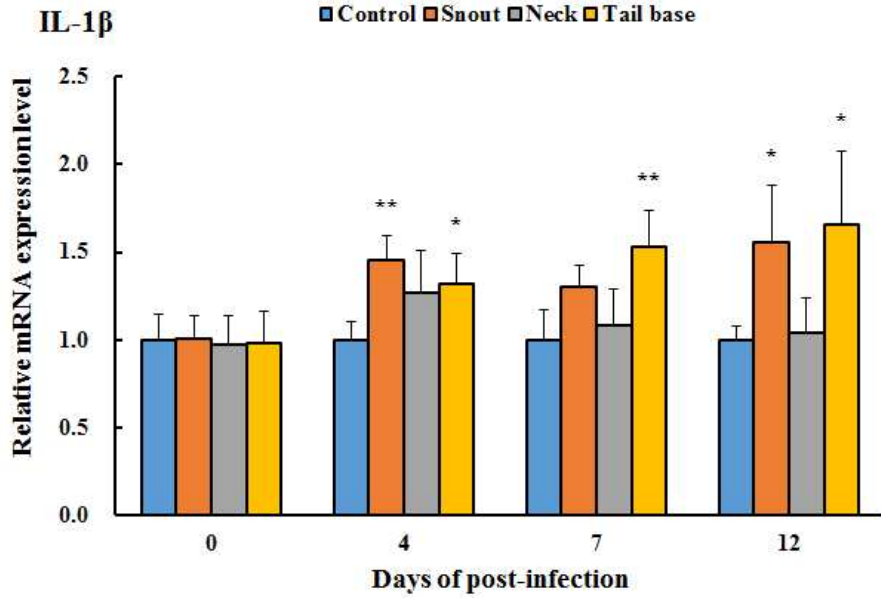


Fig 2.42. PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이 후, 이유 자돈의 사이토카인 발현양상의 변화.

아. PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이 후 봉독의 바이러스 질병에 대한 항병능 평가

(1) 부검 시 육안적 소견

PCV2와 PRRS 바이러스 혼합 공격 접종 후 12일 차에 부검을 실시하여 각 군간의 육안적 병변차이를 확인하였다. 그 결과 전군에서 PCV2와 PRRS에 의한 폐렴 소견이 관찰되었으며 이에 의한 폐의 충출혈 병변 및 폐의 경화 등을 확인할 수 있었다.

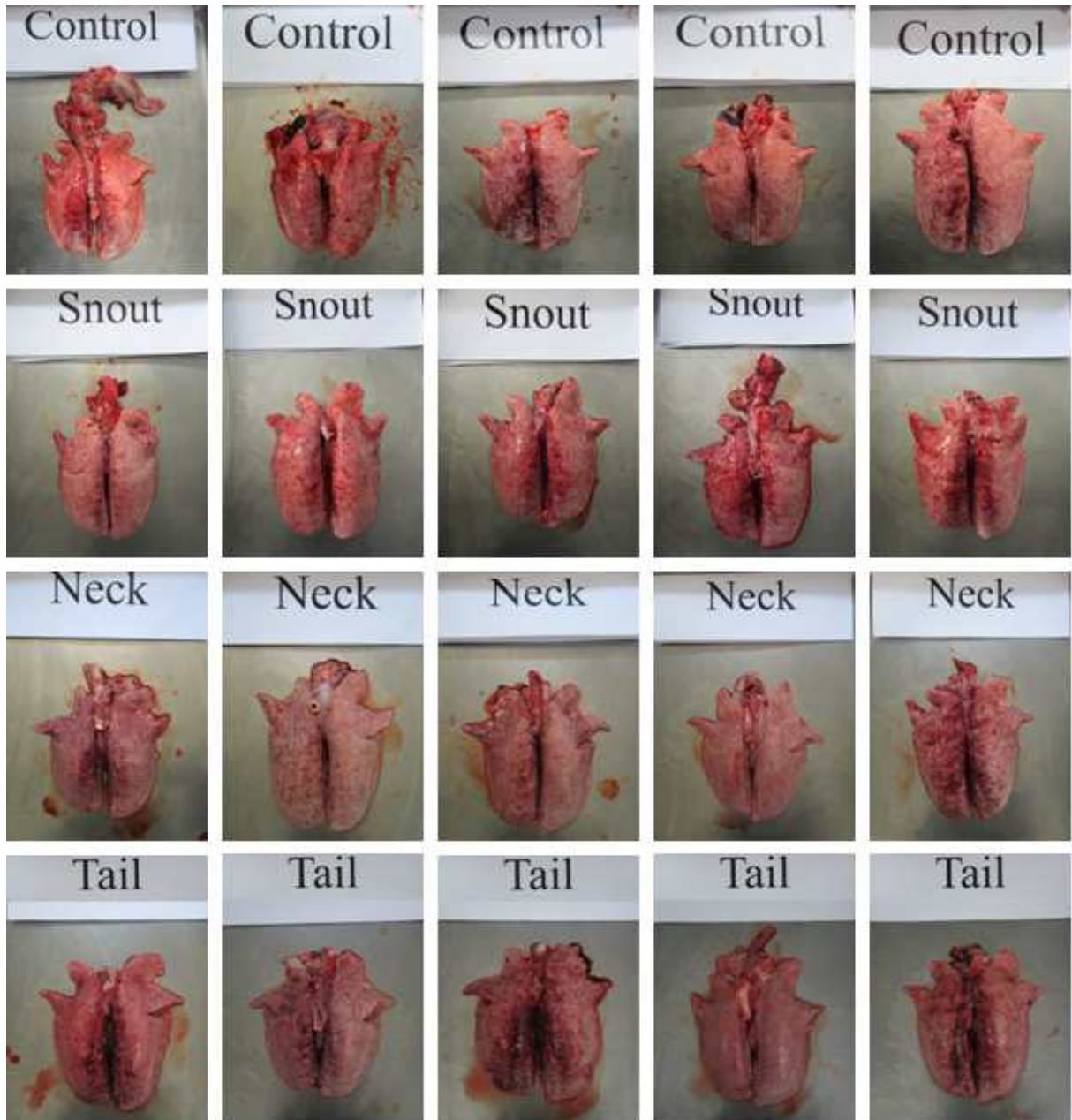


Fig 2.43. PCV2와 PRRS 혼합 공격 접종 이후, 부검을 통한 육안적 병변의 확인.

(2) PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이 후, 혈액 내 바이러스 정량 (Viremia 측정)

PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 후 혈액 내 바이러스 정량을 위해 4일, 7일, 11일차에 말초혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 혈청 분리 후 real time PCR법을 이용하여 위에서 기술한 PRRS와 PCV2 정량법 확립을 위해 실시한 실험방법과 동일한 방식으로 바이러스 정량을 실시하였다.

(가) 혈액 내 PRRSV 바이러스 정량

PRRSV 공격 접종 4일 후부터 혈액 내 바이러스를 정량 할 수 있었으며 7일 후에 최고치를 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 PRRSV 공격 접종 4일 후에 모든 봉독 주사군의 혈액 내 PRRSV수가 대조군에 비해 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었으며, 이러한 경향은 공격 접종 7일 후와 12일 후에도 지속됨을 확인할 수 있었다. 특히 미근부 주사군의 경우 공격 접종 7일 차에 대조군에 비해 유의성 있게 혈액 내 PRRSV수가 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig 2.44).

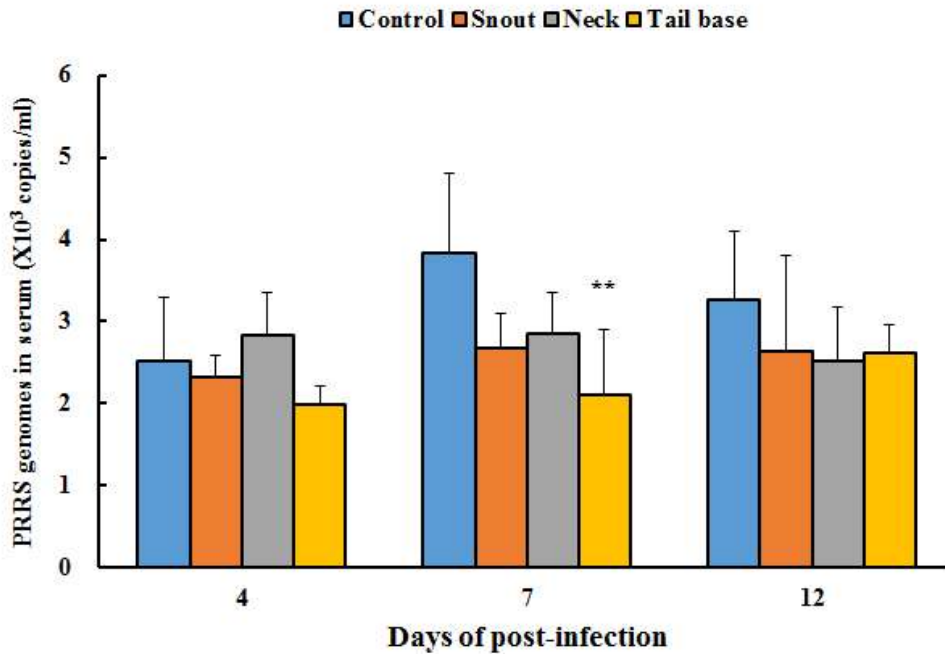


Fig 2.44. PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이 후, 이유 자돈의 혈액 내 PRRSV량의 변화. 대조군에 비해 봉독접종군의 혈중 PRRSV가 감소하는 경향을 나타냈으며, 특히 7일차에 미근부 주사군의 PRRSV수가 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다.

(3) PCV2와 PRRSV 혼합 공격 접종 이 후, 부검 시 각 장기 별 바이러스 정량

폐, 편도, 가슴샘, 기관 림프절을 채취한 후, 이를 이용해 장기내에 존재하는 PCV2와 PRRS 바이러스의 바이러스 정량을 실시하였다. 바이러스 정량은 위에서 기술한 real-time PCR 정량법을 사용하여 실시하였다.

(가) 장기 내 PCV2 바이러스 정량

폐, 편도, 가슴샘, 기관 림프절에 존재하는 PCV2 바이러스를 정량한 결과 폐에서 PCV2 바이러스를 확인할 수 있었으며, 모든 봉독 주사군이 대조군에 비해 폐내의 PCV2 바이러스량이 유의적으로 감소하였다. 특히 주둥이 주사군과 미근부 주사군의 PCV2 바이러스량이 대조군에 비해 큰 폭으로 감소함을 확인하였다 (Fig 2.45).

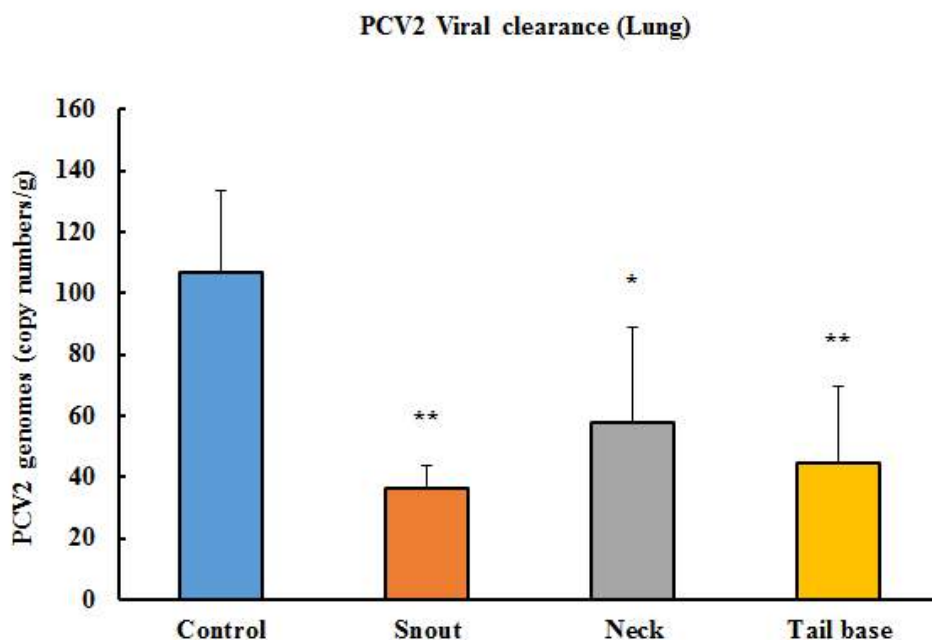


Fig 2.45. PCV2와 PRRS 바이러스 혼합 공격 접종 이 후, 이유 자돈의 폐내 PCV2 바이러스 정량 결과, 대조군에 비해 봉독주사군의 PCV2 바이러스량이 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있다.

(나) 장기 내 PRRS 바이러스 정량

폐, 편도, 가슴샘, 기관 림프절에 존재하는 PRRS 바이러스를 정량한 결과 모든 조직에서 PRRS 바이러스를 확인할 수 있었으며, 모든 봉독 주사군이 대조군에 비해 PRRS 바이러스량이 유의적으로 감소하였으며, 특히 미근부 주사군의 경우 모든 표적장기에서 PRRS 바이러스량이 대조군에 비해 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다(Fig 2.46).

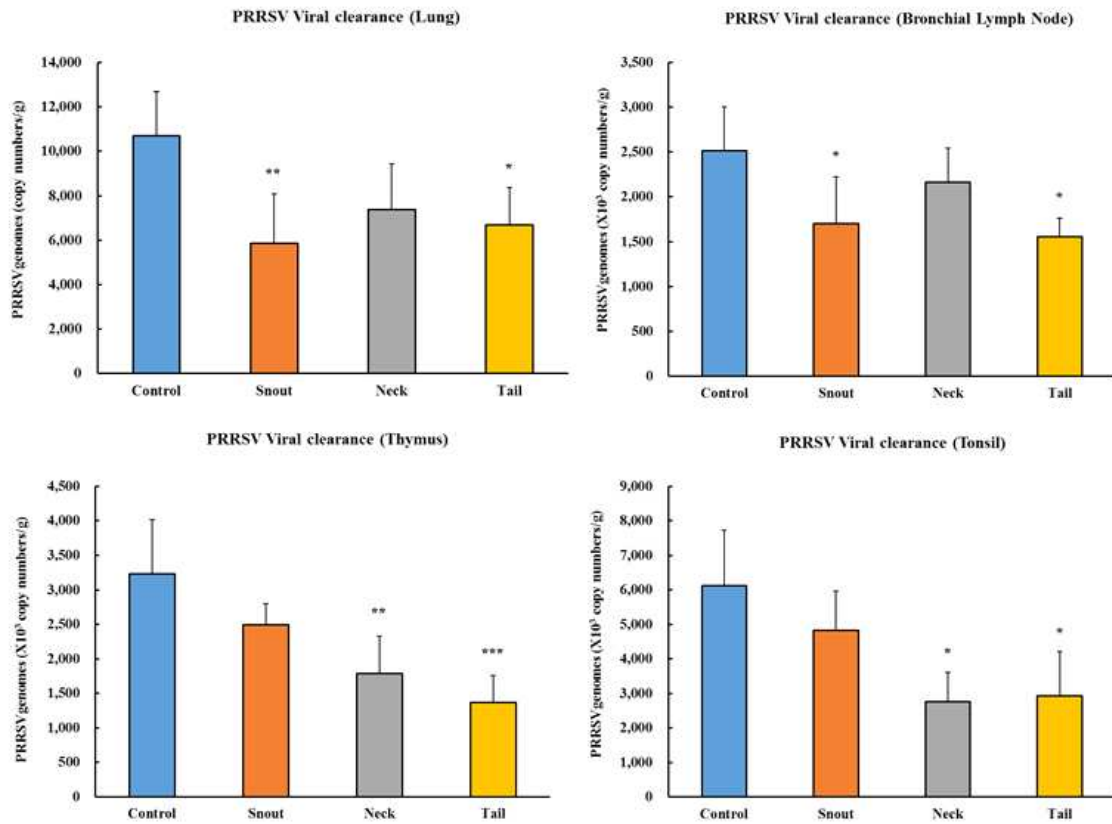


Fig 2.46. PCV2와 PRRS 바이러스 혼합 공격 접종 이 후, 이유 자돈의 장기 내 PRRS 바이러스 정량 결과. 대조군에 비해 봉독주사군의 장기 내 PRRS 바이러스수가 감소함을 확인할 수 있었다.

자. 정제 수지봉독의 돼지에서 PCV2와 PRRSV 혼합 감염에 대한 항병능 평가의 주요 결과의 종합

(1) 정제 수지봉독의 돼지에서 PCV2와 PRRSV 혼합 감염 시 면역능에 미치는 영향 평가

가. 라이소자임 활성 증가

본 연구에서는 수지 봉독 접종 후 PCV2와 PRRSV를 혼합 감염시킨 결과, 공격 접종 전에 비해 공격 접종 4, 7, 12일 후에 대조군에 비해 봉독 접종군의 혈중 라이소자임 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 목부위 주사군에 이러한 경향이 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

나. 림프구 비율의 증가

PCV2와 PRRSV 혼합 공격접종 후에 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 중성호성 백혈구의 비율은 줄어드는 반면 림프구의 비율이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 4일차와

7일차에 이러한 경향이 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

다. CD4⁺/CD8⁺ ratio의 증가

PCV2와 PRRSV 혼합 공격접종 후에, 대조군에 비해 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 CD4⁺/CD8⁺ ratio가 증가하는 경향을 보였으며, 특히 공격 접종 4, 7일차에서 미근부 주사군의 CD4⁺/CD8⁺ ratio가 통계적으로 유의성 있게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

라. IFN- γ 와 IL-1 β level의 증가

IL-1 β 는 전염증성 사이토카인 중 하나로 PCV2와 PRRSV 감염 시 바이러스가 체내의 면역을 억압하여 IL-1 β 의 수치가 감소하는 것으로 알려져 있다. 공격 접종 4일째부터 IFN- γ 와 IL-1 β 의 수치가 증가하였는데, 특히 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 사이토카인 수치가 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었으며 이러한 경향은 공격 접종 12일 후까지 지속되었다.

(2) 정제 수지봉독의 돼지에서 PCV2와 PRRSV 혼합 감염 시 항병능에 미치는 영향 평가

가. 혈액 내 PRRSV 바이러스수의 감소 확인

PRRSV 공격 접종 4일 후부터 혈액 내 바이러스를 정량 할 수 있었으며 7일 후에 최고치를 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 PRRSV 공격 접종 4일 후에 모든 봉독 주사군의 혈액 내 PRRSV량이 대조군에 비해 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었으며, 이러한 경향은 공격 접종 7일 후와 12일 후에도 지속됨을 확인할 수 있었다.

나. 장기 내 PCV2 바이러스수의 감소 확인

PCV2의 주요 표적 장기인 폐, 편도, 가슴샘, 기관 림프절에 존재하는 PCV2 바이러스를 정량한 결과 폐에서 PCV2 바이러스를 확인할 수 있었으며, 모든 봉독 주사군이 대조군에 비해 폐내의 PCV2 바이러스량이 유의적으로 감소하였다. 특히 주둥이 부위 주사군과 미근부 주사군의 PCV2 바이러스량이 대조군에 비해 큰 폭으로 감소함을 확인할 수 있었다.

다. 장기 내 PRRS 바이러스수의 감소 확인

PRRSV의 주요 표적 장기인 폐, 편도, 가슴샘, 기관 림프절에 존재하는 PRRS 바이러스를 정량한 결과 모든 조직에서 PRRS 바이러스를 확인할 수 있었으며, 대조군에 비해 모든 봉독 주사군의 표적 장기내에서 PRRS 바이러스량이 유의적으로 감소하였으며, 특히 미근부 접종군의 경우 대조군에 비해 큰 폭으로 통계적으로 유의성 있게 바이러스량이 감소함을 확인하였다.

(3) 최종 결론

정제 수지 봉독을 이유자돈에 주사 후 PCV2와 PRRS 바이러스를 공격 접종 하였을 때, 주둥이 부위에 주사한 군과 미근부에 주사한 군에서 대조군에 비해 여러 가지 면역지표들이 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 혈중 라이소자임의 활성 증가, CD4⁺/CD8⁺ ratio의 증가 및 IFN-gamma 및 IL-1 β level의 증가에 유의적인 효과가 있는 것으로 생각된다. 또한, 정제 수지 봉독 주사 시 혈중 또는 표적 장기인 폐, 림프절, 편도, 가슴샘에서 PRRSV수가 감소함을 확인할 수 있었는데, 특히 미근부 주사군의 경우 모든 표적 장기에서 바이러스 수가 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다.

따라서 미근부에 봉독 주사 후 PCV2와 PRRSV 혼합 접종 시, 다른 접종 부위에 봉독을 주사하는 것 보다 더 높은 면역 증강 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각되며 이러한 면역 증강작용에 의해 바이러스에 대한 높은 항병 효과를 나타낸 것으로 생각된다. 따라서 돼지에 봉독 주사 시 미근부를 이용한 주사 방식이 높은 면역증강효과와 항병능을 나타낼 수 있는 최적의 투여경로로 생각된다.

5. Bovine rota virus, Bovine corona virus, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* 혼합 인공감염된 송아지에서 정제 수지봉독의 예방효과

가. 실험 목적

Bovine rota virus, Bovine corona virus, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*에 동시에 인공 감염된 송아지에서 정제 수지봉독의 예방효과를 규명하고자 면역학적 변화 및 바이러스의 청소율과 병변의 육안적 조사를 실시하였다.

나. 실험동물

송아지(2주령) 총 6수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였으며, 입사 후 완전 임의로 3수씩 2군으로 나누었다.

다. 수지봉독의 주사 부위에 따른 군 분리

본 실험에서 사용한 봉독은 수지봉독(LWBV, Lipid Water Bee Venom)에 Hyaluronidase inhibitor를 첨가한(LWBV+i) 액상봉독으로써 LWBV+i의 농도는 2.1mg/ml이었다. 주사는 1ml의 부피를 총 1회 (입사 후 1일차) 목 부위 피하접종 하였다.

- Group 1: 대조군 (용제만을 주사)
- Group 2: 실험군 (정제 수지봉독을 피하 주사)

라. 접종실험을 위한 소 로타바이러스 배양액 확보 및 Real-time PCR법 확립

(1) 로타바이러스의 준비

로타바이러스 배양을 위해 TF-104 (African green monkey kidney cell)을 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum) 와 1% (v/v) antibiotics 가 첨가 되어있는 alpha-MEM배지를 이용하여 80% monolayer가 되도록 배양하였다. 80% monolayer가 되도록 배양된 TF-104 cell에 바이러스 접종 전 10ul/ml 농도의 trypsin을 30분간 잠작시킨 후, 소로타바이러스를 0.1 MOI로 cell에 접종하였다. 1시간동안 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하며 10분 간격으로 rocking을 실시한 후, 1ul/ml 농도의 trypsin과 1% (v/v) antibiotics가 함유된 alpha-MEM배지를 첨가하고 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하여 virus를 증식시켰다.

(2) 소로타바이러스 정량을 위한 Real-time PCR법 확립

배양한 소로타바이러스로부터 viral RNA를 추출한 후, 표3에 나와있는 primer set를 이용한 PCR 증폭을 실시하였다. 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy vector에 삽입하였으며, 재구성된 plasmid를 10⁶-10⁰ copies으로 10-fold dilution하여 real-time PCR의 standard로 사용하였다. Real-time PCR에 사용된 primer와 probe의 sequence는 아래 Table 2.3과 같다.

Table 2.3. Sequence of primers and probe designed for the BRV PCR and real time PCR

	Sequence (5'-3')
Rotavirus Forward Primer	TTTAAAACGAAGTCTTCRACATGGAGTCTGTA
Rotavirus Reverse Primer	TAATTGGTAGATTACCAATTCCTCCAGTTTG
Rotavirus Forward Primer	GGATGTCCTGTACTCCTTGTCAAAA
Rotavirus Reverse Primer	TCCAGTTTGGAACATTTCCA
Rotavirus Probe	FAM-ATAATGTGCCTTCGACAAT-BHQ

마. 접종실험을 위한 소 코로나바이러스 배양액 확보 및 real-time PCR법의 확립

(1) 소코로나바이러스의 준비

소코로나바이러스 배양을 위해 HRT-18G cell (Human rectal tumor cell)을 10% FBS와 1% Antibiotics이 첨가된 DMEM을 사용하여 80% monolayer를 형성하도록 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양된 HRT-18G cell을 pancreatin에 30분간 감작시킨 후, 소코로나바이러스를 접종하였다. 1시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하며, 15분 간격으로 rocking한 후, 최종적으로 DMEM (5ug/ml Pancreatin, 1% Antibiotics)를 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 배양하여 virus를 증식시켰다.

(2) 소 코로나바이러스 정량을 위한 Real-time PCR법 확립

배양한 소코로나바이러스로부터 viral RNA를 추출한 후, 표4에 나와있는 primer set를 이용한 PCR 증폭을 실시하였다. 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy vector에 삽입하였으며, 재구성된 plasmid를 10⁶-10⁰ copies으로 10-fold dilution하여 real-time PCR의 standard로 사용하였다. Real-time PCR에 사용된 primer와 probe의 sequence는 아래 Table 2.4와 같다.

Table 2.4. Sequence of primers and probe designed for the BCV PCR and real time PCR

	Sequence (5'-3')
Coronavirus Forward Primer	TCTTAGCTGTTGACTTTATTACCTGG
Coronavirus Reverse Primer	ACATAAACAGCAAAACCACTAGTATCGCC
Coronavirus Forward Primer	CTGGAAGTTGGTGGAGTT
Coronavirus Reverse Primer	ATTATCGGCCTAACATACATC
Coronavirus Probe	FAM-CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT-BHQ

바. 소화기 세균의 준비

본 실험에 사용한 세균은 Enterohemolytic *Escherichia coli* (EHEC)와 *Salmonella* Typhimurium으로 BHI broth에 증식 후, PBS 희석하여 농도를 적정하여 소화기 공격 접종에 사용하였다.

사. 소화기 병원체의 동시 공격 접종

세균성 및 바이러스성 소화기 병원체의 동시 공격 접종은 정제 수지 봉독의 피하 주사 1일 후에 실시되었다. 병원체별 공격 접종 역가는 다음과 같으며 각 병원체는 20ml씩 혼합하여 총 80ml의 병원체를 동시에 구강으로 공격 접종 하였다. 본 실험에 사용된 바이러스성 병원체인 Bovine rotavirus와 Bovine corona virus는 병원성을 나타낸 소로부터 분리된 야외 분리주로서 전남대학교 조경오 교수로부터 분양 받은 것을 사용하였다. 세균성 병원체인 Enterohemolytic *Escherichia coli*는 병원성을 나타낸 소로부터 분리된 국내 야외분리주를 농림축산검역본부로부터 분양 받아 사용하였으며, *Salmonella enterica serova* Typhimurium은 ATCC 13311 strain을 사용하였다.

- *Salmonella enterica serova* Typhimurium (4×10^7 cfu/ml)
- Enterohemolytic *Escherichia coli* (1.4×10^8 cfu/ml)
- Bovine Rotavirus (2.4×10^9 copies)
- Bovine Coronavirus (1.2×10^9 copies)

아. 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이 후, 면역학적 변화

(1) 혈중 라이소자임 활성 측정

공격 접종 4일전과 봉독 접종 후 8일에 대조군과 실험군의 모든 송아지의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 혈청을 분리하여 혈청 내 라이소자임 활성을 측정하였다. 그 결과

수지 봉독 전과 봉독 접종 후 각 군별 차이를 확인 할 수 없었다 (Fig 2.47).

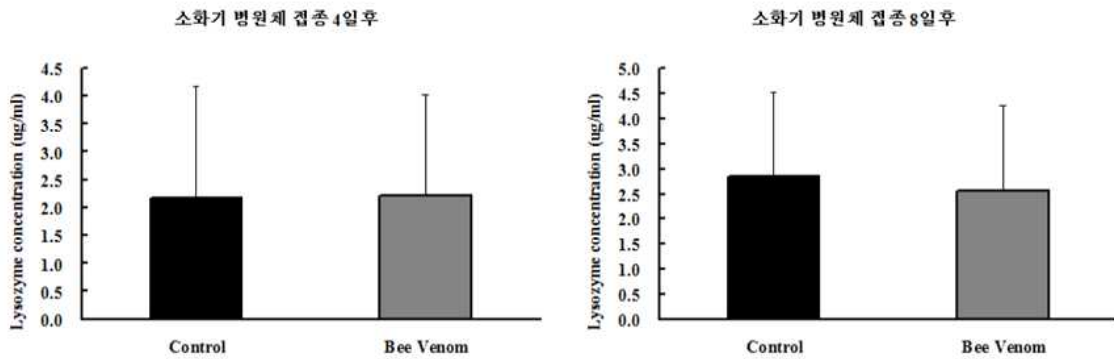


Fig 2.47. 정제 수지 봉독 주사가 소화기 병원체에 동시 공격 접종된 송아지의 혈중 라이소자임에 미치는 영향.

(2) 백혈구 감별 계산

소화기 병원체 혼합 공격 접종 2일 후, 4일 후, 6일 후에 혈액을 수거하여 말초 혈액 내 백혈구 감별 계산을 실시하였다. 그 결과 수지 봉독 주사군과 대조군간의 별다른 차이를 확인할 수 없었다 (Fig 2.48).

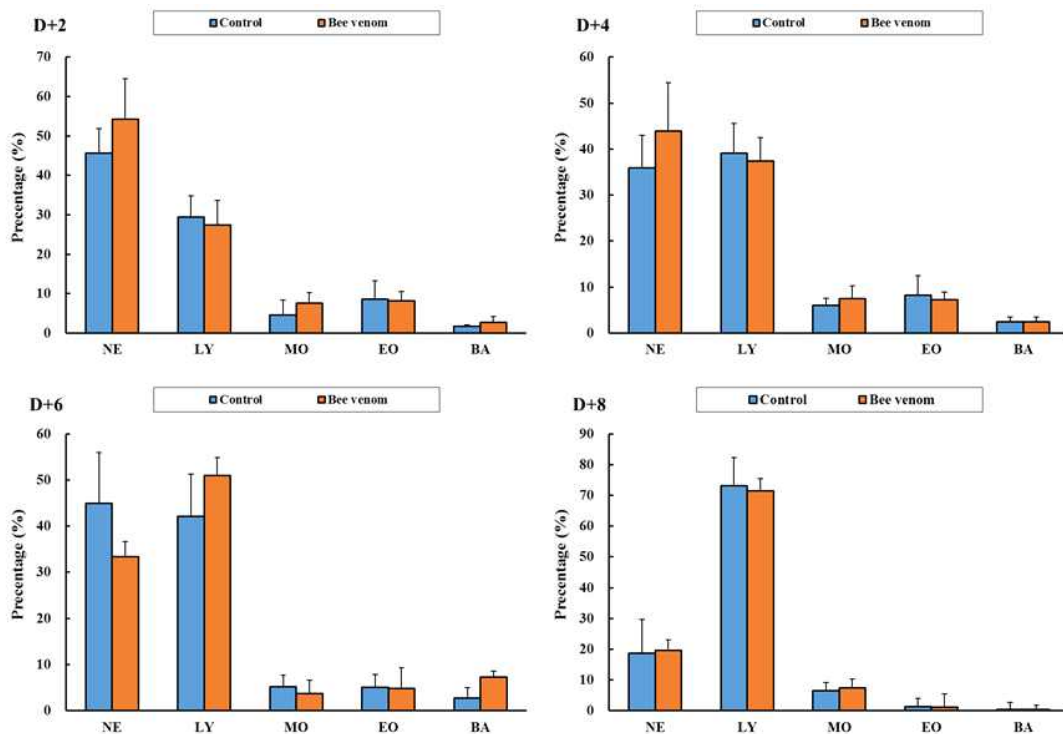
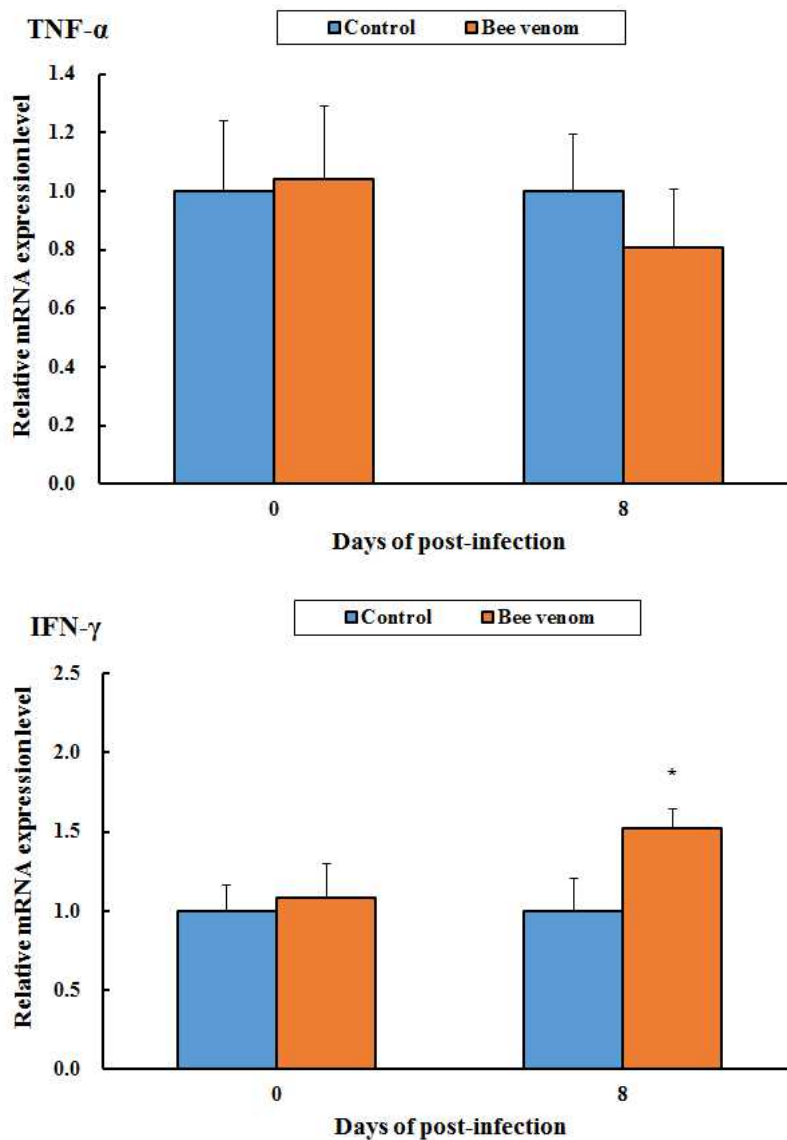


Fig 2.48. 소화기 병원체 혼합 공격 접종에 따른 송아지의 백혈구 감별 계산.

(3) 상대적인 사이토카인 발현능 평가

소화기 병원체 혼합 공격 접종 전과 공격 접종 8일 후에 대조군과 봉독주사군의 모든 송아지의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 이로부터 림프구를 분리한 후 RNA를 추출하여 이를 이용해 real-time PCR을 실시하였다.

그 결과, TNF- α level의 경우 봉독 주사 후 대조군에 비해 봉독 주사군이 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 확인할 수 없었다. 또한 IFN- γ 과 IL-12 level은 공격 접종 8일 후에 대조군에 비해 봉독 주사군에서 통계적으로 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig 2.49).



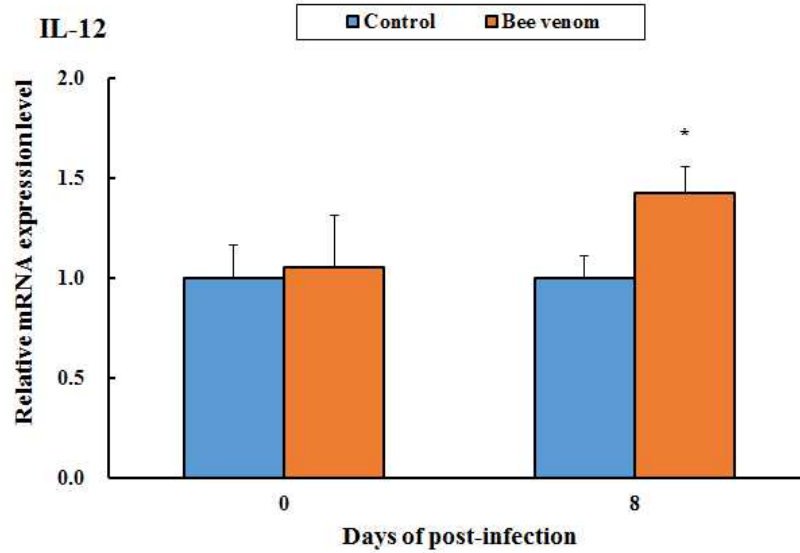


Fig 2.49. 수지 봉독 주사 후 소화기 병원체 혼합 공격 접종에 따른 송아지의 상대적 사이토카인 발현능의 변화. 공격접종 8일후에 봉독 주사군의 IFN- γ 및 IL-12 level이 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다.

자. 공격 접종 이후, 봉독 주사에 의한 소의 소화기 병원체들에 대한 항병능 평가

(1) 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이 후, 송아지의 부검 시 육안적 소견

소화기 병원체 혼합 공격 접종 후 8일 차에 부검을 실시하여 각 군간의 육안적 병변차이를 확인하였다. 그 결과 봉독 주사 군에 비해 대조군의 소화기계 충출혈 증세가 더 심각하였으며, 소화기계 림프절 역시 그 비후도가 더 심한 것을 확인할 수 있었다 (Fig 2.50).

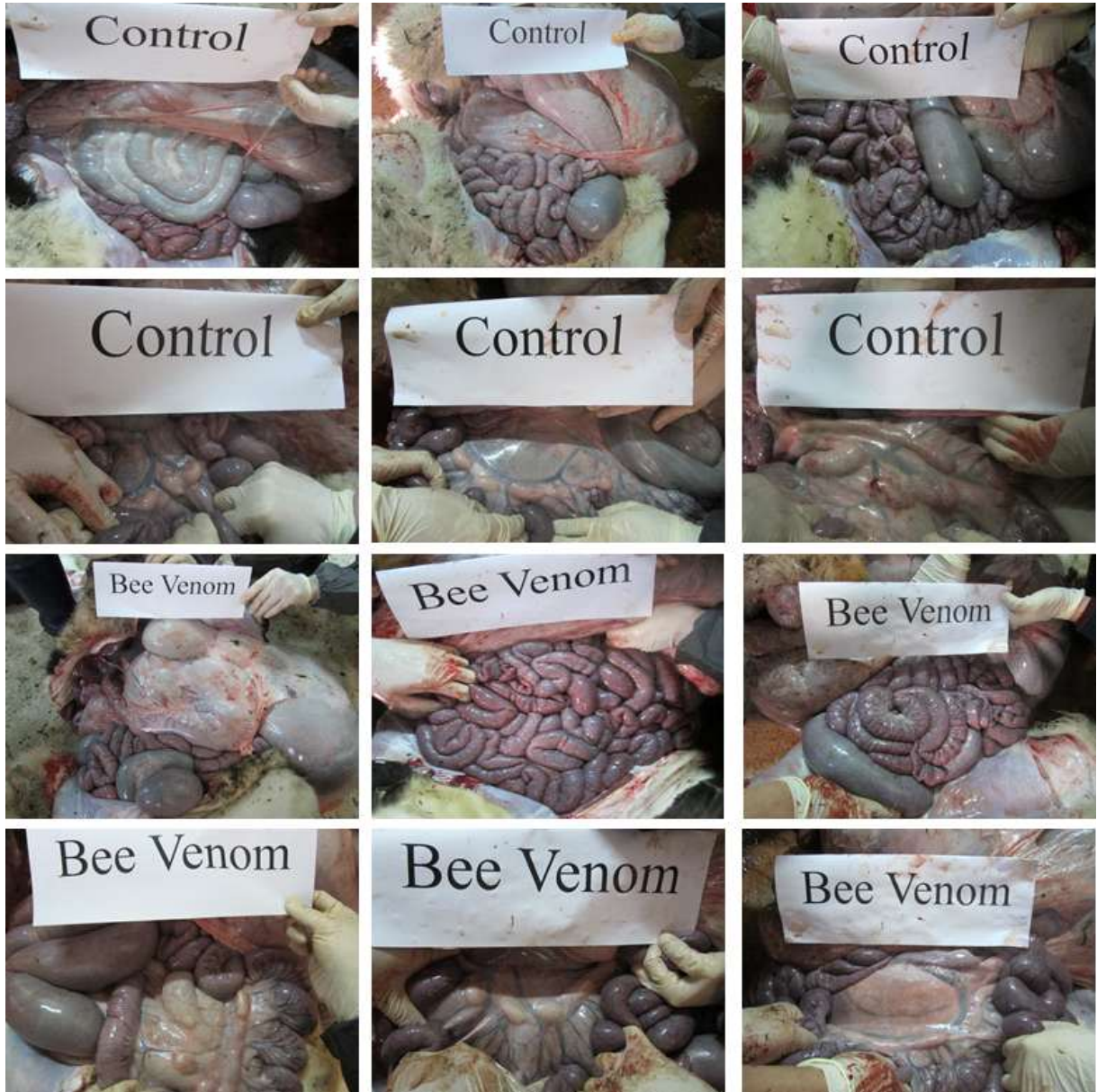


Fig 2.50. 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이후, 부검을 통한 육안적 병변의 확인.

(2) 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이 후, 송아지 분변 수분함량 변화 조사

소화기 병원체의 혼합 공격 접종 2일 후, 4일 후, 6일 후 및 8일 후에 이유 자유의 분변을 채취하여 분변의 수분함량을 측정하였다. 그 결과, 봉독 주사군이 대조군에 비해 공격 접종 2, 6, 8일 후에 채취한 분변의 수분함량이 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 공격 접종 2, 6, 8일 후에 수지 봉독 주사군이 대조군에 비해 설사 증상이 더 경미했을 것으로 생각된다 (Fig 2.51).

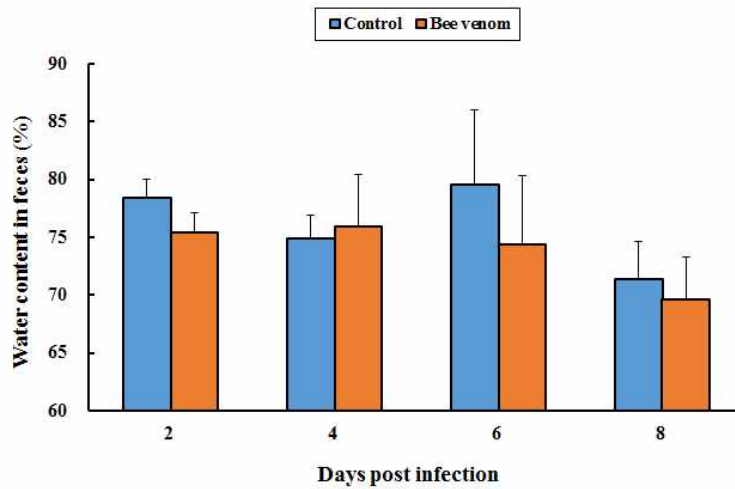


Fig 2.51. 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이 후, 송아지의 분변 수분함량. 대조군에 비해 봉독주사군의 분변 수분함량이 감소함을 확인할 수 있다.

(3) 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이 후, 송아지의 분변 내 세균 정량

소화기 병원체의 혼합 공격 접종 2, 4, 6, 8일 후에 이유 송아지의 분변을 수거하여 분변에서 분리되는 *Salmonella* Typhimurium와 *Escherichia coli* 의 집락 수를 측정하였다.

(가) 분변 내 *Salmonella typhimurium* 정량

공격 접종 6일째에 대조군에 비해 수지 봉독 주사군에서 세균수가 감소하였으며, 특히 8일째에 수지 봉독 주사군의 세균수가 대조군에 비해 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig 2.52).

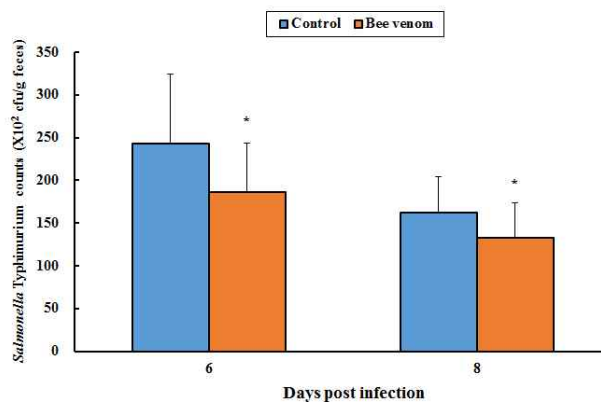


Fig 2.52. *S. Typhimurium* 공격접종 이후, 송아지의 분변으로 분리되는 세균의 수 (cfu/gram feces). 대조군에 비해 봉독 주사군의 살모넬라수가 감소함을 확인할 수 있다.

(나) 분변 내 Enterohemolytic *Escherichia coli* 정량

공격 접종 6일째, 8일째의 봉독 주사군의 세균수가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었다. 특히 접종 8일째에 대조군에 비해 봉독 주사군의 용혈성 대장균의 세균수가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig 2.53).

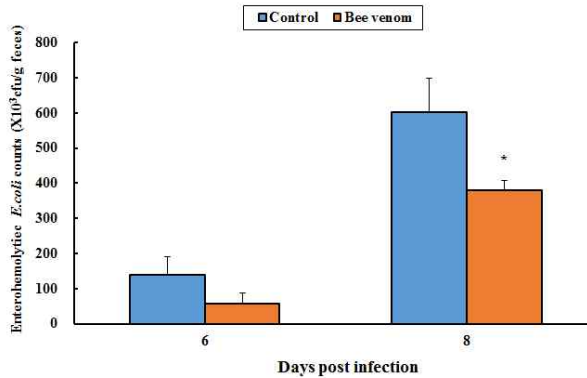


Fig 2.53. Enterohemolytic *E. coli* 공격 접종 이후, 송아지의 분변으로 분비되는 Enterohemolytic *E. coli* 의 수 (cfu/gram feces)

(4) 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이 후, 송아지의 분변 내 바이러스 정량

소화기 병원체 혼합 공격 접종 이후, 2일, 4일, 6일, 8일에 분변을 채취하여 바이러스 정량을 실시하였다. 바이러스 정량은 위에서 기술한 real-time PCR을 이용한 방식을 사용하여 실시하였다.

(가) 분변 내 소로타바이러스 정량

Fig 2.54에서 보는 바와 같이 공격 접종 후 봉독 주사군의 소로타바이러스 수가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었으며, 특히 접종 2일째와 6일째에 대조군에 비해 봉독 주사군의 소로타바이러스 수가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

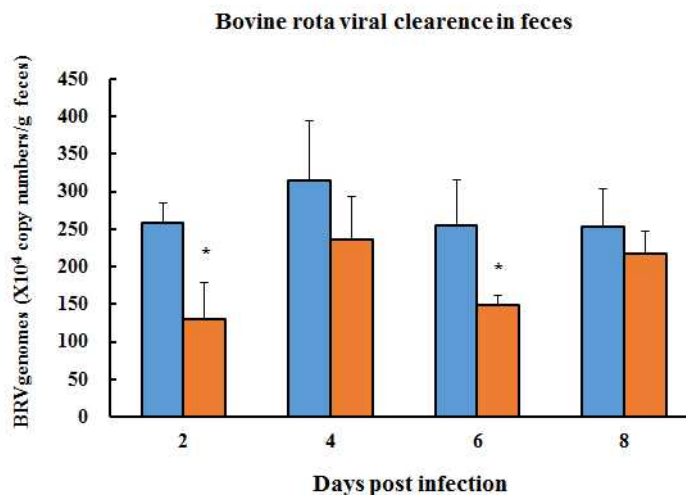


Fig 2.54. 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이후, 송아지의 분변으로 분비되는 소로타바이러스 수의 변화.

(나) 분변 내 소코로나바이러스 정량

공격 접종 후 봉독 주사군의 소코로나바이러스 수가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었으며, 특히 접종 4일째와 8일째에 대조군에 비해 봉독 주사군의 소코로나바이러스 수가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig 2.55).

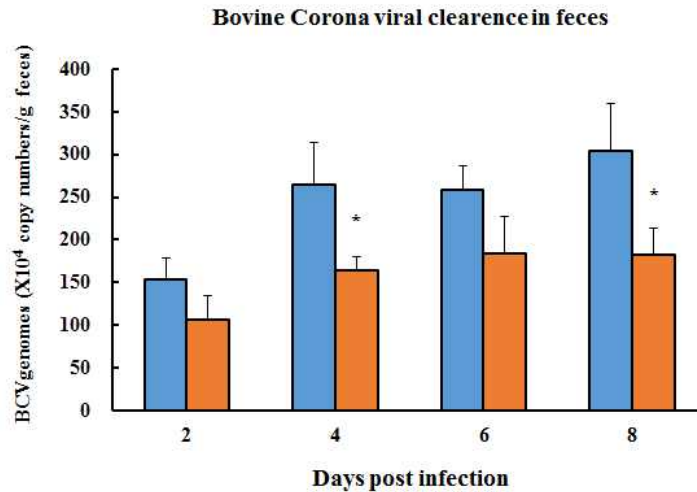


Fig 2.55. 소화기 병원체 혼합 공격 접종 이후, 송아지의 분변으로 분비되는 bovine corona virus 수의 변화.

차. 정제 수지봉독의 송아지에서 4가지 소화기 병원체 혼합 감염에 대한 항병능 평가의 주요 결과의 종합

(1) 정제 수지봉독의 송아지에서 4가지 소화기 병원체 혼합 감염 시 면역능에 미치는 영향 평가

(가) IFN-gamma와 IL-12 level의 증가

송아지에서 봉독 접종 후 4가지 소화기 병원체를 혼합 감염 후 8일차에 IFN- γ 와 IL-12 level이 대조군에 비해 봉독주사군에서 통계적으로 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다.

(2) 정제 수지봉독의 송아지에서 4가지 소화기 병원체 혼합 감염 시 항병능에 미치는 영향 평가

(가) 송아지 분변 수분함량의 감소 확인

봉독 주사군이 대조군에 비해 공격 접종 2일 후, 6일 후 및 8일 후에서 분변의 수분함량이 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 공격 접종 2일 후, 6일 후 및 8일 후에 수지 봉독 주사군이 대조군에 비해 설사 증상이 더 경미했을 것으로 생각된다.

(나) 분변 내 *Salmonella typhimurium* 수의 감소 확인

공격 접종 6일째에 대조군에 비해 수지 봉독 주사군에서 세균수가 감소하였으며, 특히 8일째에 수지 봉독 주사군의 세균수가 대조군에 비해 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

(다) 분변 내 Enterohemolytic *Escherichia coli* 수의 감소 확인

공격 접종 6일째, 8일째의 봉독 주사군의 용혈성 대장균수가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었다. 특히 접종 8일째에 대조군에 비해 봉독 처리군의 용혈성 대장균의 세균수가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

(라) 분변 내 소로타바이러스 수의 감소 확인

공격 접종 후 봉독 주사군의 소로타바이러스 수가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었으며, 특히 접종 2일째와 6일째에 대조군에 비해 봉독 처리군의 소로타바이러스 수가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

(마) 분변 내 소코로나바이러스 수의 감소 확인

공격 접종 후 봉독 주사군의 소코로나바이러스 수가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었으며, 특히 접종 4일째와 8일째에 대조군에 비해 봉독 주사군의 소코로나바이러스 수가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

(3) 최종 결론

정제 수지 봉독을 송아지에 주사 후 대표적인 소의 4가지 소화기 병원체인 살모넬라, 용혈성 대장균, 소로타바이러스, 소코로나바이러스를 공격 접종 하였을 때, 봉독을 주사한 군에서 대조군에 비해 IFN- γ 및 IL-12 level의 증가와 같은 면역학적 지표의 증가를 확인 할 수 있었다. 또한, 대조군에 비해 봉독 주사군에서 분변의 수분함량 확인을 통한 설사증세의 완화 및 분변 내 4가지 소화기 병원체의 배출량이 감소함을 확인할 수 있었다.

따라서 봉독 주사 후 송아지의 4가지 소화기 병원체를 혼합 접종 시, 봉독에 의해 체내의 면역작용이 증강되며, 이에 의해 소화기 병원체들에 대한 높은 항병 효과를 나타낸 것으로 생각된다. 따라서 송아지에 봉독 주사 시 높은 면역증강 효과와 항병능을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

6. 서방형 봉독제제의 *Salmonella Typhimurium*에 인공 감염된 이유자돈에서 예방효과

가. 실험 목적

PLGA로 봉독을 코팅한 서방형 봉독제제의 돼지에서 살모넬라에 대한 항병력 효과를 평가한다.

나. 실험동물

이유자돈 (3주령) 20수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입사하였으며, 입사 후에는 완전 임의로 5수씩 4군으로 나누었다.



Fig 2.56. 돼지 사육장의 모습

다. 봉독제제 코팅 여부에 따른 군 분리

본 실험에서 사용한 봉독은 수지봉독 (LWBV, Lipid Water Bee Venom)를 PLGA nanoparticle로 코팅한 서방형 봉독제제이며 농도는 2.1mg/ml이었다. 봉독 주사는 입사 후 3일차 0.05ml의 부피로 총 1회 실시하였고, 주사 부위는 1차 실험에서 가장 보정이 용이하고 면역학적 효능이 높게 나타난 미근부 부위를 선정하여 실시하였다. 군 분리는 일반봉독과 서방형 봉독제제의 효능을 비교하기 위한 구성으로 설정하였으며, 군 당 마리수는 5수이다.

- Group 1: 대조군 (무처치 대조군; Control)
- Group 2: PLGA nanoparticle 제제 처리군 (PLGA)
- Group 3: 일반 봉독제제 처치군 (일반봉독)
- Group 4: PLGA nanoparticle로 코팅된 봉독제제 처리군 (서방봉독)



Fig 2.57. 봉독 주사에 사용한 주사바늘의 모습과 이를 이용해 미근부에 봉독을 주사하는 모습

라. *Salmonella* Typhimurium의 인공감염

서방형 붕독 제제에 의한 살모넬라에 항병능 확인을 위해, 붕독 접종 2일후에 *S. Typhimurium*의 인공 감염을 실시하였다. 인공 감염에 사용한 *S. Typhimurium*은 ‘돼지에서 최종 선별된 수지붕독의 투여에 따른 살모넬라 감염증 예방효과’ 접종 실험에 사용한 것과 동일한 strain으로, 3×10^9 cfu/ml의 농도로 마리당 10ml씩 경구 접종하였다. 아래 사진은 *S. Typhimurium*을 구강으로 접종시키는 모습이다.



Fig 2.58. *S. Typhimurium*을 구강으로 인공감염시키는 모습.

마. 공격 접종 이후 임상증상의 평가

(1) 설사 정도의 비교

S. Typhimurium 인공 감염 이후, 1, 2, 4, 6, 8일차에 돼지의 분변을 수거하여 분변의 설사 정도를 Tanaka (2010)등의 방법에 따라 점수로 표시하였다. 그 결과, 그림 3.5에서 보는 바와 같이, 일반붕독군의 경우 접종 6일차부터 분변의 설사 정도가 감소하는 경향을 보였으나, 서방붕독군의 경우 1일차부터 분변의 설사 정도가 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 인공 감염 8일차까지 지속되어 일반붕독 및 서방붕독군의 분변 설사정도가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었다.



Fig 2.59. *S. Typhimurium* 인공 감염 이후, 설사 증세를 나타내는 돼지의 모습.

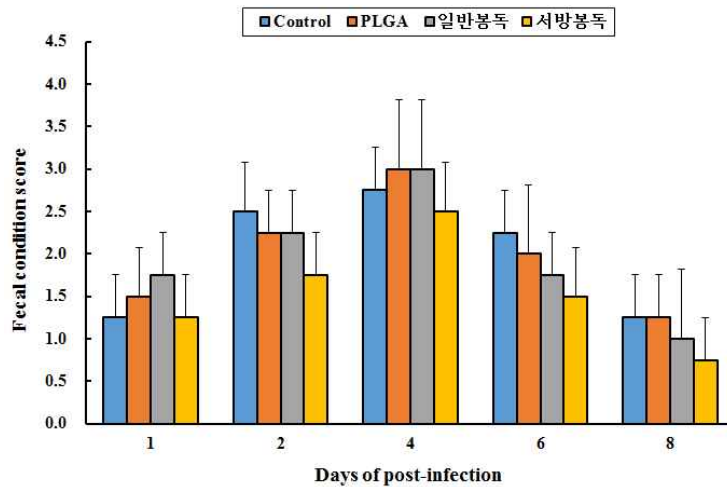


Fig 2.60. *S. Typhimurium* 인공 감염 이후, 돼지 분변의 설사 정도.

(2) 체온의 변화

S. Typhimurium 인공 감염전과 인공 감염 이후 1, 2, 4, 6, 8일차에 돼지의 직장체온을 측정하였다. 모든 군에서 인공 감염 이후 1일째부터 직장 체온이 상승하여 39°C 이상의 체온을 나타내었으며, 2일 째에 40°C 이상으로 최고점을 나타내었다. 하지만 대조군과 봉독 주사군들 간에 직장체온에 있어서는 별다른 차이가 나타나지 않았다.

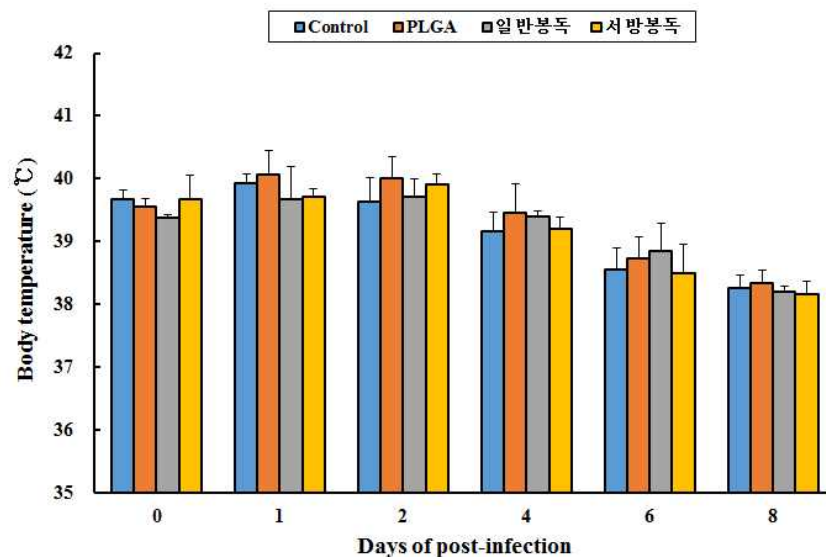


Fig 2.61. *S. Typhimurium* 인공 감염 이후, 돼지의 직장 체온 변화.

바. 체중 변화

S. Typhimurium 인공 감염전과 인공 감염 이후 4, 8일차에 돼지의 체중을 측정한 결과, 체중변화에 있어서는 대조군과 봉독 주사군간의 유의적인 차이를 확인할 수 없었다 (Fig 2.62).

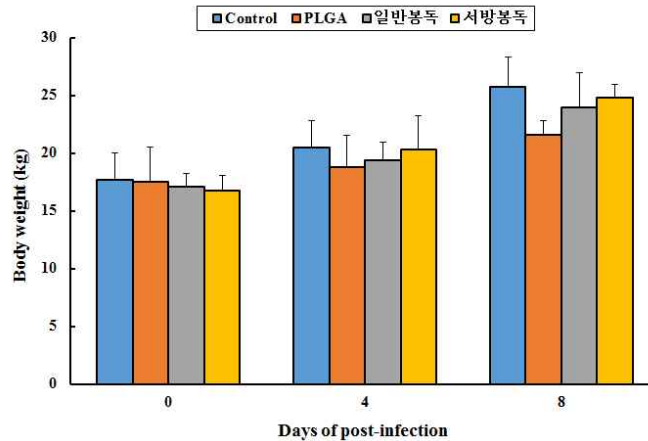
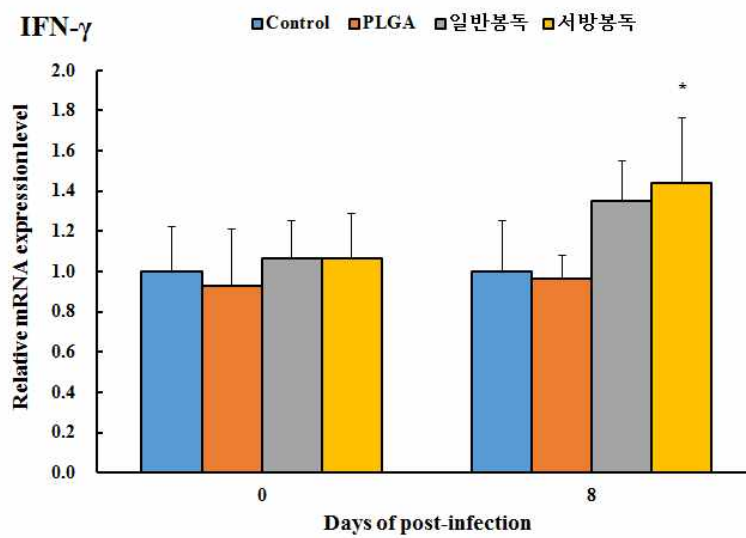
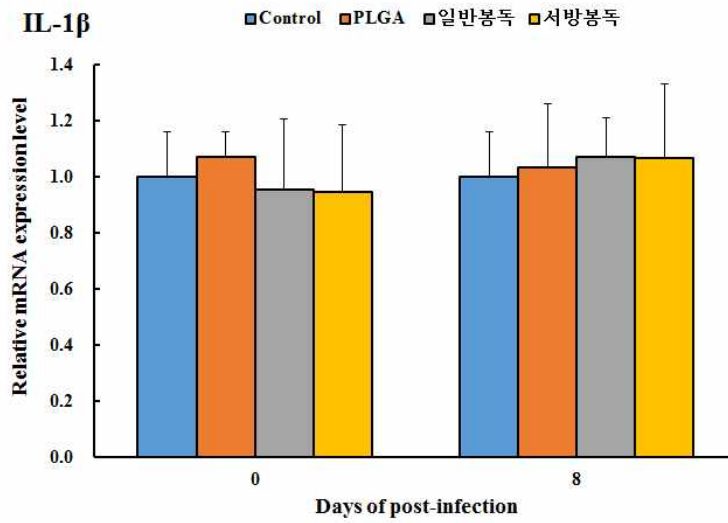
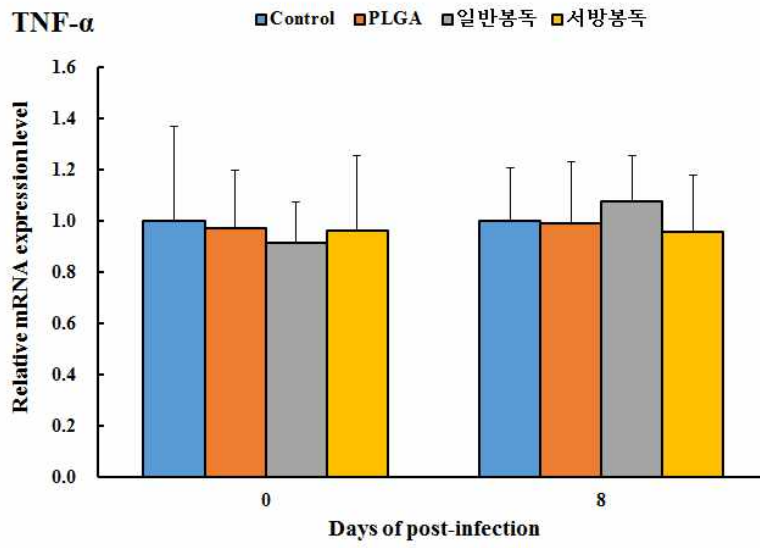


Fig 2.62. 일반 봉독 및 서방봉독 주사에 따른 이유자돈의 체중 변화.

사. 상대적인 사이토카인 발현능 평가

일반봉독 및 서방봉독 주사 전과 봉독 주사 후 7일, 14일, 21일에 각 대조군과 실험군의 모든 이유자돈의 경정맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 말초혈액에서 림프구를 분리한 후 RNA를 추출하고, 추출한 RNA를 다시 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA를 template로 사용하여 Real-time PCR 방법을 통해 IL-4, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β cytokine의 상대적 발현 정도를 측정하였다. Real-time PCR의 수행은 MyiQTM real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하였다.

그 결과, TNF- α 와 IL-1 β level의 경우 공격접종 전과 후에 별다른 차이를 확인할 수 없었다. IFN- γ 와 IL-12 level의 경우 공격접종 전에 비해 공격접종 후 일반봉독과 서방봉독 주사군에서 증가하는 경향을 보였으며, 특히 서방봉독 주사군에서 유의적인 증가가 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 IL-4의 경우 공격접종 후에 일반봉독 및 서방봉독 주사군에서 통계적으로 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



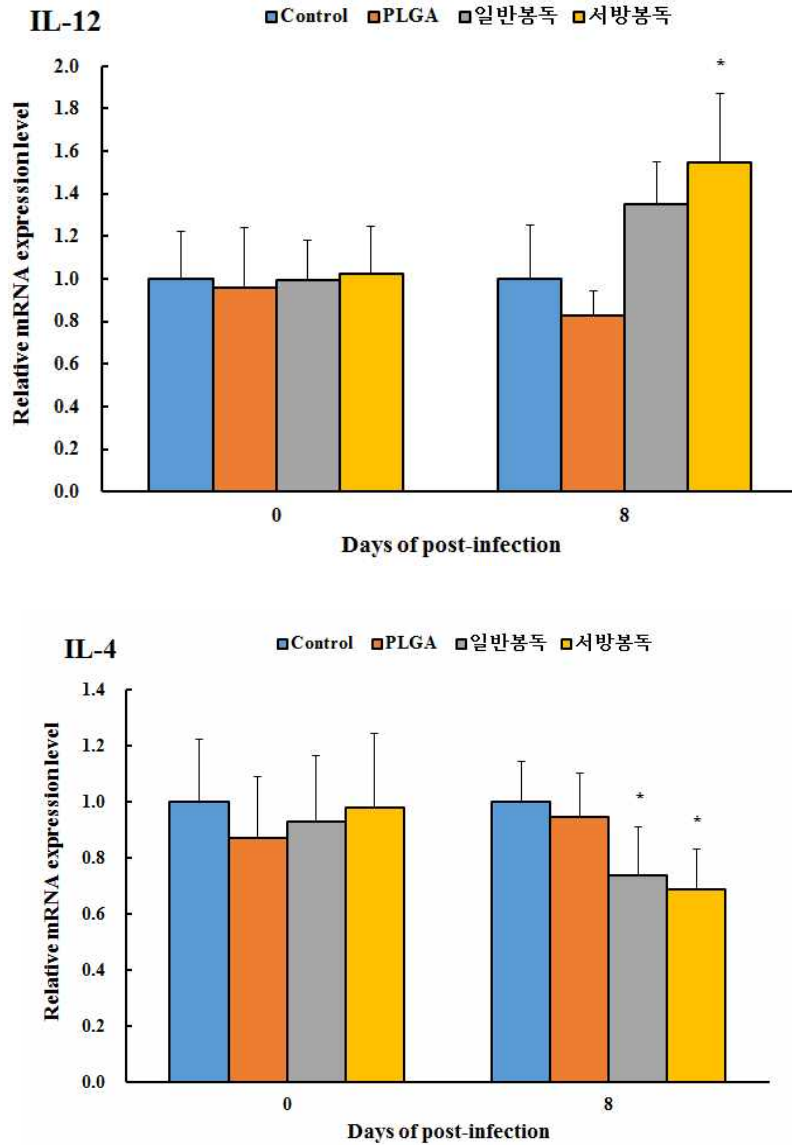


Fig 2.63. 일반 봉독 및 서방봉독 주사에 따른 이유자돈의 상대적 사이토카인 발현능의 변화.

아. 공격 접종 후, 분변으로 분리되는 *S. Typhimurium* 세균수의 변화

공격 접종 이 후, 1, 2, 4, 6, 8일째에 분변을 수거하여 분변에서 분리되는 *S. Typhimurium*의 집락 수를 측정하였으며, 집락수의 측정은 XLD agar를 사용하여 실시하였다. 그 결과, 공격접종 2일 후부터 대조군에 비해 서방봉독 주사군에서 통계적으로 유의성 있게 살모넬라수가 감소함을 확인할 수 있었으며, 이러한 경향은 공격접종 8일후까지 지속되었다. 반면, 일반봉독군의 경우 대조군에 비해 살모넬라수가 감소함을 확인할 수 있었으나 통계적으로 유의성 있게 감소하는 값을 나타내지는 않았다.

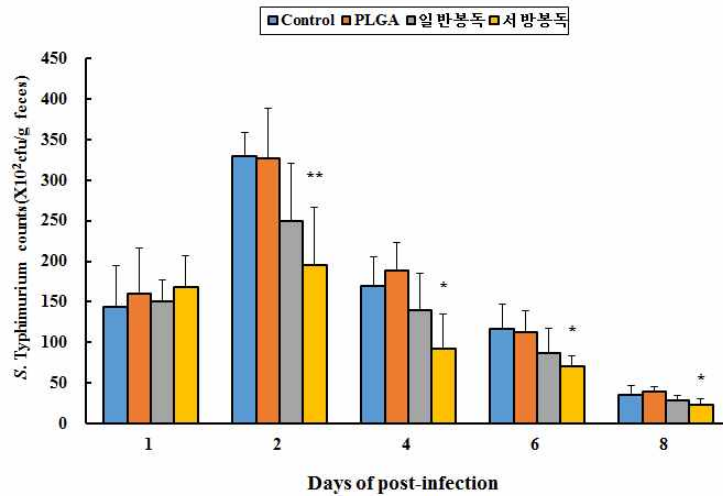


Fig 2.64. *S. Typhimurium* 공격접종 이후, 자돈의 분변으로 분비되는 살모넬라 세균의 수 ($\times 10^5$ cfu/gram feces). 공격접종 2일차부터 서방봉독 주사군의 살모넬라 세균의 수가 유의적으로 감소하였으며 이러한 경향이 8일차까지 유지됨을 확인할 수 있었다.

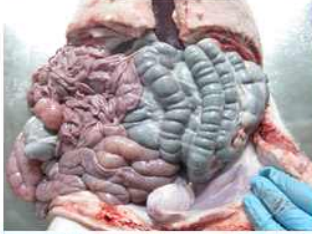
자. 육안적 부검 소견

공격 접종 후 8일째에 모든 돼지를 안락사하여 부검을 실시하였다. 대부분의 감염된 돼지의 회장 맹장 부위에서 충혈과 necrotic foci를 확인할 수 있었으며, 장간막 림프절의 충혈 및 비대 또한 관찰 할 수 있었다. 대조군에 비해 봉독 주사군에서 이러한 병변의 정도가 심하지 않았으며, 특히 서방봉독 주사군에 병변 정도가 감소함을 확인할 수 있었다. 다음 사진들은 군별 대표적인 병변의 모습이다.

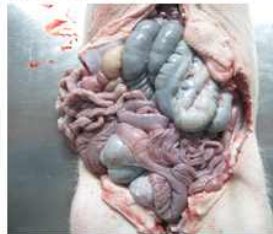
Control군



PLGA군



일반봉독군



서방봉독군

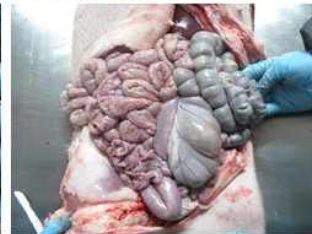


Fig 2.65. 부검 후 각 군 별 대표적인 육안적 병변의 모습

차. 부검후 표적 장기에서 *S. Typhimurium* 세균수의 조사

S. Typhimurium 공격접종 이후 8일째에 부검을 실시하여 살모넬라의 대표적인 표적 장기인 비장, 장간막림프절, 회장, 맹장, 결장에서 *S. Typhimurium*의 수를 측정 하였다. 그 결과, 비장에서는 살모넬라가 검출되지 않았으나 장간막림프절, 회장, 맹장, 결장에서 살모넬라가 검출됨을 확인할 수 있었다. 장간막림프절의 경우 대조군에 비해 일반붕독 및 서방붕독 주사군의 살모넬라수가 감소하는 경향을 나타냈다. 회장, 맹장, 결장에서도 대조군에 비해 일반붕독 및 서방붕독 주사군의 살모넬라수가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 서방붕독 주사군에서 통계적으로 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다.

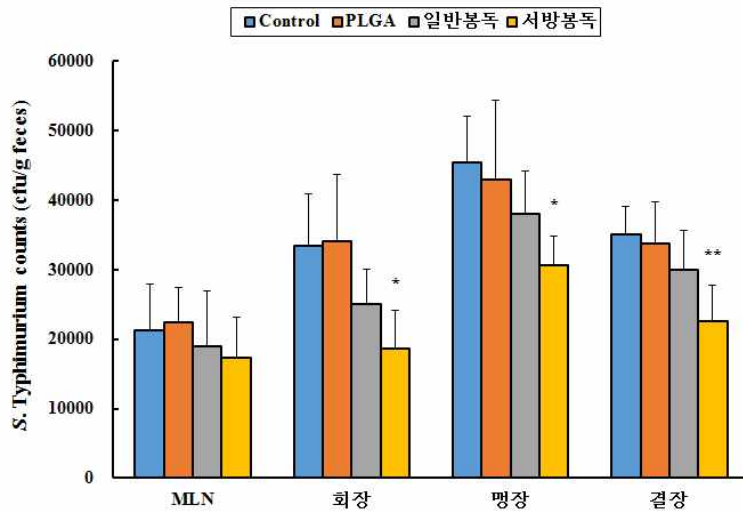


Fig 2.66. *S. Typhimurium* 공격 접종 8일째에 부검을 실시하여 표적 장기에서 *S. Typhimurium* 세균수의 확인을 실시. 회장, 맹장, 결장에서 대조군에 비해 서방붕독 주사군에서 살모넬라 세균수가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

카. 서방형 붕독의 돼지에서 살모넬라에 대한 항병능 평가의 주요 결과 종합

(1) 설사정도의 감소

일반붕독 및 서방붕독 주사군에서 대조군에 비해 설사지수가 감소함을 확인할 수 있었는데, 일반붕독군의 경우 접종 6일차부터 분변의 설사 정도가 감소하는 경향을 보였으나 서방붕독군의 경우 1일차부터 분변의 설사 정도가 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 인공 감염 8일차까지 지속되어 일반붕독 및 서방붕독군의 분변 설사정도가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었다.

(2) IFN-gamma 및 IL-12 level의 증가 확인

IL-12는 주로 대식구에서 분비되는 사이토카인 중 하나로 T helper type 1 cell의 분화를 촉진하여 IFN-gamma의 생성을 증가시키는 사이토카인으로 알려져 있다. 본 실험에서는 공격접종 전에 비해 공격접종 후 일반붕독과 서방붕독 주사군에서 IL-12와

IFN-gamma level 증가하는 경향을 보였으며, 특히 서방봉독 주사군에서 유의적인 증가가 나타남을 확인할 수 있었다. 따라서 일반봉독 또는 서방봉독 주사 후 살모넬라 감염 시 말초혈액 내의 IL-12와 IFN-gamma level이 증가하나, 그 정도가 서방봉독 주사 시 더 강하게 나타나는 것으로 생각된다.

(3) IL-4 level의 감소 확인

살모넬라 공격 접종 후 말초혈액에서 IL-4 level을 확인할 결과, 대조군에 비해 일반봉독 및 서방봉독 주사군의 IL-4 level이 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

(4) 분변으로 분비되는 *S. Typhimurium* 세균수의 감소 확인

공격접종 2일 후부터 대조군에 비해 서방봉독 주사군에서 통계적으로 유의성 있게 살모넬라수가 감소함을 확인할 수 있었으며, 이러한 경향은 공격접종 8일후까지 지속되었다. 반면, 일반봉독군의 경우 대조군에 비해 살모넬라수가 감소함을 확인할 수 있었으나 통계적으로 유의성 있게 감소하는 값을 나타내지는 않았다.

(5) 육안적 병변 정도의 감소 확인

공격 접종 후 8일째에 모든 돼지를 안락사하여 부검을 실시하였다. 대부분의 감염된 돼지의 회장 맹장 부위에서 충혈과 necrotic foci를 확인할 수 있었으며, 장간막 림프절의 충혈 및 비대 또한 관찰 할 수 있었다. 대조군에 비해 봉독 주사군에서 이러한 병변의 정도가 심하지 않았으며, 특히 서방봉독 주사군에 병변 정도가 감소함을 확인할 수 있었다.

(6) 표적 장기에서 *S. Typhimurium* 세균수의 감소 확인

살모넬라의 대표적인 표적 장기인 비장, 장간막림프절, 회장, 맹장, 결장에서 *S. Typhimurium*의 수를 측정하였으며, 이 중에서 비장을 제외한 장간막림프절, 회장, 맹장, 결장에서 살모넬라가 검출됨을 확인할 수 있었다. 장간막림프절의 경우 대조군에 비해 일반봉독 및 서방봉독 주사군의 살모넬라수가 감소하는 경향을 나타냈다. 회장, 맹장, 결장에서도 대조군에 비해 일반봉독 및 서방봉독 주사군의 살모넬라수가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 서방봉독 주사군에서 통계적으로 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다.

(7) 최종 결론

일반봉독 및 서방봉독을 이유자돈에 주사한 후에 살모넬라를 공격 접종 하였을 때, 서방봉독 주사군에서 대조군에 비해 항병능과 관련된 여러 가지 지표들이 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 설사정도의 감소 및 IFN-gamma level의 증가, IL-12 level의 증가, IL-4 level의 감소, 분변 및 표적 장기에서의 살모넬라수 감소에 유의적인 효과가 있는 것으로 생각된다. 일반봉독 주사군에서도 설사정도의 감소, IFN-gamma level의 증가, IL-12 level의 증가에 효과가 있었으나 서방봉독 주사군에 비해 그 정도가 낮았고, 본 실험에서 확인한 여러 가지 항병능과 관련된 지표 중 일부만이 활성화됨을 확인할 수 있었다.

따라서 일반봉독 또는 서방봉독 주사 시 두 제제 모두 항병능효과를 나타내나, 서방형 봉독을 접종 하는 것이 일반봉독을 접종하는 것보다 더 다양한 항병능 지표를 활성화 시켜 더 강한 항병효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

제 3 절 생봉독 성분의 안정화 및 유효성분들의 규격화

(제 1 협동과제 : ㈜ 프로데미텍 김유삼)

1. 봉독유효성분의 물리화학적 성질 규명

가. 연구의 목적

생봉독과 건조봉독 단백질에 대한 물리화학적 성질을 규명하여, 건조봉독의 제조과정에서 발생하는 봉독유효성분의 불활성화 또는 소실을 최소화하기 위한 방법을 개발하도록 과학적 근거를 제공함.

나. 생봉독과 건조봉독의 비교

봉독의 제조과정은 벌통입구에 전기적 충격을 가할 수 있는 채취기를 설치하면 벌들이 전기적 자극에 의해 봉독을 배출함. 일정 시간이 경과한 후 유리표면에 건조된 봉독을 긁어냄으로써 봉독을 수집할 수 있으며 (Fig 3.1), 이를 원심분리, 여과, 동결건조의 단계를 거치는 비교적 단순한 정제과정을 거쳐 건조봉독 제품을 제조하고 있는 실정임.



Fig 3.1. 봉독채취기 및 봉독 채취과정

기 발표된 논문과 특허정보를 수집하여 생봉독의 유용물질을 연구한 선행연구들을 조사한 결과, 생봉독의 유용물질에 대해 연구된 결과는 현재까지 밝혀진 바 없음. 그러나, 양봉 및 양봉침 전문가 면담 결과 건조봉독 대비 생봉독의 임상적 비교결과는 건조봉독에 비해 전반적으로 오랜 활용의 역사와 임상경험들이 축적되어 있는 생봉독이 현저히 더 우수한 것으로 알려져 있음. 실제적으로 SDS-PAGE 결과 건조봉독 대비 생봉독 시료에만 존재하는 특이적인 단백질들을 확인할 수 있었음 (Fig 3.2). 즉, 생봉독으로부터 건조봉독의 제조과정에서 단백질의 가수분해가 촉진되므로 제조된 건조봉독에는 생봉독의 일부 단백질들이 파편화 또는 불활성화가 이루어짐을 확인할 수 있었음. 봉독의 주성분인 melittin, phospholipase A2, hyaluronidase의 함량은 SDS-PAGE상에서는 큰 차이 없이 동등한 것으로 판단되었음.

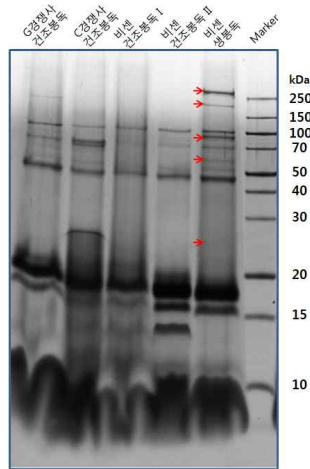


Fig 3.2. 생분독과 건조분독의 SDS-PAGE

다. SDS-PAGE을 통한 봉독단백질의 확인

생분독과 건조분독에 존재하는 단백질의 차이를 확인하기 위한 최적의 조건을 확립하기 위해 다양한 형태의 SDS-PAGE를 수행하였음.

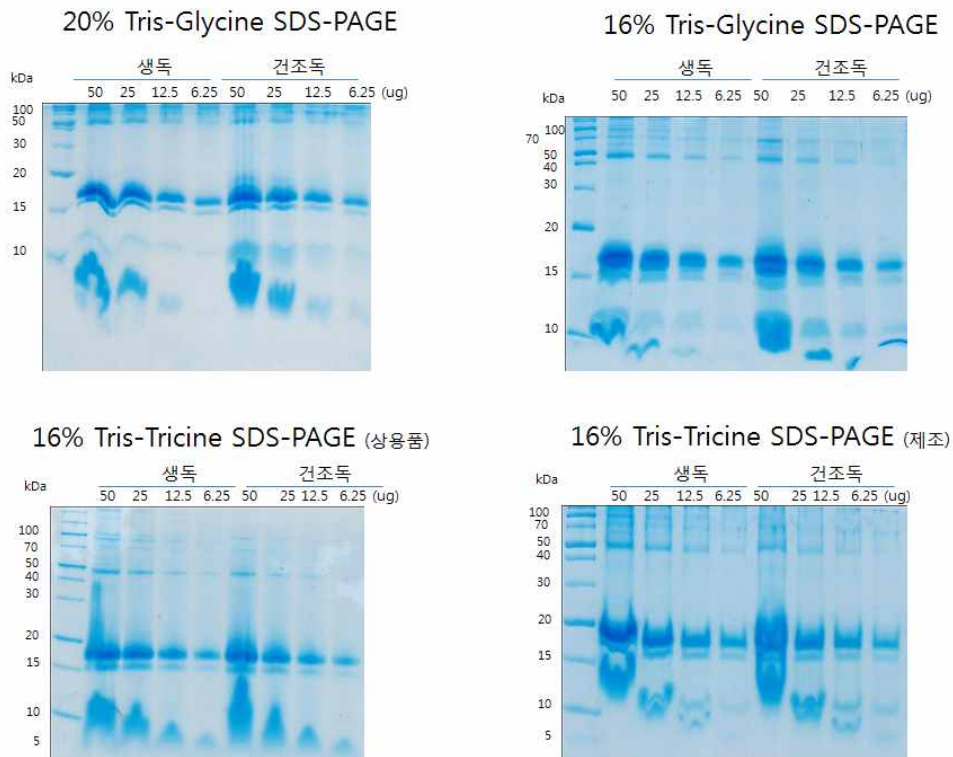


Fig 3.3. acrylamide의 농도, 완충용액의 구성에 따른 봉독단백질의 SDS-PAGE

melittin은 3 내지 7kD의 폴리펩티드로서 SDS-PAGE로 확인하기 어려움. acrylamide 농도를 16%, 20%로 증가시켜 실험한 결과 봉독의 주요 단백질은 15내지 16%농도가 적당하다고 판단되었음 (Fig 3.3). 또한 gel buffer로서 많이 사용되는 Tris-glycine

buffer와 small peptide에 대한 높은 해상도를 보이는 Tris-tricine buffer를 비교한 결과, melittin의 분석에는 Tris-tricine system이 적합하다고 판단되었음.

여러 가지 전기영동 방법 중 가장 많이 사용되는 SDS-PAGE는 단백질에 SDS를 결합시킨 후 시료를 음극에서 양극으로 전개시키고 있음. basic한 단백질의 분석하기 위해 반대방향 (양극에서 음극으로 전개)으로 전기영동하는 방법인 acetic acid-urea PAGE를 시도하였으나 붕독단백질의 분석으로 활용하기에는 해상도가 낮은 한계를 보였음 (Fig 3.4).

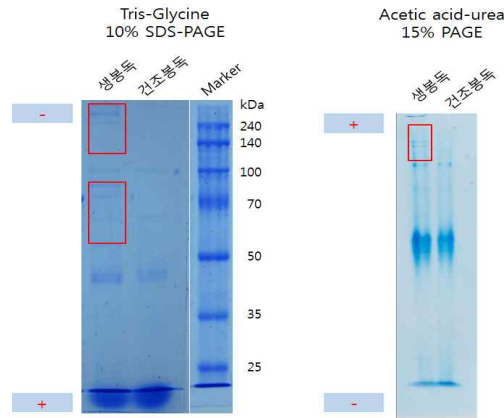


Fig 3.4. SDS-PAGE와 acetic acid-urea PAGE

라. 이차원 전기영동법의 확립

동일 양의 건조봉독과 생봉독을 2차원 전기영동법을 통해 분리하여 생봉독 또는 건조봉독에 특이적으로 존재하는 단백질을 확인하였음 (Fig 3.5).

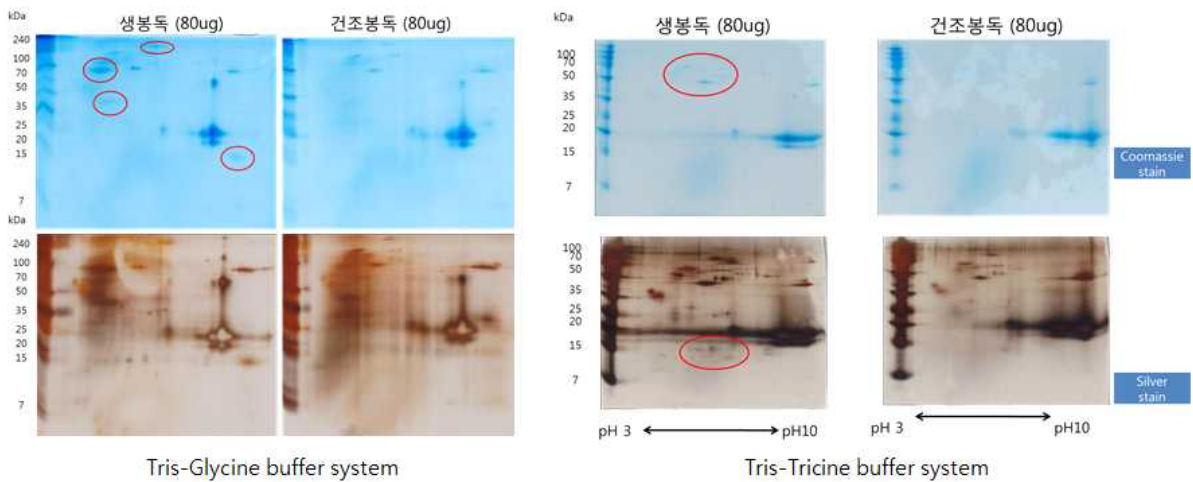


Fig 3.5. 2차원 전기영동

SDS-PAGE와 마찬가지로 Tris-glycine buffer와 Tris-tricine buffer system을 비교하였고, Tris-glycine buffer system을 선택하기로 결정하였음. 2차원 전기영동의 해상도를 증가시키기 위해 isoelectric focusing시 gel의 rehydration 방법을 비교하였음

(Fig 3.6.). cup loading을 할 경우 loading한 위치에 따라 이미지의 변화가 발생하였기 때문에 in-gel loading방식을 사용하기로 결정하였음. 또한 50kD 이상의 acidic protein들이 끌리는 현상을 개선하기 위해 protein 침전법을 사용하였으나, 일부 단백질이 회수되지 않아 전체 봉독 단백질의 확인에는 부적합하다고 판단되었음.

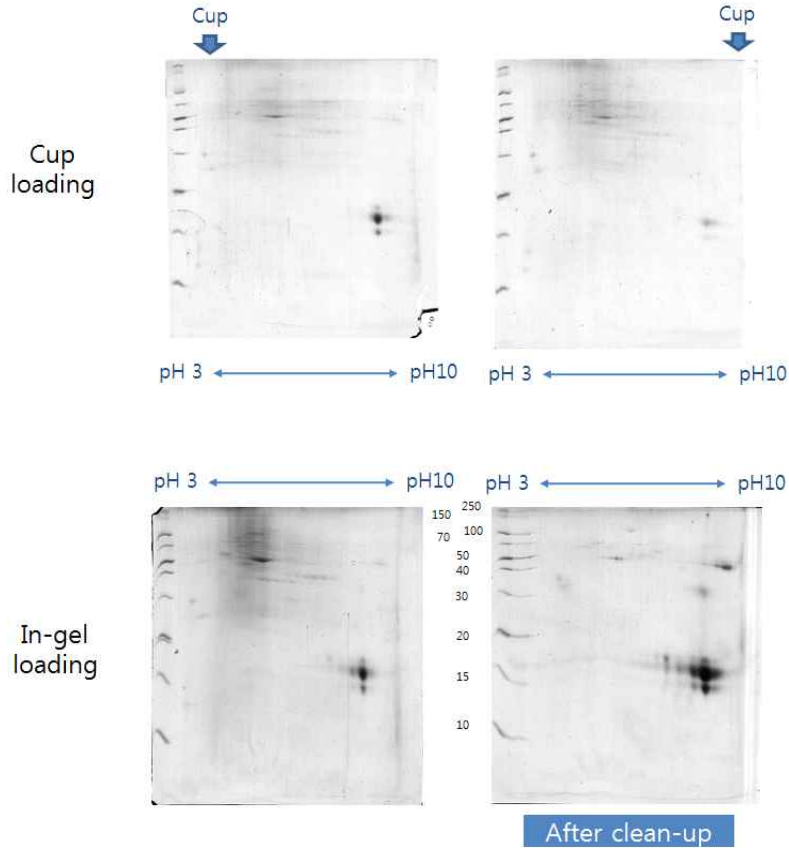


Fig 3.6. 시료의 loading방법에 따른 이차원 전기영동 결과

이상의 실험은 7cm크기의 gel을 사용한 결과인데, 18cm크기의 gel을 사용할 경우, 보다 좋은 이미지를 얻을 수 있었음 (Fig 3.7). 2차원 전기영동의 실험결과를 종합하여, in-gel loading 방식으로 시료를 loading하고, Tris-glycine buffer를 사용하여 SDS-PAGE하고 Coomassie염색으로 확인하는 2차원 전기영동 분석법을 확립하였음.

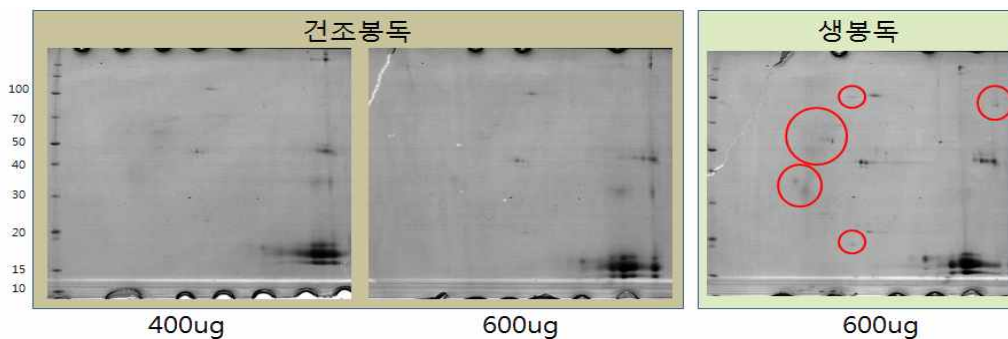


Fig 3.7. large gel을 이용한 이차원 전기영동 결과

마. peptide mass fingerprint를 이용한 봉독 단백질의 동정

1차원 또는 2차원 전기영동법으로 분리한 봉독단백질에 단백질 가수분해효소인 트립신을 처리하고, 잘려진 펩티드 절편을 질량분석법으로 분석하여 단백질을 동정하였음 (Fig 3.8).

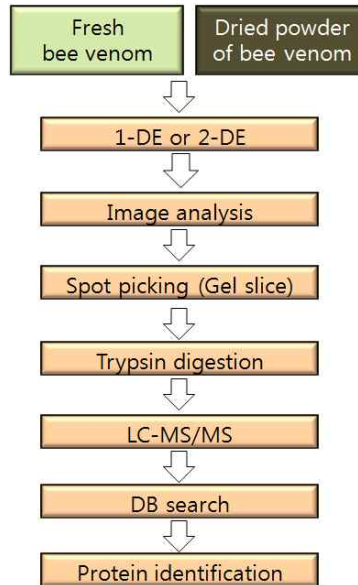
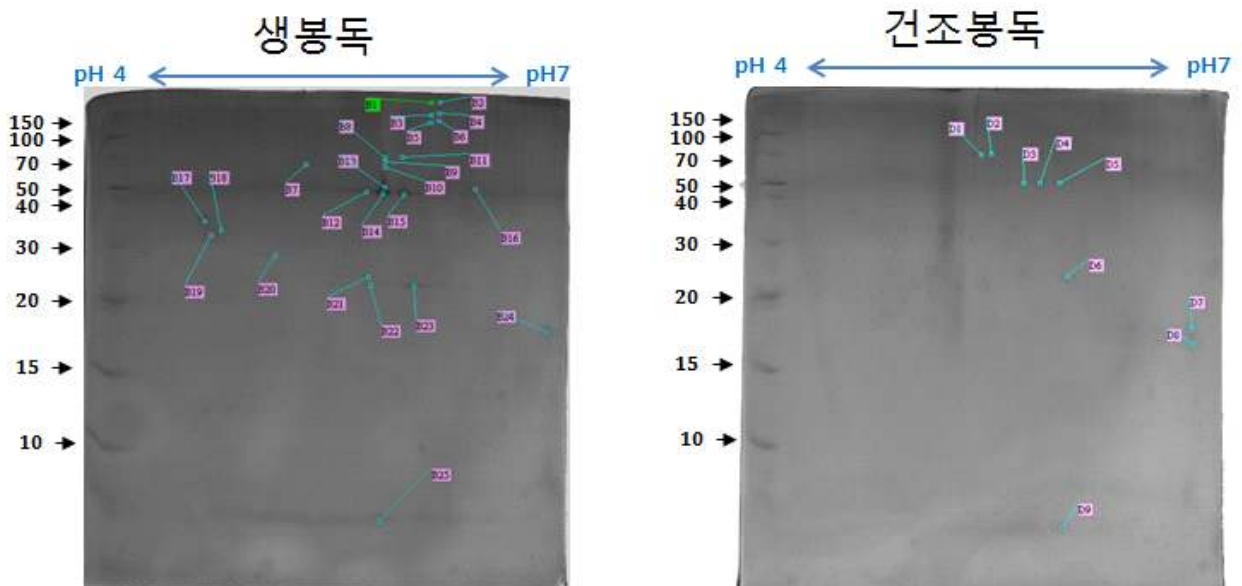


Fig 3.8. 프로테오믹스 기법을 활용한 건조봉독과 생봉독의 분석과정

(1) 2차원 전기영동과 LC-MS/MS분석



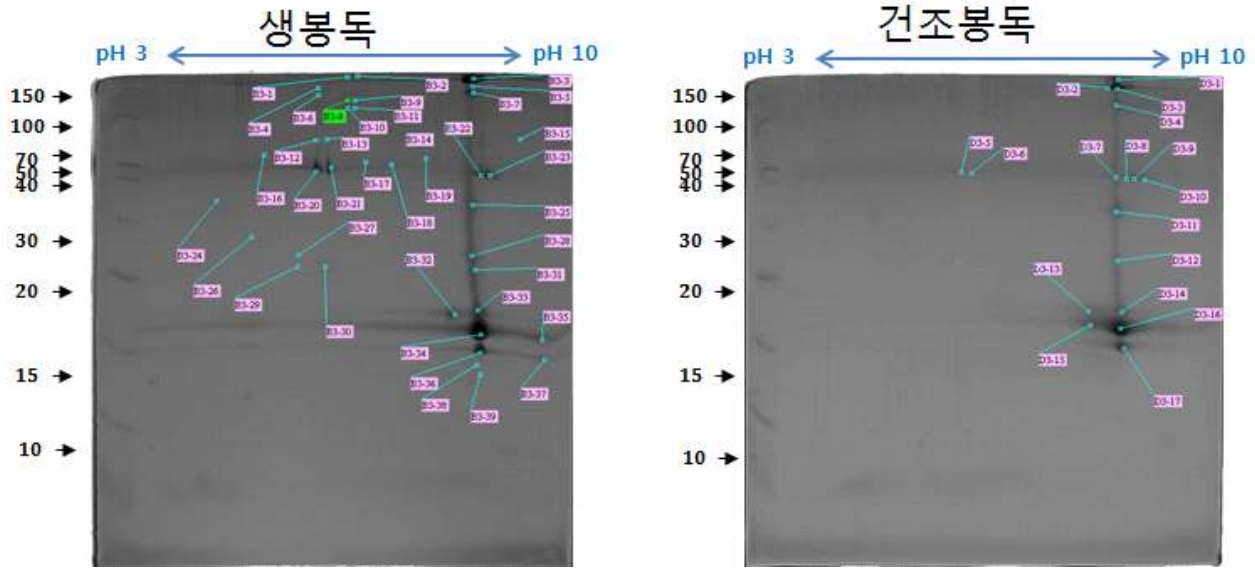


Fig 3.9. 건조봉독과 생봉독의 이차원 전기영동

생봉독과 건조봉독을 2차원전기영동법으로 분리하고 주요 단백질을 질량분석법으로 분석하였음. 각각 pH4-7와 pH3-10의 구간에서 isoelectric focusing을 수행한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과는 Fig 3.9과 같음. 이 중 주요 단백질 스팟 94개를 내려내어 트립신으로 단백질을 가수분해하여 폴리펩티드 조각들을 제조하고 ESI-LC-MS/MS로 분석하여 단백질동정을 수행하였음.

상기 트립신에 의해 가수분해된 펩티드 절편들은 nano-HPLC로 분리하고, 질량분석법으로 분석함 (Fig 3.10). 스팟 B3-23에 대한 실험결과는 다음과 같음.

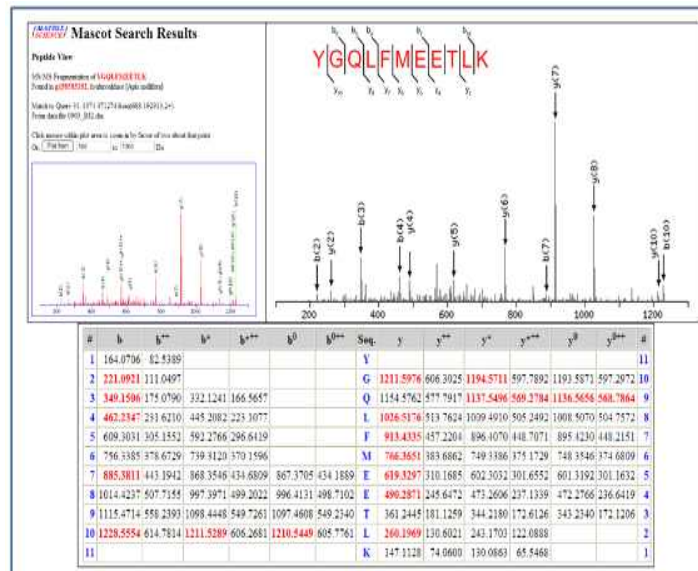


Fig 3.10. Representative LC-MS/MS spectrum data (spot number B3-23)

질량분석 데이터를 NCBInr 데이터베이스로 검색하여 단백질을 규명하였음(Fig 3.11).



Fig. 3.11. Representative data of NCBI database search

상기와 같은 실험을 각각의 스팟들에 대해 수행하여 규명된 봉독 단백질들은 다음과 같음 (Table 3.1). 봉독의 주성분으로 알려진 멜리틴은 2차원 전기영동법으로 확인할 수 없었는데, mature melittin의 pI가 11.34이기 때문에 isoelectric focusing과정에서 양전극으로 이동하여 겔에서 소실되기 때문으로 사료됨. 다른 주요 단백질인 phospholipase A2, hyaluronidase 및 venom allergen acid phosphatase는 생봉독 뿐만 아니라 건조봉독에서도 확인되었음. 총 94개의 스팟중 동정된 단백질은 모두 85개였으며, 이들 중 생봉독에서만 확인된 단백질은 glucosylceramidase 1, icarapin-like protein, vitellogenin-3, WD-repeat protein, royal jelly protein 1, 8 & 9, serine carboxylpeptidase, venom dipeptidyl peptidase 4, carboxylesterase -6 이었음. 특히 serine carboxylpeptidase, venom dipeptidyl peptidase 4, carboxylesterase-6는 가수분해 활성을 갖는 단백질로서 봉독의 채취과정에서 단백질의 가수분해가 일어난다는 가설을 뒷받침하고 있음.

Table 3.1. 2차원 전기영동법으로 분리한 봉독의 단백질 성분 요약. (a) pH 4-7의 2차원전기영동 (b) pH3-10의 2차원전기영동

(a)

시료	spot	Name	score	%	MW	pI
생봉독	1	Venom dipeptidyl peptidase 4	192	23	87.8	5.72
	2		367	39		
	3		206	19		

	4		226	27		
	5		253	20		
	6		234	15		
	7	Glucosylceramidase 1	85	8	59.2	5.34
	8		312	32		
	9		284	25		
	10		175	21		
	11		199	23		
	12	Venom allergen acid phosphatase	273	33	43.8	5.63
	13		678	52		
	14		589	54		
	15		483	44		
	16		98	10		
	17		134	21		
	18	Icarapin-like protein	76	11	24.7	4.51
	19		98	26		
	20	Vitellogenin-3	38	2	200.9	8.44
	21	WD-repeat protein	55	7	96.9	8.15
	22	Venom allergen acid phosphatase	83	10	43.8	5.63
	23	Eps8	50	1	107.2	9.06
	24	Phospholipase A2	121	24	18.4	7.18
	25	TRIADDRAFT	52	5	34.7	9.75
건조봉독	1	ATP synthase	87	14	50.9	5.18
	2	-				
	3		280	24	43.8	5.63
	4	Venom allergen acid phosphatase	299	33	43.8	5.63
	5		305	18	43.8	5.63
	6	-				
	7		73	22		
	8	Phospholipase A2	119	20	18.4	7.18
	9	-				

(b)

시료	spot	Name	score	%	MW	pI
생봉독	1	Venom dipeptidyl peptidase 4	136	18	87.8	5.72
	2		271	28		
	3	phospholipase A2	230	44	18.4	7.18
	4	Venom allergen acid phosphatase	104	11	43.8	5.63
	5	phospholipase A2	198	27	18.4	7.18
	6	Venom allergen acid phosphatase	68	7	43.8	5.63
	7	phospholipase A2	127	57	18.4	7.18
	8	Venom dipeptidyl peptidase 4	78	13	87.8	5.72
	9		183	27		
	10		131	21		
	11		184	26		
	12	Venom allergen acid phosphatase	128	27	43.8	5.63
	13		171	19		
	14	-				
	15	-				
	16	royal jelly protein 1	219	27	48.8	5.1
	17	royal jelly protein 8	81	10	46.9	6
	18		103	15	46.9	6.54
	19	serine carboxylpeptidase	62	9	53.6	6.65
	20	Venom allergen acid phosphatase	502	45	43.8	5.63

21		252	41			
22	hyaluronidase	2127	51	40.8	8.67	
23		105	36			
24	icarapin-like protein	101	31	24.8	4.51	
25	phospholipase A2	209	27	18.4	7.18	
26	–					
27	–					
28	phospholipase A2	81	18	18.4	7.18	
29	–					
30	–					
31	phospholipase A2	168	32	18.4	7.18	
32		123	27			
33		183	27			
34		380	27			
35		137	27			
36		163	27			
37		109	18			
38		83	13			
39		70	13			
40	carboxylesterase-6	79	7	63.5	9.33	
41		74	7			
42	royal jelly protein 9	248	41	48.6	8.7	
43		133	44			
	spot	Name	score	%	MW	pI
건조봉독	1	phospholipase A2	243	37	18.4	7.18
	2		168	32		
	3		184	38		
	4		147	27		
	5	Venom allergen acid phosphatase	112	19	43.8	5.63
	6		152	29		
	7	Hyaluronidase +phospholipase A2	236	52	40.8 18.4	8.67 7.18
	8		211	50		
	9		191	37		
	10	phospholipase A2	162	38	18.4	7.18
	11		219	44		
	12		105	40		
	13		212	50		
	15		231	34		
16	268		40			
17	139	35				

(2) SDS-PAGE와 LC-MS/MS분석

건조봉독과 생봉독을 SDS-PAGE를 통해 분리하여 생봉독 또는 건조봉독에 특이적으로 존재하는 단백질을 중심으로 확인하였음 (Fig 3.12).

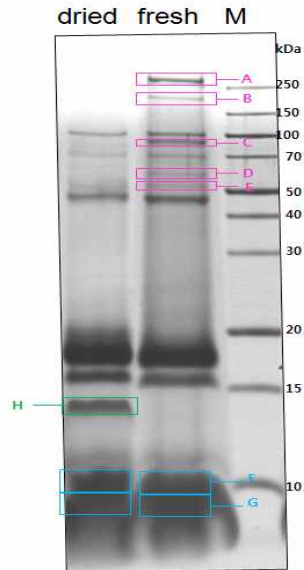


Fig 3.12. 생봉독과 건조봉독의 SDS-PAGE

건조봉독에 비해 생봉독에만 존재하는 분자량 50kD이상의 단백질들이 확인되었음. 이 특이적인 밴드들을 잘라내어 트립신으로 가수분해하고 LC-MS/MS로 분석하고 데이터베이스 검색을 통해 단백질을 동정하였음 (Table 3.2).

Table 3.2. SDS-PAGE gels에서 분리된 봉독의 단백질 성분 요약

Spot No.	Acc. No.	protein name	MW (Da)	PI	Score	Mr/cals	Sequence
A	gi 110758752	PREDICTED: similar to Retinoid- and fatty-acid binding protein CG11054-FA isoform 1	574526	8.34	32	2694.848	R.SLSVYNGINVQQLDMVAITTFQGNQQLK.F 03 2448192 R.LLSLLDNTFQVUNIFCANDTNR.F 107 1861266 K.IYSSLVAAVQSVVALAQK.Q 95 25091119 K.DVCADFAVFSGGAAFSSNIFLDAK.S
B	gi 58585104	vitellogenin	200920	5.29	77	2694.3751	K.ELDFQIANELEDASQNFVHATLEK.F 3773752 K.FMVMNMLDTVESVHSFPTETGLRFVYFNMKL
C	gi 110743690	PREDICTED: similar to Protein on eddyson-puffs CG6145-PB isoform B	87212	5.21	15	4355763	R.GGGGGGRVGNMGGGGGGGGMGN MGGGMGGGGGGGGGGGGGGGGMNPVGGMVPGRG 15 41385978 R.VGNMSSGGGGGGGMGNMGGGMGGGGGGGG GGGGGGGMNPVEGGMMPGRG
D	gi 110753363	PREDICTED: similar to tatan CG11380-PA	70825	5.7	26	4081.9818	R.SSYGMASRGPSATTFVGIAMAVAMSVRRQASQLPTQCR.C
E	gi 110773831	PREDICTED: similar to Imaginal disc growth factor 4 CG1783-PA isoform A, partial	41963	5.52	66	1813.8802	K.IYLGIGGNADFDQETHKY 51 30915965 K.IYLGIGGNADFDQETHKYVLETETSGRS 70 19411396 R.LLAPNDAMHLFTFDQK.T 39 40009001 K.LTSESQISGVPRVTDGPGAGSPHINTFGLSYAEVCSRL 94 17098824 K.GLGGVATYDLSLDFR.G
F	gi 58585154	melittin	7583	4.80	69	1510.623	K.VTTGLPALTEWKR.R
G	gi 58585154	melittin	7583	4.80	76	1510.623	K.VTTGLPALTEWKR.R

• blue common bands in both preparation

(3) Isoelectric focusing (IEF)과 LC-MS/MS분석

건조봉독과 생봉독을 isoelectric focusing을 통해 단백질 성분을 분리하고, 주요

단백질들을 질량분석법으로 동정하였음 (Fig 3.13).

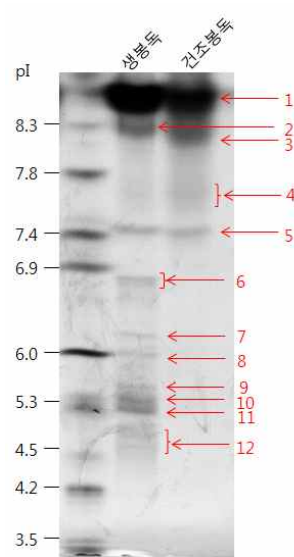


Fig. 3.13. 생봉독과 건조봉독의 isoelectric focusing

주요 단백질인 밴드 1-9번을 잘라내어 트립신으로 가수분해하고 LC-MS/MS로 분석하고 데이터베이스 검색을 통해 단백질을 동정하였음 (Table 3.3).

Table 3.3. IEF gel에서 분리된 봉독의 단백질 성분 요약

Band	Protein name	pI	MW (Da)	Score	coverage (%)
1	Not identified				
2	Not identified				
3	phospholipase A-2	7.18	18475	99	35
	major royal jelly protein 9 precursor	8.70	48658	94	18
4	phospholipase A-2	7.18	18475	71	10
5	Not identified				
6	transferrin 1 precursor	6.77	78607	281	15
	hexamerin	6.43	81435	152	16
7	major royal jelly protein 8 precursor	6.00	46927	199	23
	toll-like receptor 13-like isoform 1	6.09	75658	142	9
8	major royal jelly protein 8 precursor	6.00	46927	238	21
	venom allergen acid phosphatase	5.63	43877	163	15
	venom serine protease 34	5.89	44610	67	5
	PREDICTED: esterase E4-like	6.11	65208	57	2
9	venom allergen acid phosphatase	5.63	43877	142	25
10	venom allergen acid phosphatase	5.63	43877	323	35
	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	5.72	87882	181	17
11	venom dipeptidyl peptidase 4 precursor	5.72	87882	171	15
	venom allergen acid phosphatase	5.63	43877	128	16
12	venom allergen acid phosphatase	5.63	43877	96	21

생봉독과 건조봉독에 모두 존재하는 단백질중 band 3은 phospholipase A2로 확인되었으며, 건조봉독의 경우 이 효소가 잘려진 형태 (band 4)도 확인되었음. 나머지 band 5-band 12는 생봉독에만 존재하는 단백질들로 transferrin 1, major royal jelly protein 8, predicted toll-like receptor 13-like isoform 1, venom allergen acid phosphatase, predicted venom serine protease 34, venom dipeptidyl peptidase 4로 동정되었음. 이들 중 venom serine protease 34, venom dipeptidyl peptidase 4은 단백질 가수분해 활성을 갖는 protease들이므로, 이 효소들의 작용에 의해 봉독단백질의 가수분해가 촉진될 수 있음을 시사하고 있음.

질량분석법으로 동정한 단백질들 중 일부는 predicted protein이었는데, 이는 벌독에 대한 연구 결과가 아직 미진한 실정이라 단백질 서열이 보고되어 database로 구축된 서열정보가

부족한 것에 기인함. 주요 봉독 단백질에 대한 modification 여부를 확인한 결과 asparagine 잔기의 deamidation이나 methionine의 oxidation이 일부 확인되었으나, 이는 자연 상태에서 일어난 변형이 아니라 proteome 분석 시 발생하는 전형적인 형태의 변형으로 판단되었음. 질량분석법을 활용하여 제조과정에서 소실 또는 불활성화되는 봉독 단백질에 대한 생물학적 기능을 규명하는 것은 현재로서는 제한적이며, 앞으로 봉독 관련 연구가 지속적으로 추진되어야 할 것으로 사료됨. 생봉독에만 존재하는 단백질 중 동정된 venom serine protease 34와 venom dipeptidyl peptidase 4는 단백질 가수분해 활성을 갖는 효소로서, 이 효소들에 의한 봉독의 가수분해가 일어날 수 있음을 시사하고 있음.

바. 결론

SDS-PAGE, 2차원 전기영동, isoelectric focusing 분석법을 수행하여 건조봉독과 생봉독의 protein profile을 비교하였음. 주요 봉독 단백질로 알려진 hyaluronidase, phospholipase A2 및 melittin의 함량 변화를 전기영동법으로 분석할 경우, 유의한 차이를 보이지 않았음. 상기 3종류의 서로 다른 전기영동법을 이용하여 봉독 단백질을 분리하고 주요 단백질 114종을 질량분석법으로 분석하여 102개의 단백질을 동정하였음. 생봉독에만 존재하는 단백질 중 동정된 serine carboxypeptidase, venom dipeptidyl peptidase 4, carboxylesterase-6, venom serine protease 34는 단백질 가수분해 활성을 갖는 효소로서, 이 효소들에 의한 봉독의 가수분해가 발생함을 시사하고 있음. 이들 가수분해 효소 중 venom dipeptidyl peptidase 4와 venom serine protease 34는 최적 활성 pH가 각각 8.0 (YM Choo et al.)과 9.0 (S-K Hsieh et al.)으로 보고되었음. 따라서 용액의 pH를 완충용액을 사용하여 약산성으로 유지시킨다면 이들 가수분해 효소의 활성을 억제할 수 있음.

2. 지표성분의 보존 방법 개발

가. 연구의 목적

상기 '1. 봉독유효성분의 물리화학적 성질 규명'의 연구를 통해 생봉독과 건조봉독의 단백질 성분이 변화함을 확인하였으며, 이는 봉독의 제조과정에서 봉독유효성분의 불활성화 또는 소실이 발생할 수 있음을 시사함. 봉독 단백질의 안정성을 높여 보존할 수 있는 방법을 연구하였음.

나. 나노구조체에 의한 단백질 가수분해효소의 작용 억제

단백질 가수분해효소의 작용을 억제하여 봉독의 유효성분을 보존하는 방법을 연구하고자 다음과 같은 단백질 가수분해모델을 설정하였음. 알부민을 단백질 가수분해효소인 트립신과 37°C에서 반응시켜 단백질 가수분해를 유도함. 개발 중인 나노구조체를 트립신 반응액에 첨가하여 가수분해의 저해효과를 SDS-PAGE를 통해 확인함 (Fig 3.14).

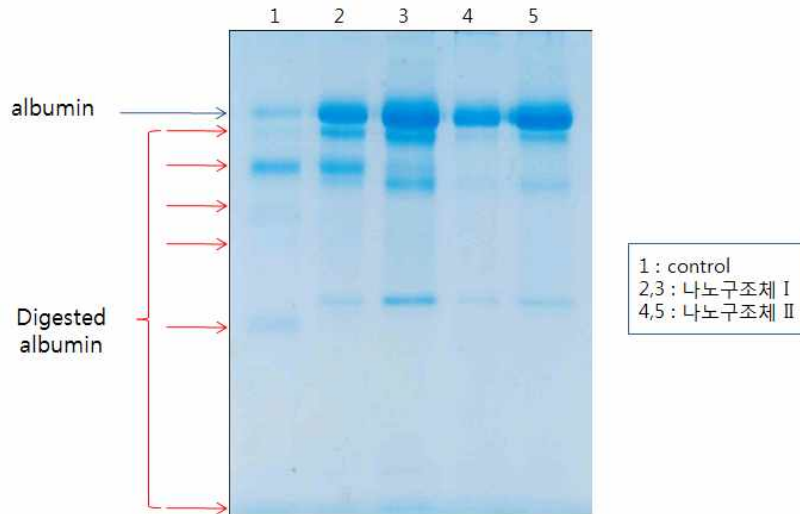


Fig 3.14. 나노구조체에 의한 트립신 활성의 억제

알부민은 트립신에 의해 가수분해 되어 폴리펩티드 절편으로 분해되었으나, 첨가된 나노구조체는 트립신의 가수분해를 억제하였음. 나노구조체I보다는 나노구조체II의 가수분해 억제능력이 높았음. 그러나 생봉독의 가수분해에 미치는 영향은 미미하였음 (Fig 3.15).

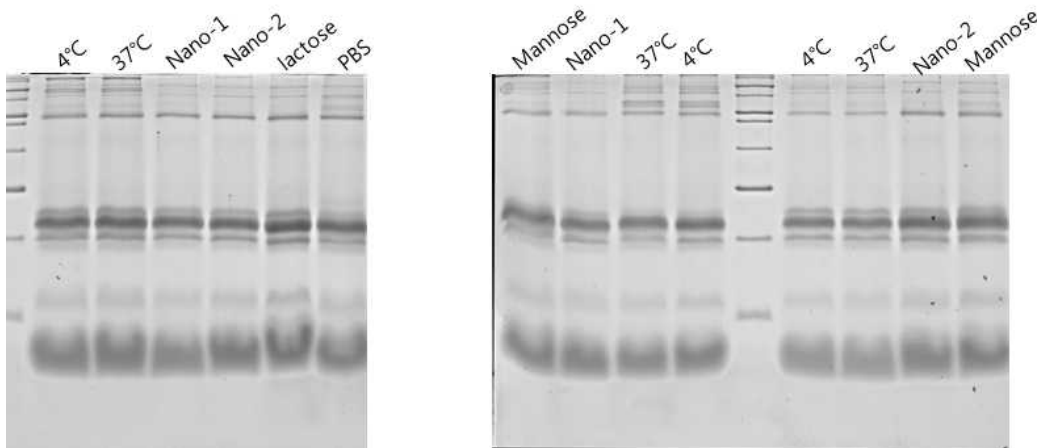


Fig 3.15. 봉독의 가수분해에 영향을 미치는 요인들

즉, 생봉독에 나노구조체를 첨가하고 37°C에서 배양하여 생봉독의 가수분해를 유도한 후, SDS-PAGE를 통해 가수분해여부를 확인하였으나 나노구조체로 인한 생봉독의 보존효과는 대조군 대비 차이가 없었음. 한편 용액내의 물을 흡습할 수 있도록 lactose나 mannose를 첨가하여 가수분해에 미치는 영향을 관찰하였으나, 유의한 변화가 나타나지 않았음.

다. 생봉독의 안정성에 대한 pH의 영향

생봉독을 각기 다른 pH에서 배양하고 SDS-PAGE를 통해 건조봉독의 안정성을 확인하였음 (Fig. 3.16). SDS-PAGE를 통해 분리된 봉독 단백질 중 밴드 A, B, C의 함량을 densitometer로 분석하여 pH에 따른 단백질 함량의 변화를 확인한 결과, 배양액의

pH가 높아질수록 가수분해로 인한 단백질의 소실이 발생함을 확인하였음. 이는 봉독의 채취과정에서 pH를 약산성으로 유지할 경우 봉독 단백질 성분의 안정성을 증가시킬 수 있음을 시사함.

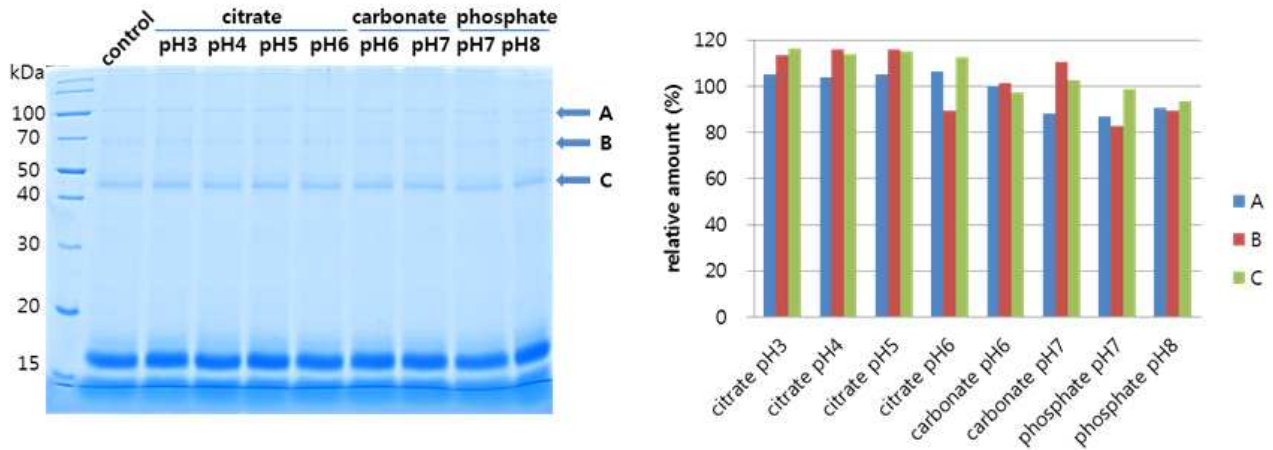


Fig 3.16.배양액의 pH 변화에 따른 생봉독 단백질의 프로파일

라. HPLC분석법에 따른 지표성분의 분석

(1) Reverse phase-HPLC (RP-HPLC)

건조봉독과 생봉독을 RP-HPLC로 분석하였음. 사용한 컬럼은 LiChrosorb RP-18이었으며, 5-60% acetonitrile gradient를 통해 봉독단백질을 분리하고 214nm와 280nm에서의 흡광도를 측정하여 용출되는 폴리펩티드들을 검출하였음 (Fig 3.17). 봉독단백질의 주성분으로 알려진 hyaluronidase (10분대 용출), phospholipase A2 (15분대 용출) 및 melittin (19분대 용출)의 함량은 변화되지 않았음. 생봉독에 존재하는 12.2분과 18.7분의 피크가 건조봉독에서는 관찰되지 않고, 15분과 19분의 minor peak로 나타났음. 산성, 중성, 염기성 pH에서 생봉독을 배양한 후 RP-HPLC로 분석한 결과 pH 변화에 따른 peak shift는 일어나지 않았음. 각각의 chromatogram을 merge한 결과 주 피크들은 동일한 시간에 재현성있게 확인되고 있음.

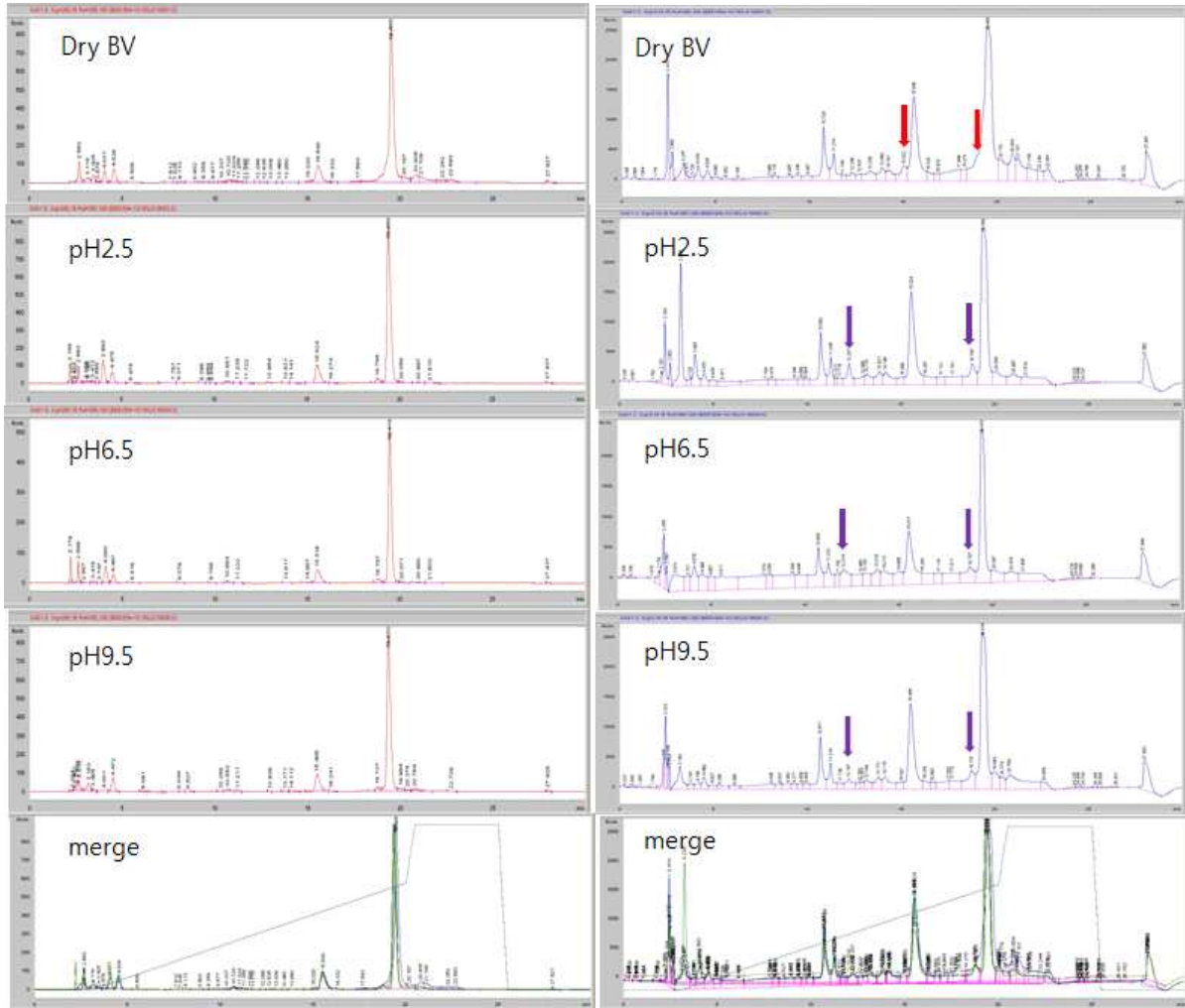


Fig 3.17. RP-HPLC chromatogram on absorbance at 214nm and 280nm

(2) Size exclusion-HPLC (SEC-HPLC)

건조봉독과 생봉독을 SEC-HPLC로 분석하였음. 사용한 컬럼은 TSKgel G5000PW_{XL}이었으며, 0.1M sodium acetate (pH5.0)를 분당 0.5ml의 유속으로 흘려서 봉독단백질을 분리하고 214nm와 280nm에서의 흡광도를 측정하여 용출되는 폴리펩티드들을 검출하였음 (Fig 3.18). 봉독 중 단백질은 25분이내에 모두 용출되었으며, 그 이후에 용출되는 peak는 분자량 4000Da이하의 small peptide 또는 salt임. merge한 chromatogram을 보면 pH의 변화에 따라 small peptide/salt의 retention time이 변화되었음. RP-HPLC보다는 각 peak의 retention time이 변화하므로, 제조한 봉독의 QC방법으로는 RP-HPLC를 사용하는 것이 좋을 것으로 판단됨.

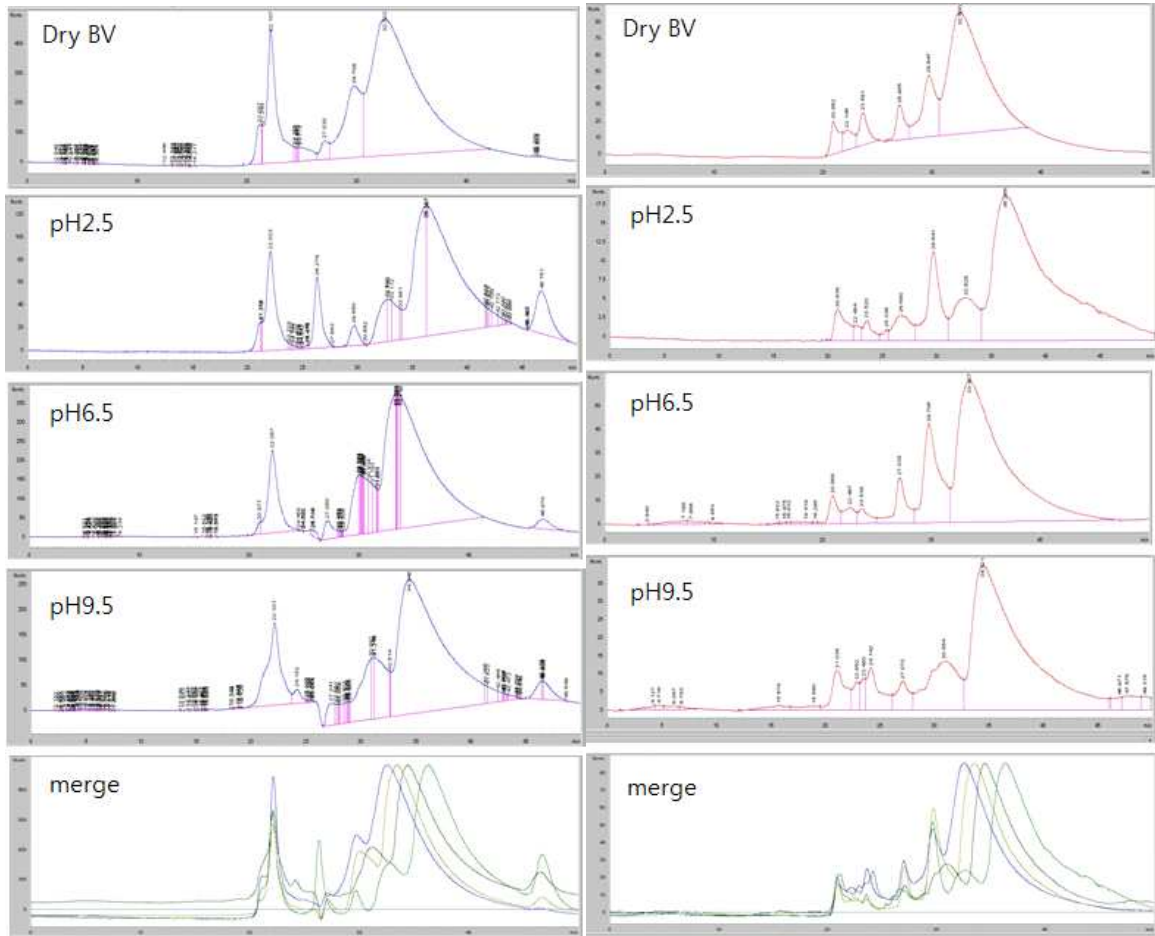


Fig 3.18. SEC-HPLC chromatogram on absorbance at 214 and 280nm

마. 결론

‘1. 봉독유효성분의 물리화학적 성질 규명’의 연구결과가 시사하듯 봉독 중에 포함된 단백질 가수분해 효소에 의한 봉독의 유효성분이 분해될 수 있음. 이를 해결하기 위해 나노구조체에 의한 단백질의 분해 억제 방법을 고안하였음. 모델시스템과는 달리 나노구조체를 활용한 봉독의 안정화방법은 만족할 만한 효과를 얻지 못하였음. 건조봉독과 생봉독에 대한 pH 안정성 실험 결과, 제조공정에서 pH의 유지가 중요한 역할을 할 것임을 시사하고 있음. 봉독의 채집 및 정제공정에서 시료의 pH를 3 내지 4로 유지시키면 봉독단백질의 가수분해를 억제할 수 있음을 확인하였음.

3. 안정성 시험

가. 연구의 목적

‘동물용의약품등 안전성 시험지침’ (국립농림축산검역본부고시 제2008-15호)에

의거하여 안정성시험을 수행하여 제품의 유효기간 설정을 위한 과학적 근거자료를 제공함.

나. 안정성 시험의 배양 조건

‘동물용의약품등 안전성 시험지침’ (국립농림축산검역본부고시 제2008-15호)에 따라 안정성시험을 수행하였음. 4가지 액상제형에 대해 각각 3로트씩을 장기보존시험 ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 보관), 가속시험 ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $60\pm 5\%$ 에서 보관)과 가속시험 ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $75\pm 5\%$ 에서 보관)을 수행하였음.

다. RP-HPLC를 이용한 시료의 분석

배양 후 일정 기간마다 시료를 회수하고 RP-HPLC로 melittin의 함량을 측정하였음. 사용한 컬럼은 Agilent사의 Eclipse XDB-C18이었으며, 파티클 크기는 5um, 컬럼의 크기는 $4.6\times 150\text{mm}$ 이며, 유속은 1ml/min이었음. 컬럼은 2% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid로 평형화하였고, 시료주입 후 5분 경과 후부터 Table 3.4의 용출 조건을 사용하여 시료를 분리하였고, 분리된 피크는 280nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였음.

Table 3.4. RP-HPLC의 용출조건

Time (min)	A buffer (0.1% TFA in ACN)	B buffer (0.1% TFA in DW)
0.0	2	98
5.0	2	98
5.1	15	85
8.0	20	80
14.0	50	50
25.0	50	50
25.1	100	0
32.0	100	0
32.1	2	98
40.0	2	98

melittin 피크는 재현성있게 확인이 되었으며, 전체 봉독단백질중의 함량은 제형에 따라 다소 차이가 있었으나 40% 이상이었음 (Fig. 3-19). Fig. 19의 피크를 분석한 결과 멜리틴은 17.1667분에서 용출되었으며, 피크의 면적은 639.3409로서 41.21%의 함량을 나타내었음.

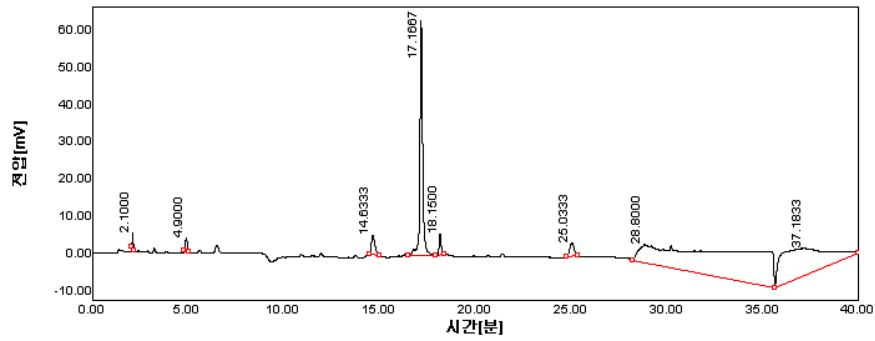


Fig 3.19. Eclipse XDB-C18를 이용한 봉독시료의 분석

멜리틴 피크는 시료의 주입양에 비례하여 증가하였으며, 선형회귀분석법으로 시험결과를 분석한 결과 매우 높은 정량성 ($r^2=0.9959$)을 나타내었음 (Fig 3.20).

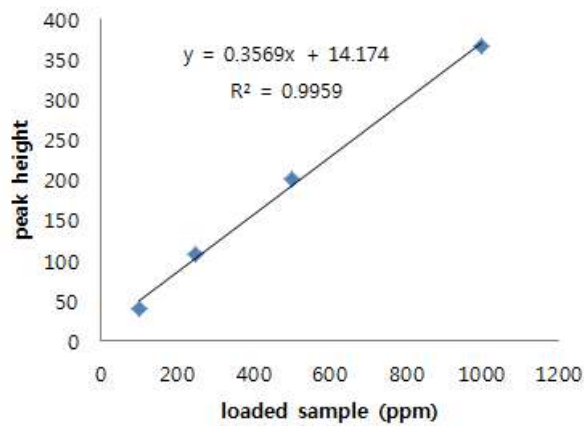


Fig 3.20. RP-HPLC로 분석한 봉독 시료의 회귀분석

라. 안정성시험 시료의 분석결과

(1) 장기보존시험

동물용의약품등 안전성 시험에 관한 규정은 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 보관하고, 3개월 간격으로 시료의 안정성을 측정하여 제품의 유효기간을 설정하도록 규정하고 있음. 이에 따라 액상제형의 3개월 안정성을 시험한 결과는 Fig 3.21.과 같음. 제형1은 시료가 불안정하여 동물용의약품으로 개발하기에는 문제가 있는 것으로 분석되었으며, 제형2-4도 시간의 경과에 따라 멜리틴의 함량이 감소하고 있음을 확인할 수 있었음. 추가적으로 6개월, 9개월의 데이터를 분석함으로써, 본 과제에서 개발하고 있는 동물용의약품의 유효기간을 설정할 수 있을 것으로 사료됨.

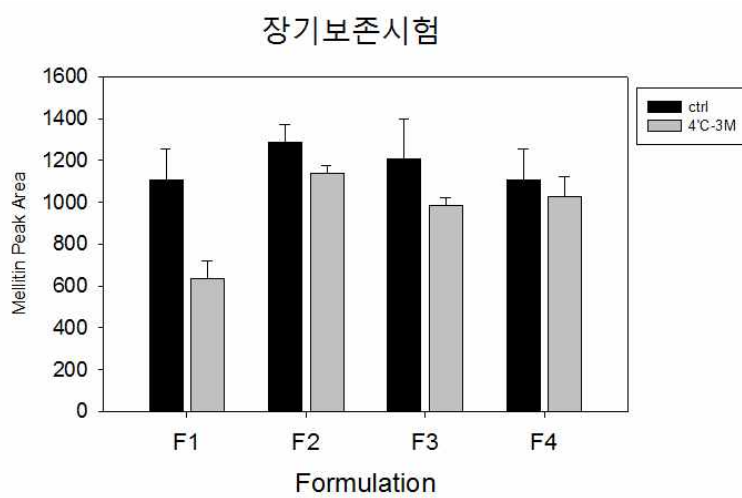
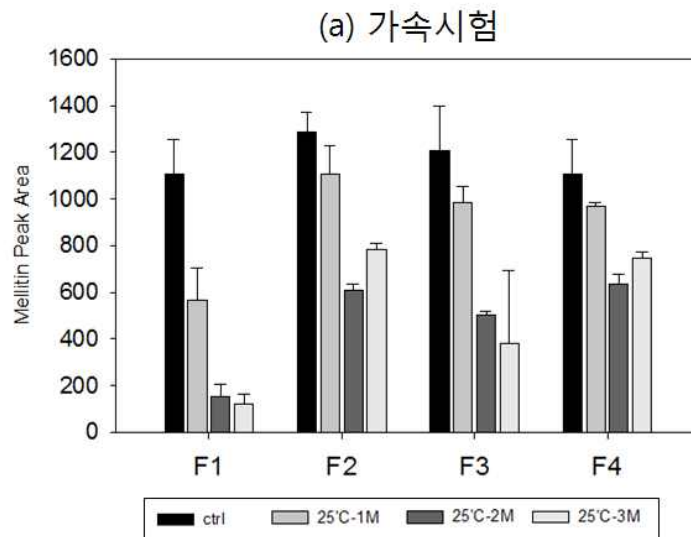


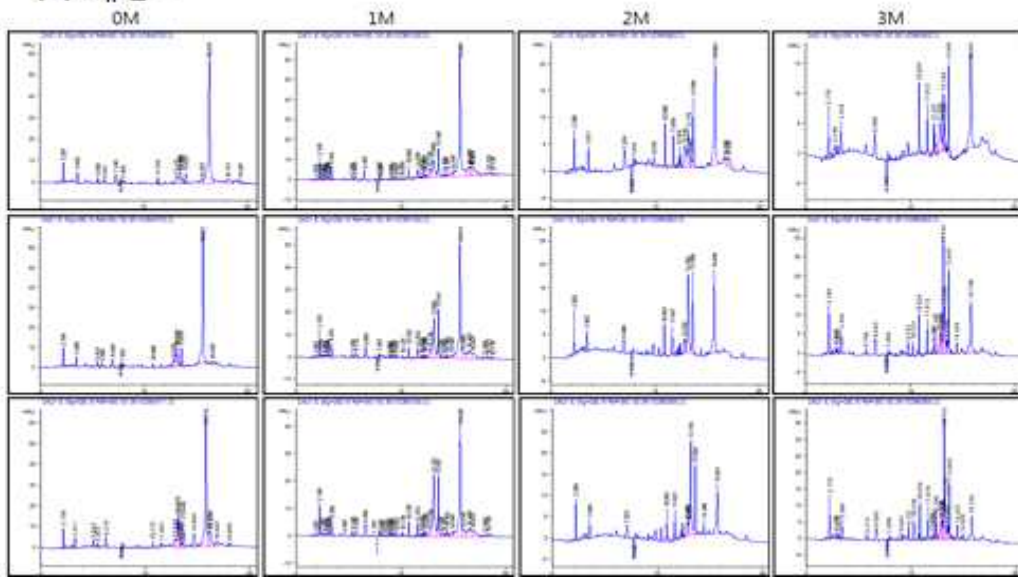
Fig 3.21. 장기보존시험

(2) 가속시험

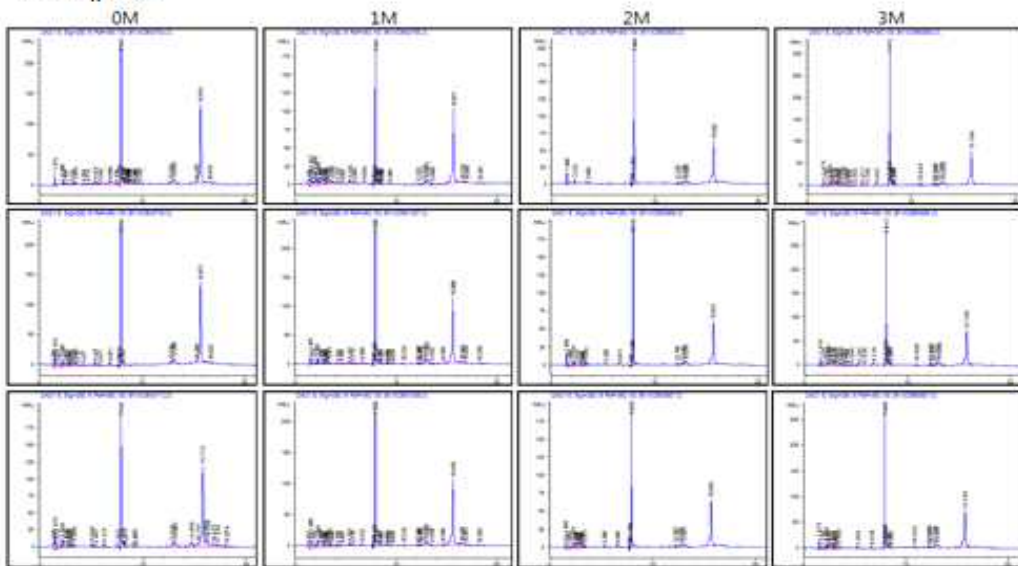
동물용의약품등 안전성 시험에 관한 규정은 3로트에 대해 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$ 에서 보관하고 최소 3번의 시험을 수행하도록 규정되어 있음. 시료를 0, 1, 2, 3개월 동안 배양하고 RP-HPLC를 통해 분석한 결과, 제형 2-4의 시료는 1개월 경과한 시점까지는 멜리틴의 함량 변화가 기준치 내에 있었으나 2달 이상이 경과하면 안정성의 문제가 발생함을 확인할 수 있었음 (Fig 3.22). 크로마토그램에서도 멜리틴 피크의 감소하며 짧은 retention time의 피크가 생성되었음 (Fig. 3.22 b-e)을 확인할 수 있는데, 이는 멜리틴의 변성이 발생하였음을 시사함.



(b) 제형1



(c) 제형2



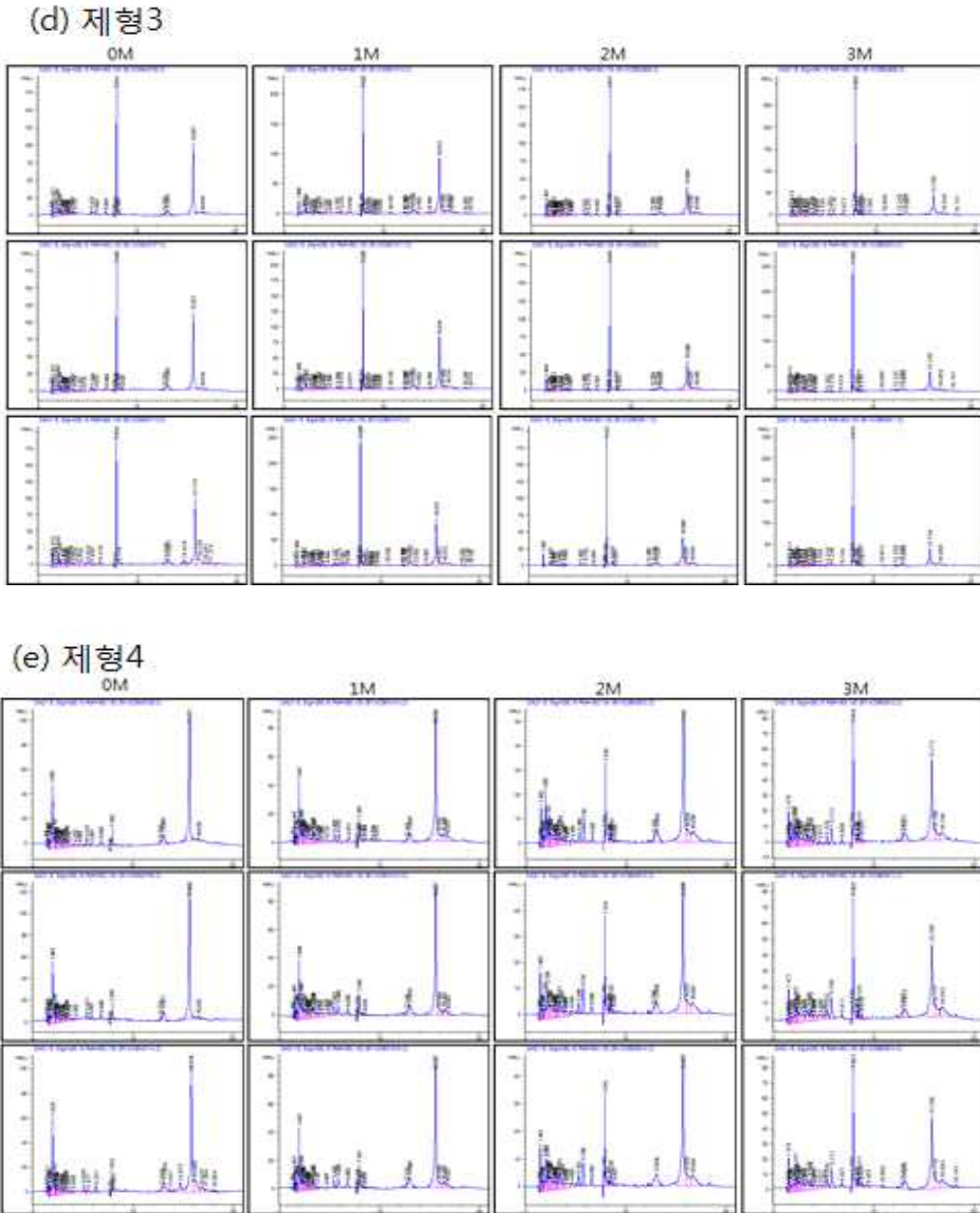
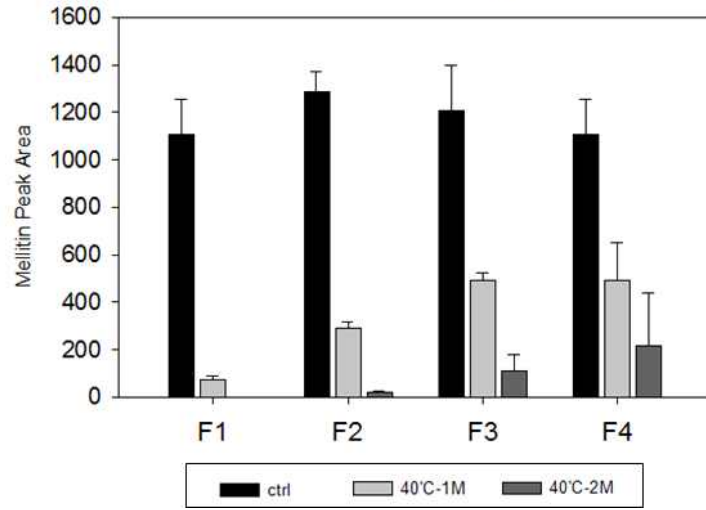


Fig 3.22 가속시험. (a) 가속시험 분석 결과 (b) 제형1의 크로마토그램 (c) 제형2의 크로마토그램 (d) 제형3의 크로마토그램 (e) 제형4의 크로마토그램

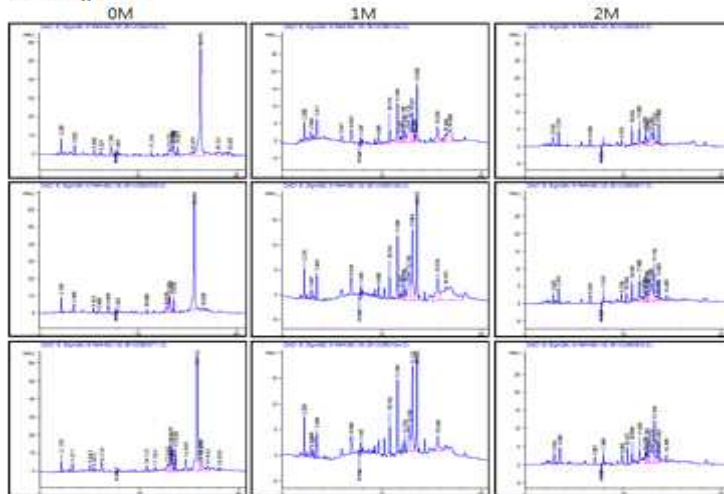
(3) 가속시험

동물용의약품등 안전성 시험에 관한 규정은 3로트에 대해 광선, 온도, 습도의 3조건을 검체의 특성을 고려하여 설정하도록 규정되어 있음. 본 시험에서는 $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $75 \pm 5\%$, 암조건에서 보관하고, 0, 1, 2개월 경과후 시료를 RP-HPLC로 분석하였음. 상기 조건에서 1달 이내에 시료의 안정성에 문제가 발생함을 확인할 수 있었음 (Fig 3.23).

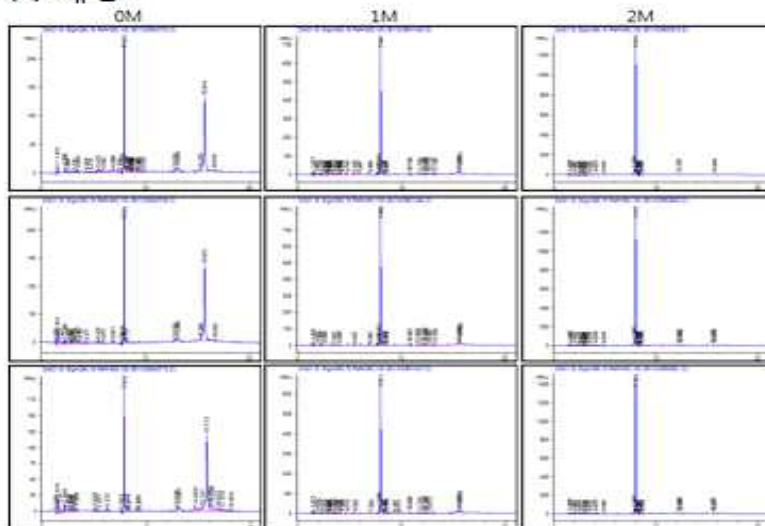
(a) 가혹시험



(b) 제형1



(c) 제형2



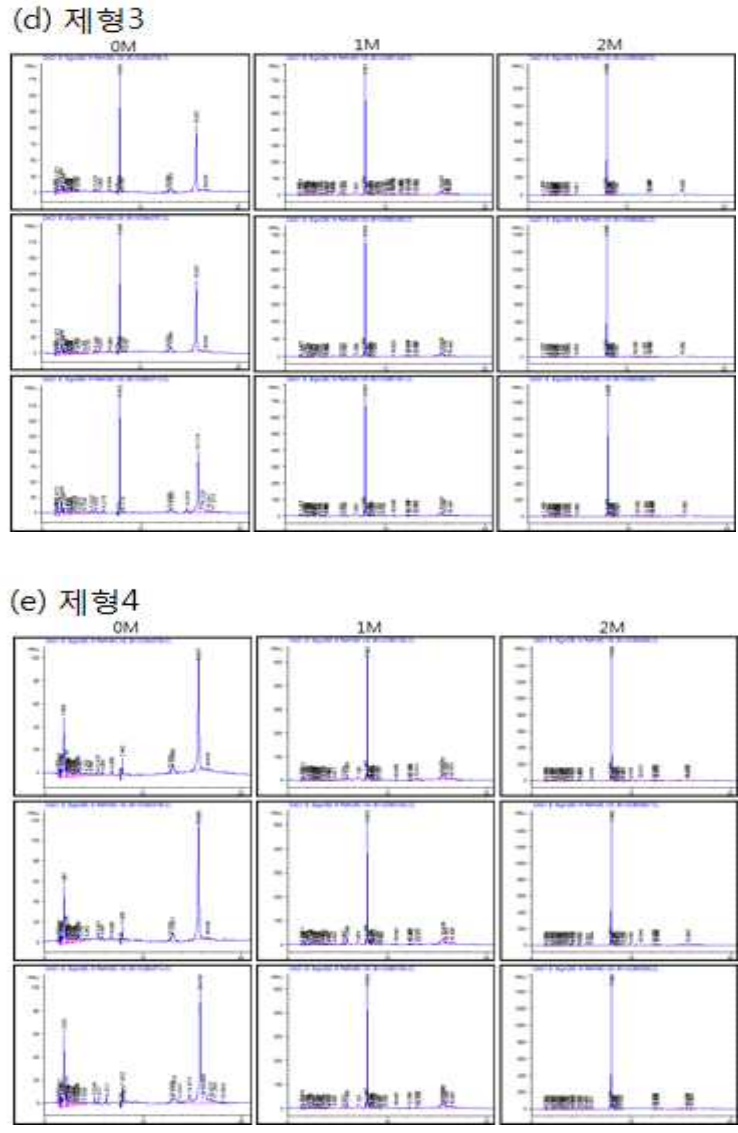


Fig 3.23. 가속시험. (a) 가속시험 분석 결과 (b) 제형1의 크로마토그램 (c) 제형2의 크로마토그램 (d) 제형3의 크로마토그램 (e) 제형4의 크로마토그램

마. 결론

4종류의 액상제형에 대해 각각 3로트에 대한 장기보존시험, 가속시험, 가속시험을 수행하였음. 시료의 분석은 Agilent사의 Eclipse XDB-C18 (파티클 크기 5um, 컬럼 크기 4.6×150mm)을 이용한 RP-HPLC를 통해 수행하였음. 시료의 양에 따른 피크의 회귀분석 결과 높은 직선성 ($r^2=0.9959$)을 보여 확립된 조건은 시료의 정량분석에 적합한 방법으로 사료됨. RP-HPLC에 의한 안정성 시험시료의 분석 결과, 제형2의 안정성이 가장 높았으며, 제형1의 안정성이 가장 낮았음.

4. 공동연구자들에 대한 분석업무 지원

가. 연구의 목적

본 제1협동과제팀은 타 협동과제팀에서 개발 중인 봉독의약품의 분석업무를 수행하고 있는 바, 제3협동과제팀에서 의뢰한 봉독시료에 대한 분석 지원 업무를 다음과 같이 실시함.

나. 봉독 단백질 동정

봉독의 제조공정에서 발생한 단백질 밴드의 성질을 규명하기 위해 SDS-PAGE를 하여 얻은 band 1과 2에 대해 LC-MS/MS를 수행하였음 (Fig 3.24). 동정된 단백질은 모두 phospholipase A2의 변이체로 확인되었음 (Table 3.5).

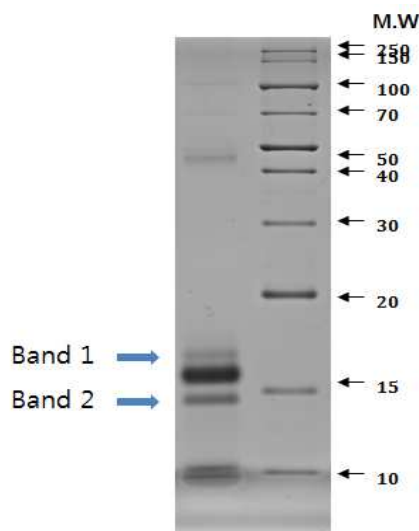


Fig 3.24. SDS-PAGE for LC-MS/MS

Table 3.5. Identified proteins by LC-MS/MS

Band	protein	Gi number	Mass	Ion score	Matched sequence (shown in red)
1	Phospholipase A-2	5627	18475	494	1 GSELLLLLST SHGWQIRDRI GDNELEERII YPGTLWCGHG NKSSGPNELG 51 RFKHTDCCR THDMCPDVMS AGESRKHGLTN TASHTRLSCD CDDKPYDCLK 101 NSADTISSYF VGRMYFNLID TKCYKLEHPV TGCGERIEGR CLHYTVDKSK 151 PKVYQWFDLR KY
		157833543	15239	494	1 IIYPGTLWCG HGNKSSGPNL LGRFKHTDAC CRTHDMCPDV MSAGESKHGL 51 TNTASHTRLS CDODDKFYDC LRNSADTISS YFVGRMYFNL IDTKCYKLEH 101 PVTGCGERTE GRCLHYTVDK SKPKVYQWFD LRKY
		58585172	19045	492	1 MQVVLGSLFL LLLSTSHGWQ IRDRIGDNEL EERIIYPGTL WCGHGNKSSG 51 PNELGREFKHT DACCRTHDMC PDVMSAGESK HGLTNTASHT RLSGCCDDKPF 101 YDCLNSADT ISSYFVGRMY FNLDITKCYK LEHPVTGCGE RTEGRCLHYT 151 VDKSKPKVYQ WFDLRKY
	phospholipase A	229378	14665	285	1 IIYPGTLWCG HGNKSSGPNL LGRFKHTDAC CRTHDMCPNV MSAGESKHGL 51 IDIASRLSCN DNDLFYKDSA DTISSYFVGR MYFNLINTRC YKLEHPVTGC 101 GERIEGRCLH YTVDKSKPKV YQWFDLRKY

다. 단백질 정량방법에 따른 봉독단백질의 정량

단백질의 정량방법에 따라 단백질의 발색원리가 각기 다르므로, 서로 다른 정량법으로 정량한 단백질의 양이 일치하지 않는 것은 일반적인 현상임. 봉독 단백질의 경우 Bradford assay보다는 BCA assay법으로 정량할 경우 단백질 양이 많은 것으로 정량되었음 (Table 3.6). 이는 시료에 Bradford 시약과 반응하는 basic amino acid의 수가 적기 때문으로 판단됨.

Table 3.6. 단백질 정량방법에 따른 봉독단백질 함량변화

2	phospho lipase A-2	5627	1847 5	486	1 GSLFLLLST SHGWQIRDRI GDNELEERII YPGTLWCGHG NKSSGPNELG 51 RFKHTDCCR THDMCPDVM AGESKHGLTN TASHTRLSCD CDDEKPYDCLK 101 NSADTISSYF VGRMYPNLID TKCYKLEHPV TCGGERTEGR CLHYTVDKSK 151 PKVYQWFDLR KY
		157833543	1523 9	486	1 IYPGTLWCG HGNKSSGPN E LGRFKHTDAC CRTHDMCPDV MSAGESKHGL 51 TNTASHRLS CDCDDKPYDC LRNSADTISS YPVGRMYFNL IDTKCYKLEH 101 PVTGGERTE GRCLHYTVDK SKPKVYQWFD LRKY
		58585172	1904 5	486	1 MQVVLGSLFL LLLSTSHGWQ IRDRIGDNEL EERIYPGTL WCGHGNKSSG 51 PNELRGFKHT DACCRTHDMC PDVMSAGESK HGLTNTASHT RLSCDCDDKF 101 YDCLRNSADT ISSYFVGRMY FNLIDTKCYK LEHPVTGCGE RTEGRCLHYT 151 VDKSKPKVYQ WFDLRKY
	phospho lipase A	229378	1466 5	285	1 IYPGTLWCG HGNKSSGPN E LGRFKHTDAC CRTHDMCPNV MSAGESKHGL 51 TDTASRLSCN DNDLFYKDSA DTISSYFVGR MYFNLIATKC YKLEHPVTGC 101 GERTEGRCLH YTVDKSKPKV YQWFDLRKY
	melittin, prepro	223015	7601	129	1 MKFLVXVALV FMVVYIXYIY AAPEPEPAPE FEAEADAED PEAGIGAVLK 51 VLTTGLPALI SWIKRKRQQG
lysozyme c-1	328779578	1790 8	88	1 MIKLCILIPA IVALIDNHV EARILTQCEA VQELQKAQIP RIYISNWVCL 51 MQSESGMNR LVTGPKTASS YSPGIFQINS AKWCSRGHSG GICNKRCEDF 101 ADDDIRDDIE CAKKIQAMEG FKAWDGWMKK CKNKPLPNIG NCKRRRRLWE 151 ILLELEQ	

	BCA assay (mg/ml)	Bradford assay (mg/ml)
CBV 2010	6.94	3.31
CBV 2011	5.78	2.38
LWBV 2010	6.14	2.55
LWBV 2011	6.34	2.13

라. 추출방법에 따른 봉독 단백질의 프로파일링

제3협동과제에서 추출한 봉독단백질을 동물시험했을 때 추출방법에 따른 역가의 차이가 확인되었음. 그 원인을 찾기 위해 추출방법에 따른 봉독 단백질의 프로파일을 SDS-PAGE와 2차원 전기영동으로 확인하였음 (Fig. 3-25, 3-26) 또한 초고압 또는 고전압 처리한 봉독시료에 대해서도 단백질 프로파일을 확인하였음 (Fig. 3-27). 추출방법에 따라 hyaluronidase의 함량에 차이가 있을 뿐 다른 주요 봉독 단백질의 함량은 큰 차이를 나타내지 않았음.

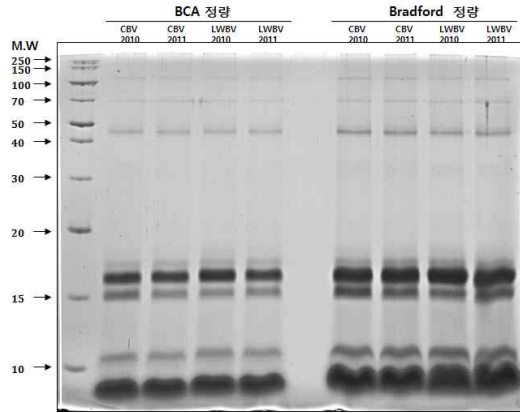


Fig 3.25. 추출방법에 따른 봉독 단백질의 SDS-PAGE profile

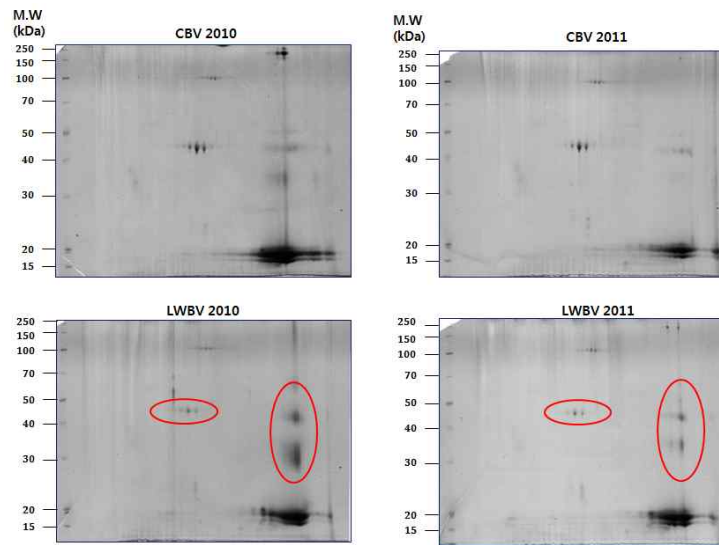


Fig 3.26. 추출방법에 따른 봉독 단백질의 2DE profile

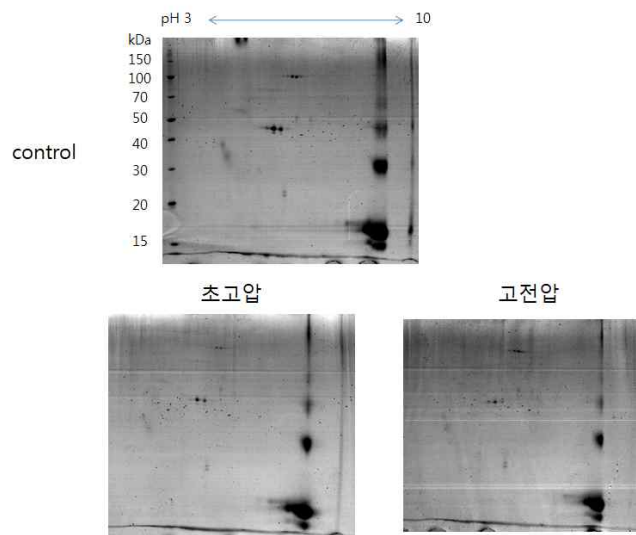


Fig 3.27. 초고압, 고전압 처리한 봉독단백질의 2DE

따. Gelatin-encapsulated bee venom의 분석

Gelatin-encapsulated bee venom을 0.45um filter를 통과시켜 filtrate의 시료를 분석한 결과, gelatin은 검출되지 않았음 (Fig 3.28).

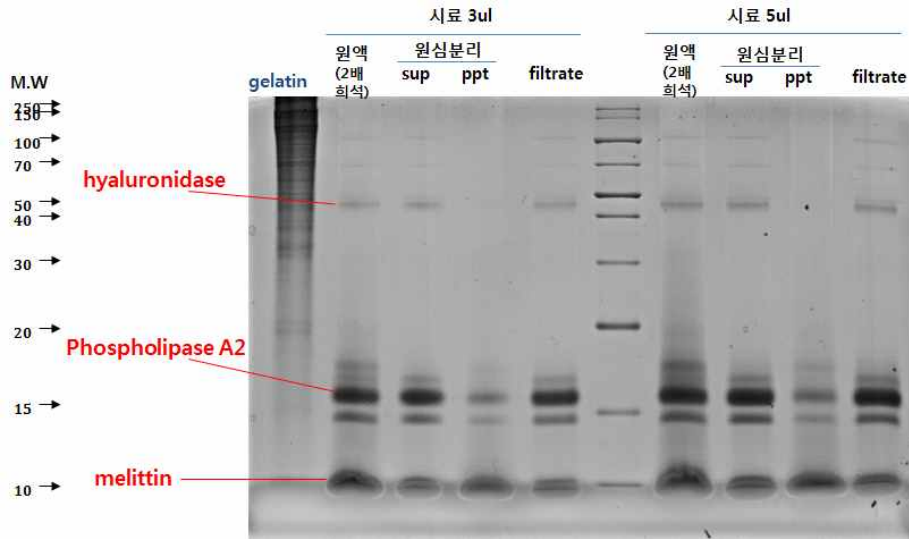


Fig 3.28. gelatin-encapsulated bee venom의 SDS-PAGE

바. 열처리한 봉독단백질의 분석

제3협동과제의 실험결과 hyaluronidase활성변화가 동물실험결과와 상관관계를 보였음. 열처리에 의해 hyaluronidase 단백질의 변화를 추적하기 위해 SDS-PAGE를 수행한 결과 효소의 활성 뿐 만 아니라 단백질 자체의 함량이 감소되는 것을 확인하였음 (Fig 3.29).

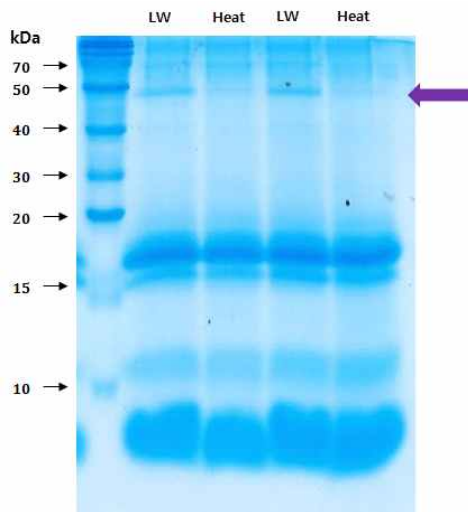


Fig 3.29. 열처리한 봉독단백질의 SDS-PAGE

사. 결론

SDS-PAGE, 2차원 전기영동법, isoelectric focusing, RP-HPLC, SEC-HPLC, 단백질 정량법을 개발하였으며, 제2협동, 제3협동과제의 연구과정 중 발생한 단백질의 물리화학적 제반 문제들에 대한 정보제공, 미지의 단백질에 대한 동정 및 분석지원업무를 지속적으로 수행하였음.

5. 결론 및 고찰

가. 봉독유효성분의 물리화학적 성질 규명

SDS-PAGE, 2차원 전기영동, isoelectric focusing 분석법을 수행하여 건조봉독과 생봉독의 protein profile을 비교하였음. 주요 봉독 단백질로 알려진 hyaluronidase, phospholipase A2 및 melittin의 함량 변화를 전기영동법으로 분석할 경우, 유의한 차이를 보이지 않았음. 상기 3종류의 서로 다른 전기영동법을 이용하여 봉독단백질을 분리하고 주요 단백질 114종을 질량분석법으로 분석하여 102개의 단백질을 동정하였음.

생봉독 특이 단백질을 ESI-LC-MS/MS를 이용하여 질량분석법으로 분석한 결과, 동정한 단백질들은 predicted protein인 경우도 많았음. 이는 벌독에 대한 연구 결과가 아직 미진한 실정이라 단백질 서열이 보고되어 database로 구축된 서열정보가 부족한 것에 기인함. 질량분석법을 활용하여 제조과정에서 소실 또는 불활성화되는 봉독 단백질에 대한 생물학적 기능을 규명하는 것은 현재로서는 제한적 활용될 수 있으며, 앞으로 봉독 관련 연구가 지속적으로 추진되어야 할 것으로 사료됨.

주요 봉독 단백질에 대한 modification여부를 확인한 결과 asparagine잔기의 deamidation이나 methionine의 oxidation이 일부 확인되었으나, 이는 자연 상태에서 일어난 변형이 아니라 proteome분석 시 발생하는 전형적인 형태의 변형으로 판단되었음.

생봉독에만 존재하는 단백질 중 동정된 serine carboxylpeptidase, venom dipeptidyl peptidase 4, carboxylesterase-6, venom serine protease 34는 단백질 가수분해 활성을 갖는 효소로서, 이 효소들에 의한 봉독의 가수분해가 발생함을 시사하고 있음.

나. 지표성분의 보존 방법 개발

‘가. 봉독유효성분의 물리화학적 성질 규명’의 연구결과가 시사하듯 봉독 중에 포함된 단백질 가수분해 효소에 의한 봉독의 유효성분이 분해될 수 있음. 이를 해결하기 위해 나노구조체에 의한 단백질의 분해 억제 방법을 고안하였음. 모델시스템과는 달리 나노구조체를 활용한 봉독의 안정화방법은 만족할 만한 효과를 얻지 못하였음.

건조봉독과 생봉독에 대한 pH 안정성 실험 결과, 제조공정에서 pH의 유지가 중요한 역할을 할 것임을 시사하고 있음. 봉독의 채집 및 정제공정에서 시료의 pH를 3 내지 4로 유지시키면 봉독단백질의 가수분해를 억제할 수 있음을 확인하였음.

다. 안정성 시험

‘동물용의약품등 안전성 시험지침’ (국립농림축산검역본부고시 제2008-15호)에 의거하여 4종류의 액상제형에 대해 각각 3로트에 대한 장기보존시험, 가속시험, 가속시험을 수행하였음. 시료의 분석은 Agilent사의 Eclipse XDB-C18 (파티클 크기 5um, 컬럼 크기 4.6×150mm)을 이용한 RP-HPLC를 통해 수행하였음. 시료의 양에 따른 피크의 회귀분석 결과 높은 직선성 ($r^2=0.9959$)을 보여 확립된 조건은 시료의 정량분석에 적합한 방법으로 사료됨. RP-HPLC에 의한 안정성 시험시료의 분석 결과, 제형2의 안정성이 가장 높았으며, 제형1의 안정성이 가장 낮았음.

라. 공동연구자들에 대한 분석업무 지원

SDS-PAGE, 2차원 전기영동법, isoelectric focusing, RP-HPLC, SEC-HPLC, 단백질 정량법을 개발하였으며, 제2협동, 제3협동과제의 연구과정 중 발생한 단백질의 물리화학적 제반 문제들에 대한 정보제공, 미지의 단백질에 대한 동정 및 분석지원업무를 지속적으로 수행하였음.

제 4 절 봉독의 spray 제제개발과 마이크로캡슐화를 통한 서방형 제제개발

(제 2 협동과제 : 충남대학교 약학대학 조정원)

1. 봉독 물리 화학적 특성 측정

가. 멜리틴 함량 측정 :

(1) 2011년에 제공받은 건조봉독

(가) 목적 : 봉독의 지표 성분이라 할 수 있는 멜리틴의 함량 측정.

(나) 방법 : 봉독의 지표 성분이라 할 수 있는 멜리틴의 함량을 측정하기 위해 HPLC 분석을 시행하였다. bee venom의 농도는 1mg/ml로 맞추고 220nm에서 분석

-분석조건 :

칼럼 => Nova-pak C18 (Waters) 3.9 x 150um, 4um

이동상 => 0.1% TFA ACN : 0.1% TFA water = 55:45

분석과장 => 220nm

분석 온도 => 30도

유속 => 1.2ml/min

(다) 결과 : 약 42%의 멜리틴 함량이 나타남.

Table 4.1. 봉독 내 멜리틴 함량

Sample	Area	Conc.(ug/mL)	Mel Content(%)
bee-1	4870.4	411.07	41.11
bee-2	4883.9	412.18	41.22
bee-3	5100.8	430.07	43.01

- 크로마토그램은 다음과 같음. 멜리틴은 3.1분에서 검출되었음.

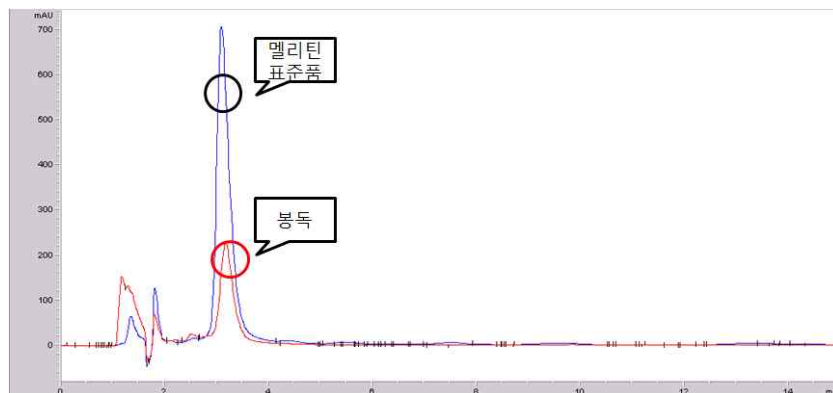


Fig. 4.1. 멜리틴 표준품과 봉독의 HPLC 피크

(2) 2012년에 제공받은 건조봉독

(가) 목적: 봉독의 지표 성분이라 할 수 있는 멜리틴의 함량을 측정하기 위해 HPLC 분석을 시행하였다.

(나) 방법: bee venom을 distilled water에 녹여 농도를 1 mg/ml로 맞추고, syringe filter로 filtering하여 HPLC 분석.

- 분석조건:

HPLC => HP HEWLET PACKARD 1100

Column => Agilent Zorbax SB C18 5 μ m 4.6*250mm

Mobile phase =>

Table. 4.2. 봉독의 HPLC 분석을 위한 이동상 조건

Time (min)	0.1% TFA in D.W. containig 10% ACN	0.1% TFA in ACN containig 10% D.W.
0	55	45
2	55	45
8	15	85
13	55	45

UV detection wavelength => 220nm

Column temperature => 50도

Flow rate => 1.2ml/min

Injection volume => 20ul

Stop time => 15min

(다) 결과 : 약 27%의 멜리틴 함량이 나타남.

Table 4.3. 봉독 내 멜리틴 함량

Sample	Melittin Content (%)
Batch 1	26.97
Batch 2	28.70
Batch 3	26.85

(라) 결과 분석

- 이전의 함량과 다르게 멜리틴 함량이 너무 낮게 나옴.
- 멜리틴 피크에 대한 머무름 시간이 고정되지 못함.

- base line이 흔들려 불명확함.
- 기대되지 않은 피크들의 검출.

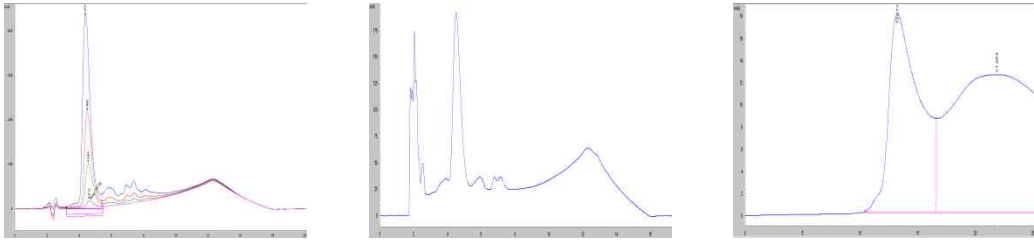


Fig 4.2. 위에 상기된 분석방법의 HPLC chromatogram

- 위의 사항들의 원인은 높은 컬럼 온도와 극소량의 물질들까지 검출되어 특수성이 없는 UV 분석 파장, 이동상 gradient의 이상이라 판단.

(마) 결론: 봉독 내 멜리틴에 대한 머무름 시간의 고정과 base line의 흔들림 방지, 기대되지 않은 피크들의 생성을 막기 위해 컬럼 온도, 멜리틴만이 검출될 수 있는 특수성을 지닌 UV 분석 파장, 그에 따른 이동상 gradient를 조절을 목표로 하여 HPLC 분석 조건을 다시 선택함.

(바) 변형된 HPLC 분석조건

HPLC => HP HEWLET PACKARD 1100

Column => Agilent Zorbax SB C18 5 μ m 4.6*250mm

Mobile phase =>

Table 4.4. 봉독의 HPLC 분석을 위한 이동상 조건

Time (min)	0.1% TFA in D.W. containig 10% ACN	0.1% TFA in ACN containig 10% D.W.
0	75	25
3	75	25
6	50	50
10	20	80
15	75	25

UV detection wavelength => 280nm

Column temperature => 35도

Flow rate => 1.0ml/min

Injection volume => 20ul

Stop time => 15min

(사) 결과: 약 52%의 멜리틴 함량이 나타남.

Table 4.5. 봉독 내 멜리틴 함량

Sample	Melittin Content (%)
Batch 1	52.61
Batch 2	52.59
Batch 3	52.08

(아) 결과 분석:

- 멜리틴에 대한 머무름 시간이 고정됨.
- base line이 안정화됨.
- peak가 날카로워짐.
- 봉독 내 소량 함유되어있는 phospholipase A2의 검출.
- 멜리틴의 함량이 이전에 분석에 대한 함량과 거의 같게 나옴.

(자) 결론: 멜리틴 함량이 약 52% 나옴.

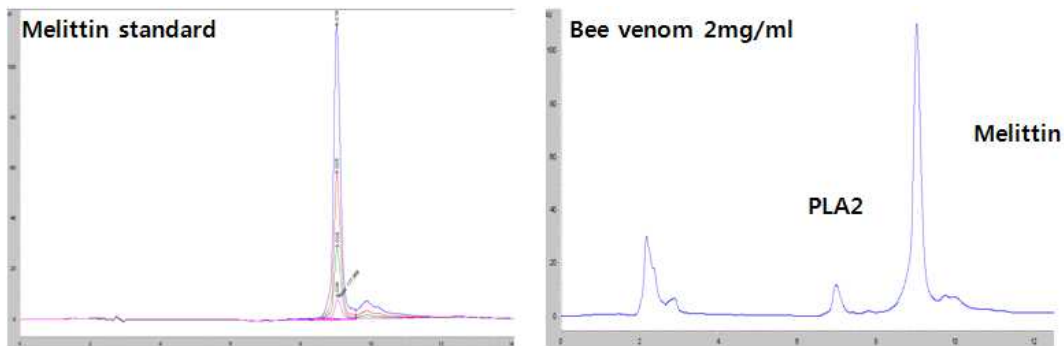


Fig 4.3. 위에 상기된 분석방법의 HPLC chromatogram

나. 멜리틴의 sonication에 대한 안정성 :

- (1) 목적: 제형 제조 과정 중 ultrasonication이 사용되기 때문에 이에 대한 멜리틴의 안정성 확인
- (2) 방법: 봉독을 증류수에 녹여 1mg/ml의 농도로 10ml용액을 제조 후 1분 간격으로 sonication 후에 샘플을 취하여 HPLC 측정함. 총 10분간 실험을 진행.
- (3) 결과: 총 10분간 약 5%의 멜리틴 함량 감소가 일어남.

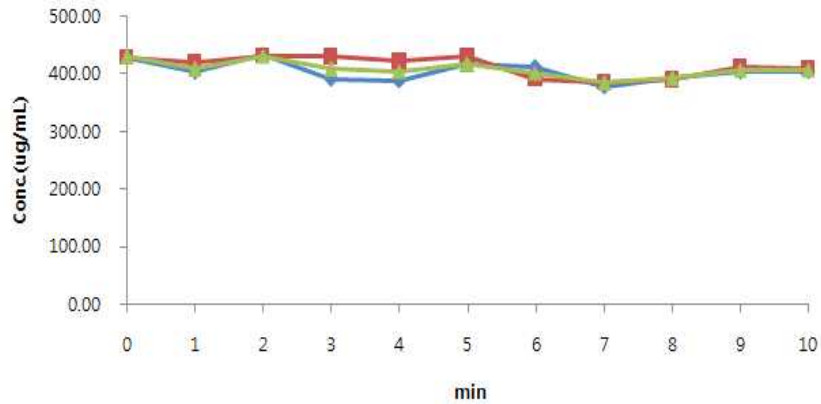


Fig 4.4. 멜리틴의 sonication에 대한 안정성

다. 멜리틴의 유기용매에 대한 안정성 :

- (1) 목적: 제형 제조 과정 중 유기용매 (dichloromethane)에 대한 멜리틴의 안정성 확인
- (2) 방법: 5mg의 봉독을 dichloromethane에 녹이고 증발 시킨 후 증류수로 재 분산 시킨 뒤 HPLC 분석.
- (3) 결과 : dichloromethane (MC)에 봉독을 넣으면 멜리틴 농도 감소가 나타남.

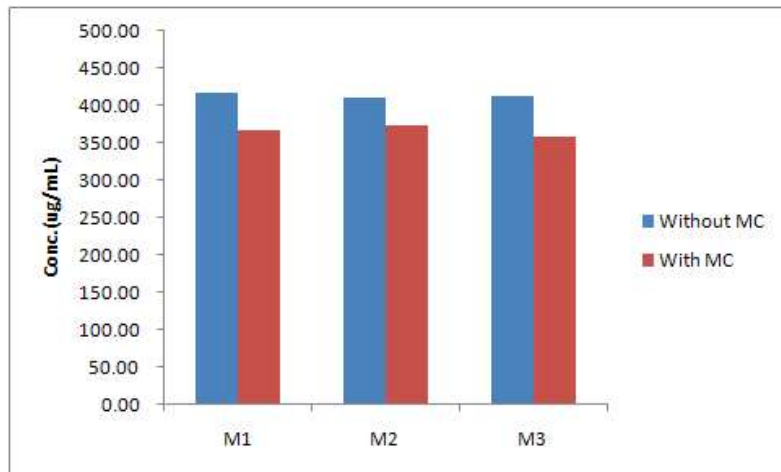


Fig 4.5. 멜리틴의 유기용매에 대한 안정성

라. 봉독 단백질의 sonication, 유기용매에 대한 안정성 :

- (1) 목적 및 방법 : 봉독 내 단백질의 안정성을 위의 방법을 사용하여 BCA 분석을 통해 측정
- (2) 결과 : Sonication과 유기용매(dichloromethane)에 대한 단백질 함량 감소 나타남

Table 4.6. 봉독 단백질의 sonication, 유기용매에 대한 안정성

Sample (1mg/ml)	Absorbance			Average		Conc. (ug/ml)
bee venom	0.5110	0.4390	0.4740	0.3734	373.3667	1030.664
Sonication	0.4700	0.4680	0.4320	0.3554	355.3667	980.0027
Dimethyl chloride	0.4520	0.4650	0.3890	0.3340	334.0333	919.9596

마. 산염기에서의 멜리틴, 봉독단백질 안정성

- (1) 목적: 봉독 내 멜리틴과 봉독단백질의 산, 염기 조건에서 안정성 확인
- (2) 방법: 증류수, 0.1N NaOH, 0.1N HCl에서 1mg/ml로 샘플을 제조 한 뒤 24시간 교반 후 HPLC 분석과 BCA 정량을 통해 멜리틴, 단백질 양 변화를 측정
- (3) 결과 : 멜리틴의 경우 원래 함량 (40~50%) 값이 증류수에서 얻어졌으며 산성조건 (0.1N HCl)에서는 거의 비슷한 값이 얻어졌으나 염기성 조건(0.1N NaOH)에서는 93%이상 감소한 값이 얻어졌다.

Table 4.7. 봉독 내 멜리틴 함량 변화 (HPLC 분석)

Sample (1mg/ml)	Area	Conc.(ug/ml)	Average Conc.(ug/ml)
Water	6675.3	441.63	440.75
멜리틴	6594.7	436.40	
안정성	6715.2	444.22	
0.1N NaOH	267.2	25.79	25.84
멜리틴	265.4	25.67	
안정성	271.3	26.05	
0.1N HCl	6461.6	427.76	425.10
멜리틴	6352.1	420.66	
안정성	6447.9	426.87	

봉독 내 단백질의 경우 증류수 내 농도에 비해서 산성조건(0.1N HCl)에서는 약 15%가 감소한 값이 얻어졌으며, 염기성 조건(0.1N NaOH)의 경우 50%이상 감소한 값이 얻어졌다. 이를 보면 봉독은 산성 조건에서는 상대적으로 안정하나, 염기성 조건일 경우 매우 낮은 안정성을 보여주었다.

Table 4.8. 봉독 내 단백질 함량 변화 (BCA 정량)

Sample (1mg/ml)	Absorbance			Average		Conc. (ug/ml)
Water	0.3940	0.3840	0.3940	0.2960	295.9667	1104.069
단백질 안정성						
0.1N NaOH	0.2130	0.2330	0.2320	0.1313	131.3	496.4428
단백질 안정성						
0.1N HCl	0.3170	0.3400	0.3460	0.2396	239.6333	896.1968
단백질 안정성						

바. 봉독 내 멜리틴에 대한 다양한 pH 의 효과

- (1) 목적: 봉독의 지표 성분이라 할 수 있는 멜리틴이 여러 pH에서의 안정성을 확인하며 봉독을 함유한 제형의 pH를 어떻게 설정해야 하는지 확인.

(2) 방법: bee venom을 pH 1~13의 용액에 녹여 농도를 1 mg/ml로 맞추고, syringe filter로 filtering하여 HPLC 분석. HPLC 분석조건외의 상기된 분석조건을 사용.

Table 4.9. pH 1 ~ 13 용액 제조 방법

pH	A	B
1	0.2M KCl 50ml	0.2M HCl 134ml
2	0.2M KCl 50ml	0.2M HCl 13ml
3	0.1M Acetic acid 98.23ml	0.1M Sodium acetate 1.77ml
4	0.1M Acetic acid 84.7ml	0.1M Sodium acetate 15.3ml
5	0.1M Acetic acid 35.7ml	0.1M Sodium acetate 64.3ml
6	0.1M NaH ₂ PO ₄ 87.7ml	0.1M Na ₂ HPO ₄ 12.3ml
7	0.1M NaH ₂ PO ₄ 39ml	0.1M Na ₂ HPO ₄ 61ml
8	0.1M NaH ₂ PO ₄ 5.3ml	0.1M Na ₂ HPO ₄ 94.7ml
9	0.1M NaHCO ₃ 100ml	0.1M NaCO ₃ 12.5ml
10	0.1M NaHCO ₃ 5ml	0.1M NaCO ₃ 5ml
11	0.1M NaHCO ₃ 8ml	0.1M NaCO ₃ 100.64ml
12	0.2M KCl 50ml	0.2M NaOH 12ml
13	0.2M KCl 50ml	0.2M NaOH 13.2ml

(3) 결과: 멜리틴은 산성 용액에서 안정. 염기성에서는 불안정.

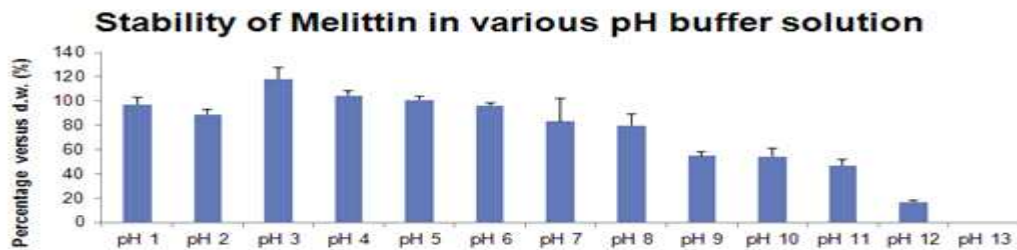


Fig 4.6. 봉독 내 멜리틴에 대한 다양한 pH 의 효과

(4) 결과 분석

- 봉독에 대한 제형을 제조 시 제형의 pH가 염기성 보다는 산성으로 유지해야 한다고

판단됨.

- 구체적으로는 제형의 pH를 6이하로 유지해야 된다고 판단됨.

사. 봉독 내 멜리틴에 대한 다양한 첨가제 효과

- (1) 목적: 봉독의 지표 성분이라 할 수 있는 멜리틴이 여러 첨가제들에 의한 안정성을 확인하며 봉독을 함유한 제형에 첨가제들을 어떻게 설정해야 하는지 확인.
- (2) 방법: bee venom을 여러 첨가제가 포함된 용액에 녹여, syringe filter로 filtering하여 HPLC 분석. HPLC 분석조건의 상기된 분석조건을 사용
- (3) 결과:
 - 봉독은 50, 70, 100% 에탄올에는 불용성이었다.
 - 대부분의 첨가제들에서 봉독 내 멜리틴 함량의 변화는 거의 없었다.

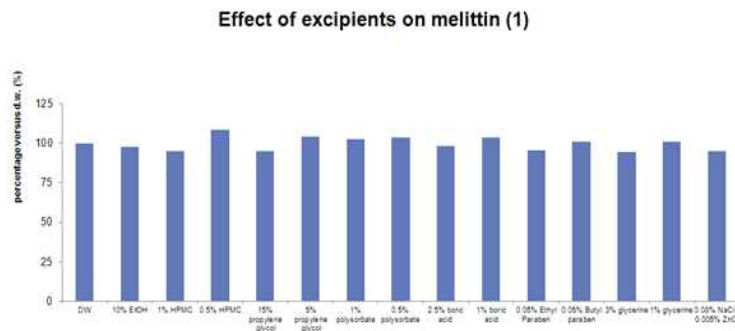


Fig 4.7. 봉독 내 멜리틴에 대한 다양한 첨가제의 효과

(4) 결과 분석

- 여러 제형을 만들 시 위에 사용된 첨가제들을 사용하는 것은 봉독 내 멜리틴 안정성에 영향을 미치지 않을 것으로 판단.
- 알코올 함량이 높아지면 봉독이 용해되지 않는 것으로 판단.

아. 고 농도 봉독에 대한 희석과 filtering의 효과

- (1) 목적: 봉독의 지표 성분이라 할 수 있는 멜리틴이 여러 pH에서의 안정성을 확인하며 봉독을 함유한 제형의 pH를 어떻게 설정해야 하는지 확인.
- (2) 방법: 200 mg의 봉독을 1 ml의 증류수에 녹인다. 첫 번째 군은 봉독 용액을 100배 희석 후 0.45 um syringe filter로 filtering하고, 두 번째 군은 고 농도 봉독 용액을 0.45 um syringe filter로 filtering한 후, filtering한 용액을 100배 희석하여 HPLC 분석. HPLC 분석조건의 상기된 분석조건을 사용.
- (3) 결과: 고 농도 봉독 용액은 희석과 filtering에 대해 영향을 받지 않는다.

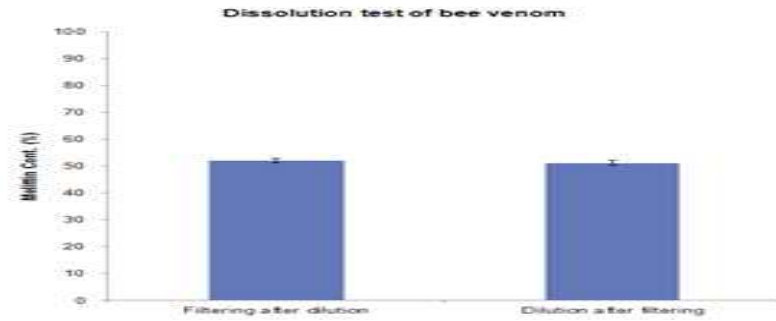


Fig 4.8. 고 농도 봉독에 대한 희석과 filtering의 효과

(4) 결과 분석

- 봉독 내 멜리틴은 syringe filter에 거의 흡착하지 않는 것으로 판단.
- 봉독 내 멜리틴은 희석에 대해 큰 영향을 받지 않는 것으로 판단. 즉, 고농도 봉독 용액을 만들어 희석하여 사용하여도 무관하다고 판단.

자. 4°C, 차광 조건에서 봉독 내 멜리틴의 안정성 확인

- (1) 목적 : 봉독의 지표 성분이라 할 수 있는 멜리틴이 4°C, 차광 조건에서 봉독 내 멜리틴의 안정성 확인.
- (2) 방법 : bee venom을 증류수에 녹여 농도를 1 mg/ml로 맞추고, 4°C, 차광 조건에서 보관하여 1, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 112, 147일째 샘플을 채취하여 syringe filter로 filtering하여 HPLC 분석. HPLC 분석조건의 상기된 분석조건을 사용.

(3) 결과:

- 4°C, 차광 조건에서 28일까지는 봉독 내 멜리틴 함량 변화과 없음.
- 4°C, 차광 조건에서 28일 이후 봉독 내 멜리틴 함량은 감소하기 시작.

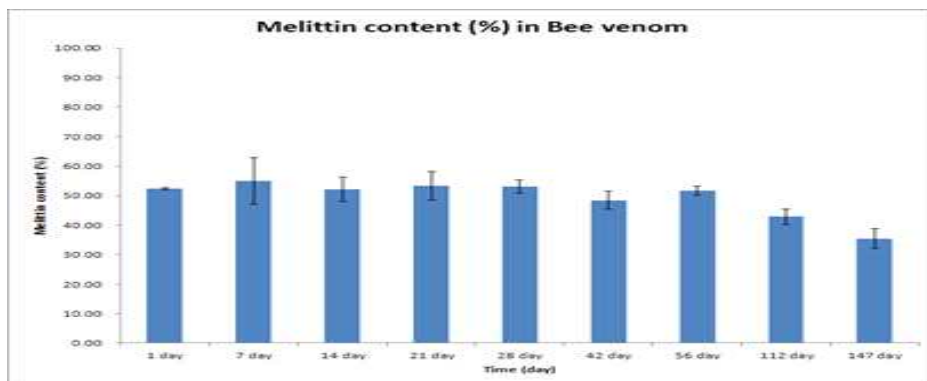


Fig 4.9. 4°C, 차광 조건에서 봉독 내 멜리틴의 안정성 확인

(4) 결과 분석

- 4°C, 차광 조건에서 28일까지는 봉독 내 멜리틴이 안정하다고 판단.

- 4℃, 차광 조건에서 28일 이후에는 봉독 내 멜리틴이 불안정하다고 판단.
- 증류수 이외의 다른 용제를 사용해야 장기간 봉독 내 멜리틴의 안정성을 유지할 수 있을 것이라 판단.

2. 봉독 spray 제형

가. 1차 봉독 spray 제형의 제조 연구

(1) Spray E1 제형 in vitro 시험 :

- (가) 목적 및 방법 : 2mg/ml 봉독을 함유한 제형을 5ml 취하여 (총 10mg 봉독) dialysis bag (cut off molecular weight = 7000Da)에 넣고 증류수 25ml을 medium으로 하여 시간별(0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96시간)로 0.5ml media를 취하고 새로운 media를 넣어 주어 방출 측정 양상을 BCA로 확인하였다.

Table 4.10. E1 제형 조성

제조 원료	%(w/v)
봉독	0.5
CMC-Na	0.5
Tween 80	1
Glycerin	1
Mannitol	0.5
sodium citrate dihydrate	0.4
boric acid	0.25
sodium borate deca hydrate	0.41
Potassium chloride	0.14

- (나) 결과 : 시간이 지남에 따라 점점 방출된 봉독 단백질의 양이 증가된 것을 확인 할 수 있었으나 48시간 이후에는 약간씩 감소하는 경향이 나타났다.

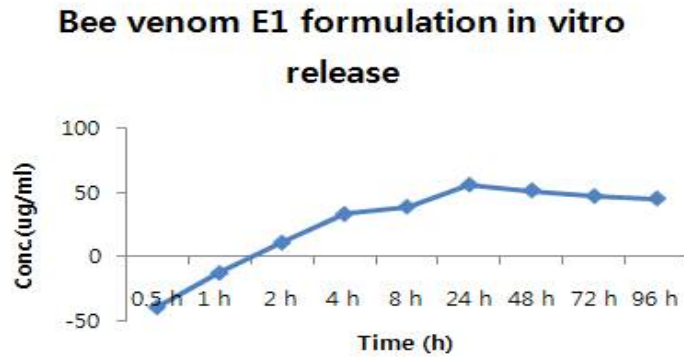


Fig 4.10. E 1 제형의 in vitro release 결과

(2) E1 제형 점도측정

(가) 목적 및 방법 : 제형의 점도 측정, 증류수, E1 제형, Tween 80의 점도를 측정하여 비교

(나) 결과 : E1 vehicle의 점도는 9.3cp로 측정되었음.

Table 4.11. 물, E1 제형 및 tween 80점도

Sample	c.p
Water	0
E1	9.3
Tween 80	272.3

(3) E1 제형의 cytotoxicity 실험

(가) 목적 및 방법 : Conjunctiva cell에 대한 세포 독성을 보기 위해 MTT assay를 시행. 실험은 5×10^4 개의 세포를 포함한 100uL cell culture medium를 96-well에 넣은 후 24시간 동안 배양하였다. 제형을 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 25, 50, 100%로 하여 medium으로 희석하고 96-well에 친 후 72시간 동안 배양 후 PBS로 plate를 씻어준 다음 MTT 20uL를 함유한 100uL medium을 plate에 넣은 후 37°C에서 3시간 배양한다. medium을 제거 한 후 DMSO를 넣어 30분 후에 540nm 파장에서 Microplate Spectrometer (Sunrise, Tecan, Austria)를 사용하여 흡광도를 측정.

(나) 결과 : 농도 구배에 따른 제형의 세포 독성을 보여주었으며 IC 50값은 1~10% 사이에서 얻어졌다.

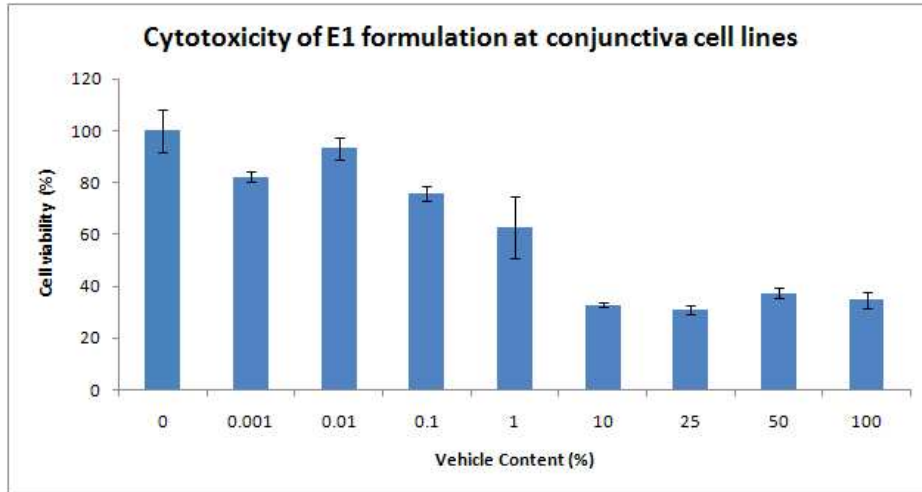


Fig 4.11. E 1 제형의 결막 세포에 대한 세포독성 결과

나. 2차 봉독 spray 제형의 제조 연구

(1) 목적: 봉독을 함유한 spray 제형을 제조하여 장기간 봉독 내 함유된 멜리틴의 안정성 유지와 spray 제형의 물리화학적인 요소의 변화를 확인.

(2) Spray 용제를 선택하게 된 배경

- 아래 문서에서 Manuka 꿀에 봉독이 3년 동안 보관되어도 안정성을 잃지 않았다는 결과 보고가 나와있다.



Fig 4.12. 4℃, 멜리틴의 안정성이 2년 이상 유지 되었다는 보고서.

- 위의 문헌 정보를 토대로 꿀의 조성이 봉독의 안정성을 유지할 수 있을 것으로 판단.
- 꿀과 비슷한 시럽 조성도 봉독의 안정성을 유지할 수 있을 것으로 판단.
- 시중에 출시되어있는 부루펜과 같은 시럽은 시럽 내 포함되어 있는 약물을 3년 이상 동안 안정하게 유지한다.
- spray 제형으로 사용될 것이기 때문에 안약의 조성을 변형할 수 있다고 판단.
- 안약의 조성은 약물의 안정성을 유지하며, 눈에도 제형의 안정성이 보장된다.

- 안약, 꿀, 시럽 조성의 조합은 시너지 효과를 낼 것으로 판단.
- 봉독은 단백질 성분이기 때문에 오랜 기간 단백질 자체의 안정성을 유지하기 위해 보관은 차광, 냉장 보관 조건으로 해야 한다고 판단.
- 봉독이든지 여러 가지 성분의 산화를 막기 위해 산화방지제가 필요하다고 판단.
- 제형의 부패와 오염을 막기 위해 antibacterial agent가 필요하다고 판단.
- spray 제형이기 때문에 피부 투과 증진을 위한 피부투과 증진제가 필요하다고 판단.
- 위의 pH에 대한 실험결과로 보아 spray 용제의 pH를 6 이하로 유지해야 한다고 판단.

(3) Spray 용제 조성 및 제조 방법(모든 제형은 봉독 농도 10 mg/ml를 목표로 제조)

(가) Formulation 1 (modified ophthalmic solution) (F 1)

Table 4.12. Formulation 1 composition

Excipients	Role	Contents (g)
Metolose 60SH-50 (HPMC 50cps)	Thickening agent	0.2 g
Boric acid	pH adjust	2.2 g
polysorbate 80	Penetration enhancer & surfactant	0.4 g
Benzalkonium chloride	Antibacterial agent	0.01 g
Distilled water	solvent	잔량
Total		100 ml

- 제조 방법:

- ① Metolose 60SH-50, boric acid, polysorbate 80, benzalkonium chloride를 위의 용량대로 측량하여 용기에 넣는다.
- ② 용기에 증류수를 넣어 총 100ml로 용량을 맞춘다.
- ③ 열을 가하지 않고 충분히 진탕하여 완전히 용해시킨다.
- ④ 봉독 2g을 위 formulation 100ml에 넣고 충분히 진탕하여 완전히 용해시켜 formulation 1을 완성한다.
- ⑤ 최종 용제의 봉독 농도는 20mg/ml로 한다.
- ⑥ (Benzalkonium chloride 대체품으로 0.05% ethyl paraben + 0.02% butyl paraben 사용 가능, 차광·냉장 보관.)

(나) Formulation 2 (modified bee honey) (F 2)

Table 4.13. Formulation 2 composition

Excipients	Role	Contents (g)
D-(-)-fructose (과당)	Thickening agent & honey composition	38.00 %
α -D-glucose		31.00 %
D-sorbitol	Stabilizing agent	10.00 %
Benzalkonium chloride	Antibacterial agent	0.01 %
2.2% boric acid in distilled water	Solvent & pH adjust	20.99 %
Total		100.00 %

- 제조 방법:

- ① D-(-)-fructose, α -D-glucose, D-sorbitol, Benzalkonium chloride를 위의 용량대로 측량하여 용기에 넣는다.
- ② 용기에 2.2% boric acid in distilled water를 넣어주며 가열된 물(70~80℃)에 중탕하며 strring해 준다.
- ③ 용액이 완전히 투명한 용액이 되었을 때 2.2% boric acid in distilled water를 넣어주어 총 용량을 맞춘 후 중탕하며 stirring하여 완전히 혼합한다.
- ④ 용액이 다 녹아 완전히 투명하게 되었을 때 차가운 물에 10분 동안 담가 식혀 formulation 2를 완성한다.
- ⑤ 봉독 2g을 2.2% boric acid in distilled water 25ml에 넣고 충분히 진탕하여 완전히 용해시킨다.
- ⑥ Formulation 2 75ml 와 봉독을 녹인 5번 용액 25ml를 혼합 후 열을 가하지 않고 충분히 진탕하여 완전히 혼합한다.
- ⑦ 최종 용제의 봉독 농도는 20mg/ml로 한다.
- ⑧ (Benzalkonium chloride 대체품으로 0.05% ethyl paraben + 0.02% butyl paraben 사용 가능, 차광·냉장 보관.)

(다) Formulation 3 (Formulation 1 + modified 2) (F 3)

Table 4.14. Formulation 3 composition

Sample	Excipients	Role	Contents
1	D-(-)-fructose (과당)	Thickening agent & honey composition	38.00 % (w/w)
	α -D-glucose		31.00 % (w/w)
	D-sorbitol	Stabilizing agent	10.00 % (w/w)
	Benzalkonium chloride	Antibacterial agent	0.01 % (w/w)
	2.2% boric acid in distilled water	Solvent & pH adjust	20.99 % (w/w)
2	Metolose 60SH-50 (HPMC 50cps)	Thickening agent	0.2 g
	Boric acid	pH adjust	2.2 g
	Ascorbic acid	Stabilizing agent & antioxidant	0.5 g
	Benzalkonium chloride	Antibacterial agent	0.01 g
	Distilled water	solvent	잔량
	Total		

- 제조 방법:

- ① Sample 1은 formulation 2 만드는 방법으로 만든다.
- ② Sample 2는 formulation 1 만드는 방법으로 만들되 polysorbate 80 대신 ascorbic acid를 첨가한다.
- ③ 봉독 2g을 sample 2 30ml에 넣고 충분히 진탕하여 완전히 용해시킨다.
- ④ Sample 1 70ml와 봉독을 녹인 3번 용액 30ml를 혼합 후 열을 가하지 않고 충분히 진탕하여 완전히 혼합한다.
- ⑤ 최종 용제의 봉독 농도는 20mg/ml로 한다.
- ⑥ (Benzalkonium chloride 대체품으로 0.05% ethyl paraben + 0.02% butyl paraben 사용 가능, 차광·냉장 보관.)

(라) Formulation 4 (modified syrups) (F 4)

Table 4.15. Formulation 4 composition

Excipients	Role	Contents (g)
Sucrose	Thickening agent & Syrup composition	85
D-sorbitol	Stabilizing agent & antioxidant	5
Ascorbic acid		0.4
Benzalkonium chloride	Antibacterial agent	0.01
2.2 % boric acid in distilled water	pH adjust & Solvent	잔량
Total		100 ml

- 제조 방법:

- ① Sucrose, D-sorbitol, Ascorbic acid를 위의 용량대로 측량하여 용기에 넣는다.
- ② 용기에 2.2% boric acid in distilled water를 넣어주며 가열된 물(60~80℃)에 중탕하며 string해 준다.
- ③ 용액이 완전히 투명한 용액이 되었을 때 2.2% boric acid in distilled water를 넣어주어 100ml로 총 용량을 맞춘 후 가열된 물(60~80℃)에 중탕하며 stirring하여 완전히 혼합한다.
- ④ 용액을 충분히 혼합 후 투명하게 되었을 때 차가운 물에 10분 동안 담가 식혀 formulation 4를 완성한다.
- ⑤ 봉독 2g을 2.2% boric acid in distilled water 10ml에 넣고 충분히 진탕하여 완전히 용해시킨다.
- ⑥ Formulation 4 90ml와 봉독을 녹인 5번 용액 10ml를 혼합 후 열을 가하지 않고 충분히 진탕하여 완전히 혼합한다.
- ⑦ 최종 용제의 봉독 농도는 20mg/ml로 한다.
- ⑧ (Benzalkonium chloride 대체품으로 0.05% ethyl paraben + 0.02% butyl paraben 사용 가능, 차광·냉장 보관.)

(4) 각 spray 제형들에 적용된 실험 방법(각각의 실험의 실행 시간은 0일, 1주, 2주, 4주, 8주로 하였다.)

(가) 멜리틴 함량 실험

- 방법:

① 멜리틴 함량 분석 샘플은 F 1, F 2, F 3, F 4 제형에서 0.2 ml를 취하여 10배 희석하여 2 ml로 만든다.

② ①의 샘플을 syringe filter로 filtering하여 HPLC 분석. HPLC 분석조건에 상기된 분석조건을 사용

(나) 용제 및 제형 pH

- 방법: 봉독을 포함하지 않은 제형의 용제와 봉독을 포함한 제형의 pH를 pH meter기로 측정한다.

(다) 용제 및 제형 점도

- 방법: 봉독을 포함하지 않은 제형의 용제와 봉독을 포함한 제형의 점도를 점도 측정기로 측정한다.

(라) 납·비소 한도 시험

- 방법:

① 검체 2 ml를 정확하게 취하여 비커에 넣고 질산 10 ml를 넣은 다음 시계접시로 덮어 8시간 방치.

② 가열판 위에 놓고 천천히 온도를 높여 갈색 연기가 발생하지 않을 때까지 가열.

③ 30% 과산화수소 5 ml를 넣어 미황색이 될 때까지 완전히 분해.

④ 가열판 위에서 1 ml가 될 때까지 농축.

⑤ 샘플을 튜브에 옮긴 후 3000 rpm으로 원심분리 후 상등액 취함.

⑥ 상등액 0.7 ml에 물을 넣어 7 ml로 한다.

⑦ 질산 10 ml를 가지고 이하 검액조제와 같은 방법으로 조작하여 공시험액으로 한다.

⑧ Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer를 이용하여 납과 비소의 양을 측정한다. 단위는 ppm 단위로 한다.

(마) 중금속 시험

- 방법:

① 샘플을 묽은 염산 3 ml를 넣어 가온 하고 여과하여 잔류물을 물 5 ml씩으로 2회 씻고 여액 및 씻은 액을 네슬러관에 넣는다.

② 페놀프탈레인시액 1 방울을 넣어 암모니아시액을 액이 옅은 적색이 될 때까지 한 방울씩 가하고 묽은 아세트산 2 ml 및 물을 넣어 50 ml로 하여 검액으로 한다.

③ 비교액은 묽은염산 3 ml를 취하여 이하 검액의 조제법과 같은 방법으로 조작하고 납표준액 3 ml 및 물을 넣어 50 ml로 한다.

④ 검액 및 비교액에 화화나트륨시액 1 방울씩을 넣어 섞고 5 분간 방치한 다음 2 개의 관을 흰색의 배경을 써서 네슬러관의 위 또는 옆에서 관찰하여 액의 색을 비교한다.

⑤ 검액이 나타내는 색은 비교액이 나타내는 색보다 진하지 않다.

(바) 미생물 한도 시험

- 방법:

◆ 생균수 시험

- ① 검액의 조제: 10 ml를 액체배지에 섞어 100 ml로 하여 검액으로 한다.
- ② 한천평판희석법: 지름 9 ~ 10 cm 페트리접시를 쓰고 희석단계마다 2 개 이상의 한천배지를 쓴다. 멸균한 한천배지 15 ~ 20 ml를 페트리접시에 넣는다. 검액을 0.05 ~ 0.2 ml를 균일하게 도말한다. 한천배지로는 세균시험에는 대두카제인소화 한천배지, 진균시험에는 항생물질이 첨가된 배지로서, 감자텍스트로오스한천배지를 쓴다. 한천이 굳은 다음 세균은 30 ~ 35℃, 진균은 20 ~ 25℃에서 5일간 각각 배양한다. 생균의 집락이 형성되는지 관찰한다.

◆ 특정미생물시험

- ① 검액의 조제: 검체를 액체배지에 희석하여 사용한다.
- ② 대장균: 검액 10 ml를 달아 유당액체배지를 넣어 100 ml로 한다. 배지는 맥콘키한천배지를 사용하여 30 ~ 35℃에서 72시간 배양한다. 주위에 적색 침강선띠를 가진 적갈색 그람음성균의 집락이 나타나는 경우는 대장균 양성으로 판정한다.
- ③ 살모넬라: 검액 10 ml를 달아 유당액체배지를 넣어 100 ml로 한다. 배지는 엑스엘디한천배지를 사용하여 30 ~ 35℃에서 72시간 배양한다. 적색, 중심부에 검은 점이 나타나는 경우와 그렇지 않은 경우에 살모넬라 양성으로 판정한다.
- ④ 녹농균: 검액 10 ml를 달아 대두카제인소화액체배지에 넣어 100 ml로 한다. 배지는 세트리미드한천배지로 하여 30 ~ 35℃에서 72시간 배양한다. 녹색 형광물질을 나타내는 집락이 형성되는 경우 녹농균 양성이라 판정한다.
- ⑤ 황색포도상구균: 검액 10 ml를 달아 대두카제인소화액체배지에 넣어 100 ml로 한다. 만니톨·식염한천배지를 배지로 사용하여 30 ~ 35℃에서 48시간 배양한다. 황색띠로 둘러싸인 황색 집락이 형성되는 경우 황색포도상구균 양성이라 판정한다.

(사) SDS-PAGE를 이용한 봉독 내 펠리틴과 phospholipase A2 확인

- 방법:

- ① 샘플은 F 1, F 2, F 3, F 4 제형에서 0.2 ml를 취하여 10배 희석하여 2 ml로 만든다. 각 샘플들을 SDS-loading buffer를 이용하여 SDS-PAGE에 적용할 수 있게 변형한다.
- ② 통상적으로 이용되는 SDS-PAGE법을 이용하여 샘플을 적용한다.

(아) 펠리틴 용출 시험

- 방법: 샘플은 F 1, F 2, F 3, F 4 제형에서 1 ml씩을 취하여 dialysis bag에 담은 뒤 1.0 ml의 PBS(1M Phosphate buffered saline, pH 7.4)용액을 포함하는 용기

내에 담은 후, 200 rpm, 37 °C에서 배양 (Incubation)하면서 시간경과에 따라 용기 내의 PBS를 원심분리하여, 상등액 중 봉독의 단백질 농도를 BCA assay를 이용하여 측정한다. 용기 내에는 다시 새로운 완충용액(PBS)을 넣어 방출실험을 계속하였다. 샘플링 타임은 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24시간으로 하였다.

(자) MTT test를 이용한 세포 독성 시험

- 방법: 결막 세포를 이용하여 각 샘플들에 대한 세포 독성 시험을 실행하였다. 샘플의 희석배수는 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000으로 실행하였다. 결막 세포를 96 well에 seeding 후 24 시간 배양기에서 배양하였다. 세포 배양 24 시간 후 샘플을 희석 배수 별로 첨가하였다. 24 시간 배양기에서 배양하였다. 샘플 첨가 24 시간 후 샘플을 제거하고 5 mg/ml의 MTT를 첨가하였다. 4시간 후 MTT를 제거하고 DMSO를 첨가하여 세포 내 흡수된 MTT를 용해시키고 30 분 후 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 결과

(가) 멜리틴 함량 실험

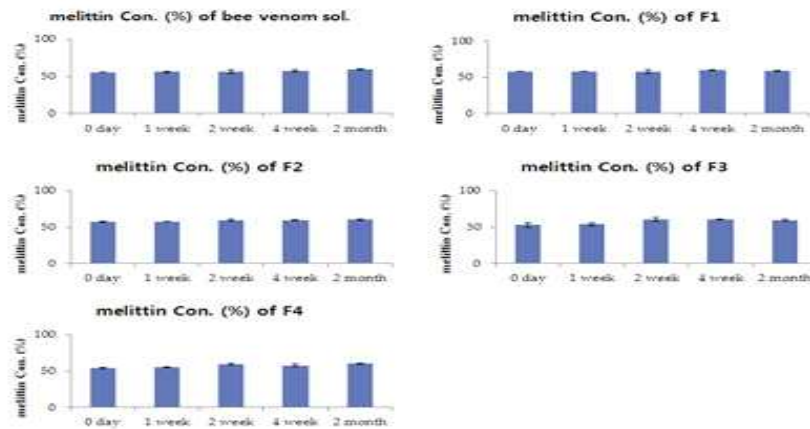


Fig 4.13. Spray 제형의 멜리틴 함량 실험결과

- 2달의 기간 동안 각 제형들의 멜리틴 함량은 거의 변화가 없었다.
- 2달의 기간 이상의 기간에서 각 제형들의 멜리틴 함량에 대한 변화가 나타날 것이라 판단됨.
- 4 가지 제형이 대조군인 봉독만이 용해된 용액보다는 멜리틴 함량이 높게 유지되었다.
- 각 제형들이 봉독 내 멜리틴을 유의한 차이는 아니지만 안정하게 유지한다고 판단됨.

(나) 용제 및 제형 pH

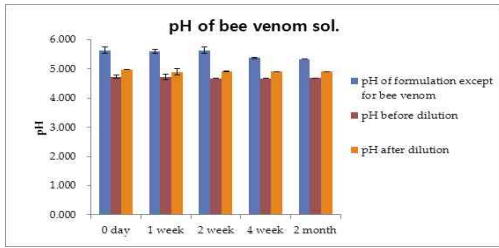


Fig 4.14. bee venom solution의 pH

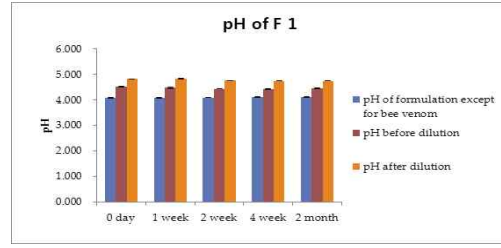


Fig 4.15. Fomulation 1 의 pH

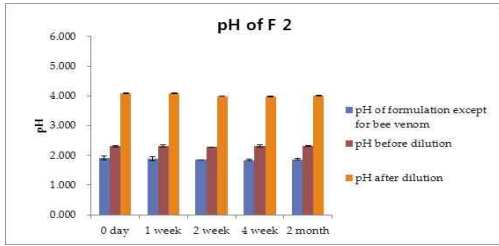


Fig 4.16. Fomulation 2 의 pH

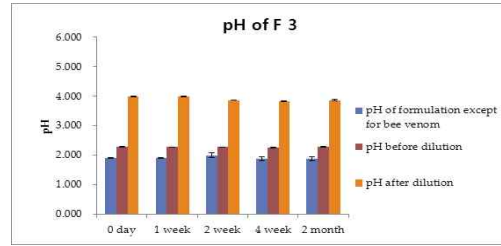


Fig 4.17. Fomulation 3 의 pH

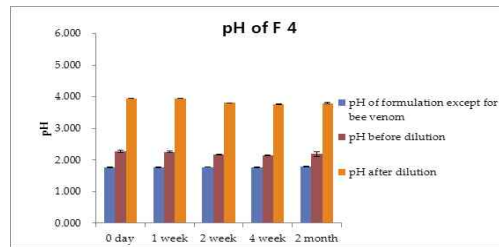


Fig 4.18. Fomulation 4 의 pH

- 봉독을 제외한 용제의 pH는 전부다 pH 6이하의 산성으로 유지되었다.
- F 2~4 제형은 과량의 산성을 띠는 당의 첨가로 인해 액성이 다른 제형들 보다 더 pH가 낮은 것으로 판단.
- F 1 제형은 boric acid로 인한 pH로 판단됨.
- 각각의 용제에 봉독의 첨가로 인해 F 1과 F 2는 pH가 감소되었고, F 3~4는 pH가 상승하였다. 이것은 봉독은 여러가지 단백질과 아미노산이 포함되어 있기 때문에 봉독은 양쪽성을 지닐 수 있다. 또 봉독은 중화능력이 있게 된다. 이런 원인으로 인하여 봉독의 첨가로 인한 용제의 pH 변화는 봉독의 중화 효과라 판단됨. 하지만 여기서 순수 봉독 용액은 약산성 이라 판단됨.
- 희석에 의한 영향은 각각의 제형들의 pH가 상승하게 만듦. 이것은 물의 첨가로 인한 중화효과라 판단됨. 그래서 물의 pH에 가까워 지려 pH가 상승되었다고 판단.
- 순수 봉독 용액은 시간이 지날수록 pH가 아주 조금씩 감소가 발생. 이것은 공기 중 이산화탄소의 영향이라 판단됨.
- 순수 봉독 용액을 제외한 제형들은 pH의 변화가 시간이 지날수록 없다.
- 이것으로 인해 제형들은 pH 변화에 의한 용액의 산패 등의 변화는 일어나지 않을 것이

라 판단. pH 변화에 의한 봉독의 파괴를 막을 수 있을 것이라 판단됨.

(다) 용제 및 제형 점도

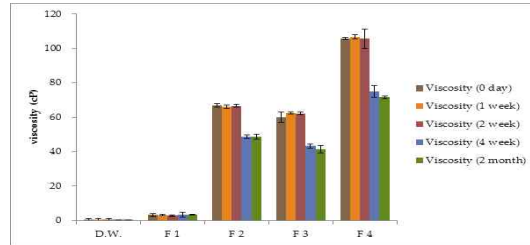


Fig 4.19. Spray 용제 및 제형 점도

- 순수 봉독 용액과 F 1 제형의 점도는 거의 변화가 없다.
- F 2~4 제형의 점도가 2 주가 지난 뒤 유의한 감소를 나타내었다.
- 이 감소에 대한 원인은 우선 상온의 상승으로 인한 감소일 수 있다고 판단됨. 두번째로는 각 제형에 첨가된 당들이 물성 변화를 일으켜 점도가 감소된 것으로 판단됨.
- 제형의 물리적 성질만 변화되고 화학적 성질은 변화되지 않은 것으로 판단. 다른 실험 결과들로 보아 봉독의 안정성에는 큰 영향을 주지 않는 것이라 판단됨.

(라) 납·비소 한도 시험

① 납 시험: 장기보존시험기간 동안 5ppm 미만으로 적합하였다.

Table 4.16. 납 한도 시험 결과

기간	0 일	1 주	2 주	4 주	8 주
Bee venom sol. - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
Bee venom sol. - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
Bee venom sol. - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 1 - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 1 - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 1 - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 2 - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 2 - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 2 - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 3 - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 3 - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 3 - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 4 - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 4 - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 4 - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합

- 모든 제형의 납 함유량이 0.05 ppm 미만인 것을 확인할 수 있다.
- 모든 제형에 인체에 해로운 납이 포함되지 않는 것으로 판단

② 비소 시험: 장기보존시험기간 동안 3ppm 미만으로 적합하였다.

Table 4.17. 비소 한도 시험 결과

기간	0 일	1 주	2 주	4 주	8 주
Bee venom sol. - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
Bee venom sol. - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
Bee venom sol. - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 1 - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 1 - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 1 - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 2 - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 2 - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 2 - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 3 - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 3 - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 3 - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 4 - 1	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 4 - 2	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합
F 4 - 3	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm	<0.05ppm
	적합	적합	적합	적합	적합

- 모든 제형의 비소 함유량이 0.05 ppm 미만인 것을 확인할 수 있다.
- 모든 제형에 인체에 해로운 비소가 포함되지 않는 것으로 판단

(마) 중금속 시험: 왼쪽부터 비교액, 검액 3배치로, 검액이 나타내는 색은 비교액이 나타내는 색보다 진하지 않았다.

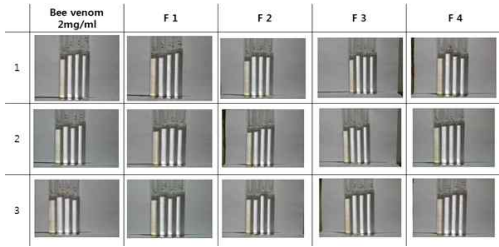


Fig 4.20. 중금속 시험(0 일)

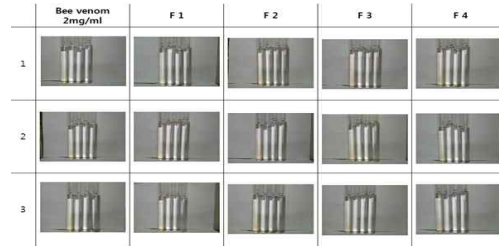


Fig 4.21. 중금속 시험(1 주)

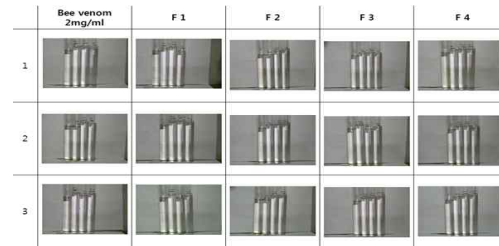


Fig 4.22. 중금속 시험(2 주)

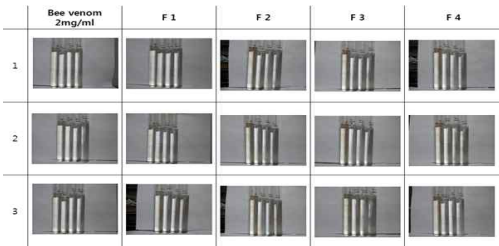


Fig 4.23. 중금속 시험(4 주)

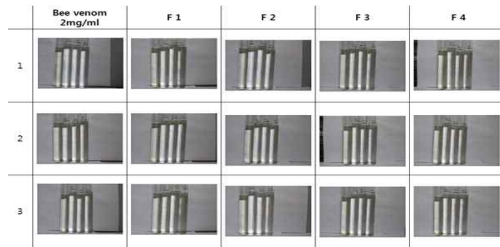


Fig 4.24. 중금속 시험(8 주)

- 모든 제형에 중금속이 없다는 것으로 판단됨.
- 모든 제형에 인체에 해로운 중금속이 포함되지 않는 것으로 판단.

(바) 미생물 한도 시험

① 생균수 시험 (일반세균)

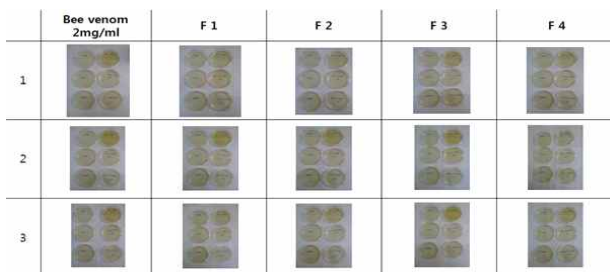


Fig 4-25. 생균수 시험 (일반세균) (0 일)

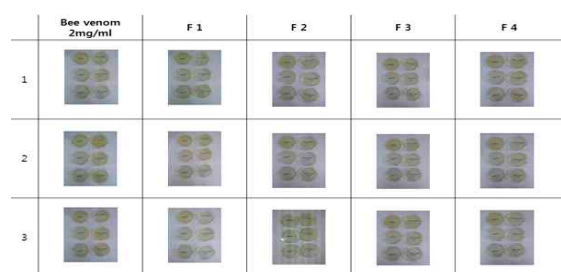


Fig 4-26. 생균수 시험 (일반세균) (1 주)

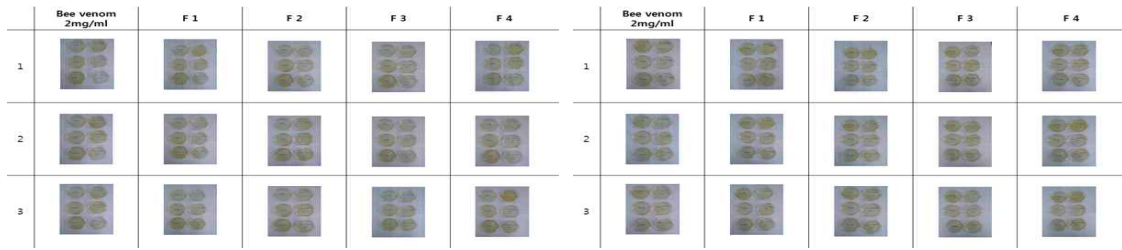


Fig 4.27. 생균수 시험 (일반세균) (2 주) Fig 4.28. 생균수 시험 (일반세균) (4 주)

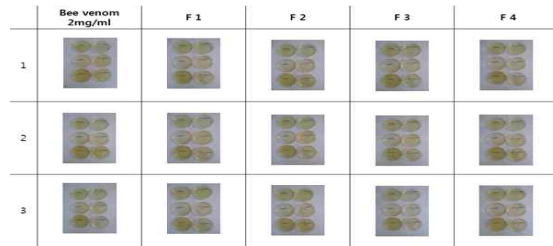


Fig 4.29. 생균수 시험 (일반세균) (4 주)

Table 4.18. 생균수 시험 결과 (일반세균)

	0 일	1 주	2 주	4 주	8 주
Bee venom sol. - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Bee venom sol. - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Bee venom sol. - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 1 - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 1 - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 1 - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

- 시험 기간 중 어느 페트리접시에서도 일반세균의 군집이 발견되지 않았다.
- 제형 중 어느 제형 중에도 시험 기간 중 일반세균이 번식하지 않았다.
- 이것은 제형에 들어가 있는 antibacterial agent이든지, 봉독 자체의 항미생물 효과에 의해서 나타난 결과라고 판단

② 생균수 시험 (진균)

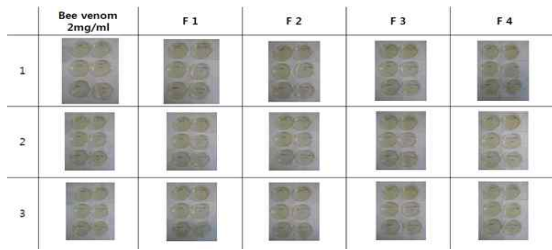


Fig 4.30. 생균수 시험 (진균) (0 일)

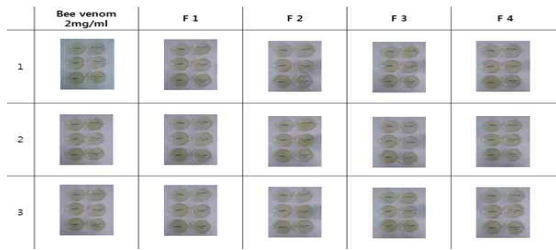


Fig 4.31. 생균수 시험 (진균) (1 주)

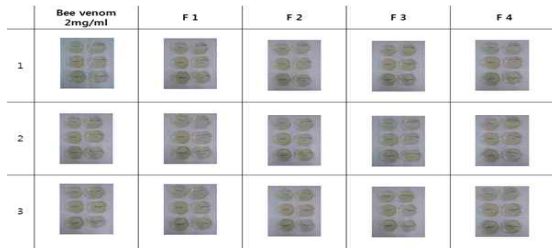


Fig 4.32. 생균수 시험 (진균) (2 주)

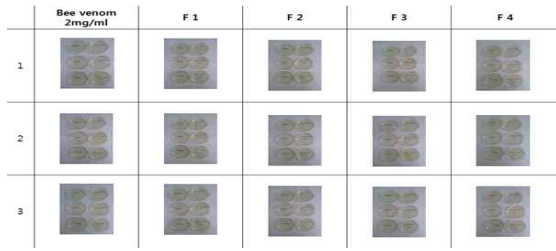


Fig 4.33. 생균수 시험 (진균) (4 주)

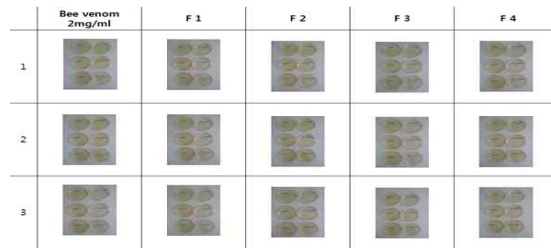


Fig 4.34. 생균수 시험 (진균) (8 주)

Table 4.19. 생균수 시험 결과 (진균)

	0 일	1 주	2 주	4 주	8 주
Bee venom sol. - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Bee venom sol. - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Bee venom sol. - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 1 - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 1 - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 1 - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 1	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 2	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

- 시험 기간 중 어느 페트리접시에서도 진균의 균집이 발견되지 않았다.
- 제형 중 어느 제형중에도 시험 기간 중 진균이 번식하지 않았다.
- 이것은 제형에 들어가 있는 antibacterial agent이든지, 봉독 자체의 항미생물 효과에 의해서 나타난 결과라고 판단

③ 특정 미생물 시험

㉞ 녹농균

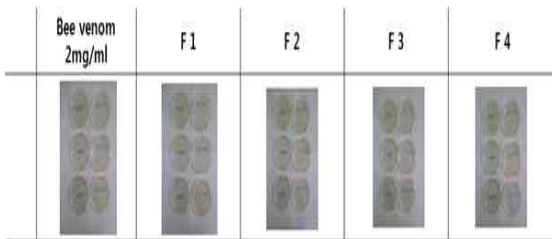


Fig 4.35. 특정 미생물 시험 (녹농균) (0 일)

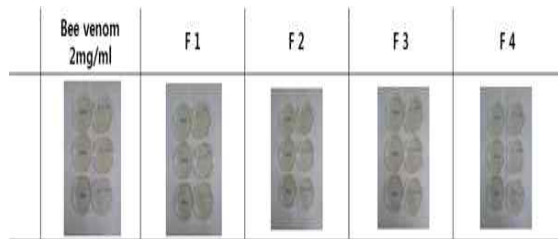


Fig 4.36. 특정 미생물 시험 (녹농균) (1 주)

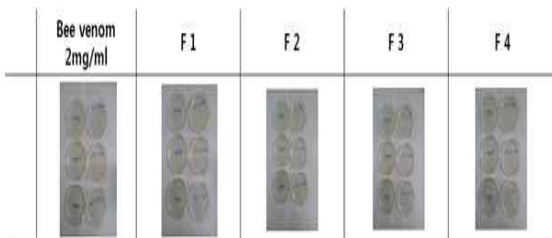


Fig 4.37. 특정 미생물 시험 (녹농균) (2 주)

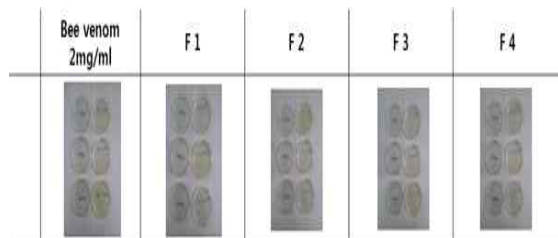


Fig 4.38. 특정 미생물 시험 (녹농균) (4 주)

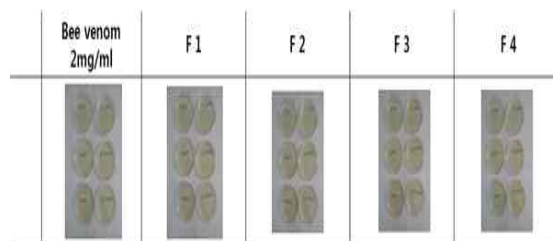


Fig 4.39. 특정 미생물 시험 (녹농균) (8 주)

㉞ 대장균

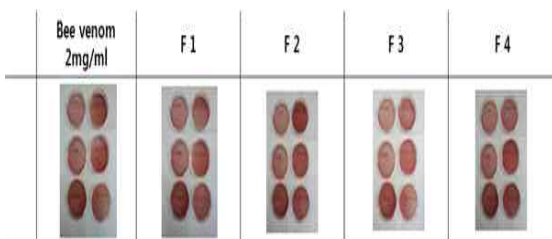


Fig 4.40. 특정 미생물 시험 (대장균) (0 일)

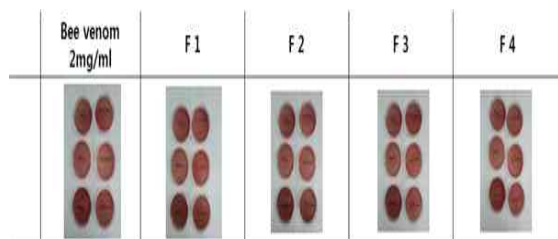


Fig 4.41. 특정 미생물 시험 (대장균) (1 주)

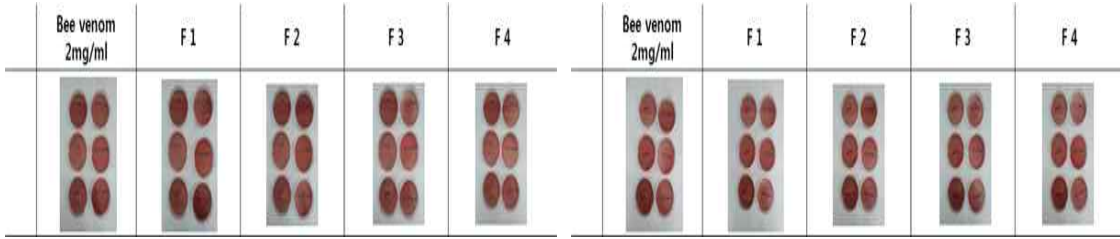


Fig 4.42. 특정 미생물 시험 (대장균) (2 주)

Fig 4.43. 특정 미생물 시험 (대장균) (4 주)

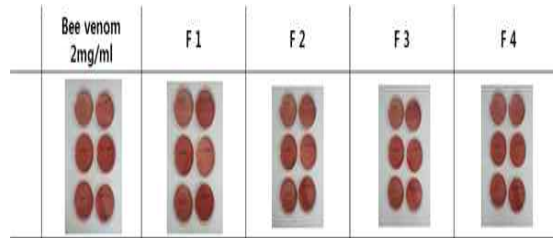


Fig 4.44. 특정 미생물 시험 (대장균) (8 주)

㊤ 살모넬라

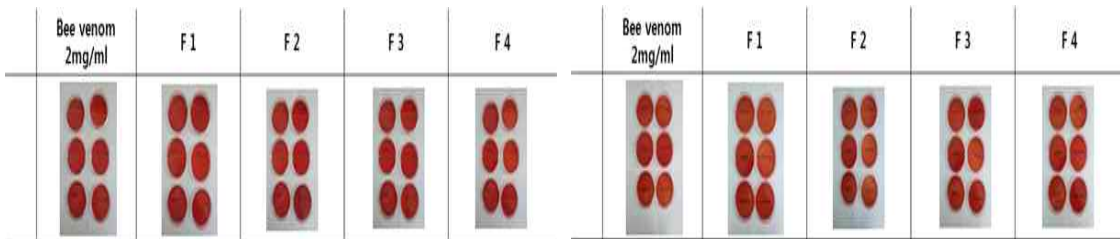


Fig 4.45. 특정 미생물 시험 (살모넬라) (0 일)

Fig 4.46. 특정 미생물 시험 (살모넬라) (1 주)

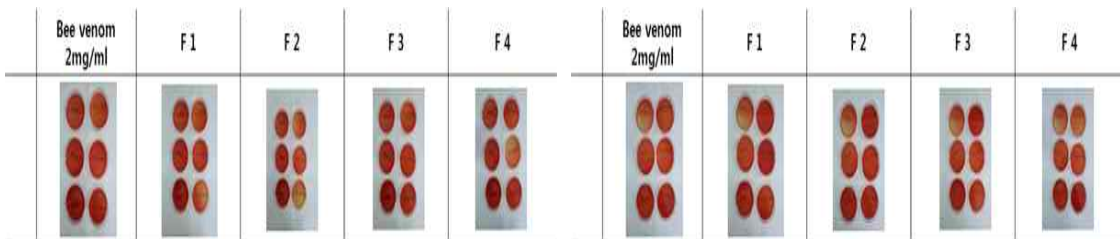


Fig 4.47. 특정 미생물 시험 (살모넬라) (2 주)

Fig 4.48. 특정 미생물 시험 (살모넬라) (4 주)

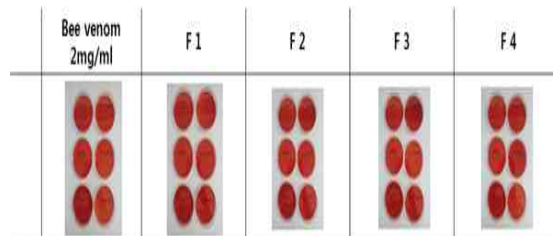


Fig 4.49. 특정 미생물 시험 (살모넬라) (8 주)

㉔ 황색포도상구균

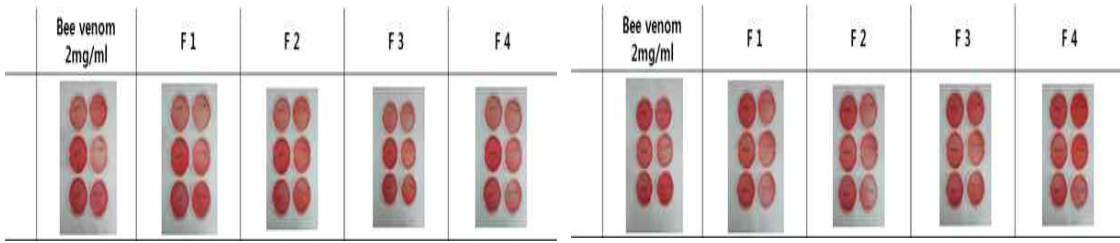


Fig 4.50. 특정 미생물 시험 (황색포도상구균) (0 일) Fig 4.51. 특정 미생물 시험 (황색포도상구균) (1 주)

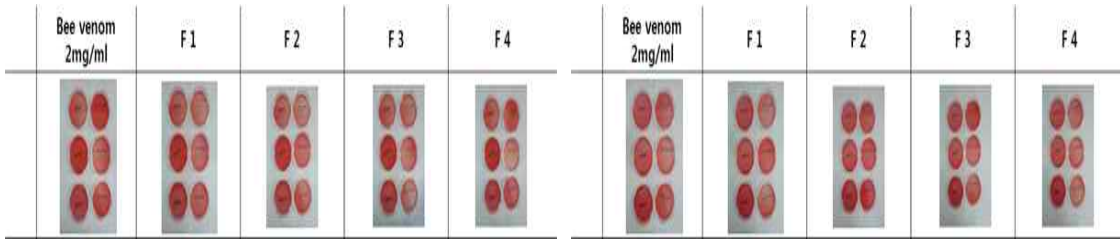


Fig 4.52. 특정 미생물 시험 (황색포도상구균) (2 주) Fig 4.53. 특정 미생물 시험 (황색포도상구균) (4 주)

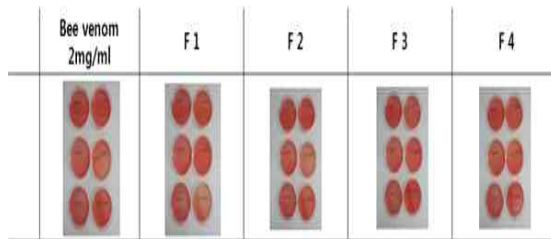


Fig 4.54. 특정 미생물 시험 (황색포도상구균) (8 주)

Table 4.20. 특정미생물 시험 결과

		0 일	1 주	2 주	4 주	8 주
Bee venom sol. - 1	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Bee venom sol. - 2	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Bee venom sol. - 3	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 1 - 1	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 1 - 2	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

F 1 - 3	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 1	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 2	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 2 - 3	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 1	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 2	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 3 - 3	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 1	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 2	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
F 4 - 3	대장균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	살모넬라	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	녹농균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	포도상구균	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

- 시험 기간 중 어느 페트리접시에서도 특정미생물의 군집이 발견되지 않았다.
- 제형 중 어느 제형 중에도 시험 기간 중 특정미생물이 번식하지 않았다.
- 이것은 제형에 들어가 있는 antibacterial agent이든지, 봉독 자체의 항미생물 효과에 의해서 나타난 결과라고 판단.

(

사) SDS-PAGE를 이용한 봉독 내 멜리틴과 phospholipase A2 확인

(밴드순서: 왼쪽부터 Marker, standard bee venom, bee venom sol., F 1, F 2, F 3, F4)

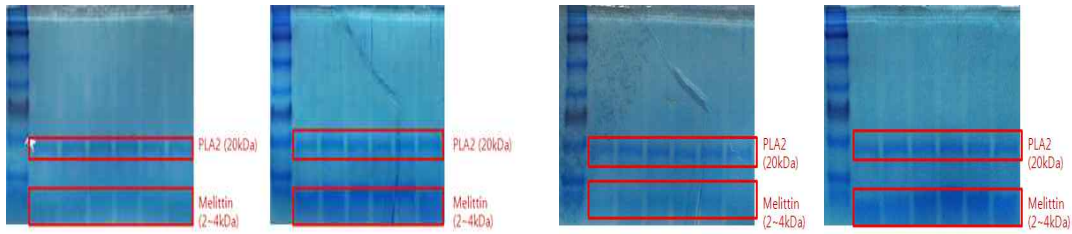


Fig 4.55. SDS-PAGE 결과 (0 일)

Fig 4.56. SDS-PAGE 결과 (1 주)

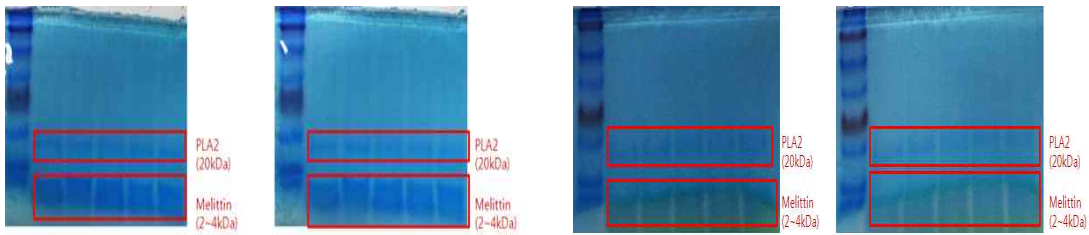


Fig 4.57. SDS-PAGE 결과 (2 주)

Fig 4.58. SDS-PAGE 결과 (4 주)

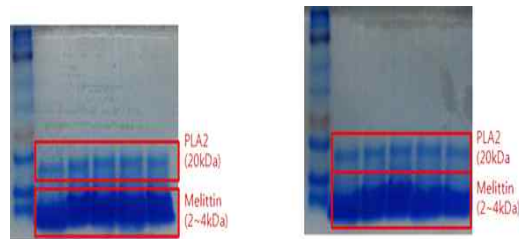


Fig 4.59. SDS-PAGE 결과 (8 주)

- 시험기간 동안 각각의 제형에서 봉독의 가장 많은 함량을 차지하는 phospholipase A 2 와 melittin을 각 제형에서 함유하고 있는 것을 확인할 수 있었다.
- 시험기간 동안 각각의 제형에서 봉독의 가장 많은 함량을 차지하는 phospholipase A 2 와 melittin을 각 제형에서 분해되지 않았다는 것을 확인할 수 있었다.
- 표준 봉독의 밴드 이외의 밴드가 나온다면 제형 중에서 봉독이 분해 또는 응집이 일어났다는 의미일 것이다. 하지만 표준 봉독의 밴드와 같다면 봉독의 일차 구조는 안정하게 봉입되었다는 의미이다. 이것으로 보아 봉독이 일차 구조상 변형, 분해, 응집 없이 안정이 제형에 함유되어 있다고 판단.

(아) 멜리틴 용출 시험

① Bee venom solution

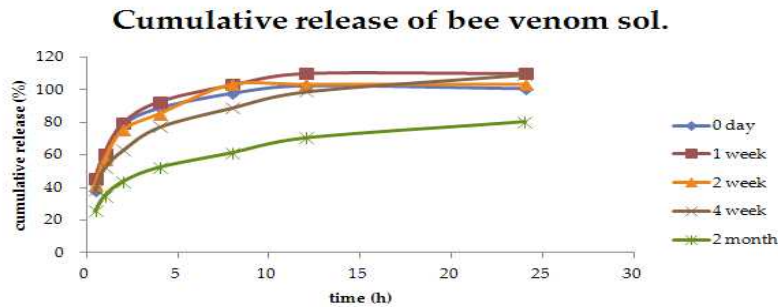


Fig 4.60. Bee venom solution 용출 결과

- 4주까지는 10분 안에 대부분이 용출되는 경향을 보여주었다.
- 2개월은 방출 경향이 이전 것 보다 서방출인 것이 관찰되었다.
- Spray 제형은 희석하여 바로 사용하는 제형이기 때문에 매우 짧은 시간 안에 확산되어 봉독이 희석액 안에 퍼져야 한다. 하지만 2개월은 느린 방출을 보여주었기 때문에 제형을 희석하여 동물들에게 적용 시 고르게 약물을 투여하지 못하게 된다.
- 봉독을 단지 물에만 녹인 제형은 동물들에게 제형을 적용 시 문제가 될 것이라 판단됨.

② Fomulation 1

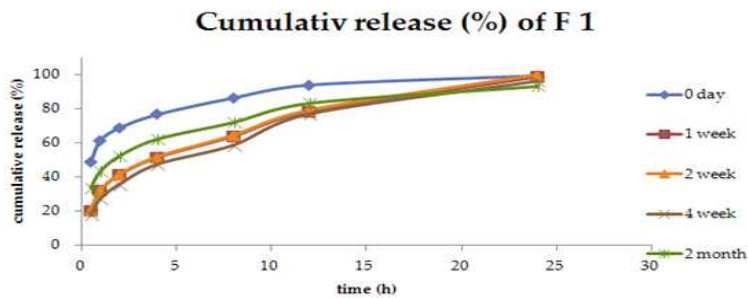


Fig 4.61. Fomulation 1 용출 결과

- 전체적으로 2달간 서방출의 경향을 보여주었다.
- 이것은 HPMC에 의한 점도 증진의 효과로 판단
- 본 제형은 안과형 제형을 변형한 제형이기에 안과 적용시 좋을 것으로 판단되나 전남대 연구에서 안과 투여보다는 피부 쪽에 뿌리는 것이 효과가 더 좋았던 것으로 보아 spray 제형으로 사용시는 약간 문제가 있을 것이라 판단됨.
- 그 이유는 상기한 것 처럼 희석 후 바로 분무하여 가금류에게 적용해야하는데 희석 후 제형을 적용하는데 시간이 오래 걸리거나 희석 후 물리적인 힘을 가해 고르게 섞어주는 노력이 필요하다고 판단했기 때문이다.

③ Fomulation 2

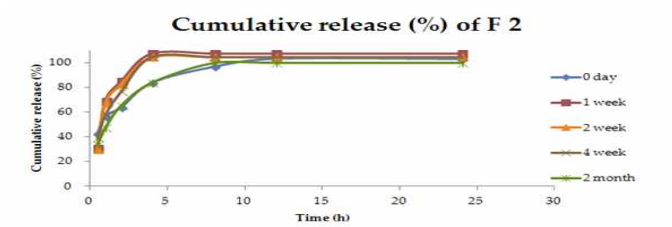


Fig 4.62. Fomulation 2 용출 결과

- 전체적으로 10분 안에 대부분의 봉독이 용출되는 것이 관찰되었다.
- 제형의 삼투압이 높아 빠른 확산과 용출에 의한 결과라 판단됨.
- 희석 후 물리적인 힘의 적용 없이 분무 시까지 충분히 짧은 시간 안에 고르게 섞일 수 있을 것이라 판단.

④ Fomulation 3

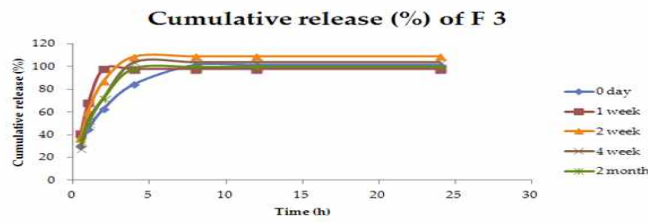


Fig 4.63. Fomulation 3 용출 결과

- 전체적으로 10분 안에 대부분의 봉독이 용출되는 것이 관찰되었다.
- 제형의 삼투압이 높아 빠른 확산과 용출에 의한 결과라 판단됨.
- 희석 후 물리적인 힘의 적용 없이 분무 시까지 충분히 짧은 시간 안에 고르게 섞일 수 있을 것이라 판단.

⑤ Fomulation 4

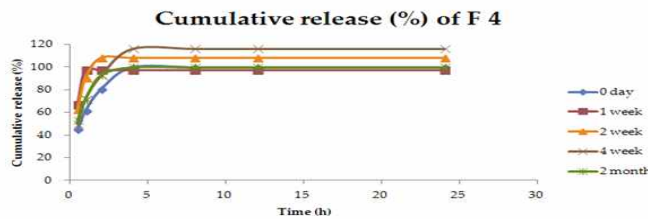


Fig 4.64. Fomulation 4 용출 결과

- 전체적으로 10분 안에 대부분의 봉독이 용출되는 것이 관찰되었다.
- 제형의 삼투압이 높아 빠른 확산과 용출에 의한 결과라 판단됨.
- 희석 후 물리적인 힘의 적용 없이 분무 시까지 충분히 짧은 시간 안에 고르게 섞일 수

있을 것이라 판단.

- ⑥ 결론: 제형의 안정성 등의 요소들을 다 제외하고 제형을 동물에게 적용 시 희석 후 분무까지의 과정만을 고려했을 시 F 2~3이 알맞을 것이라 판단됨. F 1이든지 단지 봉독만이 포함된 용액은 봉독을 분무 전 고르게 섞이게 하기 위해 물리적인 힘이 필요하다고 판단.

(자) MTT test를 이용한 세포 독성 시험

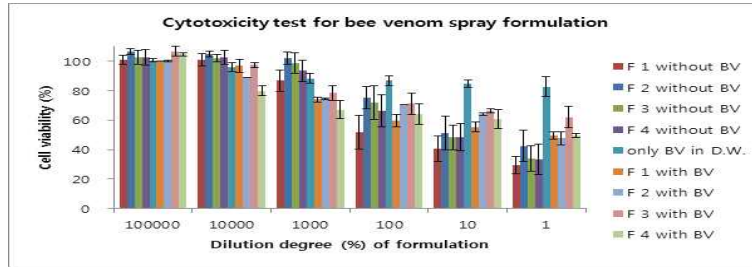


Fig 4.65. Spray 제형들의 세포 독성 시험 결과

- 봉독이 포함되지 않은 용제에서만 세포독성을 살펴보면 F 2 제형이 다른 제형들 보다 세포독성이 적다고 판단됨.
- 단지 봉독만을 녹인 용액의 결막세포에 대한 세포독성은 거의 없다고 판단됨.
- 봉독은 단백질 이므로 결막세포를 보호한다고 판단됨.
- 각 용제에 봉독을 첨가함에 따라 세포독성이 줄어들었다는 것을 확인
- F 2 ~ 3 의 독성은 높은 삼투압에 의한 독성 효과라고 판단됨
- 전체적으로 실제 적용 농도에서의 세포독성이 있기 때문에 각각의 제형을 눈에 적용하는 것 보다는 다른 투여 부위에 적용하는 것이 좋다고 판단됨. 이 결과는 전남대의 눈에 적용한 것보다 다른 등과 같은 부위에 분무 시 효과가 있었다는 것과 조화를 이루는 결과이다.

3. 봉독 봉입된 서방형 입자

가. 1차 PLGA 나노 입자 연구

- (1) 제조 방법 : 10mg 봉독을 0.25ml 증류수에 녹인다. => 100mg PLGA 50:50을 1ml dichloromethane 또는 acetic acid에 넣어서 녹인다. 위의 두용액을 분산시키며 ultrasonication을 1분간 시행한다. (W₁/O 1차 에멀전 형성) => 미리 제조한 2% PVA(w/v) 용액 5ml에 위 에멀전을 소량씩 적하하면서 sonication을 10분간 시행한다.(W₁/O/W₂ 2차 에멀전 형성) => 유기 용매를 증발시키기 위해 24시간 동안 상온에서 교반하여 dichloromethane을 증발시킨다. => dichloromethane 증발 후, 10000rpm에서 30분간 원심 분리하여 생성된 나노입자를 모은다. => 최종적으로, 여액을 버리고 3회 증류수 세척 후 동결건조 한다.

(2) 봉입률 측정 :

(가) 목적 및 방법 :

- 나노 입자에 봉입된 봉독의 양을 알아보기 위하여 제조된 나노입자에 5ml dichloromethane을 넣어 PLGA 나노입자를 완전히 용해시킨 뒤 봉입된 약물을 유출시킨다.
- 질소 건조 하에서 dichloromethane을 제거 후, 2ml 증류수를 첨가한다.
- 멜리틴의 농도를 HPLC로 파장 220nm에서 분석한다.

(나) 결과 : Dichloromethane을 사용하여 만든 입자 두 가지와 acetic acid를 사용하여 만든 입자의 봉입률을 측정한 결과 4 ~ 5% 의 봉입률이 얻어졌다.

Table 4.21. PLGA 입자 봉입률

Sample	Area	Conc. (ug/mL)	Average (ug/mL)	Encapsulation efficiency(%)
Dichloromethane 사용 나노 입자 1	637.9	49.30	49.10	4.12
	620.4	48.20		
	645.9	49.81		
Dichloromethane 사용 나노 입자 2	679.6	51.94	51.80	4.35
	691.4	52.69		
	661.1	50.77		
Acetic acid 사용 나노 입자	858.9	63.29	62.88	5.28
	814.9	60.51		
	883.5	64.85		

(3) 나노입자 SEM image 촬영

(가) 목적 및 방법 : 제조된 나노 입자가 고른 구형입자와 매끄러운 표면을 갖는지 확인하기 위하여 SEM image를 통해 확인

(나) 결과 : 약 100~200nm의 고른 구형 입자가 형성됨.

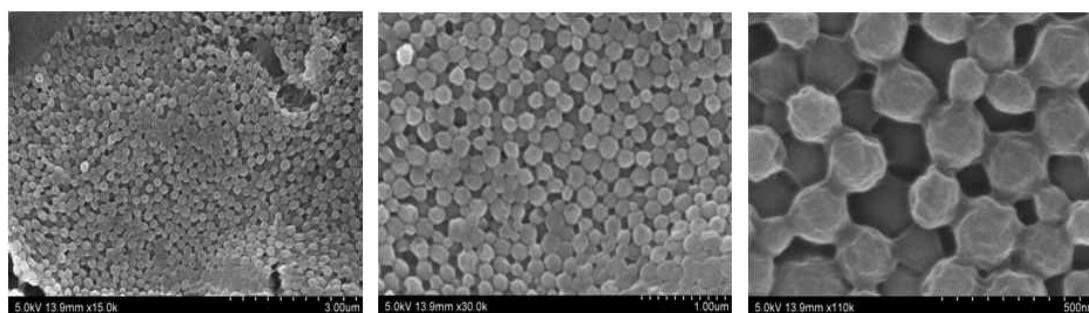


Fig 4.65. PLGA 입자의 SEM 이미지

(4) 계면활성제 첨가하여 입자 제조 :

(가) 목적 및 방법 : 입자 제조 시 계면활성제의 영향을 알아보기 위해 PLGA 입자를 제조하였다. 위의 나노 입자 제조 방법을 따르고 제조 전에 유기 용매에 1%(w/v) 계면활성제 (Lecithin, Span 80)을 넣어준다. 나머지는 같은 방법으로 제조하고 봉입률 측정.

(나) 결과 : 오히려 계면활성제를 첨가하지 않은 대조군에 비해 더 낮은 봉입률을 보여주었다. 계면활성제를 첨가함으로써 수층에 있던 봉독이 유상으로 더 쉽게 빠져나간 것으로 보인다.

Table 4-21. PLGA 입자 봉입률

Sample	Area	Conc.(ug/ml)	Average Conc.(ug/ml)	Encapsulation efficiency(%)
Control	350.3	34.95	31.40	3.52
	323.4	32.47		
	261.7	26.78		
1% Lecithin 첨가	145.7	16.09	16.08	1.91
	139.7	15.54		
	151.2	16.60		
1% Span 80 첨가	183.3	19.56	19.58	2.33
	190.5	20.22		
	176.9	18.97		

(5) PLGA 입자 외형 안정성 확인

(가) 목적 및 방법 : 제조된 나노 입자를 상온에서 2달(60일)간 저장 할 때 고른 구형입자와 매끄러운 표면을 유지하고 안정성을 확보하는지 확인하기 위하여 SEM image를 통해 육안으로 확인.

(나) 결과 : 2달 후에도 구형 입자의 형태를 유지하고 있음.

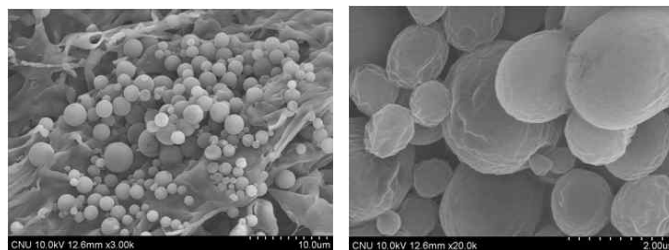


Fig 4.66. 제조 2달 후 PLGA 입자의 SEM 이미지

나. 봉독 gelatin nanoparticle

(1) 제조 및 입자 규명

(가) 목적 및 방법 : 40mg gelatin type B를 2ml 증류수에 넣고 30분간 50℃로 가열하여 완전히 녹인다. => 이 용액에 5mg의 봉독을 넣고 교반시킨다. => 얻어진 용액을 1.28g poloxamer 407을 포함한 30ml 에탄올에 교반 중에 적하한다. => 형성된 현탁액에 4% w/v glutaraldehyde 80ul을 넣고 12시간 동안 교반하여 crosslink시킨다. => 현탁액을 10000rpm에서 30분간 원심분리하고 얻어진 입자를 동결건조 한다.

(2) 나노입자 SEM image 촬영

(가) 목적 및 방법 : 제조된 나노 입자가 고른 구형입자와 매끄러운 표면을 갖는지 확인하기 위하여 SEM image를 통해 육안으로 확인

(나) 결과 : 고른 둥근 입자가 관찰되었음.

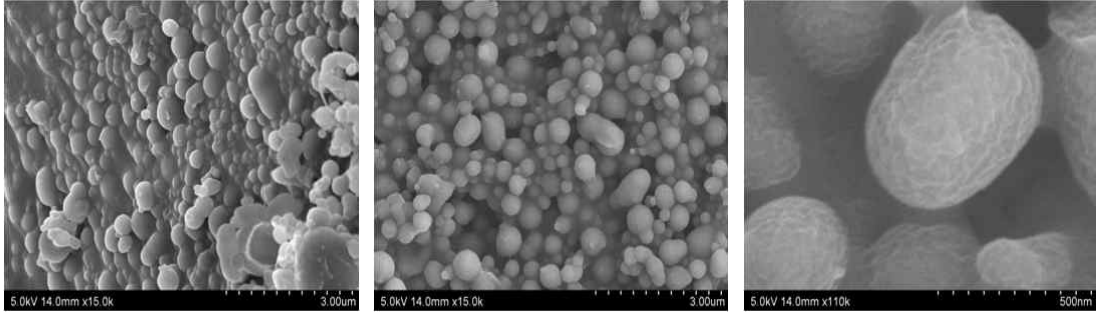


Fig 4.67. 젤라틴 입자의 SEM 이미지

(3) 젤라틴 입자 봉독 봉입률 측정

(가) 목적 및 방법 : 젤라틴 입자내 봉독 물질의 봉입률을 조사하기 위해 BCA 정량을 시행하였다. 각 샘플은 봉독을 함유한 젤라틴 입자, 대조군 젤라틴 입자, 젤라틴, 트립신을 샘플로 하여 진행하였다. 20mg의 입자(이론상 봉독 함유량 1780ug)을 3ml 증류수와 20mg trypsin을 넣고 녹인 후 BCA 정량 진행, 다른 샘플 조건도 같도록 함.

(나) 결과 : 봉독을 넣지 않은 젤라틴 입자를 대조군으로 하면, 약 274.5902ug/ml(총 823.5ug)의 단백질 함량을 나타낸다. 봉입률로 계산하면 약 46.26%를 나타냄.

(4) 젤라틴 입자 외형 안정성 확인

(가) 목적 및 방법 : 제조된 나노 입자를 상온에서 2달(60일)간 저장 할 때 고른 구형입자와 매끄러운 표면을 유지하고 안정성을 확보하는지 확인하기 위하여 SEM image를 통해 육안으로 확인.

(나) 결과 : 2달 후에도 구형 입자의 형태를 유지하고 있음.

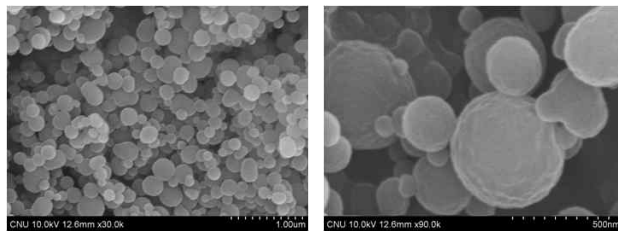


Fig 4.68. 제조 2달 후 젤라틴 입자의 SEM 이미지

(5) 펠리틴의 분석한계

- 목적 및 방법 : 젤라틴 입자 제조 시 구성 물질이 봉독에 대한 영향을 조사하기 위해 아래와 같은 조성으로 실험을 진행. 대조군으로 봉독 5mg을 2ml 증류수에 녹인 것을 사용하였으며 다른 glutaraldehyde의 영향, 입자를 분해시키기 위해 첨가하는 trypsin에 대한 영향을 보기 위해 시행하였다.

Table 4.22. 젤라틴 입자에 대한 glutaraldehyde 및 trypsin의 영향

Sample	Bee venom (mg)	4% glutaraldehyde (ul)	25% glutaraldehyde (ul)	Trypsin (mg)	Water (ml)
Control	5				2
Glu 4% + bee venom	5	100			2
Glu 25% + bee venom	5		100		2
Trypsin + bee venom	5			40	2

- 결과 : 봉독과 trypsin 혼합 용액에서 멜리틴의 피크가 관찰되지 않았음.

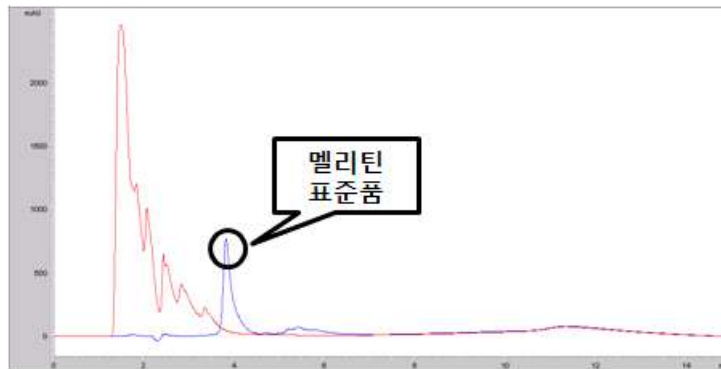


Fig 4.69. 봉독과 trypsin 혼합 용액의 피크와 멜리틴 표준품의 피크

봉독과 4% glutaraldehyde, 25% glutaraldehyde 혼합 용액의 피크에서도 멜리틴 피크가 관찰되지 않음.

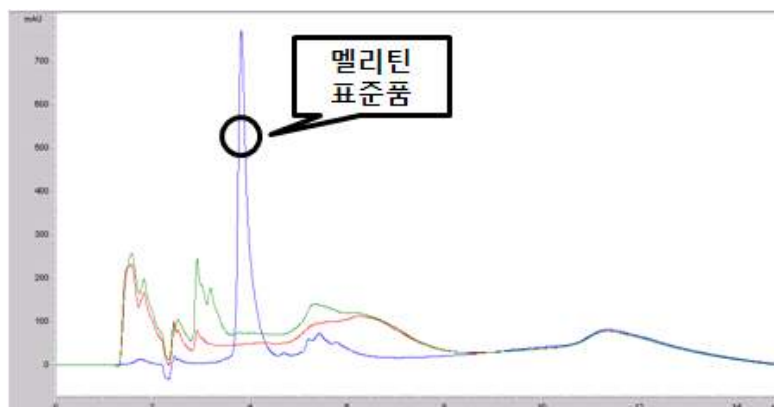


Fig 4.70. 봉독과 4% glutaraldehyde, 25% glutaraldehyde 혼합 용액의 피크와 멜리틴 표준품의 피크

(6) BSA를 이용한 장용성 입자제조

(가) BSA 장용성 입자 제조 방법 (Spray-dry 방법)

- 목적 및 방법 : 향후 봉독의 경구형 제형개발을 위하여 위산에서 분해를 저지하기 위해서는 장용성제형이 필요함, 따라서, 봉독 대체 단백질로 BSA를 사용하여 장용성

입자를 제조하고자 장용성 물질로 Eudragit을 사용하여 pH 5.5 이상에서 약물이 방출될 수 있도록 적합한 제형을 찾기 위해 시행.

- 제조 조건 :

- ◆ Eudragit 종류 : L100-55 (장용성 pH 5.5), => 분말상태
- ◆ 1g BSA/30ml 증류수와 3, 5, 7, 9g Eudragit/200ml 에탄올을 혼합하여 1시간 동안 교반한다. 이 현탁액을 분무하여 spray dry한다.
- ◆ Spray dry 조건 :
- ◆ 온도 : 180도
- ◆ 분사압 : 15kPa
- ◆ 유속 : 20ml/min

(나) 장용성 물질 비율별 방출 실험목적 및 방법 :

- 약물과 Eudragit L100-55의 비율에 따른 방출 양상을 보기 위해 1:3, 1:5, 1:7, 1:9 비율로 spray dry를 사용하여 제조. 제조된 입자는 pH 1.2, pH 6.8, 증류수를 media로 하여 10분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간에 샘플을 취하여 BCA 분석
- 결과 : 초기 2시간 이내에 BSA 대부분이 방출되는 모습을 보여줌. pH 1.2 media에서 비율별 방출 양상으로 Eudragit L100-55의 비율이 증가 할수록 BSA 방출량이 감소함. 1:9 비율이 가장 느린 방출을 나타냄. 최대 방출량은 약 800ug/ml을 보인다.

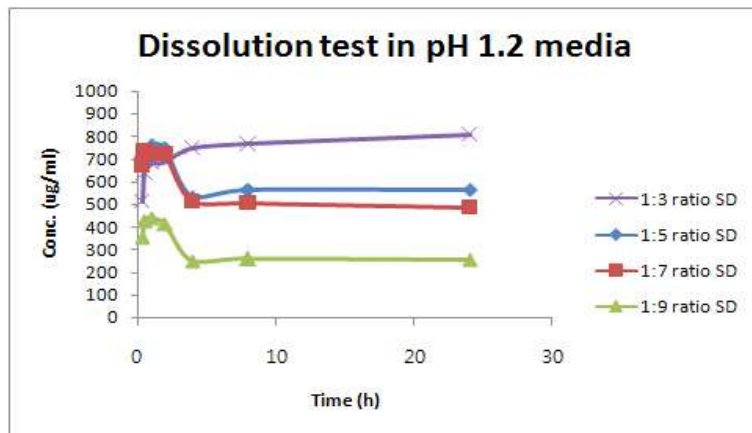


Fig 4.71. pH 1.2 media에서 비율별 방출 양상

pH 6.8 media에서 비율별 방출 양상으로 Eudragit L100-55의 비율이 증가 할수록 BSA 방출량이 감소함. 1:9 비율이 가장 느린 방출을 나타냄. 최대 방출량은 약 1400ug/ml가 나타나며 장용 pH에서 높은 방출을 나타내었다.

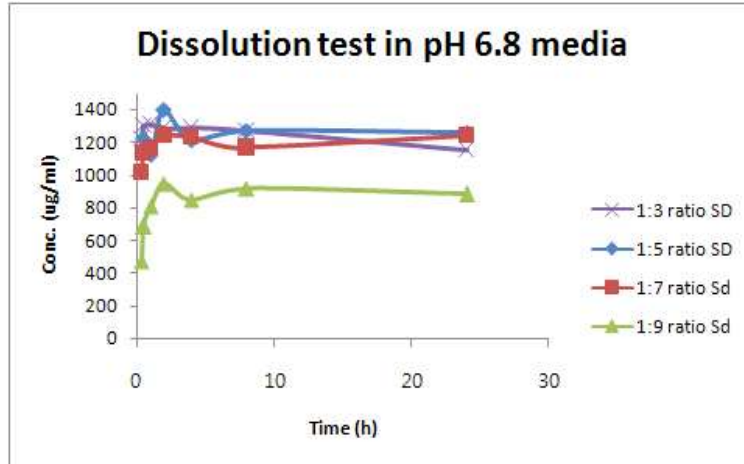


Fig 4.72. pH 6.8 media에서 비율별 방출 양상

증류수에 비율별 방출 양상으로 비율에 따른 규칙성이 나타나지 않음. 1:7 비율이 가장 방출량이 높고 1:5의 경우가 가장 낮은 방출량이 나타났다.

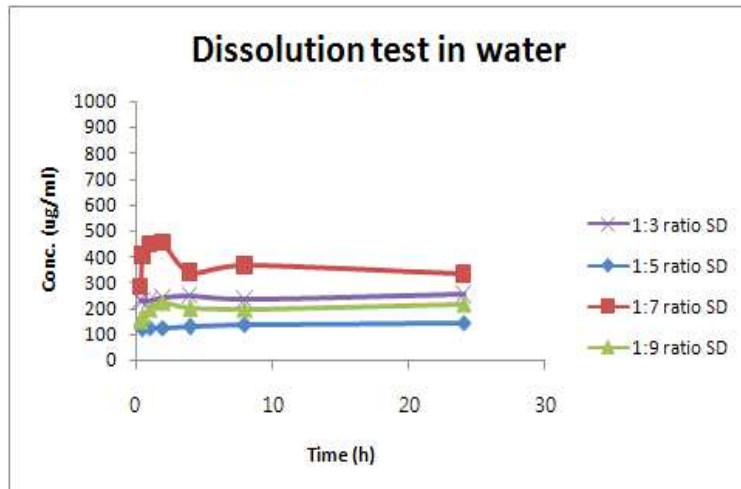


Fig 4.73. 증류수에서 비율별 방출 양상

다. 2차 PLGA 나노 입자 연구

- (1) 목적: 봉독을 함유한 PLGA 입자를 제조하여 한번의 투여로 1달 정도의 장기간 봉독이 방출하는 서방출 제형을 제조
- (2) 제조 방법

PLGA를 상온에서 유기용매에 녹인다. => 봉독을 0.5 ml 증류수에 녹인다. => 앞으 두 용액을 호모게나이저 또는 초음파 분쇄기를 이용하여 1차 에멀전을 만든다. => 앞 공정에서 만들어진 에멀전을 1.25% w/v PVA(polyvinylalcohol) 용액 30 ml에 넣으며 호모 게나이저 또는 초음파 분쇄기를 이용하여 2차 에멀전을 만든다. => 사용된 유기용매의 제거를 위하여 상온에서 하루 동안 유기용매를 증발 시킨다. => 유기 용매 증발된 용액은 4°C, 10000rpm으로 원심분리하여 입자들을 분리한다. => 세척을 하여 입자 표면에 남아 있는 PVA와 같은 부형제, 유기용매 등을 제거한다. => 동결건조.

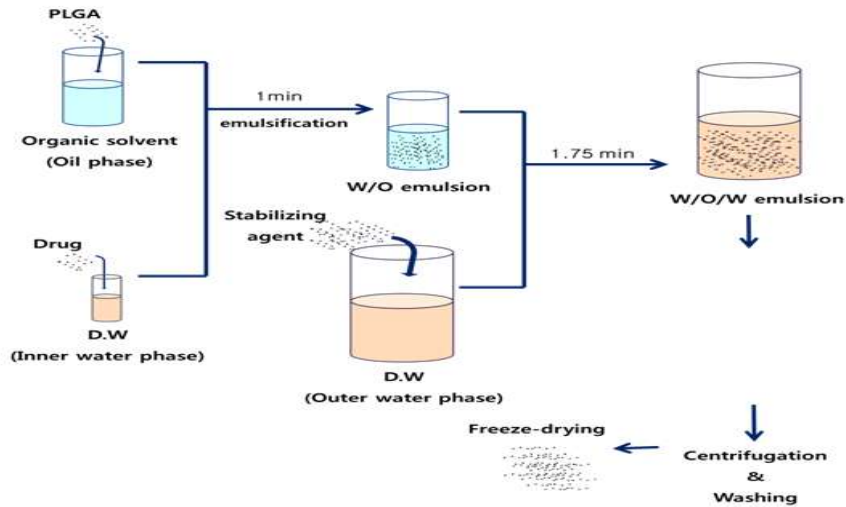


Fig 4.74. PLGA 입자 제조 모형도

(3) 입자 구성

Table 4.22. PLGA 입자 구성 요소

Formulation	Drug amount (mg)	Polymer amount (mg)	Stabilizer
V 1	15(DW 0.5ml)	PLGA R 502H 200(50:50) (Ethyl acetate 5ml) (Evonik)	1.25% (w/v) small PVA sol. 30ml
V 2	15(DW 0.5ml)	PLGA R 502H 200(50:50) (Dichloromethane (DCM) 5ml) (Evonik)	1.25% (w/v) small PVA sol. 30ml
V 3	5 (DW 0.5ml)	PLGA R 502H 200(50:50) (DCM 5ml) (Evonik)	1.25% (w/v) small PVA sol. 30ml
V 4	25(DW 0.5ml)	PLGA R 502H 200(50:50) (DCM 5ml) (Evonik)	1.25% (w/v) small PVA sol. 30ml
V 5	15(DW 0.5ml)	PLGA R 502H 100(50:50) (DCM 5ml) (Evonik)	1.25% (w/v) small PVA sol. 30ml
V 6	15(DW 0.5ml)	PLGA R 752H 200(75:25) (DCM 5ml) (Evonik)	1.25% (w/v) small PVA sol. 30ml
V 7	15(DW 0.5ml)	PLGA R 502H 200(50:50) (DCM 5ml) (Evonik)	1.25% (w/v) large PVA sol. 30ml
V 8	15(DW 0.5ml)	PLGA R 502H 200(50:50) (DCM 5ml) (Evonik) * Preparation only using homogenizer for 10min to W/O emulsion and 15min to W/O/W emulsion at 25,000rpm	1.25% (w/v) small PVA sol. 30ml

(4) 봉입률, yield, drug loading 측정

(가) 목적: PLGA 입자안에 봉독이 얼마나 함유되어 있으며(drug loading), 소비된 조성들의 양에 대한 수율(yield), 소비된 봉독에 대해 얼마나 수득된 봉독의 비율(봉입률)을 확인.

(나) 방법: 원심분리 후 상층액을 취하여 12000rpm으로 10분 동안 4℃에서 다시 원심분리하여 상층액을 HPLC로 멜리틴을 분석함. 분석하여 원심분리 후 상층액의 봉독을 봉입되지 않은 봉독으로 여겨 봉입률과 yield, drug loading을 계산한다. 봉입률과 yield, drug loading 구하는 식은 다음과 같다.

- Encapsulation efficiency (%) = Weight of the drug in particles / Weight of the feeding drug X 100
- Yield (%) = Weight of particles / Weight of the feeding polymer and drug X 100
- Drug loading (%) = Weight of the drug in particles / Weight of the particles X 100

(다) 결과

① 봉입률

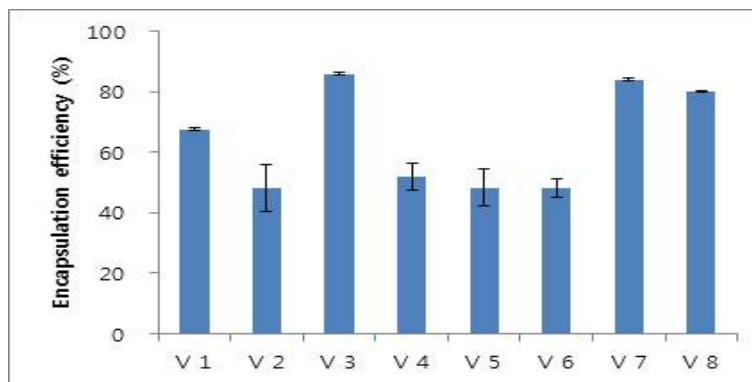


Fig 4.75. PLGA 입자 봉입률

- 에틸아세테이트를 사용했을 때 디클로로메탄을 사용한 것 보다 봉입률이 더 높다.
- 에틸아세테이트가 디클로로메탄보다 물과의 섞임성이 좋기 때문에 봉독의 외부 수상으로 빠져나가려는 힘이 디클로로메탄보다 더 적어 발생한 결과로 판단됨.
- 봉독의 양이 적을수록 봉입률이 상승하는 경향이 있다.
- 봉독은 수용성 물질이기 때문에 봉독 양이 많으면 그만큼 수용성을 띠는 물질들이 유기상에서 수상으로 빠져나가려는 경향이 커진다. 그러므로 봉독양이 적을수록 외부 수상으로 봉독이 빠져나가려는 경향이 적어지게 되고 이것은 높은 봉입률의 결과로 나타난 것이라 판단됨.
- PLGA의 양은 봉입률의 변화를 일으키지 않았다.
- 이것은 PLGA 입자에서 봉입률은 PLGA 양보다 봉독의 양에 큰 영향을 받는 것이라 판단됨.

- PLGA의 lactic acid와 glycolic acid의 비율은 봉독의 봉입에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- 이것은 역시 PLGA 입자에서 봉입률은 PLGA 형태보다 봉독의 양에 큰 영향을 받는 것이라 판단됨.
- PVA의 분자량이 클수록 봉입률이 높아진다.
- 이것은 PVA 분자량이 커질수록 외부수상의 삼투압과 점도가 높아져 내부 수상에서 유상을 가로질러 외부수상으로 봉독이 빠져나가는 힘을 상쇄시켜 발생한 결과라고 판단됨.
- 초음파 분쇄기를 사용하는 것 보다 호모게나이저만 가지고 입자를 제조하는 것이 봉입률이 더 높다.
- 이것은 초음파 분쇄기의 강한 에너지가 입자 액적에 작용하여 유기상 안의 내부 수상에 있는 봉독이 외부수상으로 빠져나올 수 있게 하는 계기를 만들어 발생한 결과라고 판단됨.
- 봉입률의 측면에서 볼 때 봉독의 양은 적게 사용하면서 PLGA 양은 200 mg으로 고정하고, 고분자량의 PVA를 사용하며 입자 제조 시 유화를 위해 사용하는 방법은 초음파 분쇄기를 사용하는 것 보다 호모게나이저를 사용하는 것이 좋다고 판단됨

② Yield

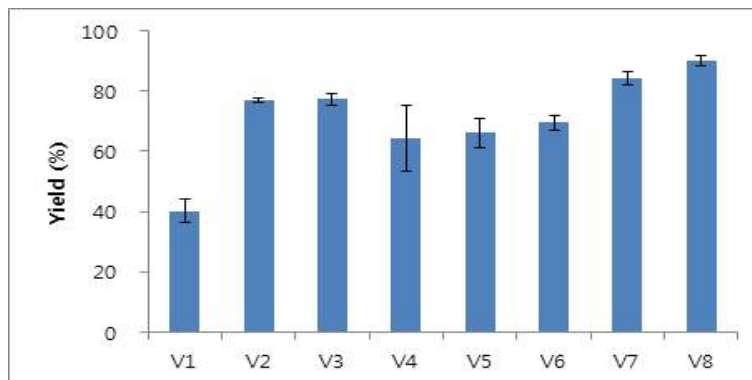


Fig 4.76. PLGA 입자 yield

- 디클로로메탄을 사용하는 것이 에틸아세테이트를 사용하는 것보다 yield가 더 높다.
- 이것은 에틸아세테이트의 물과의 섞임성 때문일 것이라 판단. 물과의 섞임성이 좋기 때문에 봉독은 이 성질 때문에 외부로 빠져나가는 게 덜할 수 있으나 전체적으로 수득되는 양에서 볼 때 봉독의 양은 고분자의 양보다 매우 적기 때문에 수득률에 큰 영향을 미치지 않는다. 고분자 자체는 물과 섞여 수득되는 양이 적어질 수 있다. 그렇기 때문에 입자 제조 과정 중 소실되는 고분자 양이 많아진다고 판단됨.
- 봉독의 양은 yield에 큰 영향을 미치지 않는다. 그 이유는 전체 수득량으로 봤을 때 사용되는 봉독양이 고분자 양보다 매우 적기 때문이다.
- PLGA 양의 감소는 yield의 감소를 유발하였다.

- 이것은 PLGA 양이 적어 그만큼 물과 섞일 수 있는 PLGA 양이 전체적으로 보았을 때 커지기 때문이라고 판단됨.
- PLGA 고분자 형태는 yield에 영향을 미친다. 이것으로 보아 PLGA (50:50)보다 PLGA (75:25)가 좀 더 물과의 섞임성이 좋다고 판단됨.
- 고 분자량의 PVA를 사용했을 때 저 분자량의 PVA를 사용했을 때 보다 yield가 더 높다.
- 이것은 봉입률에서의 해석과 마찬가지로 고분자량의 PVA가 외부 수상의 삼투압과 점도를 높여 고분자와 봉독이 외부수상과 섞이는 것을 막기 때문이라고 판단됨.
- 유화를 위하여 호모게나이저를 사용했을 때 초음파 분쇄기를 사용했을 때 보다 yield가 높다.
- 이것은 초음파 분쇄기를 강한 에너지가 고분자를 아주 작게 만들어 그만큼 물과의 섞임성이 좋아지기 때문이라고 판단됨.
- Yield 측면에서 보았을 때 디클로로메탄을 유기용매로 사용하여 고분자 양은 200 mg 와 고 분자량의 PVA를 사용하여 호모게나이저로 유화하는 것이 좋을 것이라 판단.

③ Drug loading

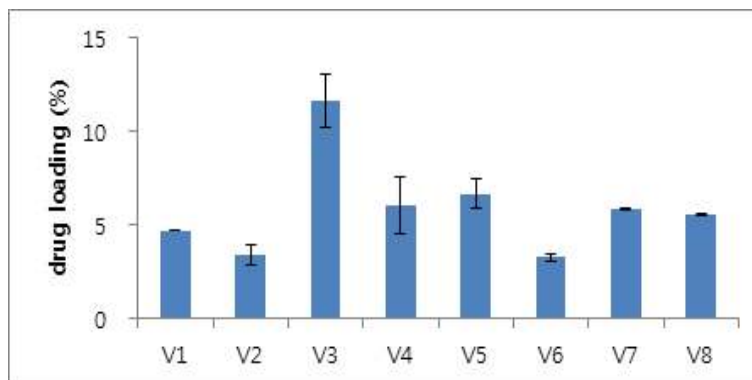


Fig 4.77. PLGA 입자의 drug loading

- 에틸아세테이트를 사용했을 때 디클로로메탄을 사용했을 때 보다 drug loading이 약간 높았다.
- 이것은 에틸아세테이트의 yield값은 매우 적고 봉입률 값은 높기 때문이다. 적은 고분자에 많은 봉독이 봉입되어있는 경우라 볼 수 있기 때문에 drug loading이 높은 값을 나타낸다고 판단됨.
- 봉독을 적게 사용할수록 drug loading 값이 높다.
- 이것은 봉독의 양이 적음으로 봉입률은 높아 봉독의 양이 많아지기 때문이라고 판단됨.
- PLGA 고분자 양이 적을수록 drug loading 값은 높다
- 이것은 drug loading 값을 계산하는 분모인 전체 입자 무게가 고분자 양의 감소로 인해 감소하기 때문에 drug loading 값이 높아진 것이라 판단됨.

- 고분자 형태는 drug loading에 큰 영향을 미치지 않는다.
- 고 분자량의 PVA를 사용했을 때 저 분자량의 PVA를 사용했을 때 보다 drug loading 값이 2배정도 높다.
- 이것은 고 분자량의 PVA를 사용함으로써 봉입률의 상승으로 인해 봉입되는 봉독의 양이 많아졌기 때문이라고 판단됨.
- 유화를 위해 호모게나이저를 사용했을 때 초음파 분쇄기를 사용했을 때 보다 drug loading 값이 더 높다.
- 이것은 호모게나이저를 사용함으로써 봉입률이 상승하여 봉입되는 봉독의 양이 많아졌기 때문이라고 판단됨.
- Drug loading 측면에서 보았을 때 봉독의 양을 적게 사용하고 고 분자량의 PVA를 사용하며, 유화를 위해 호모게나이저를 사용하는 것이 좋다고 판단됨.
- 봉입률과 yield, drug loading을 전체적으로 고려했을 시 봉독 양은 15 mg으로 고정하고, PLGA 양은 200 mg으로하며, 내부 수상과 유기상의 부피는 0.5 ml와 4 ml로 하고, 외부수상의 안정화제로서는 고 분자량의 PVA를 사용해야 한다고 판단됨. 또 이것을 사용함으로써 부족한 부분은 첨가제를 넣어 보충할 수 있다고 판단됨. 유화단계에서는 초음파 분쇄기를 사용하지 않고 호모게나이저만을 사용해야 한다고 판단됨.

(5) FT-IR 측정

(가) 목적: 봉독이 PLGA입자 안에 제대로 봉입되었는지 확인.

(나) 방법: Infrared(IR) spectroscopy는 Thermo Nicolet 380 Spectrophotometer를 사용하여 측정되었고 스윕트럼은 $500\sim 4000\text{cm}^{-1}$ 의 파장 범위로 기록되었다. 샘플은 KBr 법으로 disc에 압축되어 측정되었다.

(다) 결과:

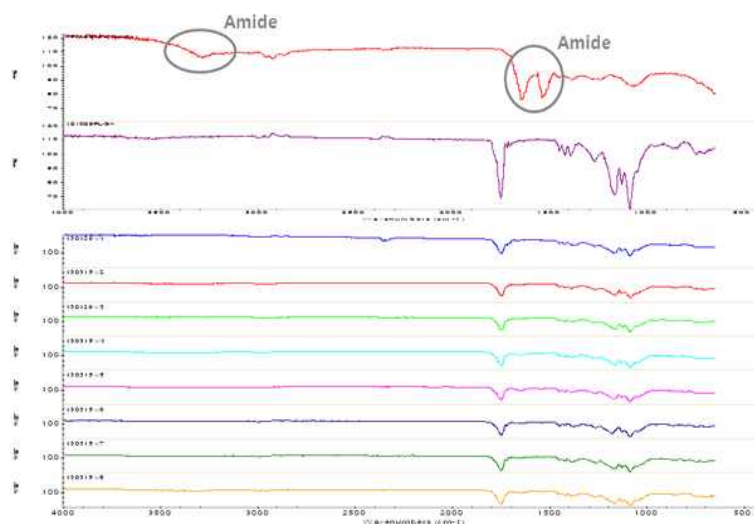


Fig 4.78. PLGA 입자의 FT-IR 결과

- 봉독의 주요 피크는 1600 과 3300cm^{-1} 에서 나타나는데 이는 단백질의 특징적인 피크

인 amide bond에 대한 피크이다.

- 모든 입자의 피크들은 1600, 3300cm⁻¹에서 피크를 가지지 않는다.
- 모든 입자들의 스펙트럼은 PLGA의 스펙트럼과 유사하다.
- 이것은 봉독과 PLGA가 물리적으로 섞여있는 상태가 아니라 봉독이 완벽하게 PLGA에 의해 봉입되어 있다는 것을 추측할 수 있게 하는 결과이다.
- 그러므로 봉독의 특징적인 피크인 amide 피크의 사라짐으로 보아 봉독이 PLGA 내부에 완벽히 봉입되었다는 것을 알 수 있다.

(6) 입자 크기와 분포 측정

(가) 목적: PLGA 입자는 입자 크기에 따라 방출 기간과 봉입률 등이 달라지기 때문에 이와 관련하여 입자 크기를 확인.

(나) 방법: 입자 크기 분석은 dynamic light scattering analyzer(ELS-8000, Otsuka electronics, Japan)으로 측정되었다. 입자는 증류수에 분산되었고, 초음파 분쇄기를 적용하여 입자 간 상호작용을 최소화 하였다.

(다) 결과

Table 4.23. PLGA 입자 크기와 크기 분포

Formulation	Mean size (nm)	표준오차	Mean polydispersity	표준오차
V 1	428.8	25.6	0.1459	0.0191
V 2	529.9	4.4	0.1799	0.0710
V 3	564.5	4.6	0.2358	0.0511
V 4	507.4	5.4	0.2370	0.0422
V 5	504.9	5.3	0.2426	0.0117
V 6	525.3	12.5	0.1507	0.0210
V 7	557.1	13.0	0.0922	0.0940
V 8	1573.4	61.2	0.1381	0.0326

- 디클로로메탄은 물과 상대적으로 낮은 섞임성을 갖는다. 이것은 유기용매가 수상으로 빠르게 확산하지 못하게 한다. 입자는 유기용매 증발 동안 형성되는데 고분자 침전에 대한 임계 농도에 도달했을 때 입자가 형성된다. 반면에 에틸아세테이트는 물과 부분적 섞임성이 있기 때문에 이 용매는 수상을 통해 비교적 자유롭게 확산하여 용액을 포화시킬 수 있다. 이렇기 때문에 에틸아세테이트를 용매로 사용했을 때 입자 크기가 디클로로메탄을 사용했을 때 보다 더 작다고 판단됨.
- 적은 양의 봉독이 사용되었을 때 봉입률은 많은 양의 봉독이 사용되었을 때 보다 높다. 이것은 봉독이 많은 단백질을 포함하고 이 단백질들의 크기는 크기 때문에 입자의 크기

는 커질 것이라 추정할 수 있다.

- 적은 양의 PLGA를 사용했을 때 봉입률은 많은 양의 PLGA를 사용했을 때 보다 작다. 이것은 역시 봉독이 많은 단백질을 포함하고 이 단백질들의 크기는 크기 때문에 봉입률이 적어진다는 것은 봉입되는 단백질 양이 적어진다는 것이니 입자 크기가 더 작아질 것이라 추정할 수 있다.
- 고분자 형태는 입자 크기에 영향을 미치지 않는다.
- 고 분자량의 PVA를 사용했을 때 저 분자량의 PVA를 사용했을 때 보다 더 큰 입자 크기를 갖는다.
- 이것은 고 분자량의 PVA가 높은 점도를 갖기 때문에 일차 에멀전이 외부 수상으로 확산하는 것이 저해되어 입자 크기가 커졌다고 추정할 수 있다.
- 초음파 분쇄기는 매우 강한 에너지를 입자에 가하게 된다. 이것은 입자들이 매우 잘게 분해되게 하여 나노크기의 입자를 형성하게 한다. 하지만 호모게나이저는 강한 에너지를 가하는 것이 아니고 급속도로 섞어주는 역할을 하기 때문에 입자크기가 크다.

(7) SDS-PAGE

(가) 목적: 입자 안에 봉입된 봉독의 많은 부분을 차지하고 있는 melittin과 phospholipase A2의 안정성 확인하여 입자 제조 중 안정하게 유지 되었나 확인.

(나) 방법: 입자를 디클로로메탄에 녹인 후 원심분리 하여 상층액을 제거한다. 이 과정을 2번 더 반복한다. 다음 침전물을 증류수에 녹인다. 이것을 SDS-PAGE 시료로 하여 통상적으로 쓰이는 SDS-PAGE방법을 실행한다.

(다) 결과:

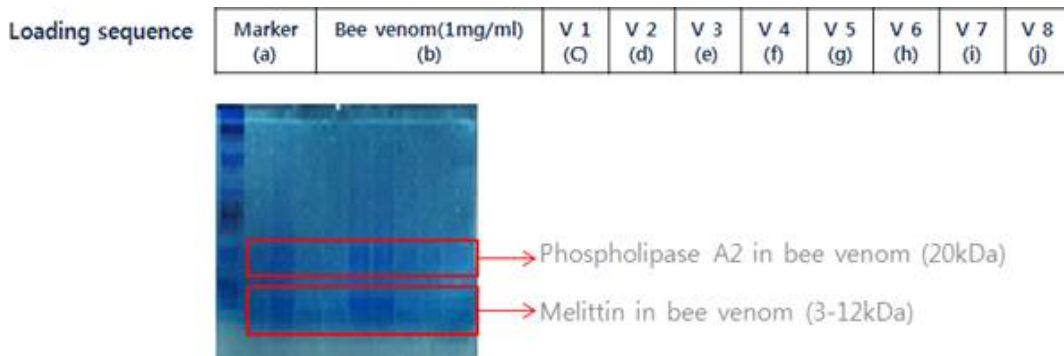


Fig 4.79. PLGA 입자의 SDS-PAGE 결과

- 봉독의 아미노산 배열 변화가 있는지는 SDS-PAGE를 통해 밝혀졌다.
- 입자에 봉입된 봉독은 입자 제조에 사용되었던 봉독과 비교됐다.
- 입자 제조에 사용되었던 봉독과 거의 같은 밴드를 입자를 분해 후 적용한 샘플들에서도 발견되었다.
- 이것은 어떠한 분해산물이든지 응집체가 검출되지 않음을 의미한다.
- 이것은 봉독 단백질의 일차 구조가 입자제조 기간에 분해되거나 응집하지 않고 그대로

유지되었다는 것을 지지한다.

- 20kDa은 phospholipase A2의 band이고, 3~12kDa는 melittin의 band를 의미한다.

(8) In vitro 용출 시험

(가) 목적: PLGA 입자 내에서 봉독이 얼마의 기간 동안 어떤 양상의 보이며 방출되는지를 in vitro 상에서 확인,

(나) 방법: 60 mg의 건조된 미립구들을 1.0 ml의 PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.4, 1M)용액으로 분산시킨 후 dialysis bag에 담은 뒤 1.0 ml의 PBS를 포함하는 용기 내에 담은 후, 37 °C에서 배양 (Incubation)하면서 시간경과에 따라 용기 내의 PBS를 원심분리하여, 상등액 중 약물의 농도를 측정하여 미립구로부터 방출되는 봉독의 양을 측정하였다. 용기 내에는 다시 새로운 완충용액 (PBS)에 분산시켜 방출실험을 계속하였다.

(다) 결과

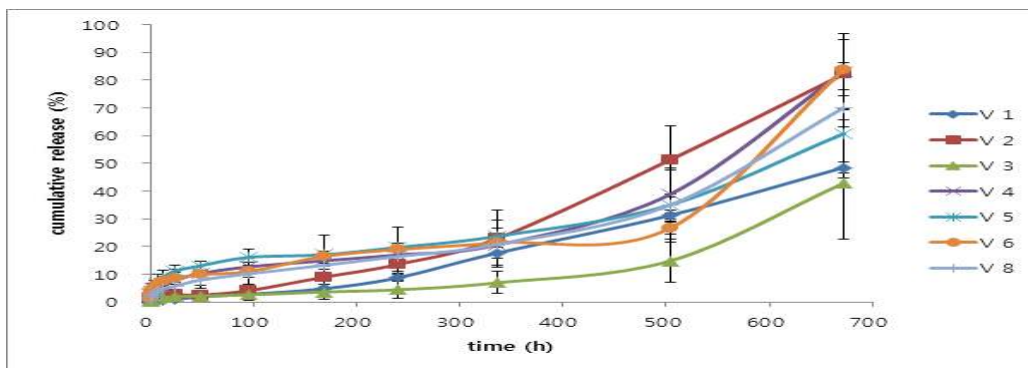


Fig 4.80. PLGA 입자의 시간에 따른 봉독 용출 결과

- 모든 제형에서 봉독이 서방출 되는 것이 관찰되었다.
- 적은 양의 봉독을 사용할수록 적은 양이 많은 양의 고분자 안에 봉입되어 있으므로 많은 양의 고분자가 분해되면서 봉독이 방출하니 방출이 느리다.
- 에틸아세테이트를 이용하여 제조한 입자의 방출이 디클로로메탄을 이용하여 제조한 입자보다 더 서방출의 경향을 보인다.
- 이것은 에틸아세테이트가 물과의 섞임성이 좋아 유기용매 증발 단계에서 에틸아세테이트가 증발하며 입자안에 있던 유기용매가 적어 입자 표면이든지 입자 사이사이에 구멍을 덜 생성하여 그만큼 밀도 있고 입자가 만들어져 서방출의 경향을 보인다고 판단함. 그에 비해 디클로로메탄을 이용한 입자는 물과의 섞임성이 적어 증발시 입자 안에 있는 디클로로메탄이 입자에 구멍을 생성하여 증발하여 봉독이 방출될 통로가 더 많이 만들어져 방출이 더 빠른 것으로 판단됨.
- 전체적으로 한달 이상의 서방출을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

(9) 호모게니제이션에 대한 봉독의 안정성

(가) 목적: 위의 실험의 결과를 모아 초음파 분쇄기를 사용하는 것 보다 호모게나이저를 사용하는 것이 입자 제조에 최적화 된 방법이라는 근거하에 호모게나이저를 몇

RPM, 몇 분 사용할 것인지를 확인.

(나) 방법: 봉독 1 mg/ml 농도의 용액을 제조한다. 이 용액을 15000, 20000, 25000 rpm으로 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 분간 ice bath가 있는 상황과 없는 상황에서 호모게나이저를 적용한 뒤 BCA assay로 단백질 정량을, HPLC 분석으로 멜리틴의 양을 정량한다.

(다) 결과

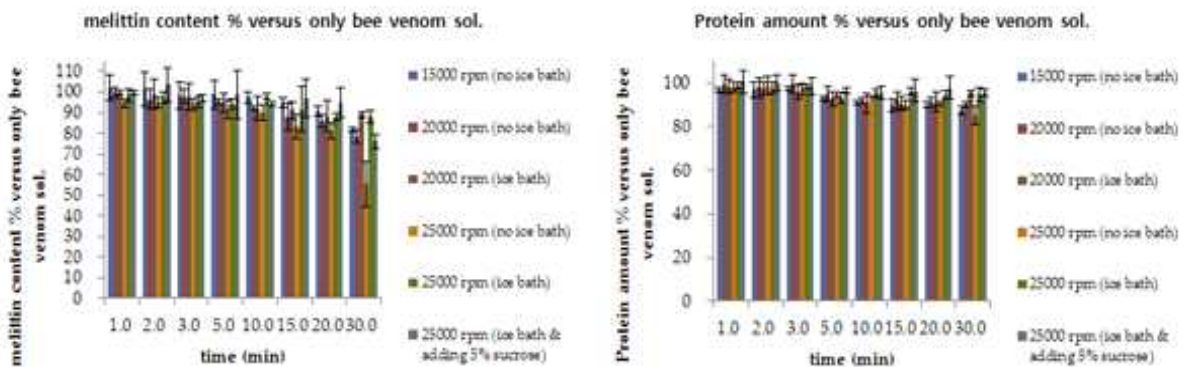


Fig 4.81. 호모게나이저의 RPM과 적용 시간에 따른 melittin 안정성과 봉독 단백질 안정성

- 위의 여러 실험들의 결과로 보아 유효를 위해 초음파와 분쇄기를 사용하기보다는 호모게나이저만을 사용하는 것이 좋다는 판단 하에 어느 정도의 rpm으로 어느 정도 호모게나이저를 어느 상황에서 적용하는 것이 좋을지 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다.
- 호모게나이저의 rpm이 상온에서 15000 rpm일 때, 20분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 10%의 멜리틴 함량이 감소하였고, 30분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 10%의 단백질이 감소하였다.
- 호모게나이저의 rpm이 상온에서 20000 rpm일 때, 15분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 10%의 멜리틴 함량이 감소하였고, 30분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 10%의 단백질이 감소하였다.
- 호모게나이저의 rpm이 상온에서 25000 rpm일 때, 10분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 10%의 멜리틴 함량이 감소하였고, 20분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 10%의 단백질이 감소하였다.
- 이러한 결과들은 호모게나이저의 높은 열 에너지에 의해 단백질과 멜리틴이 손상을 받았기 때문이라고 판단됨.
- 호모게나이저의 rpm이 ice bath에서 20000, 25000 rpm일 때, 30분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 10%의 멜리틴 함량이 감소하였고, 20분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 5%의 단백질이 감소하였다.
- 호모게나이저의 rpm이 ice bath에서 25000 rpm이고 봉독 용액에 5% sucrose를 첨가하였을 때, 30분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 5%의 멜리틴 함량이 감소하였고, 30분 정도 호모게나이저를 적용했을 때 약 5%의 단백질이 감소하였다.

- 봉독 용액을 호모게나이저 적용시 ice bath에서 적용하는 것이 봉독의 안정성에 더 좋으며, 호모게나이저 적용 rpm과 시간은 20000 rpm, 5분이내가 적절하며, 적은 양의 sucrose는 봉독을 수화시켜 봉독을 더 안정화 시킬 것이라 판단.

(10) 최적화된 PLGA 입자의 제조

(가) 목적: 위의 PLGA 입자의 실험결과들을 토대로 최적화되고 in vivo 실험에 적용 할 PLGA입자를 제조

(나) 입자 제조 방법

- PLGA를 디클로로메탄에 녹인다.
- 봉독을 증류수에 녹인다.
- 위 두 용액을 호모게나이저를 이용하여 ice bath에서 20000 rpm으로 3분 동안 적용하여 일차 에멀전(w/o emulsion)을 만든다.
- 제조된 에멀전을 1.25% w/v PVA 용액 60 ml에 넣고 호모게나이저를 ice bath에서 20000 rpm으로 5분 동안 적용하여 이차 에멀전(w/o/w emulsion)을 만든다.
- 하루 동안 stirring 하여 유기용매를 증발시킨다.
- 4°C, 10,000rpm으로 원심분리 하여 입자를 분리하여 증류수로 3번의 세척을 한다.
- 분리된 입자들을 동결건조 한다.

(다) 입자 조성

Table 4-24. 최적화된 PLGA 입자 조성

Formulation	Drug amount (mg)	W 1 volume (mL)	Polymer amount (mg)	O volume (mL)	Stabilizer
VC 1	Bee venom 30 + 5% w/v sucrose	DW 1ml	PLGA R 502H 400	DCM 8	1.25% (w/v) large PVA sol. 60ml
VC 2	Bee venom 30 + 5% w/v sucrose + 1% v/v tween 80	DW 1ml	PLGA R 502H 400	DCM 8	1.25% (w/v) large PVA sol. 60ml

(라) 결과

① 봉입률

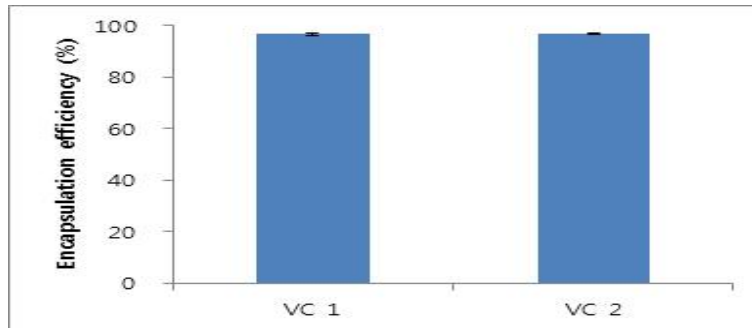


Fig 4.82. 최적화된 PLGA입자의 봉입률

- 두 입자 모두 높은 봉입률이 얻어졌다.
- Sucrose를 사용한 입자가 사용하지 않은 입자보다 봉입률이 조금 높았다.
- Sucrose에 의한 봉입률 상승 효과는 sucrose가 입자 제조 과정 동안 membrane bilayer의 파괴를 막는 membrane protecting 효과를 갖기 때문에 발생한다고 판단됨. (Crowe et al., 2006; van Winden, 2003)

② Yield

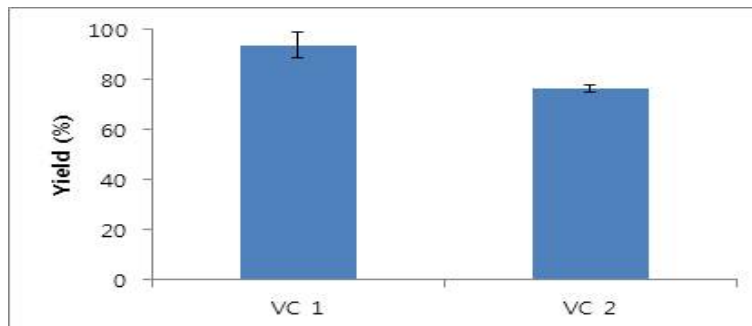


Fig 4-83. 최적화된 PLGA 입자의 yield

- Sucrose를 사용한 입자는 90% 이상의 yield값을 가졌다.
- 지금까지 실행된 실험을 전체적으로 보면 둘 다 높은 yield 값을 가졌다고 판단됨.

③ Drug loading

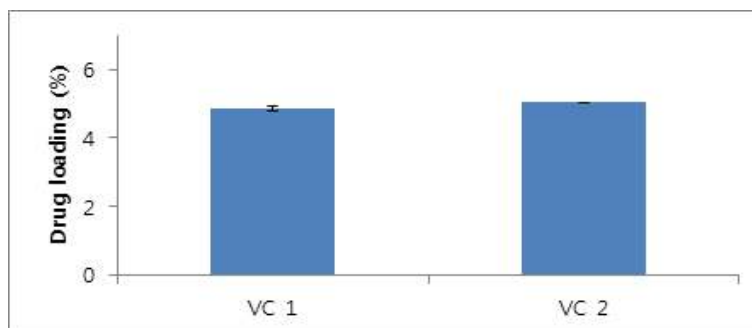


Fig 4.84. 최적화된 PLGA 입자의 drug loading

- VC 1과 VC 2 비슷한 drug loading 값을 가졌다.
- 이것은 VC 1이 봉입률도 높지만 yield값도 높아서 drug loading을 계산하는 공식에서 분모, 분자 모두 커서 발생한 결과라 판단됨.
- 이 최적화된 PLGA 입자는 전남대로 보내어져 동물실험이 진행되어 3~4주 정도 봉독의 효능을 나타낸 다는 것을 확인하였다.

제 5 절 한국산 봉독의 대량 채취 및 동물의약품 등록을 위한 제품 개발

(제 3 협동과제 : ㈜비센 박진규)

1. 봉독의 대량생산

가. 봉독채집 장치의 개선

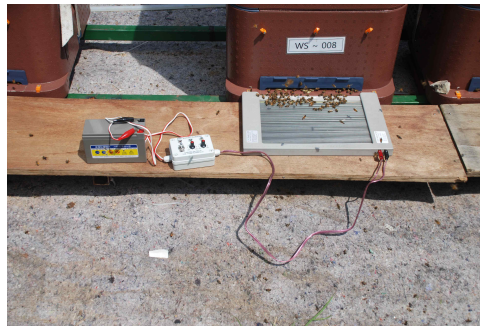
- (1) 실험목적 : 봉독을 산업화하여 제품화하기 위해서는 봉독을 대량 채취할 수 있는 장치가 반드시 필요하다. 기존의 채집기는 벌에 전기자극으로 과도한 스트레스를 줄 수 있고 또 채집기를 통해 모을 수 있는 봉독의 양도 매우 제한되어 있어서 그동안 벌들에게 스트레스를 적게 주면서 가능한 많은 봉독을 모을 수 있는 편리한 채집 장치의 개선 및 제작이 매우 중요함.
 - (가) 벌들은 외부 위협으로 부터 자기를 보호하기 위하여 침을 쏘게 됨. 이 때 1회 발사되는 봉침의 독량이 약 0.05mg정도 되며, 한번 쏘면 침이 피부에 박혀 벌의 장까지 적출되어 죽음에 이르게 되는데 봉독 채취 시에는 벌의 피해를 최대한 없애기 위해 약 10~30V의 약한 전압이 흐르는 +전극봉과
 - (나) 전극봉에 벌이 접촉하면서 그 전기적 자극에 의해 침을 쏘게 디자인 되어 있어 채취판 위에는 봉독만 남게 되고 벌에게는 큰 영향을 주지 않고 오염되지 않은 봉독을 채취하게 됨.
 - (다) 봉독의 채취판에 벌들이 자극을 받아 봉독을 쏘게 되면, 봉독 고유의 향기가 다른 벌들을 자극하여 채집판에 많이 모이게 되는데, 이 때 벌들이 채집판에 쏜 건조된 상태의 봉독을 채집할 수 있음.
 - (라) 그러나 많은 벌들이 채집판 위에서 빠른 속도로 맴돌면서 발에 봉독을 묻히거나 또는 주둥이로 헤집으면서 날개 짓으로 봉독을 건조시켜 비산시키기 때문에 실제 봉독의 70~80%가 소실됨.
 - (마) 기존의 봉독 채집기는 전극봉 연결방법이 주석 코팅 후 납땜 방법으로 처리하기 때문에 전극봉과 전극봉 사이를 좁히는 것이 한계가 있어 H사는 2.5mm이고 C사는 3.5mm로 전극 사이가 넓어 봉독의 손실이 많게 되고, 그나마 1mm 좁은 H사가 C사보다 20%이상 채취량이 많은 것을 확인하였음.
 - (바) 지금까지 출시된 봉독 채집기는 외부에 별도로 배터리와 전자 컨트롤러가 봉독채집기와 별도로 구비되어 이를 전선으로 봉독 채취기와 연결하는 방식으로 벌통 한군데서 약 20분 정도 채집 후 다른 벌통으로 이동하여 채집하여야 하는데, 이동시 마다 채집기에 연결된 전선을 분리하였다가 이동시 다시 설치-연결해야 하는 사용상의 번거로움이 있어 노동력을 그만큼 더 필요로 하게 됨.

(사) 또한, 기존 봉독채집기의 전선에는 주석 코팅이 되어 있어 봉독 채취시 봉독의 색상이 변색되는 등 봉독이 오염될 수 있음.

Fig 5.1. 타사 봉독채집기의 문제점



* H사의 봉독채집기 전선 늘어진 상태 자료



* C사의 봉독채집기 전선 늘어진 상태 자료

(아) (주)비센이 개발한 봉독채취기는 전국 봉 사이의 공간을 기존의 낚땀 방식이 아닌 전기용접 방법으로 1.0mm로 좁혀, 봉독손실을 최소화하여 기존보다 2배 이상의 봉독을 채취할 수 있도록 개발되었음.

(자) 그 밖에 전원공급장치(태양광 전지, 충전지)를 채집판과 일체형으로 제작하여 날씨가 좋은 날에는 태양광 전지를 사용하고, 날씨가 흐린 날은 충전지를 사용할 수 있도록 하여 채집기 사용일수가 현저히 증가하였으며, 늘어진 불필요한 선이 없이 밧데리와 채취기가 일체형으로 되어있어 한 봉군에서 봉독채집을 끝내고 다른 봉군으로의 이동이 용이하도록 간편화 했음.



Fig 5.2. 비센에서 개발한 일체형 봉독채집기와 채집 장면

(차) 이와 같이 비센은 기존의 봉독채집기의 문제점(전선간격 최소화, 전선의 테프론 코팅, 일체형 본체 등)을 개선한 일체형 봉독 채집기에 대한 특허를 출원(10-2010-0069042) 하였으며, 이 기술력을 인정받아 2011년 아르헨티나에서 개최된 세계양봉대회(APIMONDIA)에서 금상을 수상하였음 (2012년 4월부터 현재까지 시판 중).

[기존의 봉독채취 방식]

[개선된 봉독채취기]





2011년 세계양봉대회 금상

나. 밀원 종류에 따른 봉독의 성분 변화 비교

(1) 실험목적 : 밀원의 종류는 무척 다양하며 밀원 식물의 개화, 개화기간, 화밀생산량들은 주어진 환경에 따라 차이가 있을 뿐만 아니라 같은 환경 조건이라 하더라도 밀원 식물의 종류에 따라서도 큰 차이가 있어 환경과 밀접한 관계가 있으므로 대상 밀원에 따라 봉독의 고유한 성분들이 성분 변화가 있는지를 조사하였음.

(가) 한국에는 약 4,600여종의 관속식물이 서식하고 있는데 이들 중 경제적으로 유용한 식물은 약 2,500여종이나 되어 비교적 다양한 식물 군을 이루고 있음. 이들 중 밀원식물로 활용될 수 있는 식물은 약 800여종에 이를 것으로 추정되나, 현재 밀원식물로 활용이 가능한 종류는 약 250여종에 이룸. 이들 밀원식물이 모두 실제 양봉에서 활용되기에는 수적으로나, 양적으로 아직 크게 미흡 하여 주요밀원이나 보조밀원으로 이용할 수 있는 밀원식물의 종류는 그 보다 훨씬 적은 수에 불과함.

(나) 아래 표는 우리나라 월별 주요 밀원을 나타내었으며 개화시기에 맞춰 밀원에 따라 봉독을 채취하여 성분변화를 비교하였음. 2012년 3월부터 6월까지 매달 봉독을 3회 이상 채집하여 지표성분 분석방법에 따라 분석을 진행함.

구분	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월
봉독의 근원 (밀원)	설탕 사양	벚꽃	아카시아	밤꽃	잡화	설탕 사양	좌동
시험봉군 수	계상 20군	좌동	좌동	좌동	좌동	좌동	좌동
봉독채취기	10대 사용	좌동	좌동	좌동	좌동	좌동	좌동

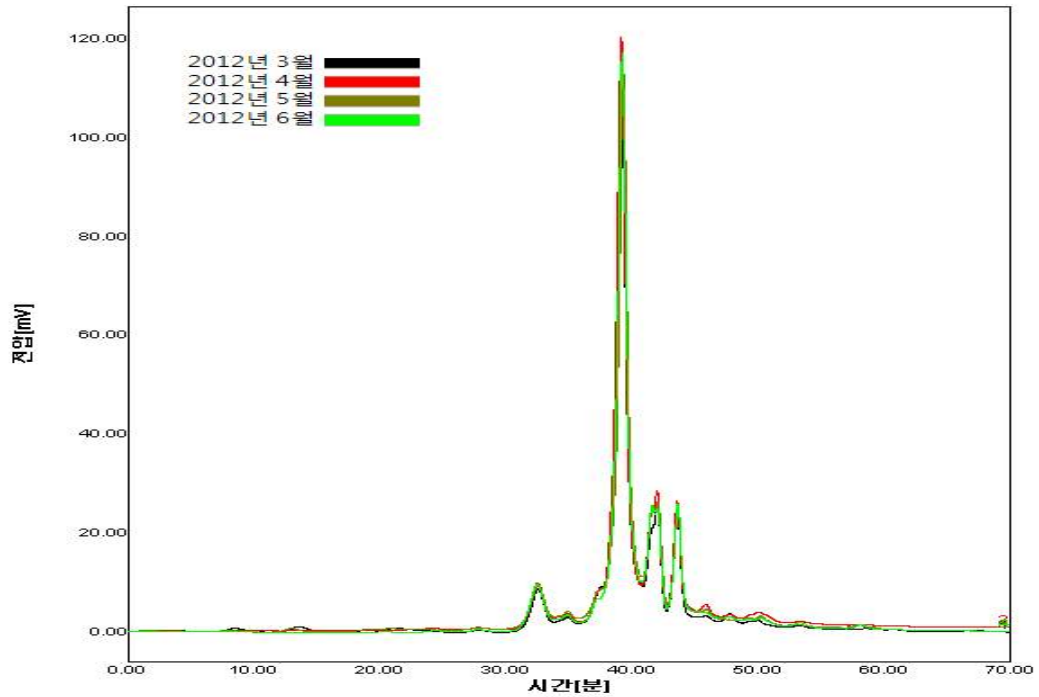


Fig 5.3. 시기별 채취한 봉독성분 분석 그래프

2012년과 2013년 걸쳐 꿀을 채취하는 시기인 3월부터 6월까지의 밀원별 봉독 성분 비교 결과 밀원에 따라 분석된 성분함량의 차이가 약간씩은 있으나 근본적으로 지표성분의 함량 차이는 거의 나타나지 않음을 확인하여 제품 생산시 봉독품질에는 큰 문제가 없을 것으로 생각됨

(다) 현재로서는 밀원에 따른 성분들의 변화의 차이는 봉독을 균질한 동물의약품 원료로 제조 가공하여 정제, QC(Quality Control) 시스템을 거치는 과정에 영향을 미치지 않는 것으로 보임. 다만, 봉독 단백질들 중 HAase(Hyaluronidase) 효소활성의 차이가 가장 민감한 차이를 보여 추후 QC의 중요한 요인으로 관리되어야 할 것으로 판단 됨.

① 밀원 별 Hyaluronidase (HAase) 활성 변화

밀원에 따른 HAase의 활성을 비교한 결과 역시 성분함량 분석결과와 동일하게 큰 차이가 없는 것으로 확인되었음.

(단위: OD_{595nm}/30min.)

	3월	4월	5월	6월
1/10 희석	0.26	0.27	0.25	0.23
1/4 희석	0.472	0.411	0.397	0.413

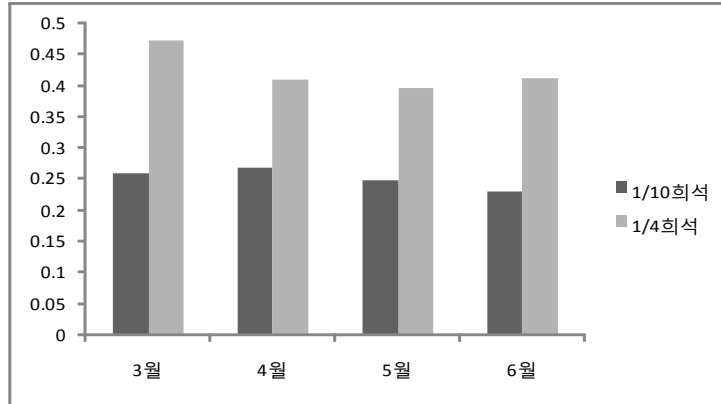


Fig 5.4 밀원별 HAase 활성 비교

다. 기존 봉독 제품과 비센 봉독의 성분 비교

(1) 실험목적 : (주)비센은 천연 생봉독의 건조과정에서 소실 또는 변성되는 유용물질을 탐색, 분리, 정제하여 기존의 건조봉독 치료제가 가진 단점을 보완하기 위하여 기존 시판되고 있는 봉독제품인 apitoxin(구주제약)과 비센의 봉독의 성분을 비교함.

(가) 수용성 물질은 대부분 단백질로 봉독 성분의 50%이상을 차지하는 melittin의 함량은 유사하나 그 외의 구성 성분의 종류 및 함량에 있어서 적거나 거의 없는 성분이 있음. 특히 지용성 부분을 분석한 결과 기존의 제품인 apitoxin에는 지용성 물질이 거의 없었으며 비센의 정제봉독은 다수의 지용성 성분들을 포함하고 있는 것으로 나타남 (Fig 5.6.). 이와 같이 기존의 봉독 제품과의 차별화를 위해 천연 생봉독에 가까운 봉독을 구현하기 위해 지용성 성분을 포함한 정제 방법을 연구함.

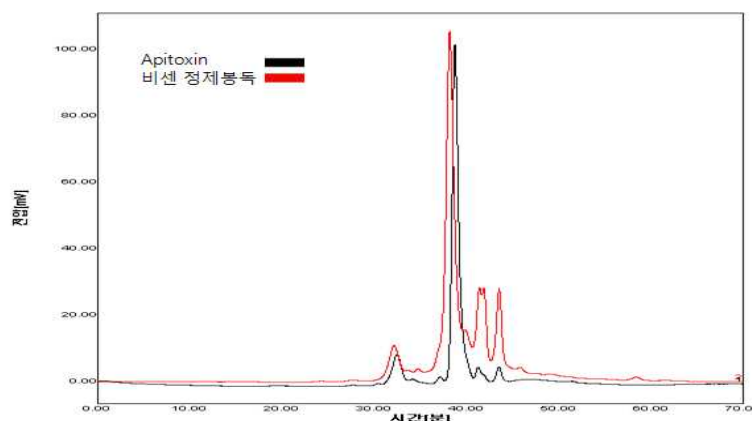


Fig 5.5. apitoxin과 비센정제봉독의 수용성 부분 비교 HPLC chromatogram

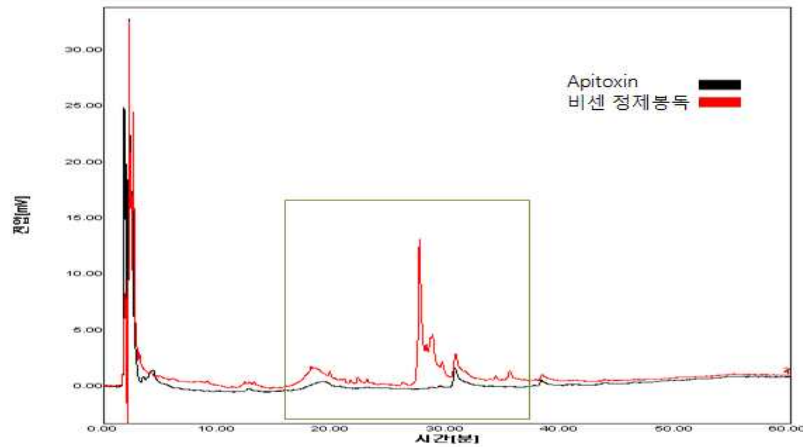


Fig 5.6. apitoxin과 비센정제봉독의 지용성 부분 HPLC 비교 chromatogram

2. 봉독의 분리, 정제 및 전처리

가. 채집된 봉독 성분의 분리 정제

(1) 수지봉독 제조

(가) 실험목적 : 기존의 제품으로 개발되어있는 봉독은 모두 melittin만을 지표 성분으로 하여 봉독의수용성 부분만을 사용하고 있음. 이는 생봉독과 비교할 때 약10여 종류의 단백질들이 소실되어 나타나는 것으로, 천연 생봉독의 지용성부분의 활용이 배제되어 있음. 따라서 (주)비센은 천연봉독의 수용성 물질과 지용성물질을 일정비율 함유하는 봉독을 제조하여 “수지봉독” 으로 명명하였으며, 이 수지봉독의 원료를 특별히 동물의 면역기능을 증강시켜 각종 질병을 예방 또는 치료 할 수 있는 분획으로 제품화하기 위해 특허를 출원하였음 (Fig 5.7).

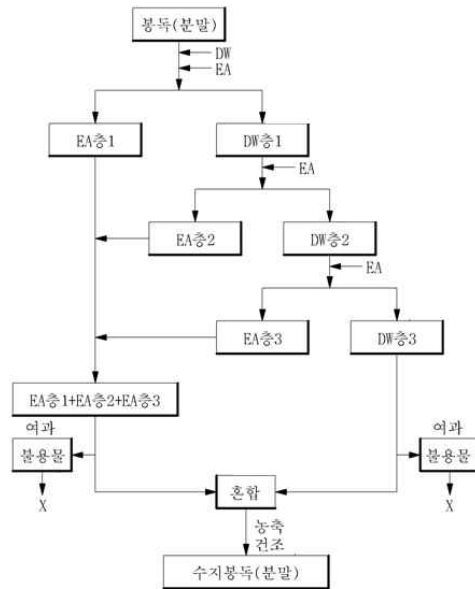


Fig 5.7. 수지붕독제조 과정에 대한 모식도

(나) 미정제 붕독(CBV) 2.5g을 비이커에 넣고 증류수(DW) 100ml에 용해시키고 용해된 붕독을 분별깔때기에 넣어 증류수 150ml로 비이커의 내벽을 씻어주면서 첨가함. 에틸아세테이트(Ethyl acetate; EA) 250ml을 넣고 잘 흔들어 혼합시킴. 이렇게 준비된 상기 혼합액을 분별깔때기를 통해 정치시키고 뚜껑을 열어 압력을 빼주면 EA층과 증류수층이 성질상 차이로 분리됨. 분리된 위층(EA)과 아래층(DW)중 아래층에 있는 증류수를 비이커를 통해 받아 놓고 위층은 따로 분리하여 받아 놓음. 분리된 증류수층을 분별깔때기에 넣고 EA 250ml을 넣고 혼합하여 정치시키면 두 층으로 분리되는데 각각의 층을 비이커를 통해 받아 놓음. 분리된 증류수층을 분별깔때기에 다시 넣고 EA 250ml를 넣고 혼합하여 정치시키면 두 층으로 분리되는데 각각의 층을 비이커를 통해 받아 놓음. 이렇게 3차례에 걸쳐 분획된 3개의 EA층을 모두 합하여 여과하여 두고, 1개의 DW층도 여과하여 분리하여 놓음. 분리된 증류수층과 EA층 부피비가 1:1에서 1:0.1의 범위 내에서 선택된 조성으로 수지붕독을 제조하여 농축·건조함(예를 들어, 위 실험내용을 기준으로 DW층 250ml과 EA층 375ml를 혼합한 조성비는 1:0.5임).

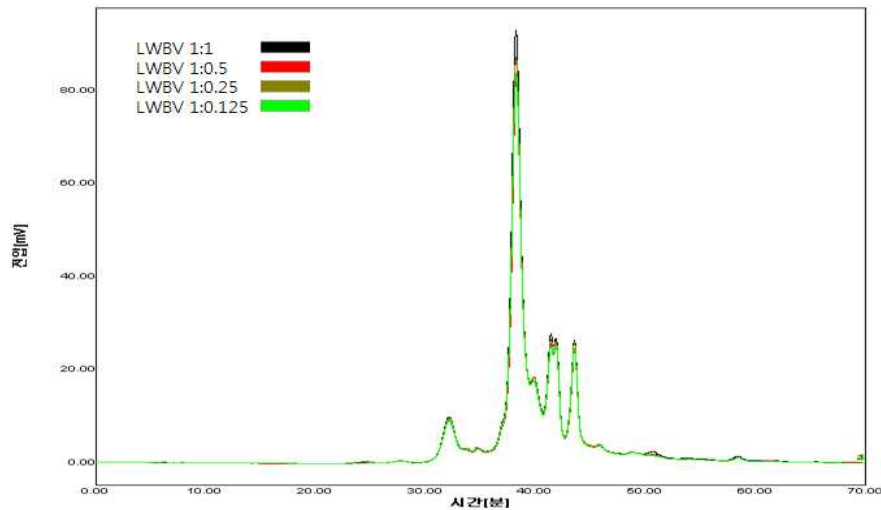


Fig 5.8. 수지봉독 종류에 따른 수용성층의 HPLC chromatogram

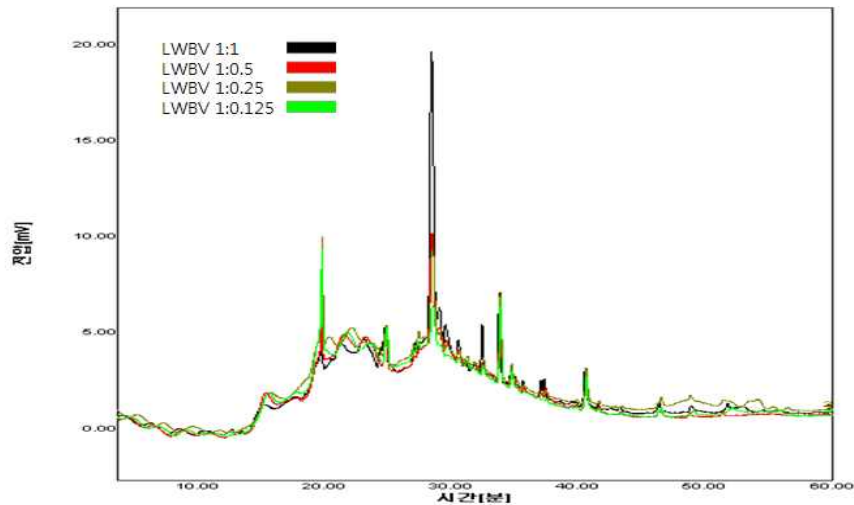


Fig 5.9. 수지봉독 종류에 따른 지용성층의 HPLC chromatogram

- ① 위 수지봉독 정제 방법으로 수용성층과 지용성층의 비율이 1:1, 1:0.5, 1:0.25, 1:0.125인 4종류의 시료를 각각 제조하여 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 대부분 단백질인 수용성층의 성분함량은 4종류의 시료가 거의 차이가 없었으며(Fig 5.8) 지용성층의 함량은 29min의 성분과 같이 지용성 비율이 감소함에 따라 함량이 비례적으로 감소됨을 관찰 할 수 있음(Fig 5.9).

나. 고전압 펄스 기술을 통한 봉독활성성분 증폭 효과 탐색

- (1) 실험 목적 : 고전압 펄스 처리 기술 (pulsed electric field treatment technology)은 전기적인 에너지를 이용하여 비교적 가혹하지 않은 조건에서 미생물을 사멸하기 위한 비열처리 살균법으로 개발됨.

- (2) 최근 고전압 펄스 기술을 이용하여 살균목적 외에 세포막 파괴를 통한 유용성분 추출 연구와 특정효소의 불활성화를 통한 생리활성 증대 연구들이 보고됨.
- (3) 또 한편, 봉독시료 속에는 생리활성이 있는 것으로 알려진 활성 펩타이드와 함께 이것을 분해할 수 있는 단백질분해효소가 같이 포함되어 있으므로 가공처리를 통해 특정 효소를 불활성화 시킬 필요가 있는지를 검토하였음.

(가) 고전압 펄스 처리 봉독 시료

① PEF 처리 조건: 분획별 봉독 시료 200mg CBV와 WBV를 물 4ml에 LBV와 LWBV는 각각 90% EtOH과 40% EtOH 4ml에 녹인 sample을 고전압펄스처리 용 vessel에 충전하고 고전압 처리 시 폭발을 막기 위해 vessel내부에 용매를 채워 넣어 공기부분을 제거하고, 안전용기의 vessel을 고전압처리기와 연결하여 고전압펄스 처리준비가 완료되면, 6,000~9,000V의 전압을 1회에 8~20 μ S 시간으로 처리하여 총 200 μ S 정도 처리함.

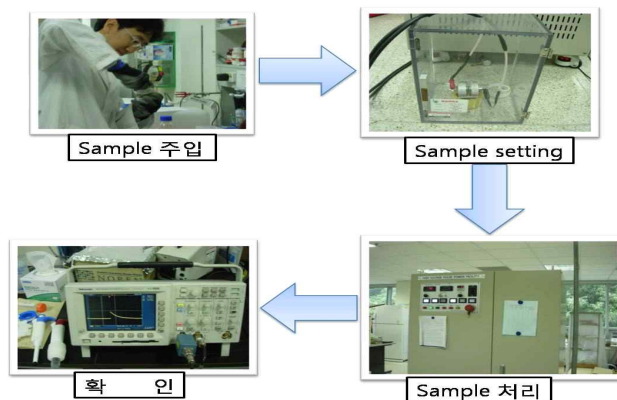


Fig 5.10. 고전압처리(PEF) 과정

Table 5.1. 고전압처리(PEF) 조건

	CBV(crude)	LBV	WBV	LWBV
Sample (mg)	200	200	200	200
solvent (ml)	water (4)	90% EtOH (4)	water (4)	40% EtOH (4)
gap setting (mm)	6	6	6	8
charging voltage (kV)	6	6	6	9
Treatment time (uS)	20	8	20	10
pulse number	10	25	10	20
Total treatment time (uS)	200	200	200	200
Treatment voltage (kV)	10	10	4	10
vessel height (cm)	0.4	0.4	0.4	0.4
total treatment voltage (kV/cm)	25	25	10	25

다. 봉독의 항균효과 확인.

- (1) 실험목적 : 봉독의 항균 작용은 일반적으로 잘 알려져 있고 이는 어떤 특정 균주가 봉독분획의 처리상태 및 각 처리조건에 따라 다양하게 변할 수 있음을 추정 할 수 있음. 따라서 봉독의 처리상태에 민감하게 활성변화를 보이는 균주들을 이용하여 *in vitro*에서 봉독의 가공 상태 및 분획처리 변화에 따른 봉독 조성의 변화 등의 민감한 QC가 가능할 수 있음. 그 중에서도 특별히 고전압펄스 처리 같이 봉독을 가공했을 경우 항균활성이 어떻게 달라지는지 확인하기 위하여, 강릉 KIST(판철호 박사팀)에서 보유하고 있는 고전압처리기를 이용, 고삼(*Sophora flavescens*)추출물을 positive control로 사용하여 항균활성을 비교하였음.
- (2) 사용균주는 *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acnes* 등 7종의 균주로 호기성과 혐기성균에 대한 1차 항균 활성을 disc diffusion법으로 확인하였음.
- (가) 먼저 각각의 시료를 20mg/mL이 되도록 하여 멸균 증류수 또는 DMSO에 녹인 후, paper disc에 5 μ l 씩 처리하여 건조시킴. 각각의 처리된 paper disc를 각 균주에 도말된 plate에 올려놓고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양 후 clear zone의 크기로 항균활성을 비교한 결과 7종 모두 봉독시료보다 positive control인 고삼 추출물의 clear zone 가장 크게 나타나는 것을 확인하였으며, 봉독시료에 대한 항균활성이 가장 크게 나타나는 균주는 *Enterococcus hirae*와 *Micrococcus luteus* 균주에서 가장 항균활성이 크게 나타나는 것을 확인하였음(Fig 5.11) 봉독시료별 항균활성 확인(disc method).

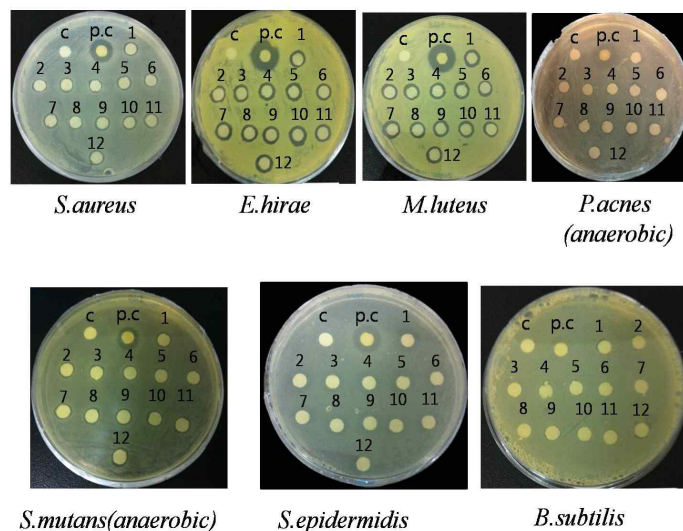


Fig 5.11. 봉독시료별 항균활성 확인(disc method)

- (나) 앞선 실험에서 봉독시료 별 항균활성 능을 확인하였으며, 항균능을 나타내는 최소 처리농도(MIC:minimum inhibitory concentration)를 결정하기 위하여 7종의 균주를

각각의 배지에 접종 후, 37°C에서 12~24시간 배양하여 배양액의 OD₆₀₀ 값이 0.2가 되도록 각 배양액을 멸균된 배지로 희석하여 항균활성을 확인할 균주를 준비함. 96 well plate H line에는 시료 100 μ l를 주입하고 나머지 well에는 배지를 50 μ l씩 주입한 후, H line에 시료 50 μ l를 분취하여 G line에 넣어주고 pipeting하는 방식으로 A line 까지 반복함. 그 후 plate well에 준비된 균주를 50 μ l씩 접종하고 shaking incubator에서 37°C, 120 rpm으로 24시간 배양하고, 0.1mg/ml의 발색시약(p -INT: Iodonitrotetrazolium chloride) 50 μ l을 넣고, 실온에서 정치시키면, 균주가 자란 well에서는 붉은색을 띄게 되어 발색이 되지 않는 농도를 확인, MIC값을 결정하였음 (Fig 5.12).

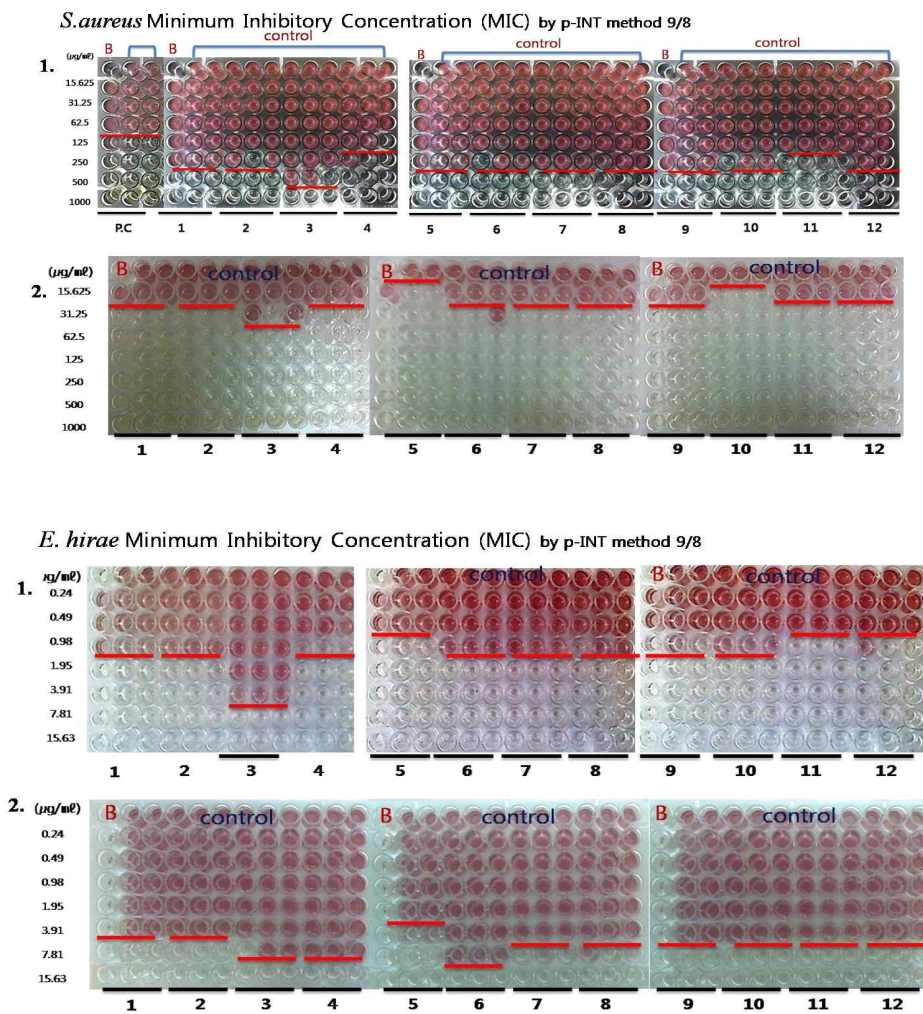


Fig 5.12. 다양한 봉독시료(분획)에 따른 최소억제농도(MIC) 결정

(다) 그 결과 Disc method에서는 고삼 추출물의 항균활성이 가장 좋은 것으로 확인되었으나. 이번 실험에서는 고삼 추출물의 MIC 값이 균주에 따라 62.5~125 μ g/ml의 농도에서 효과를 나타낸 반면, 봉독시료 "BV11"의 경우 MIC값이 다른 시료와 차이가 남을 확인하였음. 예를 들어 *E. hirae*와 *M. luteus*의 균주의 경우 MIC

값은 0.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 양성대조군인 고삼추출물의 MIC값에 비해 60배 이상 항균활성이 우수한 반면 *B. subtilis*에 대해서는 효과가 8배정도 약한 것으로 나타났음. 이와 같이 봉독성분의 조성비에 따른 효과 차이를 고찰해 보면(Table 5.2) 11번 시료가 가장 면역활성이 우수하였고 PEF처리한 5, 6, 7, 8번 시료는 항균활성에서 다른 봉독 시료와 유의적인 차이를 나타내지는 않았음.

Table 5.2. 균주별 봉독 분획에 대한 최소억제농도(MIC)

con. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	** P.C(positive control) : <i>Sophora flavescens</i> extraction in DMSO												
	P.C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>S. aureus</i>	125	500	500	100	250	500	500	500	500	500	500	250	500
		31.25	31.25	62.5	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
<i>E. hirae</i>	62.5	1.95	1.95	7.81	1.95	0.98	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	0.98	0.98
		7.81	7.81	15.63	15.63	3.91	15.63	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81
<i>M. luteus</i>	62.5	0.98	1.95	3.91	1.95	0.98	1.95	1.95	0.98	1.95	1.95	0.98	0.95
		7.81	15.63	15.63	15.63	7.81	15.63	15.63	15.63	15.63	7.81	7.81	7.81
<i>S. mutans</i>	62.5	62.5	125	>1000	62.5	62.5	62.5	250	62.5	62.5	62.5	31.25	31.25
		62.5	62.5	62.5	31.25	31.25	62.5	62.5	62.5	31.25	31.25	31.25	31.25
<i>S. epidermidis</i>	125	31.25	31.25	62.5	31.25	31.25	31.25	62.5	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
		62.5	62.5	62.5	62.5	31.25	62.5	125	62.5	62.5	31.25	31.25	62.5
<i>B. subtilis</i>	62.5	250	500	500	500	500	500	500	500	500	250	500	500
		500	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	500	500	500
<i>P. acnes</i>	125	500	1000	>1000	500	500	500	1000	500	500	500	250	250
		250	250	250	250	125	250	500	250	250	125	125	125

■ : PC □ : DW □ : DMSO

3. 봉독(bee venom) 의 기시법 확립

가. 단백질(수용성 물질) 분석

봉독의 75%는 단백질 성분으로 구성되어 있는데, 단백질 분석 방법의 한 종류인 SEC(Size Exclusion Chromatography) column을 이용하여 분자량에 따라 봉독을 분리함.

- (1) 봉독을 10mg을 정밀히 달아 DW 1ml에 vortexing하면서 녹여 0.4 μm syringe filter로 필터 한 후 HPLC를 이용하여 분석함.
- (2) melittin, apamin, PLA2를 봉독의 standard물질로 선정하고 sigma사에서 구입함. standard를 10mg/ml의 농도로 용해하여 HPLC를 이용하여 분석함.

<HPLC 분석 조건>

Column	Protein-pak 60&125
Mobile phase	100mM triethylamine-acetic acid pH4.5
Flow rate	0.5ml/min
Detector	UV 280nm
Column T.	30°C
Injection vol.	20 μ l
Run time	70min

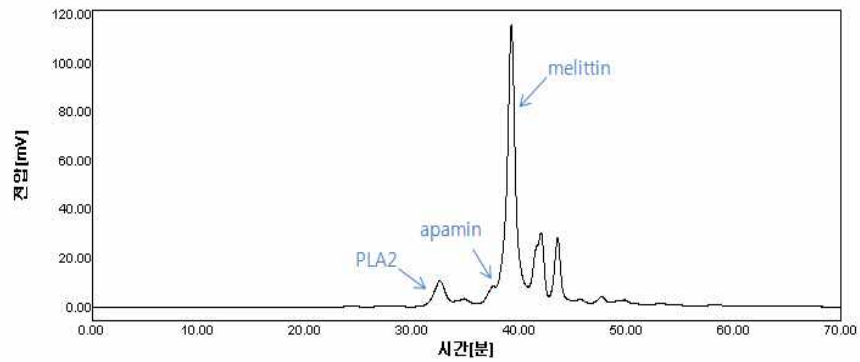


Fig 5.13. 수용성봉독(WBV)의 HPLC 크로마토그램

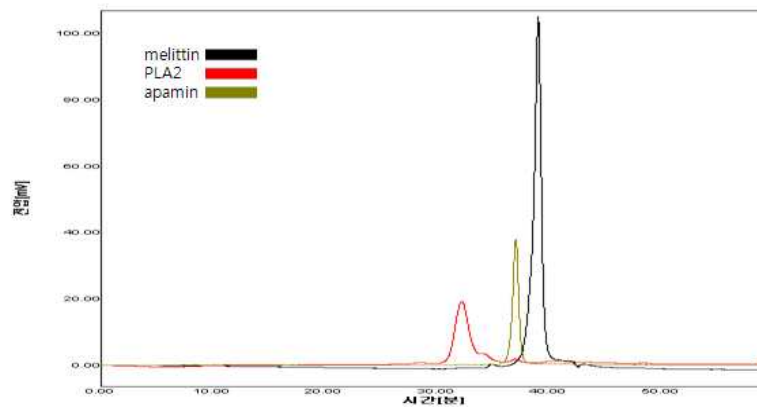


Fig 5.14. 봉독의 주요 표준 단백질들의 HPLC 크로마토그램

(3) HPLC분석 결과 39 min에서 melittin이 major peak으로 검출되었으며 37min에서 apamin이, 32min에서 PLA2가 검출되었음. 아래 crude BV와 standard(melittin, apamin, PLA2)의 HPLC chromatogram을 나타내었음.

나. 비단백(지용성 물질) 분석

(1) 봉독으로부터 분획물의 제조

(가) 봉독 5g을 물 500ml로 현탁하여 분별깔때기에 넣음. EA(ethylacetate)500ml로 3회 추출하고 수층을 다시 *n*-BuOH(butanol) 500ml로 2회 분배 추출하여 각층을 감압 농축하여 EA분획(BVE, 420mg), *n*-BuOH분획(BVB, 820mg), H₂O분획(1.2g) 및 잔사(2.5g)을 얻음.

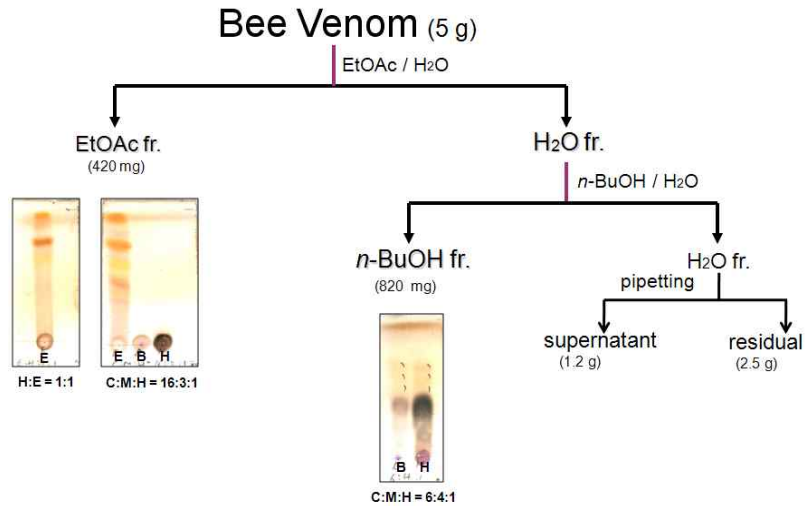


Fig 5.15. 봉독의 분획 체계도 및 TLC 결과

(나) 얻어진 각 분획에 대하여 TLC(Thin Layer Chromatography)로 성분 profile을 조사하였음. EA분획은 약 5종의 주요성분이 존재하는 것으로 나타났으며, UV 흡수가 없고 황산분무 후 가열하였을 때에 황색으로 발색되어 aliphatic 화합물로 추정됨. *n*-BuOH분획은 fructose외에 UV흡수를 보이는 3종의 화합물이 존재하는 것으로 나타남. 물층은 대부분 fructose이나 *n*-BuOH 분획과 마찬가지로 UV 흡수를 보이는 3종의 화합물이 존재하는 것으로 나타남.

(2) 봉독 EA분획으로부터 저분자 지표성분의 분리 및 구조 동정

(가) 지표성분 분리 및 동정

EA분획(420mg)으로부터 silica gel column chromatography(Ø 13×22cm, *n*-hexane:EA = 19:1 → 17:1 → 15:1 → 12:1 → 3:1 → 1:1 → CHCl₃:MeOH = 7:1 → 5:1 → 3:1 → 1:1)를 실시하여 30ml씩 분취하였음. 각 분취액을 SiO₂ TLC로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 21개의 분획물(BVE-1~BVE-21)을 얻었으며, 이 중 화합물1(BVE-3, 51mg)과 화합물 2(BVE-7, 15mg)를 분리하였음.

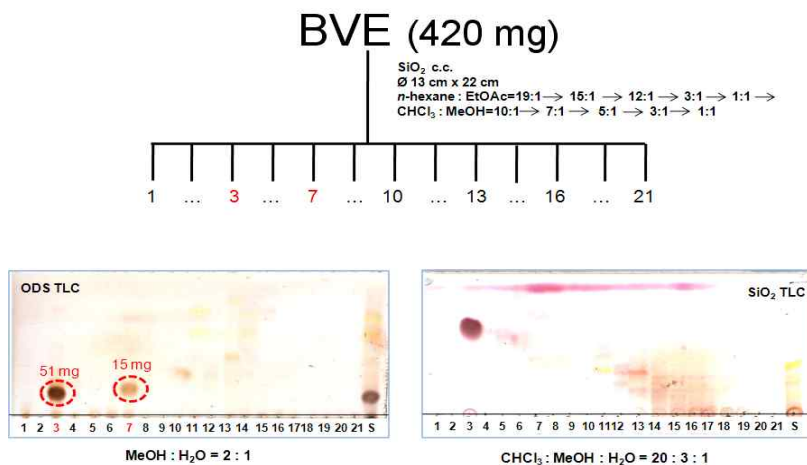


Fig 5.16. 봉독 EA분획별 TLC 프로파일

① BVE-3의 구조를 결정

BVE-3의 ¹H-NMR을 보면 5.31ppm에서 관측된 2개의 olefine methine signal로부터 chain 상의 이중결합이 한 개 존재하는 것으로 판명됨. 0.85ppm에서 관측된 한 개의 methyl signal의 coupling pattern(t, J=7.6Hz)으로부터 말단 methyl기로 판명됨. 1.6ppm에서 1.2ppm 사이에서 다수의 methylene signal이, 2.0ppm 부근에서 2개의 allyl methylene signal이 관측되었음. 또한 3.59ppm에서 oxygenated-methylene signal이 한 개 관측되어, chain 말단에 수산기가 존재함을 알 수 있었음.

¹³C-NMR에서 20개의 탄소 signal이 관측되었음. 129.8 ppm에서 2개의 olefine methine signal이, 62.9ppm에서 1개의 oxygenated-methylene signal이 관측되었음. 또한 14.0ppm에서 methyl signal이, 32.7에서 22.6ppm 사이에서 16개의 methylene signal이 관측되었음. 따라서 화합물 1은 20개의 탄소로 이루어진 사슬형 화합물로 말단에 수산기와 말단 methyl기, 이중결합을 가진 구조로 결정되었음. 이중 결합의 위치는 MS spectrum에서의 fragmentation peak를 통하여 결정함. NMR, GC/MS 구조 동정 결과 분리된 BVE-3화합물은 11(Z)-eicosen-1-ol로 판명되었으며 천연에 흔히 존재하는 물질이 아니므로, 봉독의 지표성분으로 사용할 수 있음.

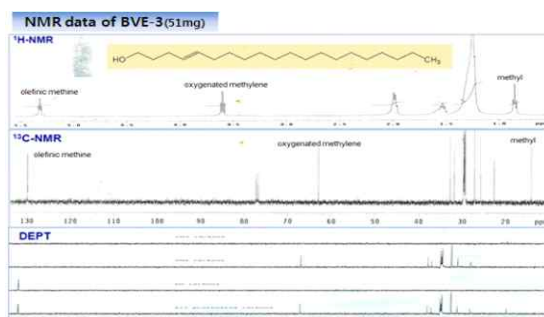


Fig 5.17. BVE-3(11(Z)-eicosen-1-ol)의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR data

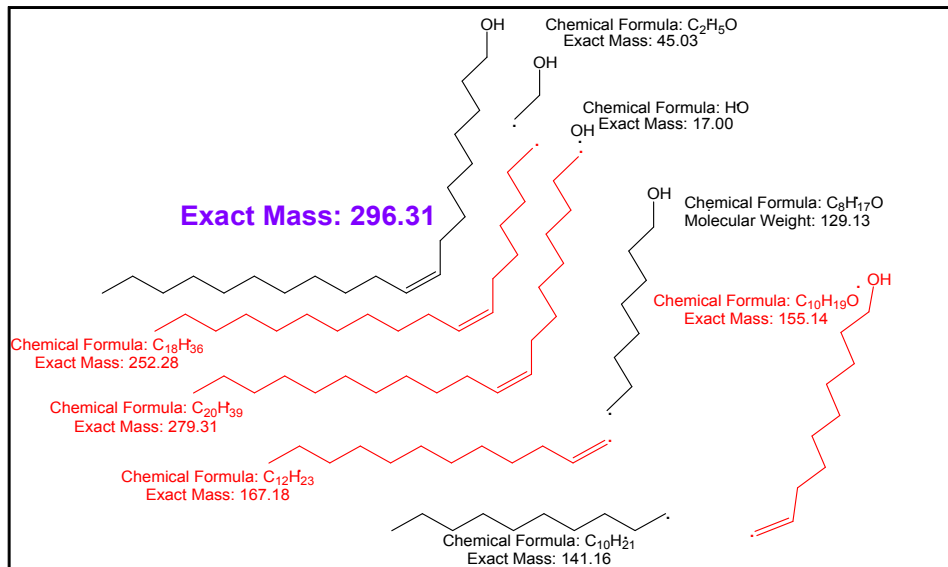
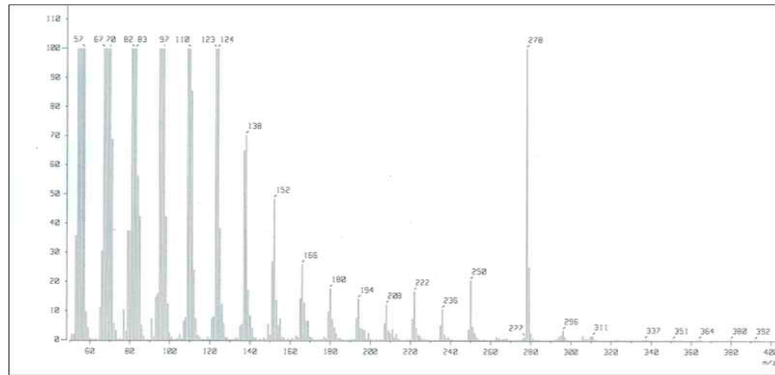
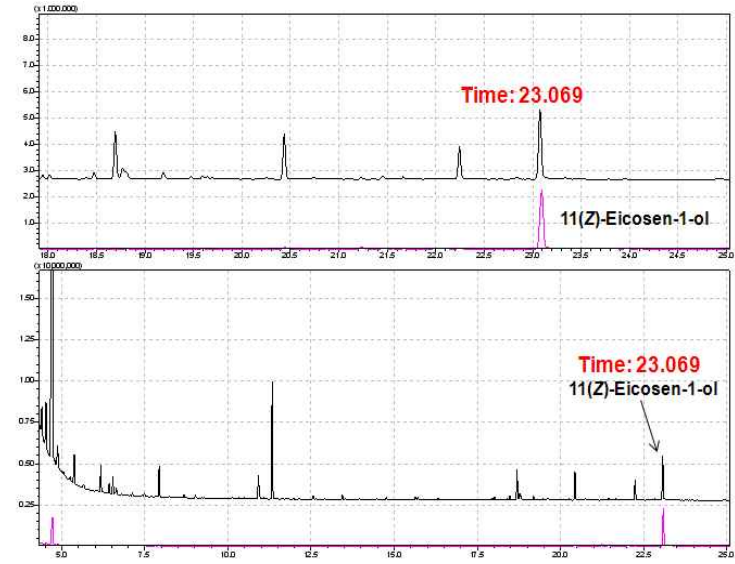


Fig 5.18. BVE-3(11(Z)-eicosen-1-ol) 의 GC/MS data와 fragmentation pattern

② BVE-7 구조결정

BVE-7의 $^1\text{H-NMR}$ 을 보면 7.69, 7.50ppm에서 2개의 olefine methine signal이 관측되었는데, chemical shift가 매우 저자장으로 shift되었기 때문에, 고리화합물 구조내에 존재하는 이중결합으로 추정됨. Oxygenated-methylene signal도 4.24ppm에서 관측되어 allyl 위치에 있는 것으로 판명되었음. 또한 0.74ppm에서 말단 methyl기가, 0.83~2.0ppm 사이에서 다수의 methylene signal이 관측되었음. $^{13}\text{C-NMR}$ 에서도 약 20개의 탄소 signal이 관측되었음. 168.3ppm에서 ester carbon signal이, 130.9, 128.8ppm에서 2개의 olefine methine signal이 관측되었음. 66.2ppm에서 1개의 oxygenated-methylene signal이, 14.1ppm에서 methyl signal이, 29.6~19.1ppm 사이에서 16개의 methylene signal이 관측되었음. 168.3ppm의 ester carbon signal은 HMBC를 측정한 결과 4.24ppm의 oxygenated-methylene proton signal과 correlation이 보여 존재를 확인하였음. 따라서 BVE-7은 20개의 탄소로 이루어진 화합물로 말단 수산기 부근에 고리구조가 형성되어 있고, 고리구조 내에 이중결합이 존재하는 화합물로 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 과 MS분석 결과 dinonyl phthalate로 확인되었음.

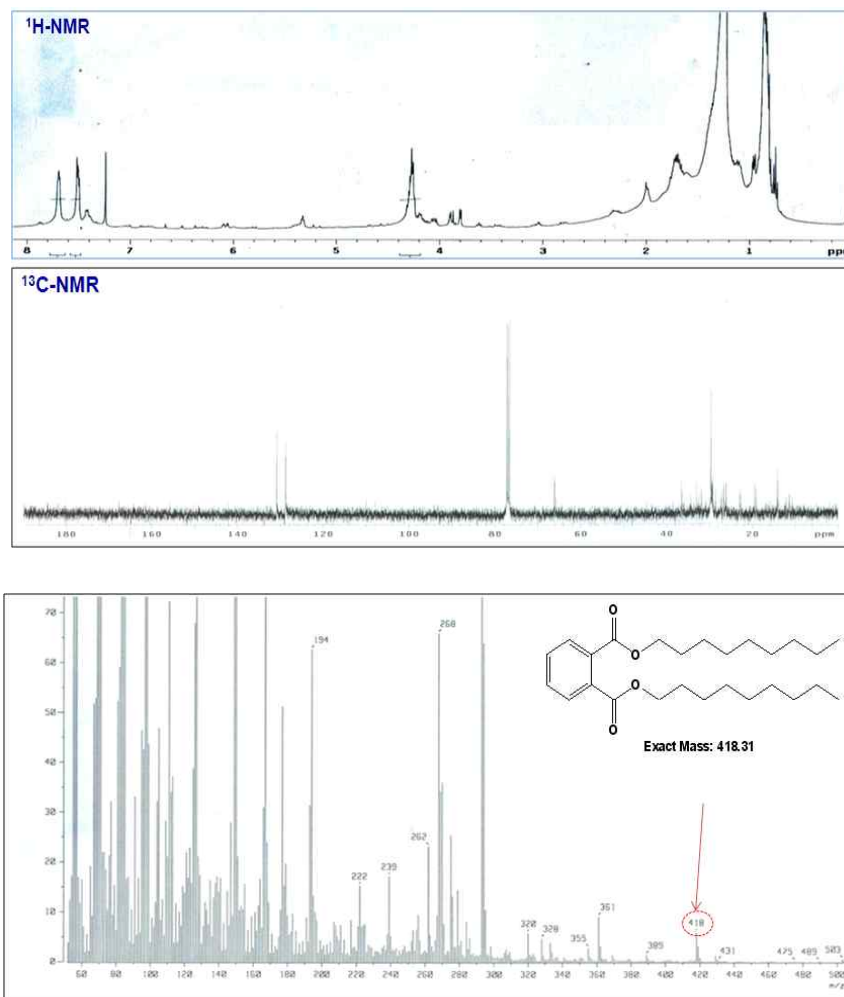


Fig 5.19. BVE-7의 mass spectrum

(나) 분획 BVE-11로부터 저분자 화합물의 분리, 정제

① 저분자 화합물 분리, 정제

BVE-11분획(41mg)에 대하여 ODS c.c.(\varnothing 3×5cm, MeOH:H₂O=1:1)를 실시하여 11개의 분획(BVE-11-1~BVE11-11)을 얻었으며, 이 중 화합물 BVE-11-7+8 (4mg)을 분리 정제하였음.

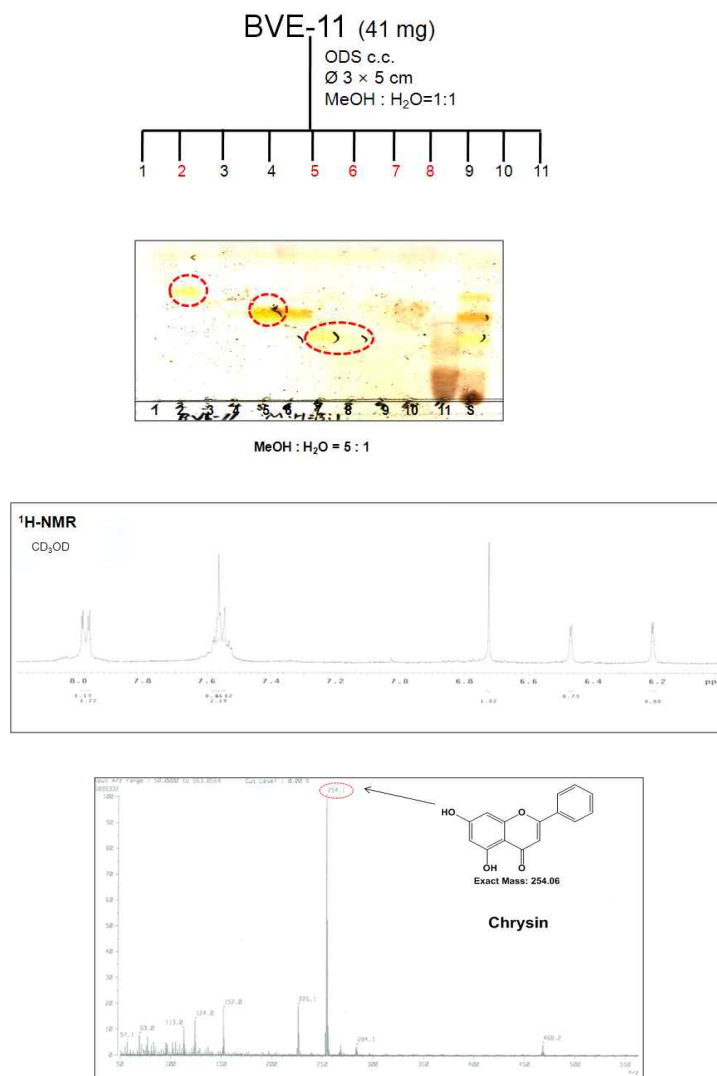


Fig 5.20. 분획 BVE-11로부터 Chrysin의 구조결정

② 봉독으로부터 분획물의 제조 II

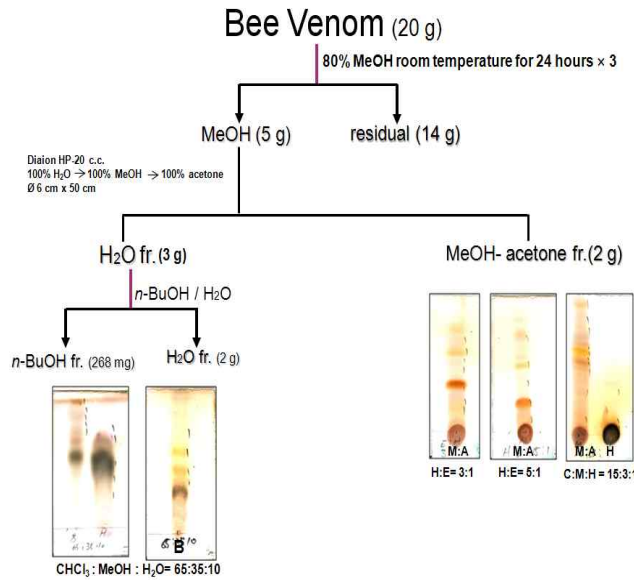


Fig 5.21. 봉독의 용매 분획도 II

봉독 20g을 80% MeOH 1L에서 24시간동안 추출하고 이를 3회 반복하여 MeOH 추출물(5g)과 잔사(14g)을 얻음. MeOH추출물을 Diaion HP-20 c.c. (Ø6×50cm)을 실시하여 H₂O분획(3g)과 MeOH-acetone분획(2g)을 얻었으며, H₂O분획을 n-BuOH을 이용하여 분별깔때기에서 분획하여 n-BuOH층과 H₂O층(2g)을 얻음.

③ 봉독 BVMMA분획으로부터 지표성분의 분리 및 구조 동정

BVMMA (MeOH→MeOH•acetone)분획 (2g)으로부터 silica gel column chromatography (Ø 5×14cm, n-hexane:EA = 30:1→20:1→10:1→1:1→CHCl₃:MeOH = 20:1→15:1→10:1→7:1→5:1)를 실시하여 30ml씩 분취하였음. 각 분취액을 SiO₂ TLC로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 14개의 분획물 (BVMMA-1~BVMMA -14) 을 얻었으며, 이 중 BVMMA-5, 190mg)를 분리하였음.

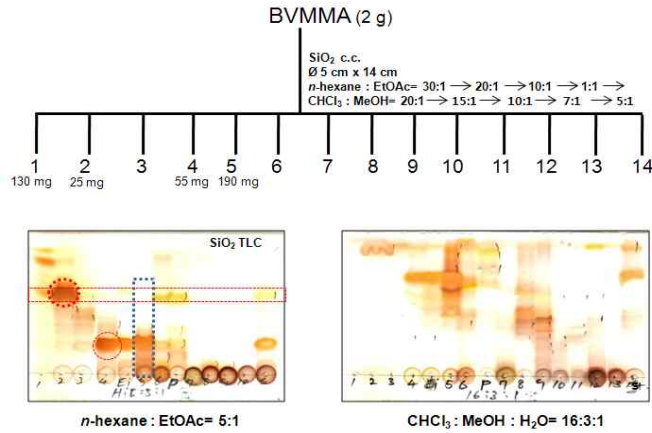


Fig 5.22. 봉독 BVMMA분획으로부터 지표성분의 분리

- ㉠ BVMMA-5(190mg)을 ODS c.c.($\varnothing 3.5 \times 5.5$ cm, MeOH:H₂O=1:1)를 실시하여 분취된 분취액을 ODS TLC로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고 농축하여 18개의 분획물을 얻었으며,

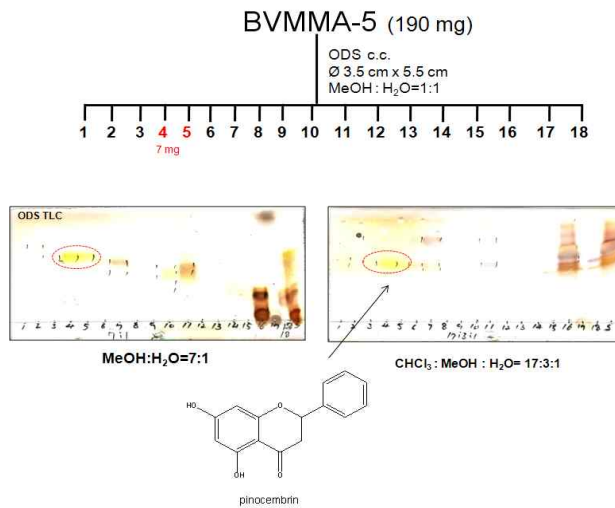


Fig 5.23. BVMHB분획(268mg)으로부터 Pinocembrin의 구조 동정

- ㉡ BVMHB(MeOH→H₂O●*n*-BuOH)분획(268mg)으로부터 silica gel column chromatography ($\varnothing 5 \times 14$ cm, CHCl₃:MeOH:H₂O=23:3:1→21:3:1→18:3:1→15:3:1→14:3:1)를 실시하여 각 분취액을 SiO₂ TLC로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 12개의 분획물(BVMHB-1~BVMHB-12)을 얻었으며, 이 중 BVMHB-3+4(18 mg), BVMHB-6+7(10mg)를 분리하였음.

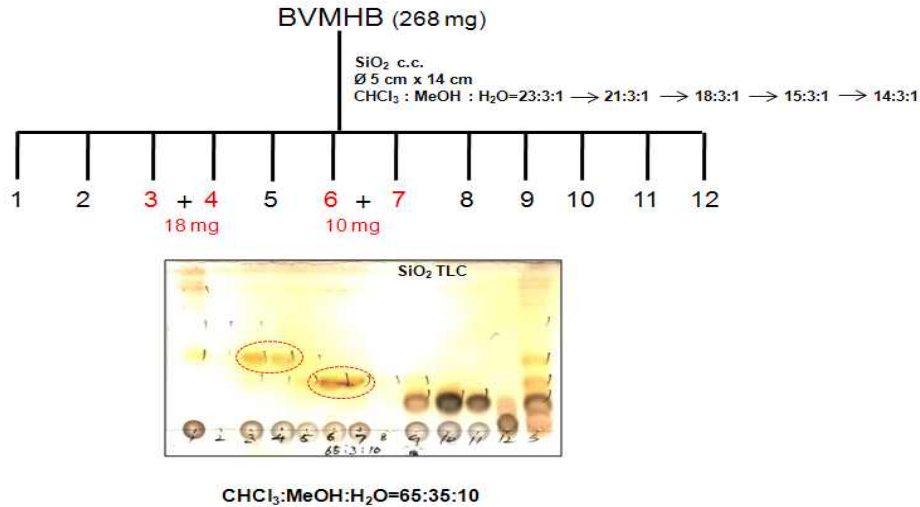


Fig 5.24. BVMHB 분획의 재 분획

다. 봉독의 활성 측정법 확립

(1) 효소 활성 측정

(가) 실험목적: 봉독의 성분 중에 함유된 효소 중 Phospholipase A2(PLA2) 10-12%, Hyaluronidase (HA) 1-3% 정도 포함되어 있어, PLA2와 HA의 효소 활성측정을 통해 봉독의 물질검증을 위한 기시법을 확립하고자 하였음.

(나) 봉독채집기로 채집된 봉독(CBV)과 분리 정제된 수지봉독(LWBV)을 각각 25ug과 50ug 씩 분취하여 각각의 HAase의 활성을 측정 비교한 결과 LWBV 1:0.25의 시료만 다른 시료보다 절반정도 낮은 HA 효소활성을 보였음.

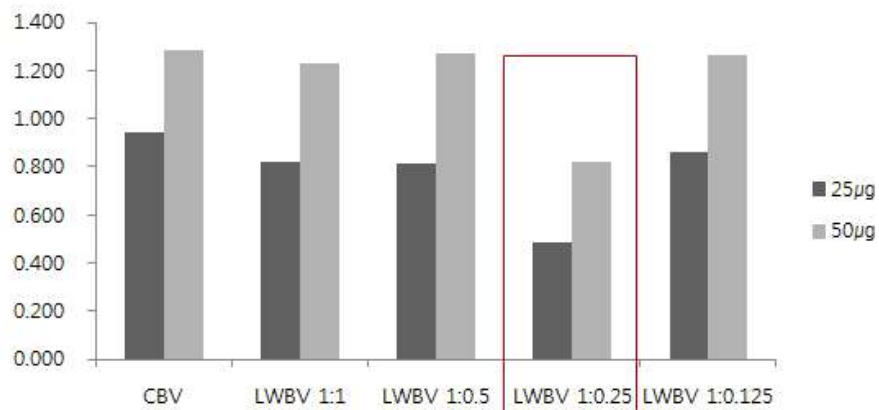


Fig 5.25. 정제 봉독 시료별 HAase 활성 비교

(다) 정제된 봉독 시료의 면역 활성화도 LWBV 1:0.25의 경우가 가장 높은 것으로 HA의 효소활성의 억제가 면역 활성화 증가와 관련 있는 것으로 추정되었으며, 투여 방법에 있어서는 1회 투여시 점안투여의 경우보다 spray방식의 투여(1:0.25 LWBVSprey3)가 더 효과적이었음(Fig 5.26, 제1세부과제수행결과임).

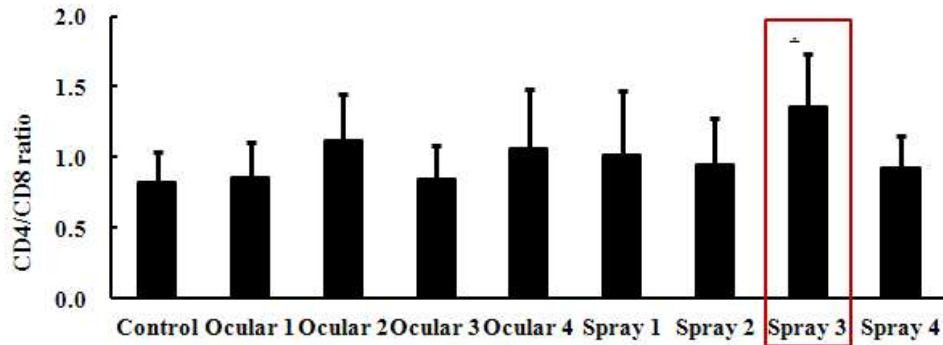


Fig 5.26. 각 시료별 점안투여와 스프레이 방식에 따른 면역증강 효과

(라) 면역 활성화는 2010년도 LWBV 1:0.25(G1)보다 2011년 LWBV 1:0.25(G3)가 더욱 우수하였음 (Fig 5.27, 제1세부과제의 수행한 결과임).

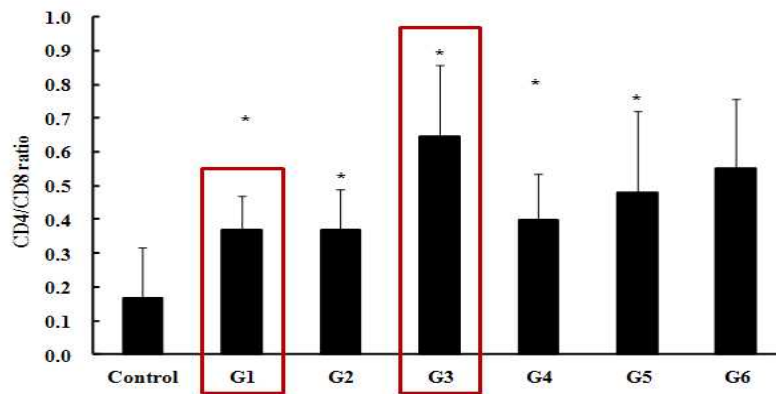


Fig 5.27. 봉독시료별 면역활성 비교

(마) 본 실험조건에서의 chrysin 농도는 HAase활성의 변화에 영향을 미치지 않았음.

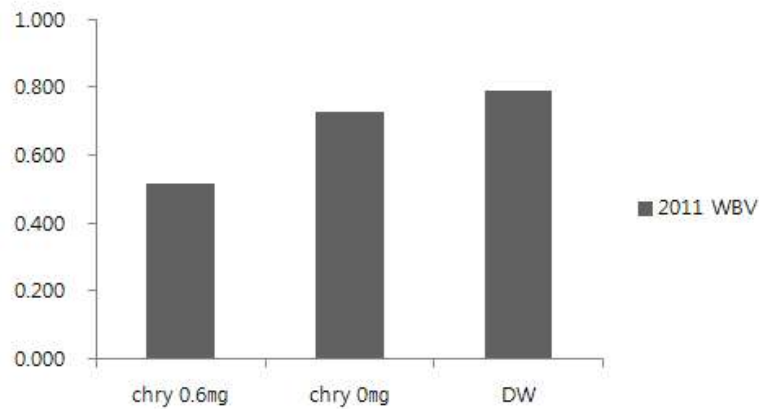


Fig 5.28. HAase활성에 미치는 Chrysine의 영향

(바) HAase 억제제에 의한 영향

- ① 한편, HAase의 inhibitor로 알려져 있는 Poly(sodium 4-styrene sulfonate, PSS, m.w.~1,000,000)를 이용하여 HAase의 활성억제에 미치는 영향을 알아보았음. 참조 논문[Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases., Glycobiology. 2006 Jan;16(1):11-21, Isoyama T, et, al.]에서는 0.0091 μ M을 이용하여 봉독(sigma 봉독 40mU)을 50% 억제(IC50)시켰다는 결과에 근거하여 0, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008 μ M의 PSS를 각각 수지봉독에 첨가(최종농도)하여 2011년 LWBV 18 μ g의 양에 대한 HAase활성을 각각 측정하였음. 그 결과, inhibitor(PSS) 0.006 μ M 농도에서 HAase 효소활성이 절반으로 감소됨을 확인하였음.

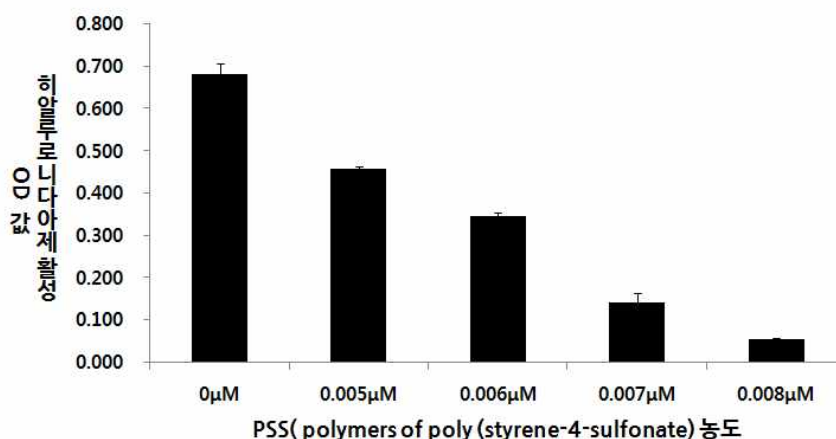


Fig 5.29. HAase활성에 미치는 농도별 PSS첨가의 영향

- ② HAase inhibitor가 육계의 면역력에 미치는 영향

기존의 봉독시료에 HAase inhibitor를 첨가한 시료(LWBV+i)와 inhibitor가 없는

시료(LWBV)의 면역활성을 비교한 결과 inhibitor가 첨가된 봉독시료가 면역 활성이 더 우수한 것으로 확인되었음 (Fig 5.30, 주관 제 1세부과제에서 수행한 결과임).

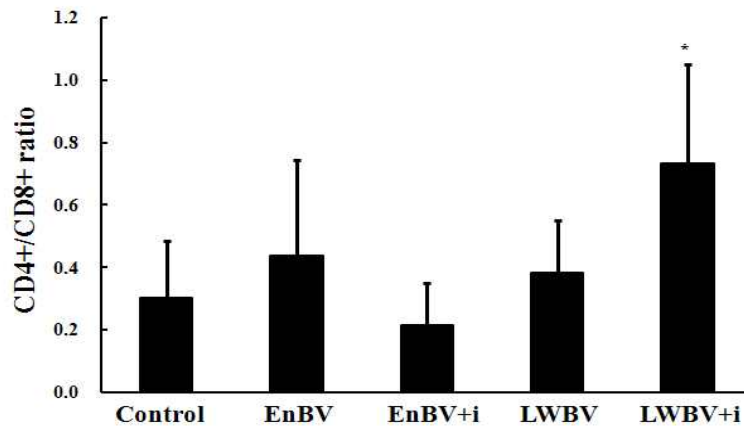


Fig 5.30. 수지봉독시료에 inhibitor (PSS) 첨가에 의한 육계의 면역반응 증강효과

- ③ 그 밖에 HAase효소활성을 억제하는 다른 방법을 모색하기 위하여 열처리에 따른 효소활성 변화를 조사하였음. 봉독시료를 실온(25℃, 55℃, 80℃에서 각각 30분간 반응시킨 뒤 4℃에서 Overnight 후, HAase 효소활성을 확인한 결과 상온에 있었던 봉독에 비해 80℃에서 반응시켰던 봉독의 HAase활성 값이 60% 가량 감소되었으나, 55℃의 경우에는 큰 영향을 나타내지는 않았음.

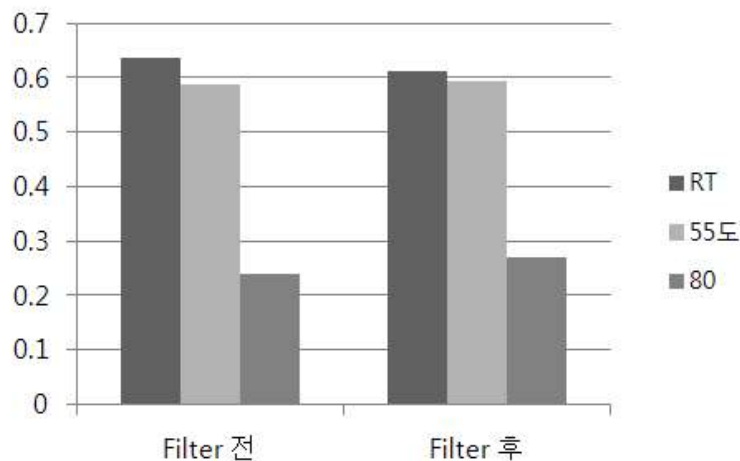


Fig 5.31. 온도변화에 따른 HAase 활성의 변화 Filter전후의 비교

- ㉞ 80℃에서 처리시간에 따른 HAase 활성을 확인해 본 결과 처리시간이 길어질수록 효소활성이 감소되며 90분정도 후 실시간 대조군에 비해 26%의 효소활성만 나타남. 반면, PLA2는 HAase에 비해 온도에 안정하였음.

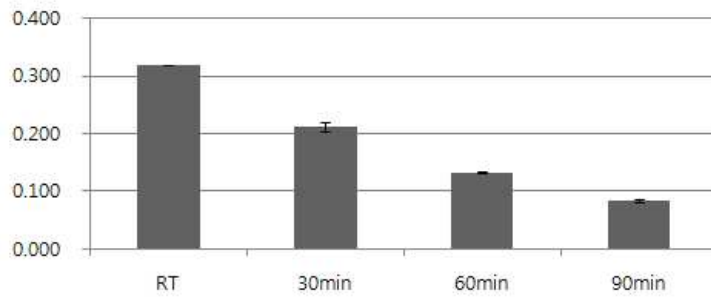


Fig 5.32. 시간변화에 따른 HAase 활성변화

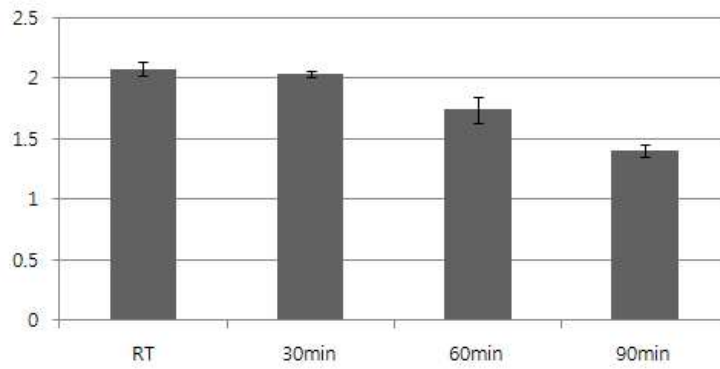


Fig 5.33. 시간변화에 따른 PLA2 활성 변화

⊕ HPLC 결과에서는 열처리한 시료들 사이에서 펠리틴과 같은 주요 단백질의 함량에는 차이가 없음을 확인하였음.

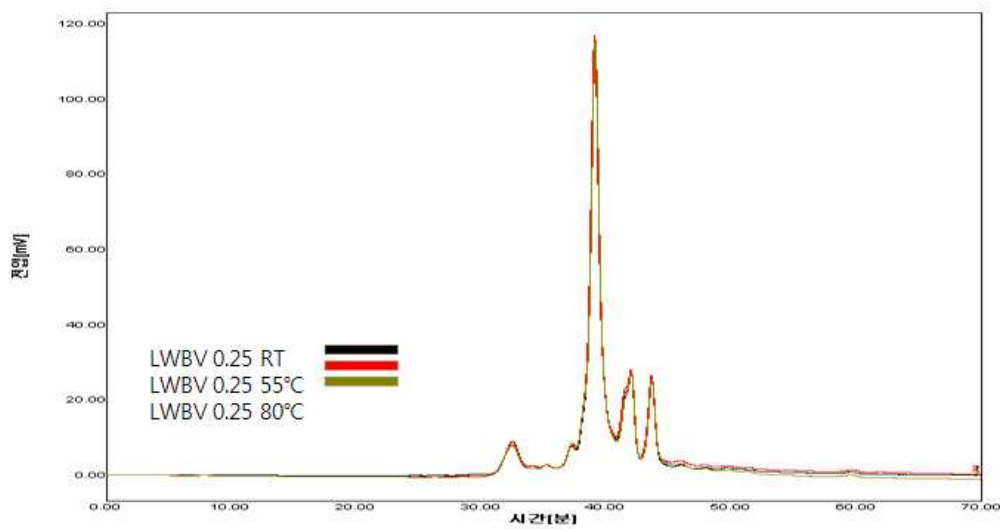


Fig 5.34. 온도처리 수지봉독의 HPLC 크로마토그램

④ 이 실험결과를 토대로 알리젠을 유발하는 효소인 PLA2와 HAase의 활성을 동시에 억제할 경우 면역증강효과의 변화에 영향을 미칠 것으로 예상하여 봉독 시료를 80℃에서 150분간 열처리 후 면역 활성화 효과를 확인함. 그 결과, 열처리군은 대조군이나 비처리 군에 비해 CD4+의 비율은 낮아지고 CD8+의 비율이 높아지면서 면역활성이 현저히 감소하였음. 이는 열처리에 의해 봉독 주요 단백질의 프로파일은 변하지 않으나 면역 활성화에는 영향을 주는 것으로 판단되었음.

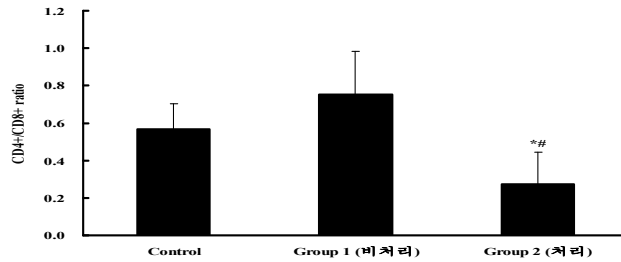


Fig 5.35. 열처리에 의한 수지봉독의 면역 활성화 저하

⑤ 봉독의 HAase 활성을 절반수준으로 억제하는 온도 조건은 60℃에서 1시간 30분, 또는 70℃에서 3분간 열처리하였을 경우 열처리 하지 않은 대조군에 비해 60℃는 53.9%, 70℃에서는 60.3%의 효소활성 저하를 나타냄을 확인하였음.

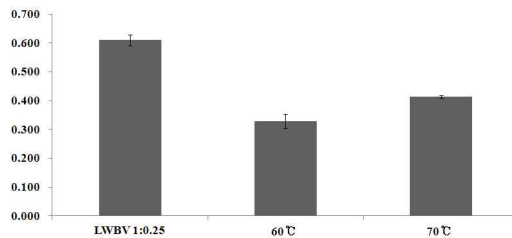


Fig 5.36 HAase활성의 50%억제에 미치는 온도 조건

4. 봉독제형 개발

가. 봉독제형 선정

제품의 제형은 액제, 또는 산제의 형태로 Spray시에 사용될 수 있으나 안정성을 고려하여 산제의 형태로 제조하여 스프레이 직전 약상의 형태로 분무할 수 있도록 제품화하고자 제형을 결정하고자 하였음.

(1) 액제 제형

봉독의 성분들은 대부분 펩타이드 성분들로 이루어져 있어, 물에 녹여 보관 하면,

봉독의 펩티다제 효소들에 의해 주요성분들이 분해되고 그 기능적 활성이 소실되는 문제가 있음. 따라서 안정화된 액제형태로 제조하기 위해 4가지 type의 제형 (Table 5.3)을 제작하였음(뉴질랜드의 마누카 꿀의 경우 봉독이 꿀과 혼합되어 있는 경우 안정적으로 보존된다는 보고를 참조하였음).

* 구체적인 내용은 충남대약대 결과보고 참조, 안정성은 프로테옴텍의 실험결과 첨부 및 참조)

(가) 안정성 및 효소 활성 검증

충남대학교에서 제조한 4가지 type에 샘플을 각각 3로트씩 제작하여 실온 조건 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$)과 가혹조건($40 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $75 \pm 5\%$)에서 봉독의 주요성분인 melittin의 함량 변화로 안정성 시험을 수행한 결과, 가혹조건 하에서는 1개월 후 10% 미만의 melittin만이 존재하였으며, 실온에서도 한 달 후 35%, 두 달 후에 25% 정도의 melittin만 보존되어 있음을 확인하였음.

Table 5.3 봉독제품의 액제 조성

	F1 (g)	F2	F3	F4
Metolose 60SH 50	0.2		P1용제 (Polysorbate 80대신 ascorbic acid첨가) 30ml에 봉독 2g을 녹인고, P2용제 70ml을 넣고 혼합하여 만듬.	0.4
Ascorbic acid				
Boric acid	2.2			
Polysorbate 80	0.4			
Benzalkonium chloride	0.01			
D-fructose		38%		
D-glucose		31%		
surcrose				85
D-sorbitol		10%		5
Benzalkonium chloride		0.01%		0.01
2.2% Boric acid in D.W		20.99%		잔량
D.W	잔량			
비고	100ml	100ml		100ml

위의 샘플에서 HA ase의 효소활성을 측정한 결과 제형의 성분에 따라 효소활성이 F1>F4>F2>F3의 순으로 활성이 차이가 나타남을 확인하였으며, 7일 경과 후에 다시 측정한 결과 효소활성이 7일 전 보다 약 5%정도 더 감소하는 것을 확인하였음.

이상과 같이 안정성 시험 및 효소활성의 변화 조건들을 검토한 결과, 액제형태 제작시 시제품의 보관 온도와 시간은 그 안정성에 많은 의문을 주는 것으로 사료됨.

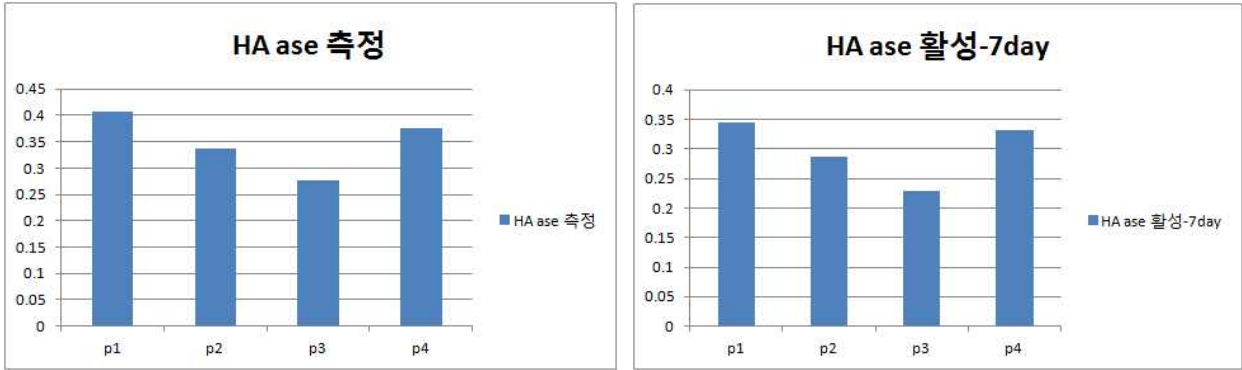


Fig 5.37. 액제 상태의 효소 활성 측정

(2) 산제 제형

액상 형태로 유지되는 봉독제품은 안정성에 문제가 있는 것으로 보고 고형(固形)의 산제(散劑) 형태로 유지하고 사용직전 수용액을 첨가하여 스프레이 하는 제품으로 개발방향을 수정하였음.

(가) 제형조성 결정.

산제형태의 조성으로 시제품을 만들어 봉독의 용해도와 안정성을 유지 할 수 있는 제형을 검토하기 위해 아래 표 의 조성대로 부형제를 혼합하고 그 혼합물을 물 15ml에 녹였을 때 용해도는 P2 > P3 > P4 > P1의 순으로 우수함을 확인하였음. 그러나 이 후 각각의 제형 조성에 조제된 봉독원료 20mg을 각각 혼합하고 이 봉독이 함유된 조성물에 물 15 ml를 첨가하여 혼합, 24시간 동안 실온에서 정치시킨 후, 육안으로 관찰했을 때 P1이 가장 많은 침전이 생겼으며 P 2, 3은 비슷한 침전정도를 나타내었고, P4가 가장 침전물이 적었음. 이 결과에 기초하여 제형 P4를 기본 조성으로 시제품을 제작하였음.

Table 5.4. 제형조성 결정

	P1 (g)	P2	P3	P4
Ascorbic acid				0.04
Boric acid	2.2	0.046	0.098	0.02
Ascorbic acid			0.012	
Polysorbate 80(tween80)	0.4			
D-fructose		3.8	2.66	
D-glucose		3.1	2.17	
sucrose				8.5
D-sorbitol		1.0	0.7	0.5
총 무게 (g)	0.026g	0.7946g	0.564g	0.904g
비고	위 조성대로 혼합 후, 각각 봉독원료 20mg씩을 혼합하여 제형을 조제하였음.			

본 과정을 통해 개발된 수지봉독성분은 농가에서 쉽게 정제수에 녹여 사용할 수 있도록

계면활성제(tween80)를 산제 제형에 첨가하였음.개발, 계면활성제의 농도별(0.5, 0.1, 0.05, 0.01,0%) 용해도를 확인한 결과 0.5% 이상의 농도에서 가장 높은 용해도를 나타내었음(Fig 5.38).

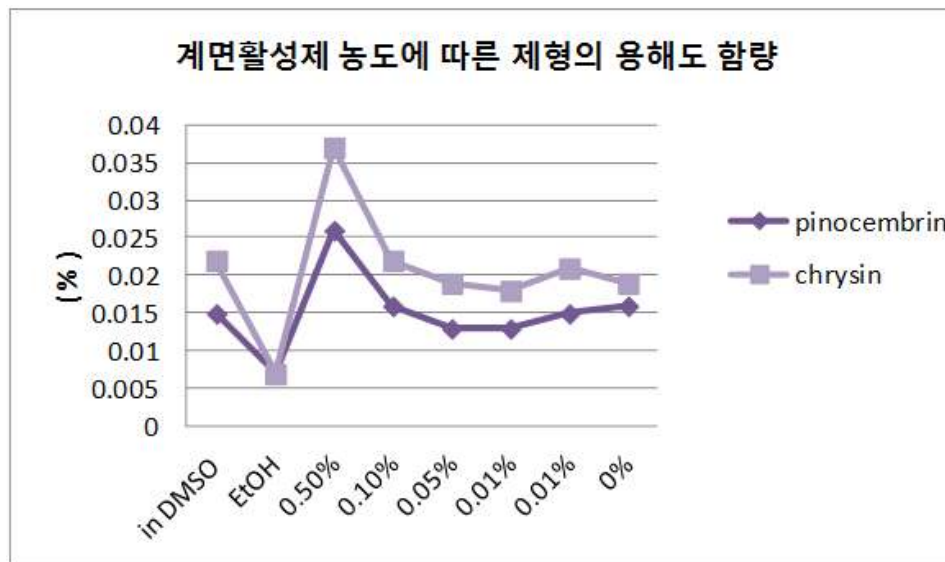
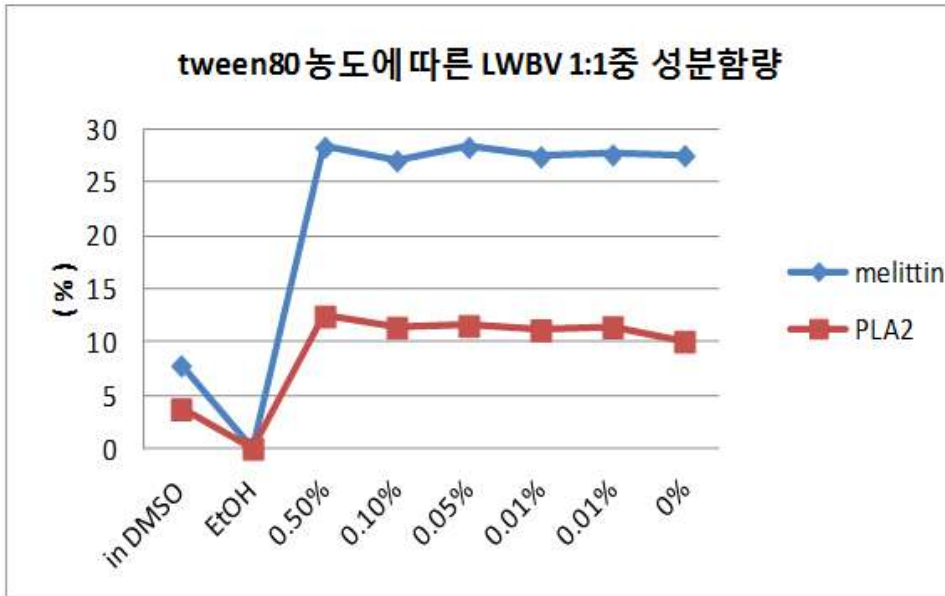


Fig 5.38. tween 80 농도에 따른 용해도 분석

(나) 산제제형 안정성 시험

위에서 결정된 제형으로 제조된 산제 제형에 대한 안정성 시험을 1개월, 3개월, 6개월에 걸쳐 실온에서 안정성 시험을 수행하였음. 그 결과 액제 상태의 가속조건(40℃, humidity 60%) 에서는 3개월 정도에 멜리틴 지표성분이 절반정도로 분해되는 것을 확인 제형을 산제로 바꾸었으며, 산제 상태에서는 시험기간 중 거의 성분변화가 없는 것을 확인하였음.

추후 가혹, 가속 조건에서도 안정성 시험을 계속 진행하여 제품등록에 필요한 자료를 확보할 예정임.

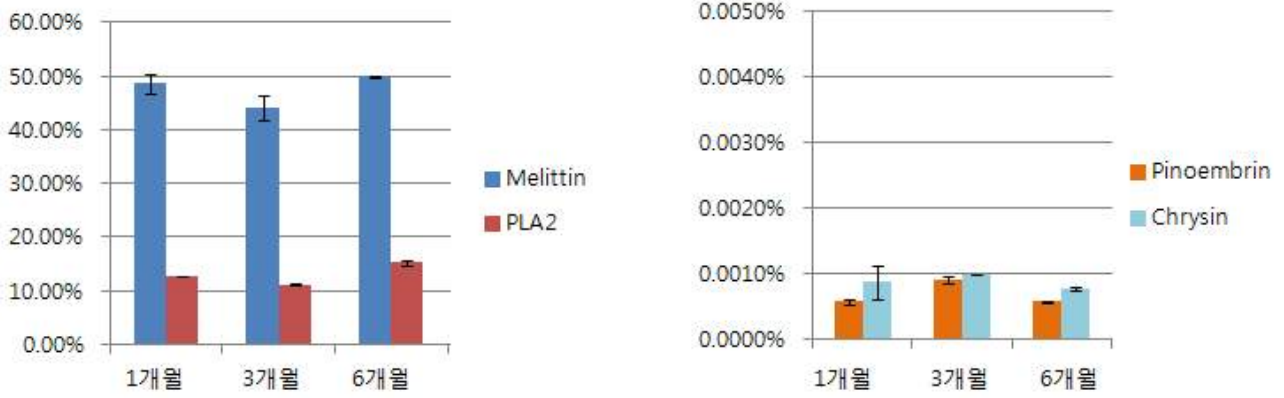


Fig 5.39. 산제 제형 안정성 시험 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부 연구개발 목표	달성도 (%)	관련분야에의 기여
봉독 가축질병치료제의 면역활성 효능검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 봉독의 성분별 안정화된 제형의 효능 비교 - 닭에서 봉독치료제의 면역 및 사양 효과규명 - 돼지에서 봉독치료제의 면역효과 규명 - 송아지에서 봉독치료제의 면역효과 규명 - 돼지에서 서방형 봉독치료제의 면역효과 규명
봉독 가축질병치료제의 항병력 효과 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 봉독을 이용한 닭의 살모넬라 장염예방 및 치료 효과 검증 - 봉독을 이용한 돼지의 살모넬라 장염 예방 및 치료 효과 검증 - 봉독을 이용한 돼지의 소모성 바이러스(PCV2와 PRRS) 질환 예방 및 치료효과 검증 - 봉독을 이용한 송아지의 세균성(대장균, 살모넬라) 및 바이러스성(로타바이러스, 코로나바이러스)설사 치료 효과 검증 - 서방형 봉독을 이용한 돼지의 세균성(살모넬라) 장염 예방 및 치료효과 검증
유효성분의 물리화학적 성질 규명 및 지표성분의 보존 방법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 봉독유효성분의 물리화학적 성질 규명 - 지표성분의 보존 방법 개발 - 안정성 시험 - 공동연구자들에 대한 분석업무 지원
봉독의 spray 제제개발과 마이크로캡슐화를 통한 서방형 제제개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 봉독제형 제조를 위한 제조환경에 따른 안정성 측정 - 봉독 spray 제형 연구 - 봉독 spray 제형의 안정성 평가 - 봉독 봉입된 서방형 입자 연구 및 평가
봉독 가축질병치료 및 예방제의 제품화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 봉독채취기 개량 - 제품의 기시법 확립 - 시제품제작 - 제품등록

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 제품등록

가금류 면역증강제 “아피릭스”의 제품등록을 위해 임상시험계획서 및 부표(첨부1 참조)를 작성함. 임상시험은 농림축산검역본부에서 사양시험을 3개 농장에서 수행하도록 수정하여 현재, 임상시험을 할 수 있는 농장을 섭외 중에 있으며, 임상시험계획서를 8월중에 다시 제출할 예정임. 한편, 동물의약품과 관련하여 닭(아피릭스), 돼지(아피돈스), 소(아피우스)에 대한 상표출원도 진행되었음. 닭의 사양시험에서 발생하는 추가적인 비용은 (주)비센에서 부담하여 2013년에 “아피릭스” 제품의 출시에 문제가 없도록 추진할 예정임.

그 밖에 소, 돼지 등의 면역증강제로서의 PLGA코팅 제제에 대한 제품등록을 위한 추가적인시험(사양시험 등)은 현재 많은 비용이 발생될 것으로 추정 되어 이 과제를 별도로 수행 할 수 있는 방법을 모색 중에 있음.



제 2 절 사업화계획

1. 봉독원료 확보

본 과제가 마무리 되는 시점에 맞추어 본격적인 제품 생산을 위해 고품질의 봉독을 다량 확보할 예정임. 현재 양봉장에서 봉독채집기를 통해 채집되는 봉독의 품질은 다양할 수 있어 정확한 품질 검사를 통한 봉독 수매 유통구조 확립이 필요함.

가. 양봉농가에서 채집되는 봉독에는 돌, 벌의 신체 일부, 또는 먼지나 화분 등 다양한 이물질들이 혼합되어 있음, 봉독 수매 시 이러한 이물질의 함량과 지표성분 함량분석 등을 통해 봉독의 등급별 수매단가를 결정하여 양봉농가에 지급하는 유통구조를 확립할 필요가 있음.

나. 비센 에서는 2011년부터 지속적으로 봉독채집기 사용방법, 보관방법 등에 대한 꾸준한 양봉농가 교육을 통해 고품질의 봉독원료 확보에 노력하고 있으며, 2012년부터 본격적인 봉독 수매를 진행하여 현재 약 2억 원 가량의 봉독을 수매하였고, 2013년에는 약 5억 원 상당의 봉독을 추가 구매 할 예정임.

다. 구입한 봉독의 원활한 소비처 마련을 위한 마케팅의 활성화가 필요함.

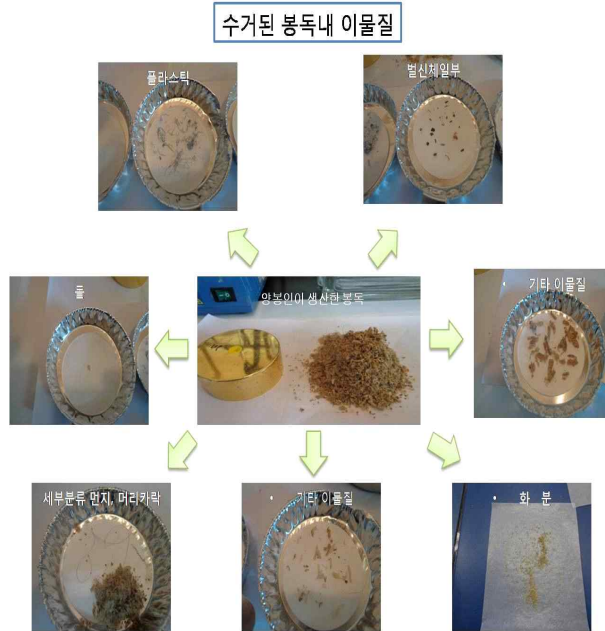


Fig 6.1 봉독 채집기 사용방법과 봉독 보관방법 교육 및 봉독수매

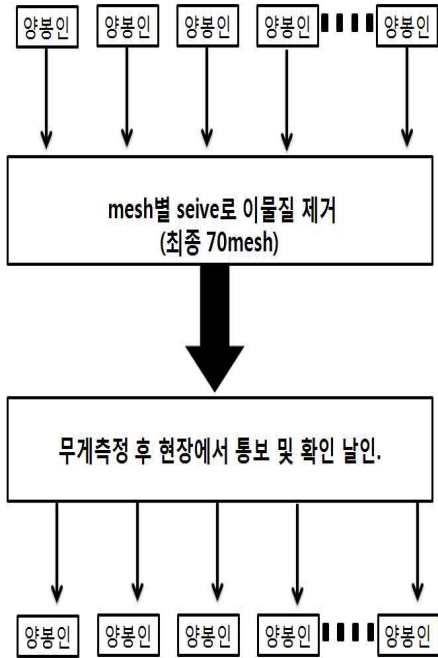
2. 봉독수매 절차

- 가. (주)비센은 양봉농가들을 대상으로 고품질의 봉독을 수매하기 위해 봉독채취 방법과 보관방법에 대한 현장 교육을 지속적으로 실시하고 있음.
- 나. 봉독 수매 시 봉독을 채취한 수매인(양봉농가)들의 참관 하에, 봉독으로부터 Sieve shaker를 통해 이물질을 제거 후 최종 sieve(70mesh)를 통과한 봉독을 평량하여, 해당 양봉인이 그 무게를 확인, 1차 서명을 하게 됨.
- 다. 구체적으로 이물질이 제거된 봉독에서 1g을 분취하여 보관용 시료로 보관함.
- 라. 이 봉독의 구성 성분들을 분석하여 기준에 따라 등급화 한 시험 성적서를 발부하고, 봉독생산자가 이 결과에 동의하면 대금을 지불하는 형식으로 봉독 수매 절차를 확립하여 운영하고 있음.
- 마. 봉독의 등급은 1차적으로 주성분인 melittin 함량을 기준으로 50~60% 1등급, 40~50% 2등급, 30~40% 3등급 그 이하는 반품으로 봉독의 등급을 결정하고 있음.
- 바. 2012년부터 지금까지 수매한 봉독의 등급은 90%이상이 1등급으로 (주)비센은 고품질의 봉독 원료를 확보하고 있으며, 과제 종료 전에 충분한 봉독원료를 확보하여 제품 생산에 문제가 없도록 추진 할 것임.



Fig 6.2. 아피치스 생산 절차

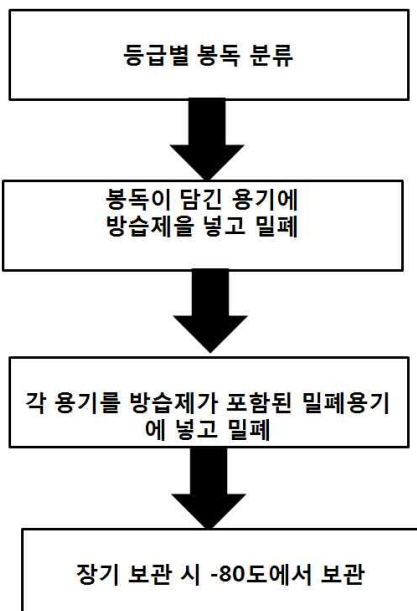
step1. 봉독수거



step2. 봉독분석



step3. 봉독보관



step4. 봉독원료 제조

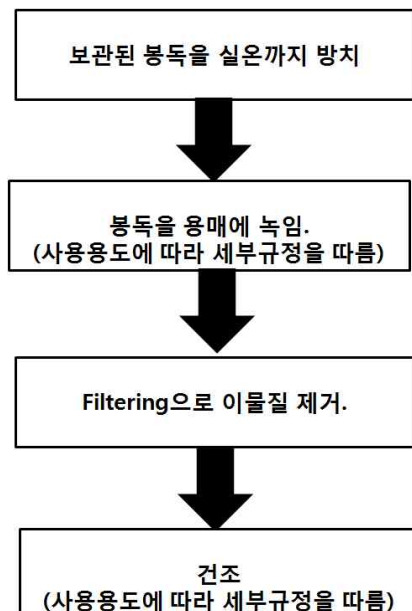


Fig 6.3. 봉독원료 확보 절차

3. 제품 판매 전략

- 양봉농가의 신뢰를 바탕으로 한 고품질의 봉독 원료 확보
- 기존 봉독제품과 차별화된 효과를 나타내는 봉독 제형에 대한 홍보 진행.
- 다른 검증기관을 통해 효과에 대한 과학적인 결과 제시를 통한 신뢰성 확보.
- 현재 수의사와 동물의약품 판매업체에 봉독 의약품에 대한 판매의지가 있으나, 제품을 구하기 어려운 실정으로 제품 등록 후, 동물의약품 판매업체와 연계하여 제품 판매가 용이할 것으로 생각됨(2013년 국제축산박람회 참석 시 많은 수의사와 동물의약품 판매업체에서 봉독의약품 출시에 관심을 많이 표명하였음).

[첨부1]

부 표

- 【업 체 명】 주식회사 비센
- 【제 품 명】 아피-칩스 (APi-Chicks)
- 【허가번호】 제 - 호

1. 원료약품 및 분량(본제 1g 중)

한국산 봉독(melittin 40% 이상, chrysin 0.001% 이상), 별규.....	12.5mg
슈크로오스.....	0.825g
부형제(exipient)	162.5mg

2. 성상 및 제형

유백색의 산제

3. 제조방법

대한약전의 산제 제조방법에 따름

4. 효능 및 효과

가금류의 면역력 증강, 성장촉진

5. 용법 및 용량

1) 용법

- ① 투약방법: 가금류의 마릿수와 일령에 따라 아래 용량표와 같이 희석하여 2시간 이내에 분무 투여 합니다.
- ② 1차 투여: 3일령 이전의 가금류에 분무투여 합니다.
- ③ 2차 투여: 9일령에 ① 같은 방법으로 분무투여 합니다.

2) 용량

- ① 일령에 따라 본제를 아래 표를 참고하여 정제수로 희석한 후 분무 투여합니다.

구 분	500수 기준 - 희석비율	1,000수 기준 - 희석비율	10,000수 기준 - 희석비율
	약제 1g vial 수량 +정제수 량	약제 2g vial 수량 +정제수 량	약제 20g vial 수량 +정제수 량
3일령	0.5g vial 1개 + 100ml	1g vial 1개 + 200ml	10g vial 1개 + 2,000ml
9일령	0.5g vial 1개 + 200ml	1g vial 1개 + 400ml	10g vial 1개 + 4,000ml

6. 포장단위

500수用 (0.5g 포장 vial x 2개), 1,000수用 (1g 포장 vial × 2개), 10,000수用 (10g 포장 vial × 2개)

7. 저장방법 및 유효기간

- 가. 저장방법 : 냉동실(-20℃)에 밀폐된 상태로 보관
- 나. 용기종류 : 밀폐용기
- 다. 유효기간 : 제조일로부터 24개월간

8. 주의사항

가. 사용상의 주의사항

- 1) 반드시 수의사에 지시에 따라 사용하십시오.
- 2) 건강한 동물에만 사용하십시오.
- 3) 지정된 축종이외에는 사용하지 마십시오.
- 4) 본제는 접종직전에 정제수에 희석하여 사용하며 용해된 약제는 충분히 섞어 전량분무 하십시오.
- 5) 본제는 접종직전에 반드시 약제의 단위와 성상을 관찰 후 이상이 있으면 사용하지 마십시오.
- 6) 개봉한 약제는 개봉 즉시 모두 사용하십시오.

나. 적용상의 주의사항

- 1) 본제는 동물의 일령(1~3, 9~10 일령 등)과 마릿수에 따라 해당 약제를 정제수로 녹이고 희석하여 분무하며 일단 희석된 약제는 전량 분무합니다.
- 2) 분무되는 입자의 크기는 50~100 마이크론이 되게 분무기를 조절합니다.
- 3) 분무 입자의 크기, 희석량을 조절하여 1,000수 분무에 약 3분간 소요되게 합니다.
- 4) 분무접종 전에 계사내의 모든 환기팬의 가동을 중지시키십시오.
- 5) 희석된 약제는 남김없이 다 사용하여야 합니다.

다. 취급자 주의사항

- 1) 취급자는 약제의 피부와의 접촉을 피하고, 만일 눈이나 피부에 닿았을 경우 즉시 충분한 양의 물로 세척하십시오.
- 2) 적당한 장갑, 보안경, 마스크를 착용하십시오.

9. 시험기준 및 시험방법

- 가. 제품[아피-칩스(Api-chicks)]의 시험기준 및 시험방법: 별첨 1
- 나. 원료의 시험기준 및 시험방법 : 별첨 2

10. 비고 : 동물용 의약 외품

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Spray 방식을 이용한 닭에서의 봉독 투여 방법

Ganapathy 등 (2010)에 의하면 산업동물인 닭에서 체액성 면역을 유도하기 위한 백신 접종 방법으로 선호되는 방식인 주사방식, 점안방식, 스프레이 방식, 음용수 방식 중에 스프레이를 통한 방법이 면역 유도에 가장 큰 효과를 나타낸다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험에는 이 결과를 토대로 닭에서 가장 큰 면역 반응을 유도할 수 있는 스프레이 방식을 이용하여 봉독을 투여하였다.

- Lysozyme activity assay를 통한 탐식구 활성의 확인

라이소자임은 대식세포나 다형핵 백혈구와 같은 탐식구들에서 주로 분비되며 세균의 벽을 녹이는 항균물질이다 (Guo et al., 2004). 따라서 혈청 내에 존재하는 라이소자임의 양을 측정함으로써 체내에 대식세포와 같은 탐식구들이 얼마나 활성화 되었는지를 확인할 수 있다 (Kreukniet et al., 1995). 따라서 본 실험에서는 이 결과를 토대로 라이소자임 활성 측정 실험을 실시하여 면역증강의 지표로 사용하였다.

- CD4+/CD8+ ratio 통한 T helper cell 활성의 확인

CD4는 T helper (Th) cell의 surface marker로 CD8을 surface marker로 가지고 있는 T cytotoxic (Tc) cell과 구별 할 수 있는데, 특히 이 중 Th cell이 체내의 체액성 면역에 가장 핵심적인 역할을 담당하고 있는 세포로 알려져 있다 (Gobel et al., 2003). 따라서 CD4+/CD8+ ratio의 증가는 체내의 Th cell의 증가를 의미하며, 이를 통한 면역증강의 지표으로써 흔히 사용되어 진다 (Chakravarti et al., 1995). 따라서 본 실험에는 이러한 결과를 토대로 체내 말초혈액내의 CD4+/CD8+ ratio를 측정함으로써 전신적인 체액성 면역 증강 효과를 확인하고자 하였다.

- PRRSV 공격 접종에 따른 돼지에서의 면역 억압 발생

PRRSV는 돼지에서 폐렴 및 유산에 관여할 뿐만 아니라 전신적인 면역 억압을 일으켜 체내의 방어능을 떨어뜨려 그 증세가 더 악화되는 것으로 알려져 있다 (Dwivedi et al., 2012). 따라서 PRRSV 감염 시 이러한 면역 억압의 정도는 병의 경중에 중요한 역할을 하는데, Barranco 등 (2012)은 체내의 대표적인 면역 억압 사이토카인인 IL-10과 TGF- β 의 측정을 통해 면역 억압의 정도를 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 봉독 투여 후 PRRSV 공격 접종 시, PRRSV에 의한 면역 억압 정도가 얼마나 개선이 되는지 확인하기 위해 각 표적 장기의 IL-10과 TGF- β gene의 수치를 real-time PCR방식을 이용하여 측정하였다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 없음

제 8 장 참고문헌

1. Chakravarti A. The CD4/CD8 ratio: message in a bottle? *Nat Med.* 1995. 1(12): 1240-1241.
2. Barranco I, Gómez-Laguna J, Rodríguez-Gómez IM, Queda JJ, Salguero FJ, Pallarés FJ, Carrasco L. Immunohistochemical expression of IL-12, IL-10, IFN- α and IFN- γ in lymphoid organs of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012. 149(3-4):262-271.
3. Cox, C.M., Stuard, L.H., Kim, S., McElroy, A.P., Bedford, M.R., Dalloul, R.A., 2010. Performance and immune responses to dietary beta-glucan in broiler chicks. *Poult. Sci.* 89, 1924-1933.2. Erf GF, Trejo-Skalli AV, Smyth JR Jr. T cells in regenerating feathers of Smyth line chickens with vitiligo. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995. 76(2) :120-126.
4. Dwivedi, V., Manickam, C., Binjawadagi, B., Linhares, D., Murtaugh, M.P., Renukaradhya, G.J., 2012. Evaluation of immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs during early stage of infection under farm conditions. *Virology Journal* 9, 45.
5. Ganapathy, K., Bufton, A., Pearson, A., Lemiere, S., Jones, R.C., 2010. Vaccination of commercial broiler chicks against avian metapneumovirus infection: a comparison of drinking-water, spray and oculo-oral delivery methods. *Vaccine.* 28, 3944-3948.
6. Gobel, T.W., Schneider, K., Schaerer, B., Mejri, I., Puehler, F., Weigend, S., Staeheli, P., Kaspers, B., 2003. IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4⁺T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *J. Immunol.* 171, 1809-1815.
7. Guo, Y.M., Chen, S.Y., Xia, Z.G., Yuan, J.M., 2004. Effects of different types of polyunsaturated fatty acids on immune function and PGE2 synthesis by peripheral blood leukocytes of laying hens. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 116, 249-257.
8. Hinch DK, Crowe JH. The lytic activity of the bee venom peptide melittin is strongly reduced by the presence of negatively charged phospholipids or chloroplast galactolipids in the membranes of phosphatidylcholine large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1996. 1284, 162-170.
9. Han, S.M., Lee, K.G., Yeo, J.H., Hwang, S.J., Jang, C.H., Chenoweth, P.J., Pak, S.C., 2009. Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. *Am. J. Chin. Med.* 37, 253-260.
10. Han, S.M., Lee, K.G., Yeo, J.H., Oh, B.Y., Kim, B.S., Lee, W., Baek, H.J., Kim, S.T., Hwang, S.J., Pak, S.C., Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. *Poult Sci.* 2010. 89. 2396-2400.
11. Kreukniet MB, Nieuwland MG, van der Zijpp AJ. Phagocytic activity of two lines of chickens divergently selected for antibody production. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995. 44(3-4). 377-87.
12. SK Hsieh et al. Functional expression and characterization of dipeptidyl peptidase IV from the black-bellied hornet *Vespa basalis* in Sf21 insect cells *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011. 75, 2371.
13. Tanaka T, Imai Y, Kumagai N, Sato S. The effect of feeding lactic acid to *Salmonella typhimurium* experimentally infected swine. *J Vet Med Sci.* 2010. 72(7). 827-31.
14. van Winden EC. Freeze-drying of liposomes: theory and practice. *Methods Enzymol.* 2003, 367. 99-110.
15. YM Choo et al. Dual function of a bee venom serine protease. 2010. *PLoS One.* 5. e10393.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.