

GOVP1200823115

2020294

호남지역 수산양식어를 위한 항질병 및
면역증강제 탐색 및 개발

Screening and development of anti-disease and
immuno-stimulating supplements for aquaculture fish in
south-west area

연구 기관

군산대학교

해양수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “호남지역 수산양식어를 위한 항질병 및 면역증강제 탐색 및 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 5월 30일

주관연구기관명: 군산대학교

주관연구책임자: 최 상 훈

연 구 원: 하 대 망

연 구 원: 노 진 구

요 약 문

I. 제 목: 호남지역 수산양식어를 위한 항질병 및 면역증강제 탐색 및 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구의 목적

국내 수산양식 산업에 가장 문제가 되는 바이러스 및 박테리아성 질병의 발생빈도를 줄이거나 예방할 수 있는 항균, 항생, 항산화 및 항변이적인 효능의 천연물질을 탐색하여 사료의 첨가제로 개발함으로써 수산농가의 수익증대와 국가 경쟁력 확보를 목표로 현재 국내 서해안에서 내수면 양식중인 장어나 무지개송어를 대상으로 임상 동물 실험을 통해 그 효과가 밝혀진 겨우살이의 추출물을 이용하여 항질병 또는 면역증강의 효능을 탐색하고 이에 대한 약제를 개발하고자 하였다.

2. 연구의 필요성

내수면 양식의 대표적 어종인 송어와 장어를 모델로 삼아 vaccine 또는 vaccine과 함께 투여되는 면역증강제의 효능을 어체의 체액성 및 세포성면역체계를 이용하여 검증할 수 있는 기술을 습득할 수 있다. 기존에 사용되고 있는 고가의 면역증강제 대부분은 수입에 의존하고 있으며 특히 로열티 지급 등으로 인한 외화낭비로 많은 경제적 손실이 예견되는 바 본 연구과제에서 개발, 적용되는 면역증강제는 순수한 한국산 mistletoe에서 분리하는 것으로 국내 기존자원을 이용한다는 측면에서 성공확률이 높을 뿐 아니라 경제적 고부가가치를 기대할 수 있다.

II. 연구개발의 내용 및 범위

겨우살이 추출물의 송어에 대한 독성조사
송어의 특이적 및 비 특이적 면역기능 조사
항 질병효과 검색
공격실험

III. 연구개발 결과

본 연구기간 내에 도출된 결과는 다음과 같다.

- 가. In vitro에서는 30-40 $\mu\text{g/ml}$, in vivo에서는 100 $\mu\text{g/송어}100\text{ g}$ 의 농도가 최적조건으로 확인 되었다.
- 나. 주사, 구강, 침지, bath법 등을 조사해 본 결과 본 시료의 약제전달 경로로서 주사법이 가장 효과적이고 구강, 침지, bath법이 그 다음 순이었다.
- 다. ROI: 500 μg 투여군에서 활성산소농도가 최적으로 나타났다.
- 라. 보체의 활성(항체를 매개로한 classical pathway)도 증가되는 것으로 관찰되었다.
- 마. 라이소자임의 효과 역시 증가되는 것으로 관찰되었다.
- 바. 대식세포의 활성은 시료의 농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가되었다.
- 사. in vitro 및 in vivo 수행결과 *E. tarda*에 대한 중화나 감염 후 치료효과가 미약한 것으로 나타났다.
- 아. 겨우살이를 접종한 후 *E. tarda*를 감염시킨 송어의 치사율이 현저히 감소하였다.

V. 연구개발 결과의 활용계획

- 가. 송어 이외의 양식어종에 적용
- 나. 사료첨가제로서의 활용조사
- 다. 현장적용 가능성 타진

SUMMARY

I. Project Title

Screening and development of anti-disease and immuno-stimulating supplements for aquaculture fish in south-west area

II. Necessity and Objective of Research

1. Objective

In the present domestic aquaculture industry, the microbial infection, which would lead to a serious mass mortality of cultured fish, is a main target to avoid. To solve the predicament, anti-microbial, anti-oxidative and anti-mutational materials should be developed. In this report, Korean mistletoe, which is known as a strong anti-cancer natural product, was tested whether it has an immuno-stimulating activity against rainbow trout being cultured inside West coast in Korea.

2. Necessity of research

The present available immuno-adjuvants adjusted to fish culture are mostly relied on the imported products. The phenomenon has pushed many people working in fishery industry in a detrimental economic loss. Therefore, the present study was necessary to obtain domestic natural products in terms of immuno-supportive materials development. Through the study, lots of economical profits are expected.

III. Research Contents and Scope

1. The toxicity of mistletoe extract against rainbow trout
2. The specific and non-specific immunity of rainbow trout induced by mistletoe
3. Anti-disease effect

4. Challenging test

IV. Research Results

1. The optimal concentration was determined to 30–40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in vitro and 100 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 100g in vivo.
2. Peritoneal injection route appeared to be the most effective compared to other ones
3. Optimal ROI production was elicited at the concentration of 500 μg of mistletoe
4. Complement activity based on the classical pathway was effectively enhanced
5. Lysozyme activity was also increased
6. Phagocytic activity was enhanced on a mistletoe concentration-dependant manner
7. There was no pharmaceutical effect against *E. tarda* in vitro and in vivo
8. Mortality of rainbow trout was radically decreased following an injection of mistletoe

V. Applications

1. Application to other fishes besides rainbow trout
2. Development of fish diets supplemented with mistletoe
3. Field based try

CONTENTS

Chapter I. Introduction -----	8
Chapter II. Domestic and International Research status-----	9
Section 1. Domestic status -----	9
Section 2. International status-----	11
Chapter III. Research Scope and Results -----	11
Section 1. Experimental Methods -----	11
Section 2. Results -----	14
Chapter IV. Achievement and Contribution of Research -----	22
Chapter V. Application of the Results -----	22
Chapter VI. References -----	23

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요-----	8
제 2장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보-----	9
제 1절 국내 기술동향-----	9
제 2절 국외 기술동향-----	11
제 3장 연구개발 수행내용 및 결과-----	11
제 1절 연구개발 수행방법-----	11
제 2절 연구개발 결과-----	14
제 4장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	22
제 5장 연구개발결과의 활용계획-----	22
제 6장 참고문헌-----	23

제 1장 연구개발과제의 개요

연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

◆ 기술적 측면

지금까지 양식어류에 사용되어왔던 기존의 면역증강제들은 더 이상 포유류의 입상에 적용시키지 못 할 만큼 심각한 부작용이 있거나 효능이 미비해 지속적인 사용을 자제해야 할 형편이다. 어류에 적용되는 면역증강제를 포함한 모든 약제들은 일단 포유류의 임상실험을 통해 그 효능이 입증된 것들이지만 어류가 포유류에 비해 생리적 특성 즉, 물이라는 독특한 서식환경 및 진화과정에서 하등동물이라는 등의 현격한 차이가 있음에도 불구하고 어류에 대한 포괄적이며 심도 있는 응용가능성의 연구 없이 무분별하게 사용되고 있는 실정이다. 그러므로 본 연구과제에서는 면역증강제를 어류에 투여할 때 가장 효과적인 방법을 다각도로 모색 할 것이며 어류의 면역체계를 포유류의 것과 상호 비교연구 하면서 어류에 가장 효과적으로 적용될 수 있는 면역증강제를 개발 또는 수정 및 보완할 수 있는 기술을 축적할 수 있다. 이미 본 연구과제팀에서 mistletoe로부터 강력한 면역증강효과를 나타내는 추출물에 대한 분리와 그에 대한 임상적 기초자료들을 충분히 축적해 놓은 상태며 본 연구 과제를 통해 더욱 효과적인 분획을 순수분리 할 수 있는 기술은 물론 이러한 특정 면역증강물질을 유전공학적인 기법으로 대량생산 할 수 있는 기술을 마련 할 수 있다. 나아가서는 내수면 양식의 대표적 어종인 송어와 장어를 모델로 삼아 vaccine 또는 vaccine과 함께 투여되는 면역증강제의 효능을 어체의 체액성 및 세포성면역체계를 이용하여 검증할 수 있는 기술을 습득할 수 있다.

◆ 경제·산업적 측면

양식송어 및 장어의 생산에 있어서 치어에서부터 성어에 이르기까지 양식 전 기간 동안 계절에 관계없이 발생하는 Edward 병, IHNV 및 IPNV에 의한 대량폐사 등의 고질적인 질병 등으로 말미암아 수산농가에 막대한 경제적 손실이 따르고 있는 바 이를 방지하여 농어민의 소득증대에 크게 기여 할 수 있다.

기존에 사용되고 있는 고가의 면역증강제 대부분은 수입에 의존하고 있으며 특히 로열티 지급 등으로 인한 외화낭비로 많은 경제적 손실이 예견되는 바 본 연구과제에서 개발, 적용되는 면역증강제는 순수한 한국산 mistletoe에서 분리하는 것으로 국내 기존자원을 이용한다는 측면에서 성공확률이 높을 뿐 아니라 경제적 고부가가치를 기대할 수 있다.

◆ 사회·문화적 측면

공중보건학적인 측면에서 무분별한 약제의 오용 및 남용 등은 궁극적으로는 인간의 식품 위생에 엄청난 위험을 초래케 하는 것으로 하루라도 빨리 어체 내에 잔류되어있는 약품들의 최소규정농도를 법제화하는 것이 시급한 실정이다. 그러므로 본 연구과제가 성공적으로 수행되었을 시 보건위생에 미치는 유익하고도 바람직한 파급효과를 기대 할 수 있다.

제 2장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

본 연구과제의 연구책임자는 인간과 포유류를 대상으로 항암제의 개발과 면역증강제 개발에 많은 연구투자를 하였다. 최근에는 어류를 모델로 하여 잉어, 넙치 및 뱀장어 등의 면역체계를 이해하고자 면역글로부린의 분리, 이에 대한 단일클론 및 복합항체생산, 면역세포들의 선택적 분리, 각 세포들의 면역학적기능들을 집중적으로 연구함으로써 어류면역체계에 대한 기본적인 지식과 연구과정에서 습득된 기술들을 바탕으로 각종 어류용 vaccine은 물론 면역증강제의 효능을 검증할 수 있는 연구 환경조건들을 우수하게 확립시켰다.

제 1절 국내기술동향

항 질병 능력을 배양시키기 위해서는 약화된 면역기능을 부활시키거나 또는 증강시키는 다양한 면역학적 방법들이 요구되는데 이미 포유류를 대상으로 많은 연구가 진행되어 오고 있다(Mizoguchi *et al.*, 1992; Tartour *et al.*, 1995; Aoe *et al.*, 1995). 생체의 면역기능을 활성화시키는 면역증강물질로서는 오래 전부터 미생물 또는 식물류에서 추출한 polysaccharide 계통이나 peptide가 결합되어 있는 muramyl dipeptide 또는 peptidoglycan 등의 불 수용성 다당류가 주류를 이루어 왔다. 최근에는 cytokine의 일종인 interferon- γ , interleukin-2, -10 및 -12 등을 재 조합단백질로 제조하여 투여하거나 그것들의 유전자를 vector에 삽입한 후 생체에 주입시키는 유전자 치료법으로 직접 및 간접적인 면역기능 상승효과가 나타나는 것을 확인하였다 (McKnight, *et al.*, 1994; Fakhrai, *et al.*, 1994; Kim & Cohen, 1994, Colombo & Forni, 1994). 이 밖에도 위에서 언급된 계통과 유사한 다른 종류의 물질들을 대상으로 활발한 연구가 진행 중에 있다. 그러나 미생물 세포벽의 구성원인 polysaccharide 계통의 물질들은 불용성인 관계로 생체내의 특정기관에 침착되어 정상세포에도 cytotoxicity를 심하게 나타내는가 하면 과도하게 면역세포를 활성화시킴으로써 과잉 분비되는 cytokine들의 정상세포에 대한 cytotoxicity 부작용이 심각한 문제점으로 대두되고 있다. 이렇듯 면역증강효과를 나타내는 훌륭한 후보물질을 개

발하기 위해서는 첫째, 정상세포에는 cytotoxicity의 부작용이 없어야 하고 둘째, macrophage 외에 다양한 종류의 면역세포들을 활성화시킬 수 있어야 하며 마지막으로 수용성이면서 적절한 면역기능을 균형 있게 활성화시킬 수 있는 제반의 조건들을 만족시켜야만 할 것이다.

어류용 면역증강제 개발을 위해 현재 많은 연구가 진행되고는 있으나 이렇다 할 효과적인 제재의 개발은 미흡한 실정이다. 군산대학교의 박성우 교수는 beta-glucan을 이용한 면역증강제의 개발을 수행하였으나 상업적으로 이용될 만큼의 성공적인 결과를 얻지 못했으며 부경대학교의 정현도 교수팀은 일본에서 시판되어 포유류 등에 사용되고 있는 PS-K를 이용하여 어류에 대한 질병예방제 및 면역보조제로서의 효능을 조사하여 좋은 결과를 얻었다. 그러나 이러한 일련의 연구결과들은 기존에 이미 개발되어 상품화된 물질들을 단순히 어류에 적용시켜 효과의 유무확인만 하는 것에 지나지 않았으며 더욱더 탁월한 효능을 나타내는 신 물질 개발 등에는 소홀히 해왔다. 본 연구자와 지속적인 협동연구자로서 활동하고 있는 한동대의 김종배 교수팀은 이미 포유류를 대상으로 한국산 mistletoe의 항암효과는 물론 면역증강효과가 유럽산의 것에 비해 월등히 나왔음을 기초 연구로써 밝혔으며 효능을 보이는 분획이 유럽산의 lectin-I보다 오히려 국내산의 lectin-II라는 새로운 사실을 입증함에 따라 어류에 있어서도 동일한 결과가 도출될 것으로 기대하고 있다.

겨우살이는 한방에서 일명 상기생(viscum album coloatum)으로 불리며 진정, 통경, 요통, 고혈압, 소종, 유산방지, 치통 등에 널리 사용되어온 반 기생 식물로 우리 나라 전역에 분포하여 주로 참나무, 배나무, 오리나무, 사과나무, 뽕나무 등을 숙주로 기생한다. Mistletoe의 초기추출물을 이용하여 현재까지 수행한 연구의 결과들을 간략하게 요약하면 첫째, 초기추출물과 추출물 분획을 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 탁월한 암 전이 억제효과는 물론 암세포를 직접 공격하는 강력한 항암 효과를 확인하였고 둘째, 면역학적인 기능 면에서 추출물 자체로서는 mitogenic effect가 약하게 나타났지만 추출물로 감작을 시킨 후 기존의 mitogen을 처리하였을 시 *in vivo* 및 *in vitro* 모두에서 탁월한 상승효과를 보였으며 또한 IL-1의 합성을 유도하는 기존의 mitogen과 비교하였을 때 2-3배의 높은 역가를 나타낸 반면에 *in vivo*에서는 전혀 독성효과가 나타나지 않았다. 마지막으로 keyhol limpet hemocyanin (KLH)을 항원으로 하여 추출물에 대한 면역보조제로서의 기능을 조사해본 결과 대조군에 비해 항체의 titer가 현격히 증가하였으며 항체의 isotype은 대부분이 IgG로써 isotype class switching이 매우 우수하게 일어나고 있다는 사실을 확인하였다.

제 2절 국외기술동향

현재 어류에 사용되고 있는 면역증강제로서 미생물의 세포벽 구성 성분의 일종인 불용성 다당류로서 β -1, 3와 β -1, 6 고리로 연결된 glucan과 peptide로 강하게 결속 되어있는 peptidoglycan, Miyairi 균체말, 및 올리고당 등이 있다. 그러나 이들 모두는 동물의 임상 실험을 통해 면역증강 효능이 확인되어 어류에 적용된 것이지만 그 후에 부작용이 동물에 심각하게 나타나 더 이상 동물에는 이용되지 않고 있는 실정이므로 어류에 계속 적용시키는 것도 또한 고려해 보아야 할 것이다. 이렇듯 면역증강제의 개발은 우선 포유류를 대상으로 철저한 임상실험을 거친 후 시도되고 있으며 현재도 다양한 장소에서 계속 연구개발 되고 있다. 겨우살이(mistletoe)에 관한 연구는 주로 독일과 스위스 등 대부분 유럽에서 수행되었으며 mistletoe를 이용한 특허 건수는 현재까지 27건(mitogen immune stimulator 및 tumor therapy, 발모촉진제, 강장제, 혈압강하제, 음료첨가물 및 치아세척용 power 등)에 달한다. 항암제로 이용되는 겨우살이의 주사제는 주로 스위스의 Iscardor, 독일의 Helixor, Absorba 등 3개회사에서 생산하고 있으며 연간 매출액은 약 1,000억 정도에 이른다. 단백질류 중 lectin은 세포독성효과 및 mitogen의 역할을 하는 것으로 polysaccharides (mannose, galatose, glucose, N-acetylglycosamine 포함), proteins (Lectin I, II, III, viscotoxin, complex VP 16), alkaloids 등의 각 성분이 모두 항암 효과를 나타내지만 lectin이 주된 약효성분으로 밝혀졌다. 주로 lectin에 대한 연구가 많이 되어있지만 구조가 완전히 밝혀진 것은 lectin-I 뿐이고 lectin-II와 III에 대한 보고는 거의 없다. 연구내용으로는 mitogenic 효과, cytokine분비유도, NK 세포활성, 면역증강효과는 물론 암세포전이 억제 및 항암효과 등이 탁월하다고 보고되고 있다.

외국에서 진행된 대부분의 연구는 lectin-I 에 대한 것이며 lectin-II 및 -III의 효능에 대한 보고는 거의 없는 상태다. 그러나 한국산 mistletoe는 lectin-I 보다 lectin-II가 주성분으로 밝혀진바 lectin-II에 대한 구조적, 생리 활성적 특성이 규명되면 lectin 관련 연구 분야에 새로운 영역을 구축할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 국산 mistletoe의 면역증강력이 기존의 외국산 mistletoe의 것보다 2-3배 강력하며 세포독성은 현저하게 떨어지는 본 연구팀의 연구결과들을 감안할 때 포유류는 물론 여태껏 양식어류에 적용되었던 기존의 항질병제를 획기적으로 대체할 수 있으리라 전망된다.

제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 연구개발 수행방법

겨우살이의 독성유무 조사

LD₅₀을 단위로 한 기초적인 예비독성시험을 실시하였다. LD₅₀의 경우 송어의 생식세포에서 유래된 RTG-2 세포주 salmon의 상피세포에서 유래된 CHESE-14 세포주를 각각 이용하여 *in vitro* 상에서 측정하였다. 각각의 세포주를 24 well plate에 well 당 1×10^6 씩 분주한 후 겨우살이를 10 ng부터 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 다양한 농도로 접종하여 37 °C 배양기에서 약 3일간 배양하였으며 그 후 각각의 세포주에서 나타나는 50% 세포의 독성효과를 MTT법으로 측정하였다. *In vivo* 상의 독성유무 조사는 잉어 50g부터 1kg까지를 대상으로 하였다. 어체중 100g당 겨우살이 100 μg 과 1000 μg 을 각 군 당 5미씩 3개 군으로 나누어 복강으로 투여하였다. 약 2일 후 어체의 혈액을 채취하여 간 기능의 정상여부를 측정할 수 있는 GOT와 GPT수치와 혈중 c-creatin 농도의 변화를 Fugi Dry Chem System으로 조사하였다.

투여경로에 따른 면역반응

항원으로 hemocyanin을 사용하였으며 복강내 주사는 어체 100g당 100 μg 의 겨우살이를 항원 100 μg 과 혼합하여 총 200 μl 로 주입하였다. 대조군(겨우살이 미주입) 및 시험군(겨우살이 주입) 각각 10미씩을 사용하였으며 약 한달 후 혈액을 채취하여 항체의 양을 ELISA로 측정하였다. 침지법과 bath 법은 수조 ℓ 당 500mg으로 ml당 500 μg 으로 농도를 조정하였으며 수조의 총 물의 부피는 4 ℓ 로 하였다. 침지법은 10미의 잉어를 3분간 겨우살이가 용해된 수조에 순치 시킨 후 바로 정상 수조 수에 이동시켜 항원으로 면역화 시켰다. Bath법은 10미의 잉어를 약 6시간동안 겨우살이 용해 수조 수에 순치 시킨 후 항원으로 면역화 시켰다. 구강면역은 ml당 500 μg 으로 구강을 통해 강제 주입시켰으며 항체생성 유무를 확인하기 위해 복강 내 주사법에서 사용되었던 시간대를 각각의 실험법에 일정하게 적용하였다.

기타 첨가제와의 혼합투여

기존의 면역증강제인 complete Freund's adjuvant (FCA) 및 β -glucan을 겨우살이와 비교 분석 하였다. FCA는 항원과 1:1의 희석으로 emulsion화시킨 후 총 부피 200 μl 로 주사하였다. FCA와 겨우살이를 혼합하여 주사한 group에는 PBS대신 겨우살이를 1:1로 혼합하였다. β -glucan은 이미 적정화된 농도(50 $\mu\text{g}/100\text{g}$ of fish)로 항원과 혼합하여 200 μl 로 주사하였다. 겨우살이는 어체 100g당 100 μg 의 겨우살이를 항원 100 μg 과 혼합하여 총 200 μl 로 주입하였다. 각 group당 10미씩으로 총 40미(면역증가제를 사용하지 않은 대조군 포함)를 사용하였다. 총 면역시킨 기간은 40일 정도로 하였다. 최종 항체역가는 ELISA로 측정하였다.

ROI, lysozyme 및 보체 활성화 분석

본 연구에서 어류모델로 사용한 장어에 겨우살이를 200, 500, 1000, 1500 μ g/ml 및 FCA로 주사한 지 약 4일 후 신장세포가 나타내는 reactive oxygen intermediate (ROI), lysozyme 및 보체의 활성능력을 측정하였다. 우선 신장세포를 HBSS로 충분히 세척한 후 1×10^6 씩 96-well 판의 well 당 100 μ l로 NBT (mg/ml) 100 μ l와 함께 분주하였으며 ROI 특정을 위해 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원능을 측정하였다. 약 25 °C에서 한 시간 후 과잉 NBT 양을 PBS로 세척하고 신장세포들을 70% 메탄올로 고정하였다. 메탄올을 걷어낸 다음 PBS로 세포를 2회 세척하였다. 환원된 formazan을 KOH 120 μ l와 DMSO 140 μ l로 용해시켜 OD가를 ELISA 측정기로 620 nm에서 측정하였다. 혈청 lysozyme 활성은 turbidimetric microtitre plate 방법을 사용하여 측정하였다. 즉, *micrococcus lysodeikticus* (Sigma) 0.15mg/ml 표준시료를 66 mM phosphate buffer (pH6.0)에 준비하여 장어의 혈청을 박테리아 표준시료 1ml 당 50 μ l씩 첨가하였으며 흡광도의 감소를 흡광도계 450 nm에서 0.5 및 4.5 분 간격으로 측정하였다. 보체의 활성은 ICR 마우스 적혈구를 표적세포로 사용하였다. Heparin이 처리된 장어의 혈액(겨우살이 처리군 및 대조군의 혈액)을 Histopaque 용액(Sigma)으로 2500 rpm에서 40분 동안 원심 분리하여 적혈구를 수집하였다. Alternative 경로의 보체활성화 측정을 위해 혈청을 PBS로 1:2, 1:4 및 1:8로 희석시킨 후 각각 200 μ l씩 250 μ l의 적혈구에 최종세포의 수가 2×10^7 이 되도록 조정하였으며 상온에서 한 시간 배양하였다. Classical 경로의 보체활성을 측정하기 위해 2×10^7 의 적혈구 250 μ l를 PBS로 1:5로 희석 및 56 °C에서 30분간 불활성화 시킨 rabbit anti-mouse RBC 혈청 또는 이스라엘 잉어 anti-mouse RBC 혈청 200 μ l에 1시간 가량 배양시켰다. 배양 후 시료들을 1000 rpm에서 3분간 원심분리하고 200 μ l의 측정혈청을 첨가하여 약 1 시간 후에 나타나는 용혈반응을 검사하였다.

대식세포의 탐식능 및 살해세포활성화 분석

대식세포의 탐식능을 측정하기 위해서 겨우살이 또는 PBS로 감작된 신장세포를 10^6 씩 5% FBS-MEM 200 μ l에 희석하여 8-well slide chamber (Nunc)에 분주한 후 25 °C에서 하루동안 배양하였다. 배양 후 20 μ l의 zymosan (mg/ml)을 각 well에 첨가하고 25 °C에서 2시간 더 반응시켰으며 탐식능을 Wright's 염색을 통해 측정하였다. 장어의 자연살해세포(Natural cytotoxic cell, NCC)능력을 측정하기 위해 겨우살이 투여군과 비 투여군의 대조군을 MTT법으로 조사하였다. 우선 D17 bovine sarcoma 세포주를 10^4 씩 96 well plate에 분주하고 각 농도의 겨우살이에 감작된 장어의 신장세포를 1:10, 1:50, 및 1:100의 숫자로 넣은 후 약 4시간 37 °C 배양기에서 반응시켰다. 그 후 표적세포에서 나타나는 세포의 apoptosis를 MTT법으로 측정하여 %로 나타내었다.

공격실험

겨우살이에 의한 면역력증가가 이전 실험을 통해 확실히 입증은 되었지만 병원균에 의해 감염된 어류가 겨우살이에 의해 확실히 면역이 되는 지 공격실험이 필요하다. 이에 본 연구에서는 *Aeromonas hydrophila*를 겨우살이에 이미 감염이 된 장어에 감염시켜 그 후 나타나는 생존율을 관찰하였다. 우선 *hydrophila*에 의해 장어가 죽는 그 때의 농도를 결정하고 (2.5×10^6 /마리) BHI 배지에서 배양한 *A. hydrophila*를 장어 1마리 당 2.5×10^6 씩 겨우살이에 농도별로 감염된 각 군에 주입하였다.

제 2절 연구개발 결과

In vitro 및 In vivo 독성조사

어류세포주 RTG-2 및 CHSE-214 세포주를 대상으로 겨우살이에 대한 in vitro 독성여부에 대한 조사를 해 본 결과 Fig.1에서 나타난 것처럼 50 %의 세포상해를 보이는 겨우살이의 농도는 각각 $40 \mu\text{g/ml}$ 및 $30 \mu\text{g/ml}$ 이었다. 다양한 세포주를 대상으로 독성에 대한 감수성을 조사해 볼 필요는 있겠으나 이 정도의 독성수준은 포유류의 세포를 대상으로 한 실험적 수치와 비슷한 것으로 생체에 미치는 영향은 미미할 것으로 생각되었다. Table 1은 겨우살이가 어체에 노출되었을 시 in vivo 상의 간에서 생산되는 GOT 및 GPT 수치와 혈중 c-creatin의 수치를 나타낸 결과로서 어체 100 g당 겨우살이 $100 \mu\text{g}$ 의 농도투여에서는 control 군의 PBS 투여 시와 유의성 있는 차이가 발견되지 않았다. 그러나 10배 이상의 농도투여 시에는 각 독성 표준물질의 수치가 정상치보다 증가하는 것을 관찰할 수 있었지만 이 또한 정상범위내의 상승효과로서 겨우살이의 어체에 대한 독성유발효과는 미미한 것으로 간주되었다. 그러나 적정농도에서 최대의 면역효과를 얻기 위해 어 체중 100 g당 겨우살이 $100 \mu\text{g}$ 의 투여를 원칙으로 하여 본 연구의 전체실험에 적용하였다.

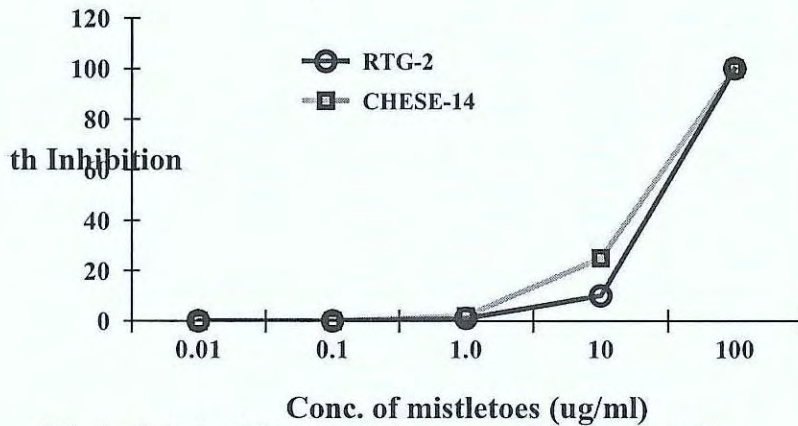


Fig 1. Cytotoxicity of mistletoes on fish tumor cells

Table 1. The levels of GOT, GPT and c-creatin in rainbow trout sera following injection of mistletoes

Standards for toxicity	Dose of mistletoes injected in fish		
	PBS	M100/100 ¹	M1000/100
GOT	20±4 ²	23±5	33±3
GPT	40±5	43±4	50±6
c-creatin	31±7	28±5	41±8

¹ μg of mistletoe/ g of fish

² mg/ml

투여경로에 따른 면역반응 차이점 조사

겨우살이를 면역화 시키는 데 있어서 통상적인 복강주사법 이외에 목욕법(Bath), 침지법(Immersion) 및 사료섭이를 이용하여 항체생산의 변화를 조사하였다. 특히 어류를 면역시키기 위해서는 복강주사법이 현실적으로 맞지 않으며 이에 버금갈 수 있는 항원의 주입 경로를 찾는 것이 무엇보다도 중요하다 할 것이다. Fig. 2는 항원투입경로에 따른 송어의 항체생산 변화를 나타낸 결과로서 복강주사의 경우 항체의 생산이 가장 높았고 Oral, Bath 및 Immersion이 그 다음 순이었다. 그러나 복강주사법 보다 다른 세 가지 방법이 항체생산 효율면에 있어서 현저히 떨어졌으나 diet를 통한 방법이 bath나 immersion방법 보다는 약간 나은 것으로 조사되었다.

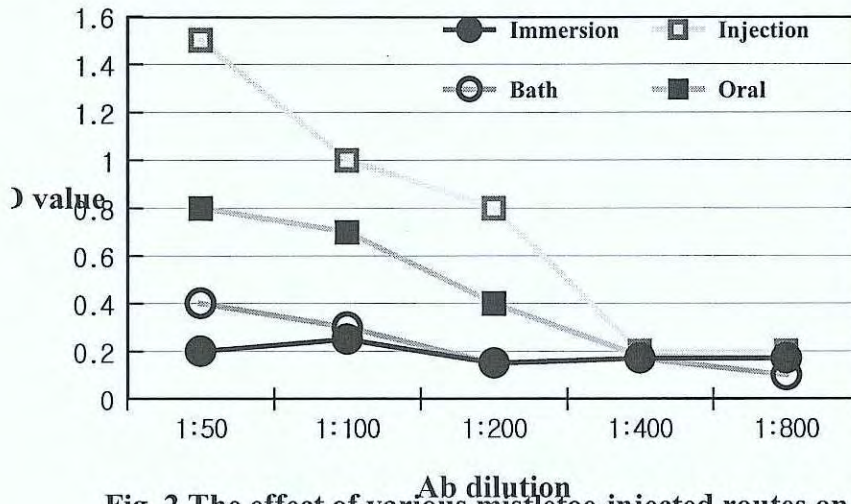


Fig. 2 The effect of various mistletoe-injected routes on producing rainbow trout antibodies

선정된 어류모델내의 체액성 면역반응, 다양한 종류의 부 첨가제와의 상승효과

겨우살이의 면역증강효과는 이미 Fig. 2의 실험결과에서 밝혀졌듯이 체액성 면역반응이 확실하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 그러나 겨우살이의 특성은 기존의 면역증강보조제의 불용성과는 다르게 수용성으로서 체내에 침투되는 확률이 높은 반면에 불활성화 되는 속도가 상대적으로 높을 것으로 생각된다. 이러한 단점을 보완하여 면역반응을 극대화시킬 수 있는 조건을 추구하고자 기존의 면역증강보조제인 FCA 및 β -glucan에 겨우살이를 혼합하여 투여하는 실험을 수행하였다. Fig. 3는 기존의 면역증강제에 겨우살이를 혼합하여 투여하였을 시 잉어혈청 내에서 일어나는 항체반응에 대한 결과이다. FCA와 겨우살이를 혼합했을 경우 겨우살이만을 투여했을 때보다 면역반응이 오히려 감소한 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 FCA가 오히려 겨우살이의 면역증강효과를 억제할 수도 있다는 가능성을 제시하고 있으며 복강 내 주사된 FCA는 약 한 달 후에도 복강 내에 거의 잔류되고 있는 사실을 고려해 볼 때 불용성의 FCA가 면역증강의 효과를 상승시키는 면도 있지만 생체적으로 질병유발 또는 그를 통한 겨우살이의 면역증강효과를 저해 할 수도 있다는 가능성을 또한 배제 할 수 없었다. 반면에 β -glucan은 자체적으로 사용되었을 경우 FCA와 별 다른 차이점을 발견할 수 없었으나 겨우살이와 혼합하여 투여하였을 시 어떠한 조건의 경우보다도 면역반응이 상승하였다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 결과는 겨우살이와 β -glucan의 면역증강 혼합제제를 개발할 필요성이 있음을 암시해 주고 있다.

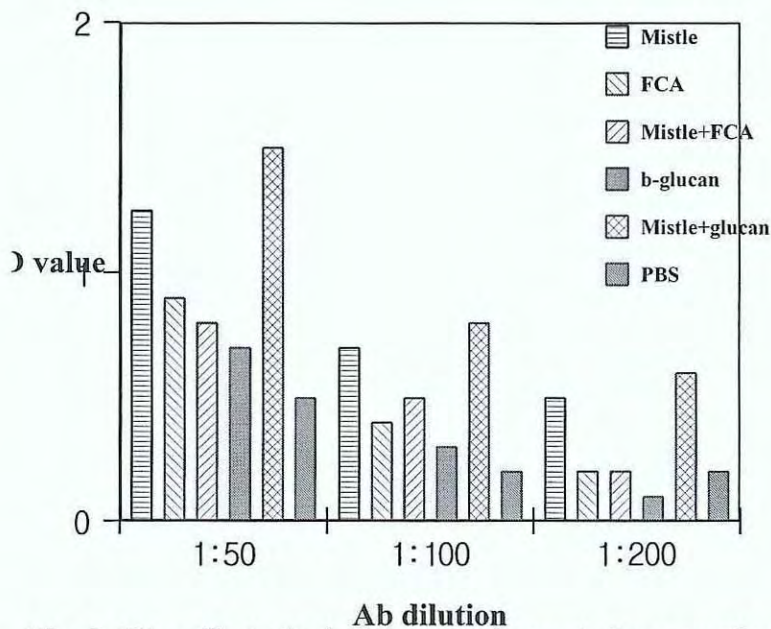


Fig. 3. The effect of mistletoe-supplemented conventional adjuvants on inducing immune response in rainbow trout

ROI, lysozyme 및 보체 활성화 검색

다양한 농도의 겨우살이에 의한 대식세포의 산화유도물질(ROI)의 생성능력을 측정해 본 결과 Fig. 4에서 나타난 것처럼 PBS의 대조군에 비해 모두 상승하는 것을 알 수 있었다. 그 중 500과 1000 μg 에서 ROI 생성능이 높이 관찰되었으며 양성대조군의 FCA보다도 50% 이상 높은 활성도를 나타내었다. Fig. 5는 혈청 내의 lysozyme 활성도를 측정한 결과이다. 대조군 PBS보다 겨우살이의 각 농도에서 더 높은 lysozyme 활성을 나타내었으며 그 중 1000 μg 에서 가장 높았다. 양성대조군인 FCA 보다 겨우살이가 농도에 따라 거의 비슷하거나 더 높은 활성이 관찰되었다. 그러나 1500 μg 의 경우 500과 1000 μg 보다 낮은 활성이 나타나는 것은 아마도 겨우살이의 특성에 의한 영향일 것으로 추정된다. 보체의 활성은 각 well에 나타나는 Hb의 농도를 OD로 측정하였지만 측정코자 하는 시료 혈청의 원 Hb 농도가 일정치 않아 Fig. 6와 같이 RBC의 용혈정도를 육안으로 관찰하여 나타내었다. 추후 본 실험과 동일한 실험을 추진할 경우 시료 혈청을 PBS로 일정하게 투석해서 사용해야 할 것이다. Fig. 6의 경우 항체가 첨가되지 않은 대조군에 비해 겨우살이가 첨가된군에서 RBC가 확실히 용혈되는 현상을 관찰할 수가 있었으며 FCA의 경우도 1000 μg 보다는 못하지만 높은 활성을 나타내었다.

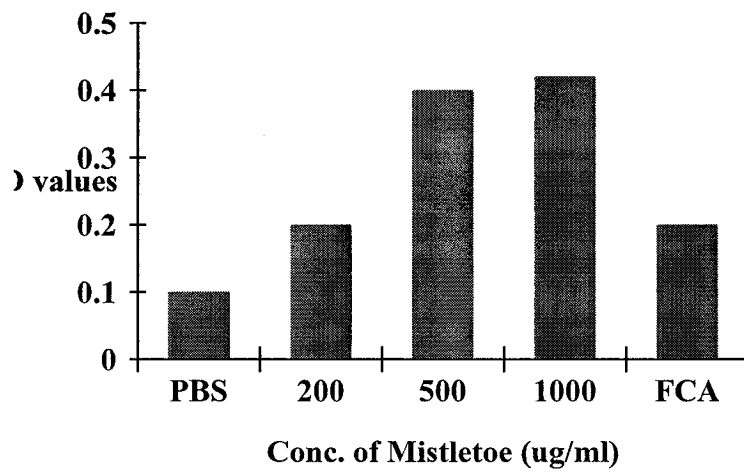


Fig. 4. Effect of in vivo mistletoe on the ROI production of kidney leucocytes at 4 days post-injection.

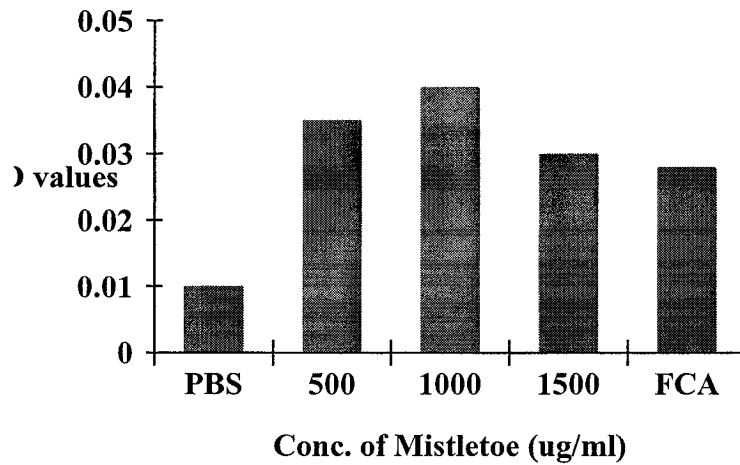


Fig. 5. Effect of in vivo mistletoe on the lysozyme activity of kidney leucocytes at 4 days post-injection.

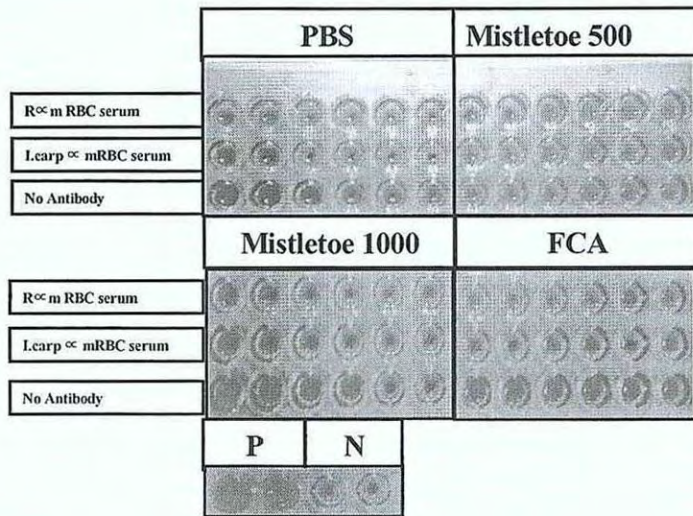


Fig. 6. Effect of mistletoe on inducing complement activity in serum at 4 days post-injection.

대식세포의 탐식능 및 살해세포활성화 검색

Fig. 7은 겨우살이에 의해 활성화된 대식세포가 zymosan을 포획한 결과로서 대조군에 비해 겨우살이 50 μ g 및 200 μ g 주입한 군에서 대식세포의 활성화가 나타났다. 그러나 겨우살이의 농도가 높으면 높을수록 대식세포가 zymosan을 포획하는 양이 많아졌으며 포획할 때의 세포특성은 세포막에 많은 양의 부착분자들이 합성되어있는 것처럼 서로 간에 응집현상이 많이 관찰되었다. Fig. 8은 장어의 자연살해세포 활성화에 관한 결과로서 E:T ratio 50:1에서 겨우살이 500 및 1000 μ g에 감작된 세포가 40% 이상의 살해율을 보여주고 있다. 이러한 결과를 통해 역시 겨우살이에 의해 송어의 비특이적인 살해세포의 활성화도 증가됨을 알 수 있었다.

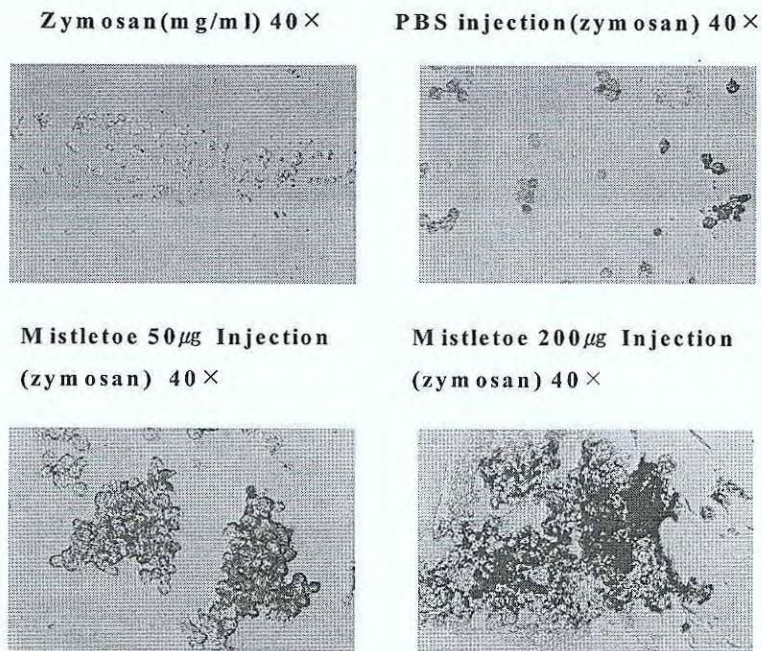


Fig. 7. Effect of mistletoe on inducing phagocytic activity of kidney leucocytes at 2 days post-injection.

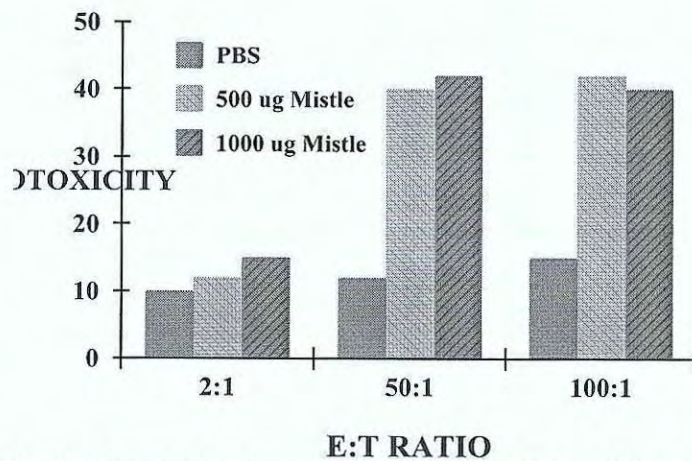


Fig. 8. Effect of in vivo mistletoe on the NCC activity of kidney leucocytes at 4 days post-injection.

항 질병 효과 검색

In vitro 실험으로서 *E. tarda*에 대한 mistletoe의 중화여부를 조사해 본 결과 mistletoe의

1-500 ug/ml 농도에서 *E. tarda*의 수가 전혀 감소하지 않았으며 in vivo 실험으로서 어체에 복강 주사 감염시켜 병을 유발시킨 후 mistletoe를 투여하여 생존율의 변화를 관찰해 본 결과 *E. tarda*에 의한 치사율을 전혀 감소시키지 못함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 mistletoe가 박테리아에 대한 질병치료효과가 없다는 사실을 암시해 주고 있다.

병원균에 대한 겨우살이의 면역증강효과 검색

어체 100g 당 500 µg과 1000 µg을 주입한 후 박테리아를 감염시켰을 때 Fig. 6에서 나타난 바와 같이 500 µg과 1000 µg의 경우 최종 10일 동안 70%의 생존율을 나타냈다. 그러나 PBS 만을 투입한 대조군은 4일부터 0%의 생존율을 나타내었으며 본 실험의 경우 1000 µg의 겨우살이를 투여하였을 경우가 500 µg의 경우보다 약간 나은 생존 형태를 보여주었다. 그러나 유의할 만한 특이한 차이는 나타나지 않았다. 이로써 겨우살이를 복강 내에 직접 투여함으로써 박테리아의 감염에 장애의 면역력이 확실히 증가됨을 알 수 있었다.

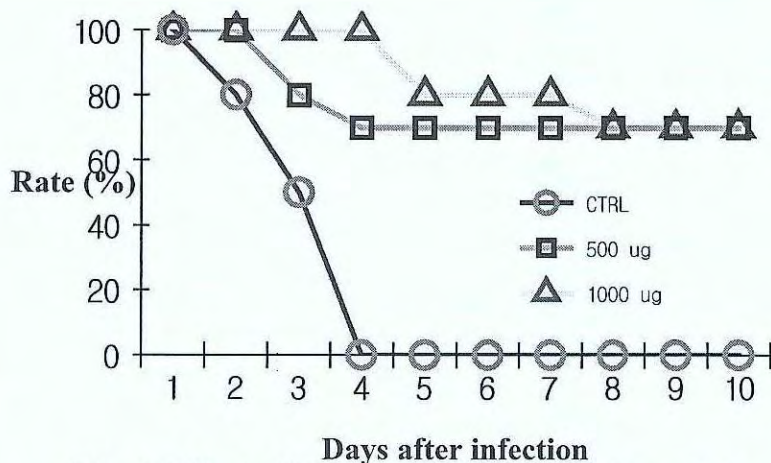


Fig. 6. Effect of in vivo mistletoe on antibacterial immune reponse lysozyme activity of kidney leucocytes at 4 days post-injection.

제 4장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 신 물질 창출이라는 산업기술개발의 목표 하에 천연물의 일종인 한국산 mistletoe에 획기적인 면역증강효능이 있음을 입증한 본 연구과제팀의 연구결과를 토대로 양식넙치의 항균, 항바이러스 및 항암 능을 강화시킬 수 있는 그러면서 부작용이 전혀 없는 면역증강제를 순수분리 하여 유전공학적 기법으로 대량생산할 수 있는 체계를 갖추므로써 수산농가의 수익증대는 물론 수입대체효과와 원료수출이라는 경제적 이익을 추구하고 나아가서는 양식어종에 알 맞는 면역증강제의 신개발에 궁극적인 목표를 두었다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

성공적인 본 연구결과들을 토대로 장어 이외의 어종에 알맞는 면역증강제 개발을 위한 지속적인 연구를 할 것이다. Lectin 단일성분으로 면역증강 효과가 인정될 경우 제약화를 위한 전 임상연구를 추진할 것이며 개발된 면역분석법(예; ELISA, TR-FIA)을 다음 목적으로 활용할 수 있다. 즉, 숙주의 종류, 계절부위(줄기, 잎, 열매 등) 및 지역에 따른 KML의 양적변화조사, Q.C.를 위한 kit 개발, epitope-mapping을 위한 활용, 및 각종 진단용 시약개발을 위한 활용 등에 활용하고자 한다. 장어양식에 가장 효과적인 면역증강제 투입경로를 결정하여 체내에서 보다 더 효력을 발생할 수 있도록 어류에 적합한 약제 전달체계(drug delivery system, DDS)를 이용한 면역증강제 개발을 지속적으로 시도할 것이다. 또한 본 연구에서 개발된 면역증강제 효능이 양식어류의 구강면역에 우수한 것으로 입증이 될 경우 사료회사와 협조체제를 이루어 어류용 사료개발에 역점을 둘 것이다.

제 6장 참고문헌

Aoe, T, Okamoto, Y, Saito, T. Activated macrophages induce structural abnormalities of the T cell receptor-CD3 complex. *J. Exp. Med.* 181:1881-1886, 1995.

Bang OS, Lee YS, & Kang S-S: A possible role of fibronectin on the differentiation of monocyte or macrophage. *Kor J Zool* 36:514-521, 1993.

Beauchamp C, and Fridovich I: superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287, 1971

Choi SH & Splitter GA: Induction of MHC-unrestricted cytolytic CD4⁺ T cells against virally infected target cells by cross-linking CD4 molecules. *J. Immunol.* 153:3874-3881, 1994

Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Royston I, Sobol RE: Immuno-gene therapy of rat glioma with TGF-beta antisense and IL-2 gene modified tumor cells. *Cancer Gene Therapy* 1:308, 1994.

Kim TS, Cohen EP : IL-2 secreting mouse fibroblasts transfected with genomic DNA from murine melanoma cells prolong the survival of mice with melanoma. *Cancer Res.* 54:2531-2535, 1994.

Colombo, M.P., and Forni, G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? *Immunol Today* 15:48-51, 1995.

McKnight, AJ, Zimmer GJ, Fogelman, H, Fogelman, SF, Wolf F and Abbas, AK. Effects of IL-12 on helper t cell-dependent immune responses in vivo. *J. Immunol.* 152:2172-2179, 1994.

Mizoguchi, H, O'Shea, J, Longo, D, Loeffler, C, McVicar, D, Ochoa, A. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science*, 258:1795-1798, 1992.