

636.4
L293C

GOVP 19904404

최 중
연구보고서

돈유종의 체세포 분석과 면역 증강 유도를 통한
돼지 생산성 향상에 관한 연구

Enhancement of pig production by analysing somatic
cells in milk and by inducing host immunostimulation

연구기관

서울대학교 수의과대학

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돈유종의 체세포 분석과 면역증강유도를 통한 돼지 생산성 향상에 관한 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

1999년 1월

주관연구기관명 : 서울대학교 수의과대학
총괄연구책임자 : 우 희 중
협동연구기관명 : 서울대학교 수의과대학
협동연구책임자 : 박 용 호
협동연구기관명 : 강원대학교 수의과대학
협동연구책임자 : 한 정 희

요 약 문

I. 제 목

모돈의 체세포분석과 면역증강유도를 통한 돼지생산성 향상에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 최근 축산물중에 잔류함으로써 인체에 유해한 항균물질의 사용기피 및 제한된 사용이 전 세계적으로 추진되고있는 실정에서 대체물질의 개발과 이에 대한 효과분석에 따른 가능성 확인 및 이용연구는 매우 중요한 과제임.
2. 첨단 기술의 개발에 의한 동물 숙주내 생체방어기전 분석이 가능해짐으로써 비특이 면역증강제의 모돈 및 자돈에 적용하는 기술개발을 통한 현장 접목 연구임.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 모돈유중 체세포 측정에 의한 생체 면역기능 분석기술 확립

가. 모돈유의 체세포수 측정분석 기술을 이용하여 모돈의 건강상태를 신속하게 판단함으로써 모돈의 건강은 물론, 그로부터 출산된 자돈에 대한 효율적인 면역 증강을 위한 방법 모색

나. 우유중 체세포수 측정 기술과 동일한 방법으로 체세포수 측정기기 (somatic cell counter)를 활용하여 분석 가능

표-1) 비특이 면역증강제 투여에 따른 돈유종 평균 체세포수 증감효과

구 분	평균 체세포수 (×1,000)		
	투여전	1차 투여후	2차 투여후
대 조 군	1,186	1,401	1,234
비특이면역증강제 투여군 (A)	608	2,122	494
비특이면역증강제 투여군 (B)	915	2,755	278
비특이면역증강제 사료첨가군 (C)	684	198	330

표-2) 비특이 면역증강제 투여후 백혈구 아집단 분포율 조사

백혈구 표면 특이 항원	MoAb	양성율(mean %)			
		대조군	비특이면역 증강제 투여군(A)	비특이면역 증강제 투여군(B)	비특이면역 증강제사료 첨가군 (C)
MHC-class I	PT85A	94.8	96.4	96.9	94.2
class II	H42A	10.5	8.9	14.4	10.0
class II	TH81A5	14.6	10.0	15.1	13.2
CD2	MSA4	87.1	74.2	87.0	86.7
CD4	PT90A	37.5	33.3	37.1	40.3
CD8	PT81B	45.2	33.0	52.5	43.2
sIgM	PIg45A	5.2	3.9	9.1	6.9
N cell	PT79A	11.9	7.7	9.8	7.0
CD11a	MHC76A	95.4	97.1	?	91.5
CD45	74-9-3	98.7	97.6	96.3	96.1
G/M	DH59B	7.6	7.8	6.3	7.0

2. 비특이 면역증강제 및 세포면역 활성물질 이용 모돈 및 자돈 숙주 면역기능 향상 기술 개발

가. 비특이 면역증강제의 모돈적용에 따른 모돈 및 그로부터 출산한 자돈의 면역기능 향진을 유도함.

1) 비특이 면역증강제를 투여한 모돈군에서는 개체별로 다소 다른 결과를 보이고 있으나, 숙주면역체계의 주된 기능을 하고 있는 MHC-class II 항원 발현 면역세포의 분포가 유의성있게 증가되었으며, CD2 표면항원 발현 T 림프구와 함께 CD 4⁺ T helper cell 및 T cytotoxic cell의 비율도 증가되었음이 관찰되었다.

2) T 림프구는 물론 항체생산과 관련된 B 림프구 및 반추류 등 동물의 세포성 면역 반응에 깊게 관여하고 있다고 연구된 N 림프구의 비율도 크게 증가되었음이 인정되었다.

3) 반면에 1차면역반응에 관여하는 것으로 알려진 granulocyte / monocyte 의 비율은 개체마다 차이가 큰 차이를 보였으며, 다소 감소되는 추세로 나타났다.

● 이상의 결과로 미루어보아 비특이 면역증강제의 모돈에 대한 영향은 모돈의 면역세포의 기능을 향진시킬 수 있는 것으로 판단되며, 특히 T 림프구의 활성화를 유도시킬 수 있으리라 생각된다. 반면에 비특이적인 면역반응인 granulocyte 및 monocyte에 의한 방어기전은 변화가 없거나 상대적으로 다소 약화될 수 있음을 시사하고 있다. 이러한 일차 면역기능약화의 가능성은 비특이 면역증강제를 병용함으로써 회복될 수 있으며, 질병방어에 특이적인 주요 반응인 T 림프구를 통한 세포성 면역기능 향진의 유지에도 좋은 영향을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

3. 비특이 면역증강제의 현장적용에 의한 자돈 생산성 향상 및 종합기술지침 수립

가. 모돈 및 그로부터 출산한 자돈에 대한 비특이 면역증강제 (B product)의 생체면역 증진효과 분석을 위하여 비투여군, 비특이 면역증강제 투여군 (A 집단) 및 비특이 면역증강제 함유사료 투여군 (B 집단) 각각의 면역세포 분포율을 돼지 면역 세포특이 단클론항체 11종을 이용하여 Flow Cytometry법으로 분석하였다.

나. K농장의 경우, 모돈에서 비특이 면역증강제 비투여군에 비해 비특이 면역증강제 투여군은 T lymphocyte (CD2), Th cells (CD4), Tc/s cells (CD8) 및 class II MHC molecule 발현세포 (Macrophage 등의 항원제시세포) 등이 유의성있게 증가되었음이 확인되었으며, granulocyte/monocyte 는 다소 증가하였으나, B lymphocyte, N lymphocyte 는 유의성있는 변화를 보이지 않았다.

다. K농장의 비특이 면역증강제를 투여한 모돈으로부터 출산한 자돈의 경우, 비투여군에 비하여 유의성있는 변화를 나타내었다. 특히, 비특이 면역증강제 함유사료를 투여한 군은 class II MHC molecule 발현세포는 매우 유의성있게 증가하였으며, 그 외에 T lymphocyte (CD2), Th lymphocyte (CD4), Tc/s lymphocyte (CD8)의 분포율 또한 유의성있게 증가되었다.

라. K농장의 비특이 면역증강제를 투여한 모돈의 경우 바이러스성 설사병에 대한 예방책의 일환으로 임신 모돈에 분만 4주전과 2주전에 2회 바이러스성 소화기백신을 접종함으로써 초유와 상유를 통한 포유자돈의 바이러스성 설사병에 대한 면역력을 형성케 함으로써 포유자돈의 폐사와 더불어 이유체중의 증가를 관찰하였다. 그 결과 비특이 면역증강제를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 모돈평균산차가 5.3인데도 불구하고 평균이유두수가 9.5두, 평균자돈이유체중이 6.8kg을 보였다. 비특이 면역증강제를 모돈사료에 3%미강발효처리하여 급여한 B군은 평균이유두수가 7.7두이나 이유시까지 포유자돈의 폐사가 없었고 평균자돈이유체중이 7.0kg을 보여 비특이 면역증강제를 모돈사료에 투여하지 않은 C군이나 임신모돈에 바이러스성 설사병에 대한 백신접종을 실시하지 않고 또한 모돈사료에 비특이 면역증강제를 투여하지 않은 D군에 비하여 성장효과가 있음을 알 수 있었다.

마. D농장의 경우, 모돈에서 비투여군에 비해 투여군은 T lymphocyte (CD2), Tc/s cells (CD8) 및 class II MHC molecule 발현세포 (Macrophage 등) 등이 유의성있게 증가되었음이 확인되었으며, granulocyte/monocyte, B lymphocyte, N lymphocyte 는 유의성있는 변화를 보이지 않았다.

바. D농장의 비특이 면역증강제 투여모돈으로부터 출산한 자돈의 경우, 비투여군에 비하여 class II MHC molecule 발현세포 및 T lymphocytes (CD2), Tc/s lymphocyte (CD8) 및 B lymphocytes는 매우 유의성있게 증가하였으나, Th (CD4), N, granulocyte/monocyte 는 변화가 없었다.

사. D농장의 경우 임신 모돈에 분만 4주전과 2주전에 2회 바이러스성 소화기백신을 접종함으로써 초유와 상유를 통한 포유자돈의 바이러스성 설사병에 대한 면역력을 형성케 함으로써 포유자돈의 폐사와 더불어 이유체중의 증가를 관찰하기 위하여 비특이 면역증강제(B product)를 분만 4주전부터 이유시까지 사료첨가하여 투여한 결과, 비특이 면역증강제를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 모돈평균산차가 5.3인데도 불구하고 평균이유두수가 9.5두, 평균자돈이유체중이 6.8kg을 보였다. 비특이 면역증강제를 모돈사료에 3%미강발효처리하여 급여한 B군은 평균이유두수가 7.7두이나 이유시까지 포유자돈의 폐사가 많았으나 평균자돈이유체중이 6.3kg을 보였으며 비특이 면역증강제를 모돈사료에 투여하지 않은 C군에 비하여 성장효과가 있음을 알 수 있었다.

- 따라서 상기 2개 양돈장의 임신모돈에 있어서 바이러스성 설사병에 대한 백신접종시에 비특이 면역증강제를 사료첨가하였을 경우에 비특이 면역증강제를 급여하지 않은 경우에 비하여 포유자돈의 성장면에서 뚜렷한 효과 있었음을 알 수 있었다.

● 종합하여 볼 때, 2개 양돈장 모두에서, 모돈의 경우는 특히 비특이 면역증강제 투여군에서 class II MHC 발현세포를 비롯한 세포성면역이 유의성있게 항진되고 있으며, 이로 인한 신생 자돈에서도 비특이 면역증강제 및 함유사료 투여군모두에서 면역세포가 증가되었다. 따라서, 올바른 vaccine 접종 및 위생관리를 병행해나간다면 비특이 면역증강제에 의한 동물 생체면역증진을 통한 질병감소 효과를 기대할 수 있으리라 생각되며 임신모돈에 있어서 바이러스성 설사병에 대한 백신접종시에 비특이 면역증강제를 사료첨가 하였을 경우, 급여하지 않은 경우에 비하여 포유자돈의 성장면에서 뚜렷한 효과 있었음을 알 수 있었다.

4. 비특이 면역증강제의 특이 질병에 대한 숙주 방어기능 측정

가. 비특이 면역증강제투여에 따른 특정질병에 대한 생체방어 효능을 확인하기 위하여 Hog Cholera virus vaccine program과 함께 투여군과 비투여군에서의 생체 면역세포 분석을 통한 효과를 분석.

1) 돼지콜레라(HC)백신을 접종한 후 HCV공격접종에 따른 투여에 대한 성장효과

각 실험군에 있어서 성장률에 대한 사료요구율은 20일간 비특이 면역증강제 사료첨가한 후 HCV를 공격접종한 다음 10일간 일반사료로 교체급여한 A 투여군은 1.29, 20일간 비특이 면역증강제 사료첨가한 후 HCV를 공격접종한 다음 계속하여 동일사료를 10일간 급여한 B 투여군은 1.36, 20일간 3% 비특이 면역증강제 사료첨가한 후 HCV를 공격접종한 다음 10일간 일반사료로 교체급여한 비특이 면역증강제 C 투여군은 1.26, 20일간 일반사료급여한 후 HCV를 공격접종한 다음 10일간 동일사료를 급여한 무투여 대조군은 1.86이었다. 두당 일당증체는 A 투여군은 573g, B 투여군은 540g, C 투여군은 573g, 무투여 대조군은 393g을 보여 A와 C 투여군이 다른 군에 비하여 높은 성장률을 보였다. 전 군은 HCV공격접종에 따른 폐사를 동반하지 않았다.

2) 돼지콜레라 백신접종한 후 HCV공격접종에 따른 비특이 면역증강제 투여에 대한 혈액학적 소견

총백혈구수는 전군에서 백신접종전에 비해 점차 증가하는 양상을 보였으며 특히 A 투여군에서 HCV공격접종전에서, C 투여군에서 실험종료시에 많이 증가된 소견을 나타내었다. 백혈구 감별계산에서는 림프구(lymphocyte)는 전군에서 시간이 경과함에 따라 증가하였고, 상대적으로 호중구(neutrophil)는 전군에서 감소하는 전형적인 림프구증다

증(lymphocytosis)과 호중구감소증(neutropenia)소견을 보였다. 호산구(eosinophil)는 전군에서 백신접종전에 비해 약간 증가하는 양상을 보였으나 정상범위내의 변화였다. 단핵구(monocyte)는 전군에서 백신접종전에 비해 약간 감소하는 경향을 보였으나 정상범위내의 변화였고, 총적혈구수는 전군에서 점차 증가하는 양상을 나타내었다. 혈색소(hemoglobin)는 전군에서 뚜렷한 변화가 인정되지 않았다. 적혈구 심층용적(packed cell volume)은 백신접종전에 전군에서 증가하는 경향을 보였으나 정상범위내의 변화였다. 혈소판(platelets)은 전군에서 정상범위내의 변화를 보였다.

3) 돼지콜레라(HC)백신을 접종한 후 HCV공격접종에 따른 비특이 면역증강제 투여에 따른 돼지콜레라 중화항체가 변화

- 전군의 HC백신접종전 혈청항체는 32 - 64로 모체이행항체가 잘 유지되어 있으며 HC백신을 2차까지 접종한 후의 항체도 64 - 128을 형성하고 있다. HCV공격접종한 후의 항체는 비특이 면역증강제 사료첨가한 시험군에서는 64 - 128로 백신접종한 후의 항체가 오는 큰 변화가 없이 비교적 안정적인 중화항체를 유지하고 있었다. 무투여 대조군은 16을 보여 백신접종한 후의 항체가보다 낮은 수치를 보였다.

● 비특이 면역증강제 투여 (A, B 집단) 및 비특이 면역증강제 발효 사료 급여한 돼지 집단 (C 집단)과 비특이 면역증강제가 첨가되지 않은 사료급여 집단 (D 집단, 대조군)을 대상으로 돼지 콜레라 백신접종 (2회)과 공격바이러스 접종에 따른 돼지 콜레라에 대한 비특이 면역증강제의 돼지 숙주 면역 증강효과를 조사하여본 결과, 비특이 면역증강제 첨가 사료를 투여한 돼지는 백신 접종후 대조군에 비하여 월등히 높은 면역세포 분포를 나타내었고, 이러한 경향은 공격 바이러스 접종후에도 대조군에 비하여 높은 수준으로 지속되고 있음이 입증되어, 돼지콜레라 백신 접종과 함께 비특이 면역증강제 함유 사료 급여시 상승효과에 의해 돼지 콜레라에 대하여 보다 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 판단됨.

Ⅲ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 모돈 및 자돈의 숙주면역증진 효과가 확인된 비특이 면역증진제의 모돈 및 자돈 사료에 활용토록 시책 건의 계획 ('99)
2. 모돈유종 체세포 측정에 의한 숙주 면역기능 확인 기술의 지도사업 반영 건의 추진 ('99)

Summary

(영문요약문)

A set of monoclonal antibodies specific to porcine cluster of differentiation (CD) antigens and non-specific immunomodulator (NIS) were used to investigate the effects of maternal immune enhancement on litter piglets by non-specific immune stimulation. Furthermore, this experiment was extended to a specific disease, hog cholera, in the fields. Host immune state was determined by the comparison of leukocyte subpopulation changes between NIS (product B) treated and non-treated groups. For these purposes, proportion of immune cells in porcine peripheral blood were measured in product B-nontreated group (Control, Group C and D), 0.05% spray-treated (Group A) and in superfeed (3% product B-fermented feed)- fed group (Group B), respectively. Furthermore, general indications like a weight gain, mortality, and feed conversion rate and clinical signs of a disease were also evaluated. Our results are as follows;

1. Sows fed with 0.05% product B-spray treated feed have shown a significant increase of the immune cell subpopulation in pig farms. Thereafter, litter piglets born from sows fed with product B-feed program (0.05% spray-treated and 3% superfeed) have also shown a significant increase in immune cell subpopulation which are related with a cell-mediated immune responses against invading pathogens.
2. Challenge of a specific disease using a hog cholera vaccine showed increasement of CD4+ helper T cells in product B-treated groups than in non-treated. This effect was maintained even after post-vaccination.
3. Other general indications and clinical signs in sow and piglets were improved in product B-treated groups with a feeding program.

From these results we conclude NIS, represented by the product B, can be used in potentiating sow immune functions resulting enhanced immunity in litter piglets. Furthermore, this finding can also be applicable to vaccine program for the appropriate and effective results in pig farms. Using NIS, therefore, can be applied in a prevention of specific diseases and in productivity increasement in pig farms.

Contents

(영문목차)

Ch 1. Preface	
- Purpose and extent of this study	11
Ch 2. Results and evaluations of the 1st year.	
- Preface	13
- Materials and methods	13
- Results	16
Ch 3. Results and evaluations of the 2nd year.	
- Preface	24
- Materials and methods	25
- Results	28
Ch 4. Results and evaluations of the 3rd year.	
- Preface	34
- Materials and methods	35
- Results	37
Legends for Figures	69
Profiles of nonspecific immunostimulators selected in this study	72

목 차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 목적

최근 축산물중에 잔류함으로써 인체에 유해한 항균물질의 사용기피 및 제한된 사용이 전 세계적으로 추진되고있는 실정에서 대체물질의 개발과 이에 대한 효과분석에 따른 가능성 확인 및 이용연구, 그리고 첨단 기술의 개발에 의한 동물 숙주내 생체방어기전 분석이 가능해짐으로써 비특이 면역증강제의 모돈 및 자돈에 적용하는 기술개발을 통한 현장 접목 연구임.

2. 범위

가. 모돈유중 체세포 측정에 의한 생체 면역기능 분석기술 확립

1) 모돈유의 체세포수 측정분석 기술을 이용하여 모돈의 건강상태를 신속하게 판단함으로써 모돈의 건강은 물론, 그로부터 출산된 자돈에 대한 효율적인 면역 증강을 위한 방법 모색

2) 우유중 체세포수측정 기술과 동일한 방법으로 체세포수 측정기기 (somatic cell counter)를 활용하여 분석 가능

나. 비특이 면역증강제 및 세포면역 활성물질 이용 모돈 및 자돈 숙주 면역기능 향상 기술 개발

- 비특이 면역증강제의 모돈적용에 따른 모돈 및 그로부터 출산한 자돈의 면역기능 향진을 유도함.

다. 비특이 면역증강제의 현장적용에 의한 자돈 생산성 향상 및 종합기술지침 수립

- 모돈 및 그로부터 출산한 자돈에 대한 비특이 면역증강제의 생체면역 증진효과 분석을 위하여 비투여군, 비특이 면역증강제 투여군 (A 집단) 및 비특이 면역증강제 함유사료 투여군 (B 집단) 각각의 면역세포 분포율을 돼지 면역 세포특이 단크론항체

11종을 이용하여 Flow Cytometry법으로 분석하였다.

라. 비특이 면역증강제의 특이 질병에 대한 숙주 방어기능 측정

- 비특이 면역증강제투여에 따른 특정질병에 대한 생체방어 효능을 확인하기 위하여 Hog Cholera virus vaccine program과 함께 투여군과 비투여군에서의 생체 면역세포 분석을 통한 효과를 분석.

제 2 장 1차년도 연구결과 및 평가

제1절 서설

1. 연구개발목표 및 평가의 착안점

가. 연구개발목표

- 모든유 체세포수 측정을 통한 건강지표작성기술 확립
- 생체면역증강 유도에 따른 생산성 향상
- 첨단 유전면역기법을 이용한 숙주의 질병방어 기전 측정

나. 평가의 착안점

- 모든유종 총 체세포수 및 혈액중 백혈구 아집단 분포율 측정에 의한 건강지침서 기초자료 작성여부
- 비특이 면역증강제 이용 숙주방어기전 증진효과 측정가능여부
- 비특이 면역증강제 이용 숙주방어기전 증진효과 획득여부
- 첨단 유전면역기법의 양돈 생산성 향상 적용 가능 여부

2. 연구개발목표의 달성도

- 모든유종 체세포수 측정이용 숙주 면역 한정치 설정 :
면역증강제 투여 및 비투여군별 돈유종 체세포수 측정에 따른 방어수준 측정
- 숙주 생체 면역 세포 분석 및 기능 분석 :
면역증강유도에 따른 숙주 생체 면역기전을 단크론항체 미 Flow cytometry로 측정해냄으로써 숙주면역증진 여부 확인 가능
- 돈유종 체세포수 및 생체면역세포별 상관관계 비교분석 :
모든의 유종중 체세포수 변화를 면역증진 개체와 비교분석함으로써 신속한 국소 방어능력 판단기술 확보

제2절. 연구 조사 항목 및 실험방법

돼지 백혈구 표면 특이 단크론항체와 flow cytometry를 이용하여 면역증강제 투여전 후 혈액내 면역세포, 즉 구조조직합체(Major Histocompatibility Complex) 및 림프구

아집단 분포율에 미치는 영향과 유즙내 체세포수 증감효과를 조사했다.

1. 말초혈액으로부터 백혈구 분리

말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte;PBL)의 분리는 Davis 등(1987)의 방법으로 실시하였다. 즉 돼지 전대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제 EDTA가 첨가된 시험관에 혼합하여 잘 섞은 다음, 1500rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 원심후 buffy coat층을 채취한 후 Ficoll(Histopaque 1.119, Sigma)에 중층한 후 1500rpm에서 20분간 원심분리한 후 Ficoll과 혈장과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS로 3회 세척하여 PBS에 부유시킨 다음 tryphan blue exclusion technique에 의해 생존 세포수를 측정 한 후 최종농도가 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 정도로 조절하여 이용하였다.

2. 백혈구 아집단 검사용 단클론항체

면역증강제 투여전 후의 면역학적 특징을 조사하기 위하여 백혈구 세포 표면 분자 (cell surface molecules)에 특이적인 단클론항체 즉 class I MHC , class II MHC , CD2, CD4, CD8 및 surface IgM, Non T/Non B, CD11a, CD45, granulocyte와 monocyte에 특이적인 백혈구 표면 단클론항체 등 총 11종을 실험에 사용하였다(Table 1).

3. 형광세포 유출장치 분석(flow cytometry analysis)

백혈구 아군별 분포율 분석은 Davis 등(1990)의 방법에 준해서 flow cytometry를 이용하여 실시하였다. 즉 conical bottom microplate의 한 well당 단클론항체 $50 \mu\text{l}$ ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$)과 혈액에서 분리한 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 의 백혈구를 첨가한 후 4°C 에서 30분간 감각시킨 다음 4°C 의 first washing buffer (PBS 450 ml, ACD 50 ml, 20% NaN_3 5 ml, gamma globulin free horse serum 10 ml, 250mM EDTA 20 ml, 0.5% phenol red 1 ml)로 3회 원심(2,000 rpm, 3분, 4°C) 세척한 후 상층액을 버리고 밑부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다.

부유된 백혈구는 secondary antibody로 단일 염색을 하기 위하여 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody (caltag Lab, Inc, San Francisco, U.S.A)를 200배 희석한 후 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 이를 다시 4°C 에서 30분간 감각시킨 다음 4°C 의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한것)로 3회 원심 세척한 다음 2% PBS-formalin(38% formalin 20 ml, PBS 980 ml)용액을 $200 \mu\text{l}/\text{well}$ 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사 때까지 모두 냉암소(4°C)에 보관하였다.

염색이 완료된 재료는 flow cytometry를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton Dickinson사의 FACSCalibur 및 Cell Quest program을 이용하여 실시하였다.

Table 3. A panel of monoclonal antibodies specifically reactive with swine leukocyte differentiation antigens

Leukocyte differentiation antigen	Monoclonal* Antibodies	Representative cells	References
class I MHC	PT85A	All nucleated cell	Davis et al
class II MHC	H42A	Antigen presenting cell	"
	TH81A5	"	"
PoCD2	MSA4	T cells	Hammerberg & Schurig
PoCD4	PT90A	T h/i cells	"
PoCD8	PT81B	T c/s cells	"
sIgM	PIg45A	B cells	Davis et al
$\gamma\delta$ TCR α N.	PT79A	N cells	"
PoCD11a	MUC76A	B, T, N	"
PoCD45	74-9-3	T, N, B	"
G/M	DH59B	granulocyte & monocyte	"

* Monoclonal antibodies that specifically react with swine leukocyte differentiation antigen.

4. 돈유의 체세포수 검사

돈유중 체세포수를 조사하기 위하여 먼저 유즙분비를 촉진시키기 위하여 옥시토신으로 근육주사한 다음 유두로부터 유즙을 채취하여 멸균된 시험관에 돈유시료를 채취하였다. 그후 냉장 운반한 다음 Somacount 300(Bentley Co. Minnesota, USA)기기를 이용하여 체세포수를 측정하였다.

제3절: 시험결과

1. 면역증강제 1차 투여전, 후 말초혈액중 백혈구 아집단 분포율

표-4) 면역증강제 1차 투여전, 후 말초혈액중 백혈구 아집단 분포율

백혈구 표면 특이 항원	MoAb	양성율(mean %)		
		투여전	투여후 1차	
			대조군	사료첨가군
MHC-class I	PT85A	94.0	95.4	97.2
class II	H42A	34.8	11.3	8.0
class II	TH81A5	43.7	13.1	8.8
CD2	MSA4	71.5	82.1	74.8
CD4	PT90A	32.7	40.5	30.3
CD8	PT81B	45.4	33.1	37.6
sIgM	PIg45A	7.4	5.1	5.0
N cell	PT79A	17.4	4.5	12.1
CD11	MUC76A	90.4	96.9	96.3
CD45	74-9-3	96.4	99.2	97.1
G/M	DH59B	6.9	10.8	9.6

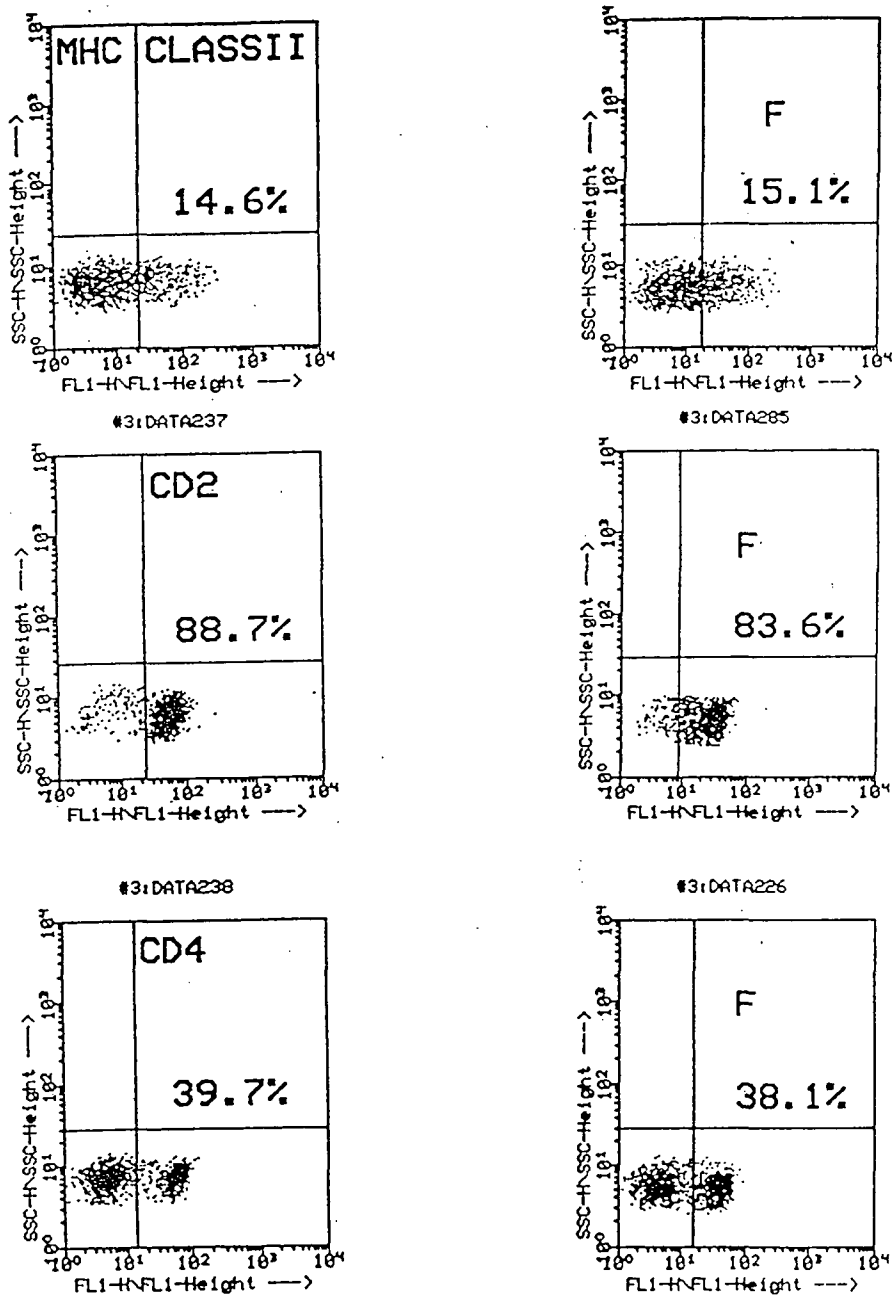


Fig. 1. Representative dot plot profiles of lymphocytes from peripheral blood labeled with monoclonal antibodies specific to porcine class II MHC molecule, CD2 and CD4 molecules, respectively. These profiles were obtained with peripheral blood mononuclear cell of piglets without (control), or with plasma protein(F) treatment at 7 days after first administration.

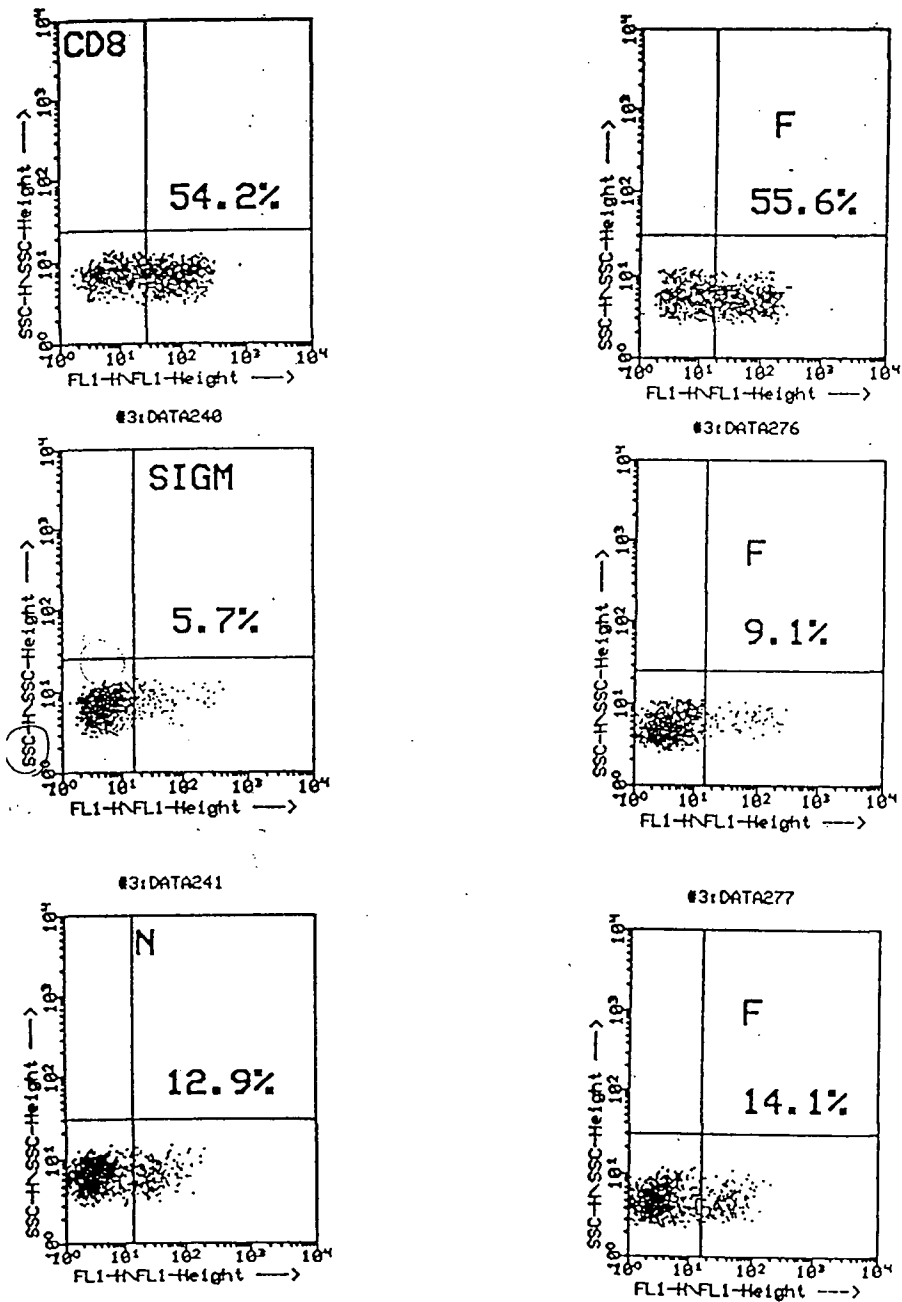


Fig. 2. Representative dot plot profiles of lymphocytes from peripheral blood labeled with monoclonal antibodies specific to porcine CD8 and sIgM and N12 molecules, respectively. These profiles were obtained with peripheral blood mononuclear cell of piglets without (control), or with plasma protein(F) treatment at 7 days after first administration.

2. 비특이 면역증강제 2차 투여후 백혈구 아집단 분포율 조사

표-5) 비특이 면역증강제 2차 투여후 백혈구 아집단 분포율 조사

백혈구 표면 특이 항원	MoAb	양성율(mean %)	
		대조군	사료첨가군
MHC-class I	PT85A	94.8	96.9
class II	H42A	10.5	14.4
class II	TH81A5	14.6	15.1
CD2	MSA4	87.1	87.0
CD4	PT90A	37.5	37.1
CD8	PT81B	45.2	52.5
sIgM	PIg45A	5.2	9.1
N cell	PT79A	11.9	9.8
CD11	MHC76A	95.4	?
CD45	74-9-3	98.7	96.3
G/M	DH59B	7.6	6.3

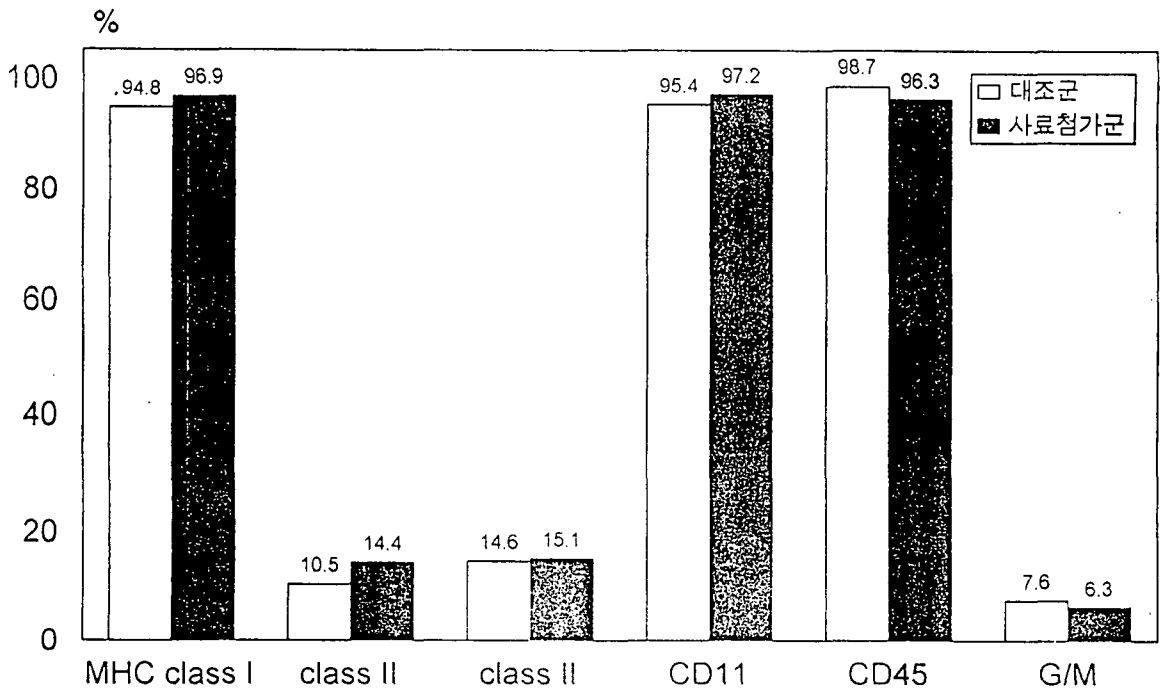


그림 3. 면역증강제 2차 투여후 혈중 구조조직합항원에 대한 분포율

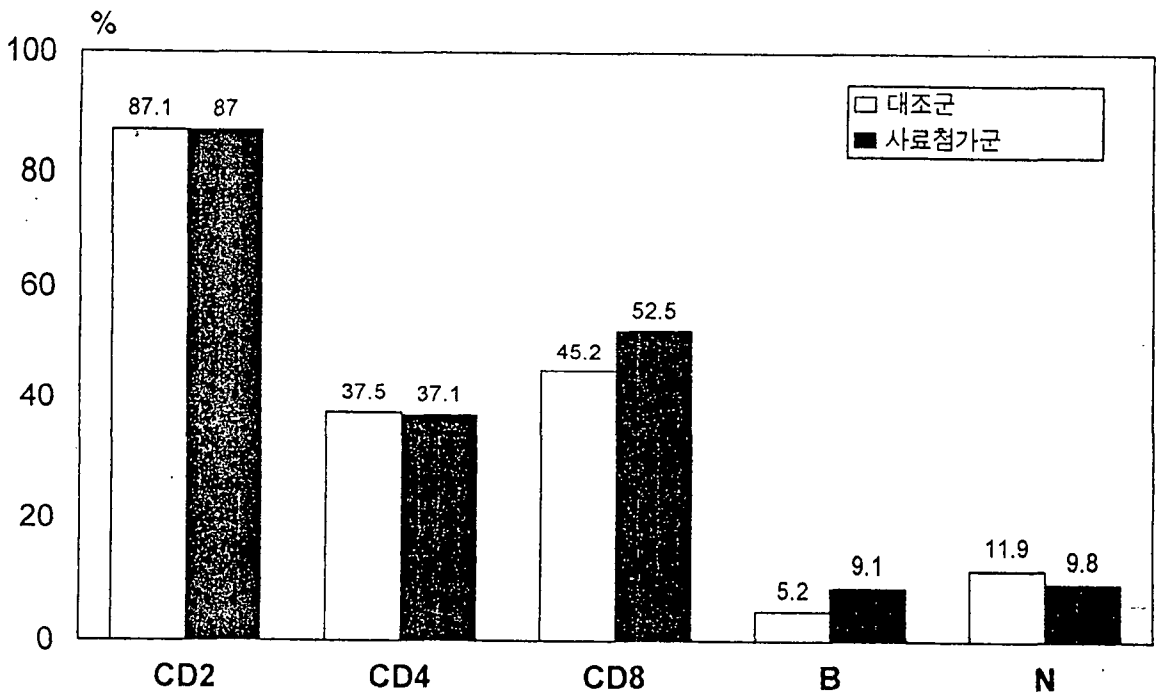


그림 4. 면역증강제 2차 투여후 혈중 백혈구 아집단(T, B, N)에 대한 분포율

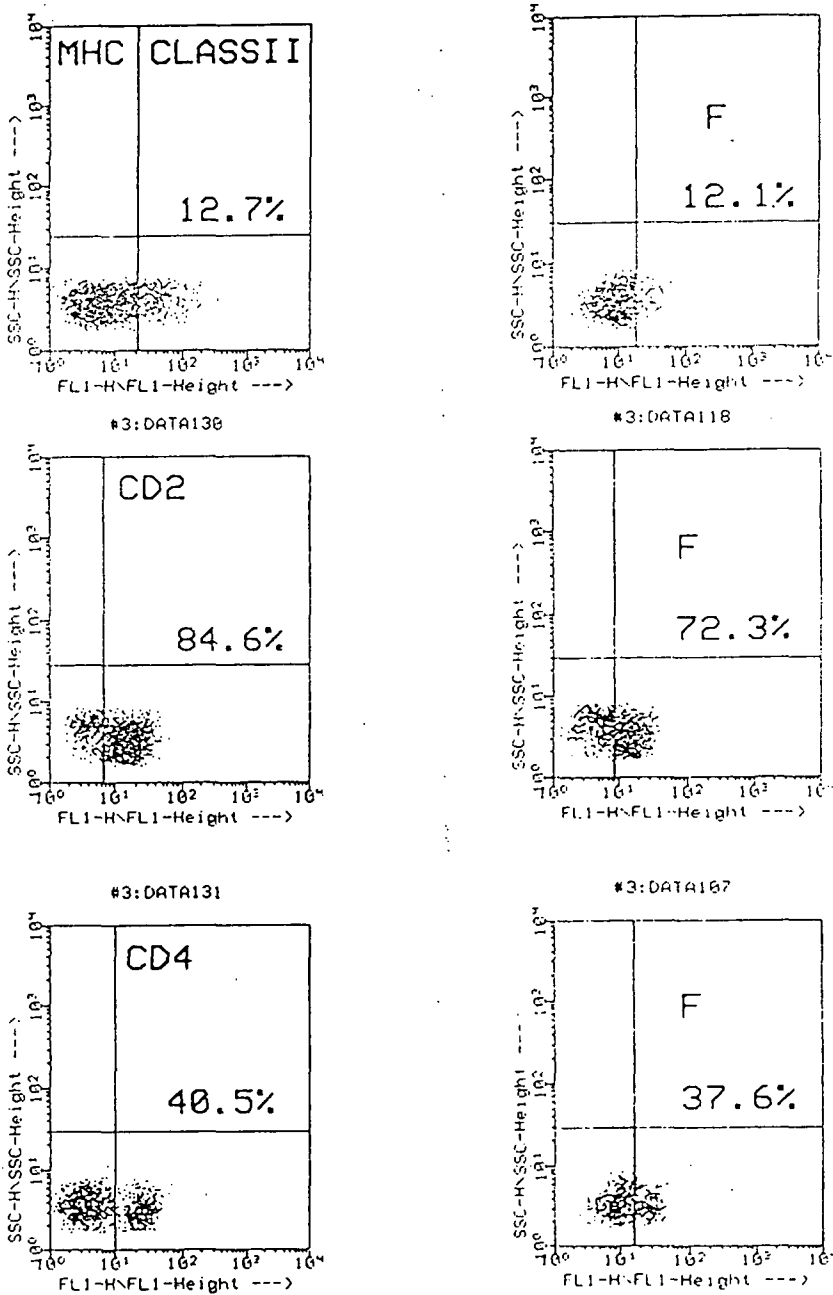


Fig. 5. Representative dot plot profiles of lymphocytes from peripheral blood labeled with monoclonal antibodies specific to porcine class II MHC molecule, CD2 and CD4 molecules, respectively. These profiles were obtained with peripheral blood mononuclear cell of piglets treated without (control), or plasma protein(F) treatment at 7 days after second administration.

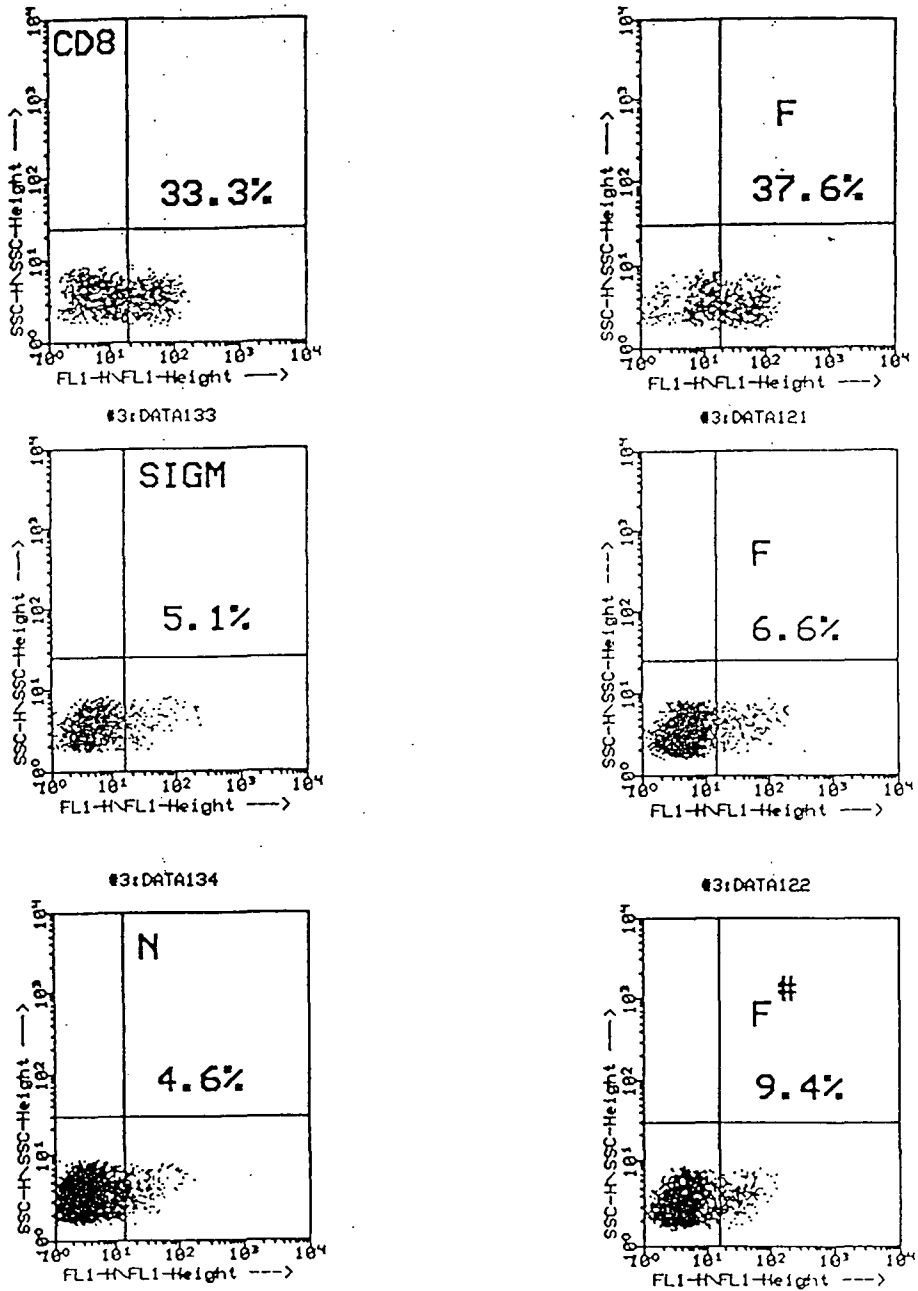


Fig. 6. Representative dot plot profiles of lymphocytes from peripheral blood labeled with monoclonal antibodies specific to porcine CD8 and sIgM and N12 molecules, respectively. These profiles were obtained with peripheral blood mononuclear cell of piglets treated without (control), or plasma protein(F) at 7 days after second administration.

3. 면역증강제 투여 전후의 돈유중 평균 체세포수 증감 효과
 표-6) 면역증강제 투여 전후의 돈유중 평균 체세포수 증감 효과

구 분	평균 체세포수(× 1,000)		
	투여전	1차 투여후	2차 투여후
대 조 군	1,186	1,401	1,234
사료 3% 첨가군	684	198	330

4. 결과요약

가. 항원전달세포(antigen presenting cell ; APC), B 림프구 및 활성화된 일부 T림프구 표면에 발현되는 class II MHC에 대한 양성 분포율이 면역증강제 2차 접종후에 감소되는 경향을 나타내었으나, class I MHC 항원 발현세포의 분포율은 큰 차이를 보이지 않았다.

나. 비특이 면역증강제 1차 투여후 모든 T 림프구가 소유하고 있는 CD2 양성세포에 대한 분포율은 대조군의 82.1%에 비하여 비특이 면역증강제 그룹이 74.8%로 감소하였다. T 림프구 아군중 T helper cell이 소유하고 있는 CD4 양성세포와 T cytotoxic/suppressor이 소유하고 있는 CD8 양성세포에 대한 분포율도 대조군에 비하여 감소되는 것으로 나타났으며, 이와 같은 경우는 비특이 면역증강제 2차 투여후에도 유사한 결과를 나타내었다. 한편 비특이 면역증강제와 비특이 면역증강제를 혼합하여 투여한 경우는 이와 같은 변화는 보이지 않고 대조군과 비슷한 경향을 나타내었다.

다. 숙주의 체액성 면역기능에 관여하는 B 임파구 양성 세포의 분포율 역시 비특이 면역증강제 접종군은 9.1%로 대조군 5.2%에 비하여 높은 것으로 나타났다.

라. 비특이 면역반응에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 N 림프구에 대한 양성율은 비특이 면역증강제 투여 횟수에 따라 다양한 결과를 나타내었는데, 이와 같은 결과는 실험동물들간의 연령차이로 인한 것으로 사료된다.

마. 비특이 면역증강제 투여에 따른 돈유중 체세포수는 대조군은 시기별로 큰 차이를 나타내지 않았으나, 비특이 면역증강제 투여후에는 접종전에 비하여 50-60%정도 매우 감소되었다.

제 3 장 2차년도 연구결과 및 평가

제1절 서 설

1. 연구개발목표 및 평가의 착안점

가. 연구개발목표

- 설정 숙주면역 한계치에 의한 생체 방어 효능 확인
- 면역 세포기능 정밀분석과 활성화 규명
- 비특이 면역증강제에 의한 생산성 측정

나. 평가의 착안점

- 비특이 면역증강제 선발 및 개체별 숙주 방어능력 측정
- 숙주 면역세포별 분포 및 면역증강활성도 분석
- 모든 숙주면역증진에 의한 질병 발생등 생산성 분석
- 모든면역증진기법 기초자료 확립

2. 연구개발목표의 달성도

가. 연구개발목표의 달성도

○ 비특이 면역증강제 선발 및 선발제제 투여에 따른 생산성 분석 : 모든 대상 면역증강제 투여 및 비투여군별 현장적용 생산성 비교 분석으로 1차년도에 이어 모든 투여에 따른 면역증강제별 생산성 확인 (2차년도 목표 달성)

○ 선발 면역증강제 투여에 따른 숙주 면역세포기능 분석 : 면역증강제 적용별 숙주 면역세포 분포 및 활성화 증가여부를 돼지 백혈구표면 특이 단크론항체 및 Flow cytometry를 이용하여 규명 (2차년도 목표 달성)

○ 모든 유증 체세포 특정에 의한 숙주 면역상태 점검 : 면역증강제 투여 여부 결정 및 투여수 모든 숙주 면역상황 확인을 위한 모든유증 체세포를 자동체세포추정기인 Fossmatic을 이용하여 분석 (2차년도 및 3차년도 지속적 추진)

나. 상기 평가의 착안점에 따른 달성도에 대한 자체 평가

○ 비특이 면역증강제 선발 및 개체별 숙주 방어능력 측정 : 현재 유통중인 비특이 면역증강제중 모든 면역증강 가능성을 지닌 제제를 선발하고, 이를 이용하여 양돈장 모돈에 직접 적용함으로써 현장에서의 효과를 직접 확인하였고, 이에 대한 숙주방어능력을 규명함으로써 근본적인 기전분석이 가능하였음은 현장적용에 직접적으로 활용가능한 본 연구의 우수성으로 높이 평가됨.

○ 숙주 생체 면역세포 분포 및 면역증강 활성화도 분석 : 돼지 백혈구 표면 항원 특이 단클론항체와 Flow cytometry를 이용하여, 면역증강제 투여에 따른 숙주 면역세포를 비교함으로써 면역증강제 투여에 따른 구체적인 방어기전 참여 면역세포의 반응을 확인함으로써 세포성 면역기전 규명이 가능하게 됨이 높게 평가됨.

○ 모돈 면역증진 및 증진 기법 자료확보와 자돈 질병 발생 및 생산성 분석 : 모돈 유충 체세포와 모돈 혈액면역 세포활성도를 분석하고, 이에 따른 모돈 개체별 분만자돈의 주요 질병 발생 상황 및 이에 따른 생산성을 현장에 적용하여 분석함으로써 첨단연구와 현장적용의 접목가능성을 입증시킨점이 매우 우수한 점으로 평가됨.

제2절. 연구수행방법

1. 비특이 면역증강제 선발 및 선발제제 투여에 따른 생산성 향상 연구

가. 시험방법

- 공시 동물
 - 초산 및 산차에 따른 경산 모돈 (32-40두)
 - 사이옥스 사료 Ton당 200g 첨가

표-7) 시료 투약방법

실 험 군	두수	투여용량 및 방법
대 조 군	4두	무 투 여
시 험 군 I	4두	임신사에서 분만전까지 모돈 사료 Ton당 200g 투여
시 험 군 II	4두	분만후부터 이유까지 모돈 사료 Ton당 200g 투여
시 험 군 III	4두	임신사부터 이유까지 모돈 사료 Ton당 200g 투여

나. 조사항목

1) 모돈

- 모돈산차
- 모돈 체중 (분만시, 이유시)
- 모돈 번식 성적
- 모돈 건강 및 영양상태
- 면역 증강 효과
 - 가) 혈액검사 - 임신시, 분만후 1주일 - 10일 사이, 이유시
 - 나) 돈유충세포수 - 분만시 (초유), 분만후 1주일 - 10일사이
- metabolizable energy balance

나) 포유자돈

- 포유자돈 폐사율
- 생시체중, 이유체중
- 설사 등 임상소견
- 1주일령 2주일령 및 이유시 돈분에서 대장균 검사 (병원성 대장균, serotyping)

2. 선발 면역증강제 투여에 따른 숙주동물 면역세포기능 정밀 분석 연구

가. 세부시험방법

돼지 백혈구 표면 특이 단클론항체와 flow cytometry를 이용하여 면역증강제 투여전 후 혈액내 면역세포, 즉 주조직적합체(Major Histocompatibility Complex) 및 림프구 아집단 분포율에 미치는 영향과 유즙내 체세포수 증감효과를 조사하였다.

1) 말초혈액으로부터 백혈구 분리

말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte; PBL)의 분리는 Davis 등(1987)의 방법으로 실시하였다. 즉 돼지 전대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제 EDTA가 첨가된 시험관에 혼합하여 잘 섞은 다음, 1500rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 원심후 buffy coat층을 채취한 후 Ficoll(Histopaque 1.119, Sigma)에 중층한 후 1500rpm에서 20분간 원심분리한 후 Ficoll과 혈장과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS로 3회 세척하여 PBS에 부유시킨 다음 trypan blue exclusion technique에 의해 생존 세포수를 측정한 후 최종농도가 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 정도로 조절하여 이용하였다.

2) 백혈구 아집단 검사용 단클론항체

면역증강제 투여전 후의 면역학적 특징을 조사하기 위하여 백혈구 세포 표면 분자(cell surface molecules)에 특이적인 단클론항체 즉 class I MHC , class II MHC , CD2, CD4, CD8 및 surface IgM, Non T/Non B, CD11a, CD45, granulocyte와 monocyte에 특이적인 백혈구 표면 단클론항체 등 총 11종을 실험에 사용하였다.

Table 8. A panel of monoclonal antibodies specifically reactive with swine leukocyte differentiation antigens

Leukocyte differentiation antigen	Monoclonal* Antibodies	Representative cells	References
class I MHC	PT85A	All nucleated cell	Davis et al
class II MHC	H42A	Antigen presenting cell	"
	TH81A5	"	"
PoCD2	MSA4	T cells	Hammerberg & Schurig
PoCD4	PT90A	T h/i cells	"
PoCD8	PT81B	T c/s cells	"
sIgM	PIg45A	B cells	Davis et al
$\gamma\delta$ TCR α N.	PT79A	N cells	"
PoCD11a	MUC76A	B, T, N	"
PoCD45	74-9-3	T, N, B	"
G/M	DH59B	granulocyte & monocyte	"

* Monoclonal antibodies that specifically react with swine leukocyte differentiation antigen.

3) 형광세포 유출장치 분석(flow cytometry analysis)

백혈구 아군별 분포를 분석은 Davis 등(1990)의 방법에 준해서 flow cytometry를 이용하여 실시하였다. 즉 conical bottom microplate의 한 well당 단클론항체 $50\mu\text{l}$ ($15\mu\text{g/ml}$)와 혈액에서 분리한 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 의 백혈구를 첨가한 후 4°C 에서 30분간 잠작시킨 다음 4°C 의 first washing buffer (PBS 450 ml, ACD 50 ml, 20% NaN_3 5 ml, gamma globulin free horse serum 10 ml, 250mM EDTA 20 ml, 0.5% phenol red 1 ml)로 3회 원심(2,000 rpm, 3분, 4°C) 세척한 후 상층액을 버리고 밀부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다.

부유된 백혈구는 secondary antibody로 단일 염색을 하기 위하여 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody (caltag Lab, Inc, San Francisco, U.S.A)를 200배 희석한 후 각 well에 100 µl씩 첨가하였다. 이를 다시 4℃에서 30분간 감작시킨 다음 4℃의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한것)로 3회 원심 세척한 다음 2% PBS-formalin(38% formalin 20 ml, PBS 980 ml)용액을 200 µl/well 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사때까지 모두 냉암소(4℃)에 보관하였다. 염색이 완료된 재료는 flow cytometry를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton Dickinson사의 FACSCalibur 및 Cell Quest program을 이용하여 실시하였다.

제3절. 연구 수행 내용 및 결과

1. 숙주동물 (모든) 면역세포 기능 분석

표-9) 모든의 면역세포 기능 분석

백혈구 표면 특이 항원	MoAb	양성율(mean %)		
		투여전	투여후 1차	
			대조군	사료첨가군
MHC-class I	PT85A	94.0	95.4	97.2
class II	H42A	34.8	11.3	8.0
class II	TH81A5	43.7	13.1	8.8
CD2	MSA4	71.5	82.1	74.8
CD4	PT90A	32.7	40.5	30.3
CD8	PT81B	45.4	33.1	37.6
sIgM	PIg45A	7.4	5.1	5.0
N cell	PT79A	17.4	4.5	12.1
CD11	MUC76A	90.4	96.9	96.3
CD45	74-9-3	96.4	99.2	97.1
G/M	DH59B	6.9	10.8	9.6

- 숙주 면역 관계치 설정에 따른 개체 및 집단 개체 방어 효능 확인
- 면역증강제 투여에 따른 돈유 체세포수 증가 효과 측정

2. 돈유의 체세포수 검사

돈유중 체세포수를 조사하기 위하여 먼저 유즙분비를 촉진시키기 위하여 옥시토신으로 근육주사한 다음 유두로부터 유즙을 채취하여 멸균된 시험관에 우유시료를 채취하

였다. 그후 냉장 운반한 다음 Somacount 300(Bentley Co. Minnesota, USA)기기를 이용하여 체세포수를 측정하였다.

- 면역세포별 증감 분포 조사 결과 (1차, 2차 투여별)

표 10. 면역증강제 투여 농장의 접종전 1차접종후 및 2차접종후별 면역세포반응 변화

Control	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전						
1차접종후						
2차접종후						
PT85A(class I MHC molecule)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전	80.9	68.3		94.1		
1차접종후	85.3	97.9		99.8		
2차접종후				99.8		
H42A(class II MHC molecule)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전	5	8	18.9	7.2	1.4	5.1
1차접종후	12.8	2.3	19.3	26.3		12.3
2차접종후				20.1	14.2	22.9
TH81A5(class II MHC molecule)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전	6.3	7.9	23.3	11.2	6.7	20.2
1차접종후	10.5	11.4	28.3	14.2		28.3
2차접종후				30.2	24.7	22.5
MSA4(CD2)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전			49.9	65.5		
1차접종후			60	65.5		70.3
2차접종후				77.6	71.9	56
PT90A(CD4)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전	8.7	12.1	22.3	27.3	32.3	27.5
1차접종후	27.1	29	22.9	29.1		33.6
2차접종후				32.2	34.8	28.1
PT81B(CD8)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전	13.5	12.3	35.1	31.6	37.5	29.9
1차접종후	44.6	28.2	24.8	31.1		42.8
2차접종후				34.8	19.5	19.1
PIG45A2(sIgM)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전	3	2.7	4.6	5.6	2.3	2.3
1차접종후	6.8	1.5	5	8		13.4
2차접종후				27	19	15.2
PT79A(N cells)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전	6.7	10.1	19.7	22.9	8.7	13.2
1차접종후	15.2	24.1	20.6	25.6		22
2차접종후				15.5	10.1	11.7
DH79A(G/M)	D9627(S3)	D9611(S5)	D9606	D9615	D9608	D9613
접종전	57	57.5	1.9	48.9		43.8
1차접종후	36.6	74.6	60.9	35.8		74.1
2차접종후				73.3		74.1

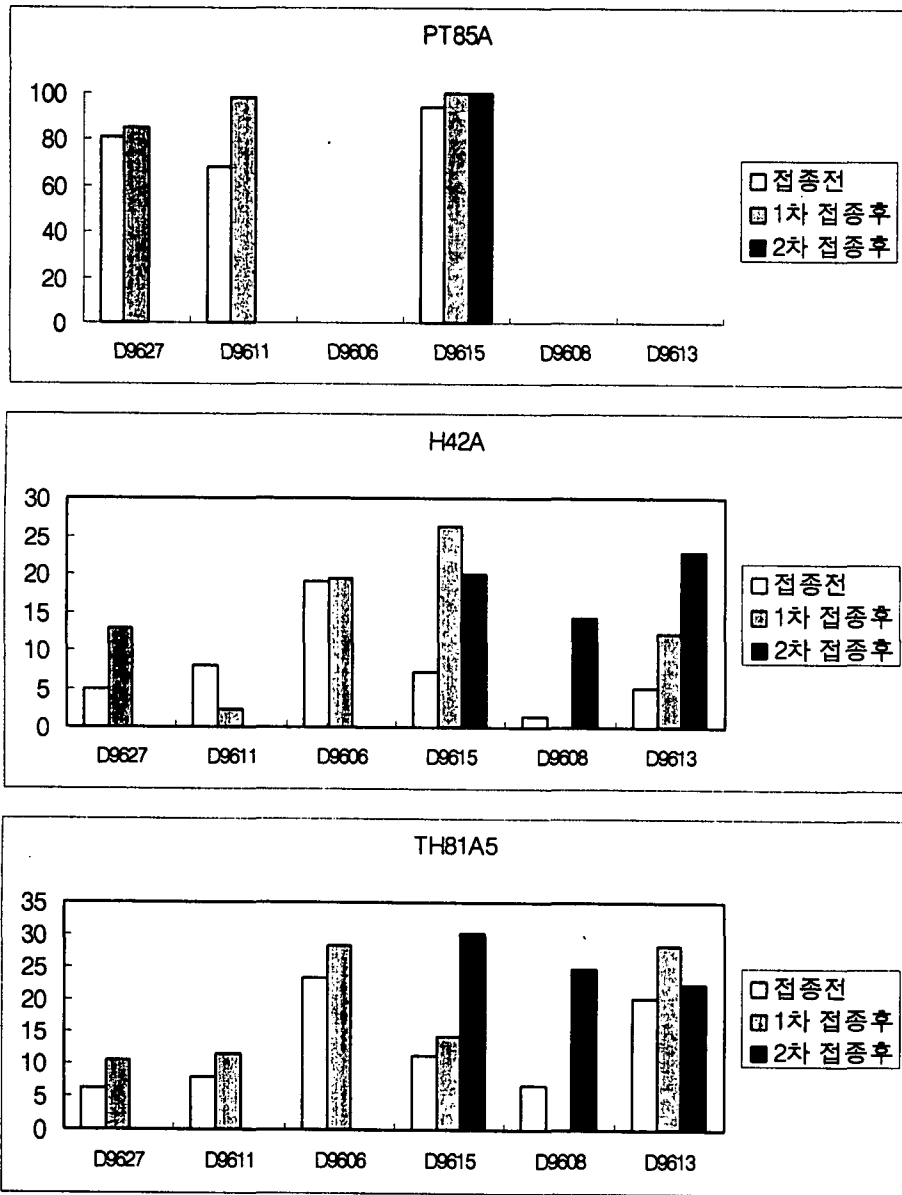


Fig 7. 돼지백혈구 표면항원 특이 단클론항체 및 Flow cytometry를 이용하여 실험한 결과 면역 증가제 투여군 (Treated, 상단 3box)과 비투여군 (하단 3box)에 있어서의 class II MHC 항원 발현세포, T림프구 (PoCD2) 및 T helper/inducer 림프구 (PoCD4)의 분포율 비교 조사

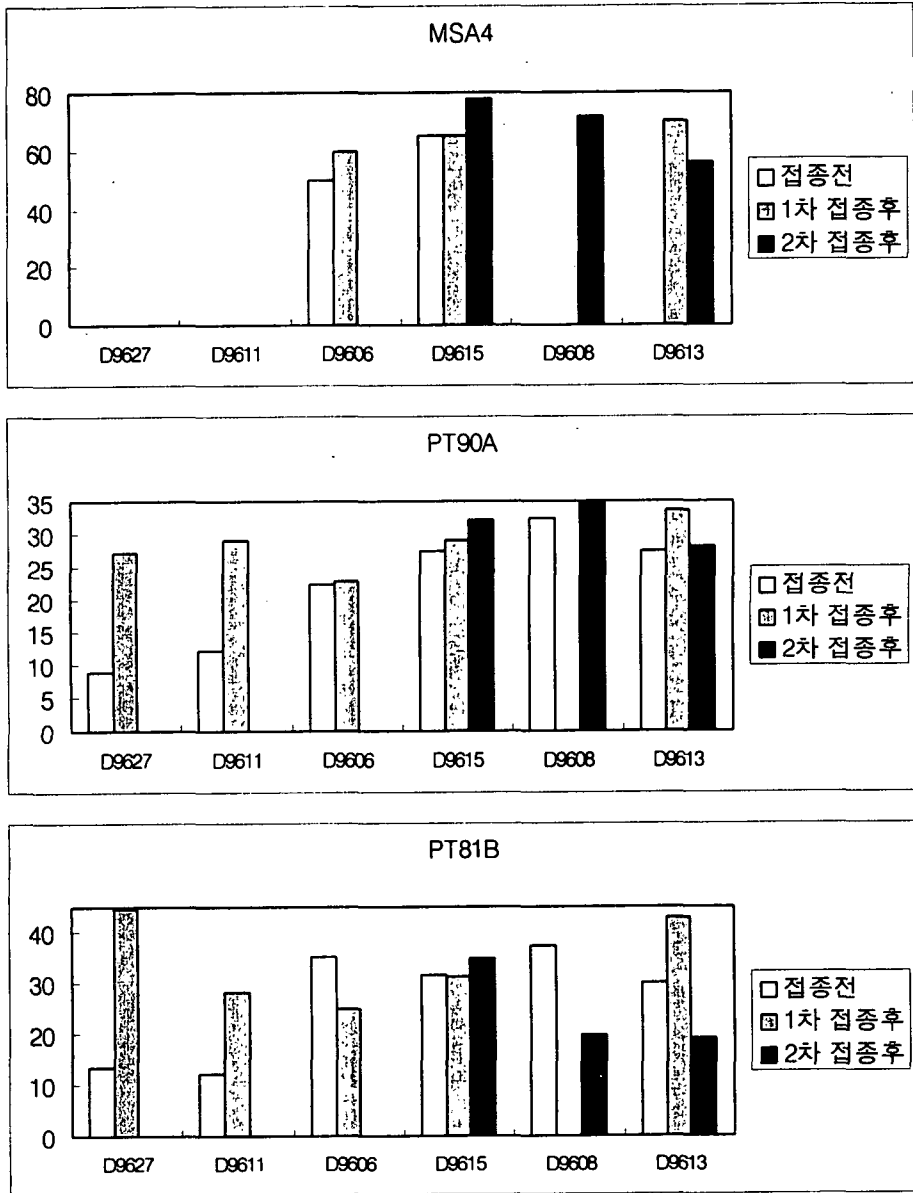


Fig 8. 돼지백혈구 표면항원 특이 단클론항체 및 Flow cytometry를 이용하여 실험한 결과 면역 증가제 투여군 (Treated, 상단 3box)과 비투여군 (하단 3box)에 있어서의 T cytotoxic/suppressor 림프구 (PoCD8), B 림프구 (sIgM) 및 N 림프구 (Non/Non8)의 분포율 비교조사.

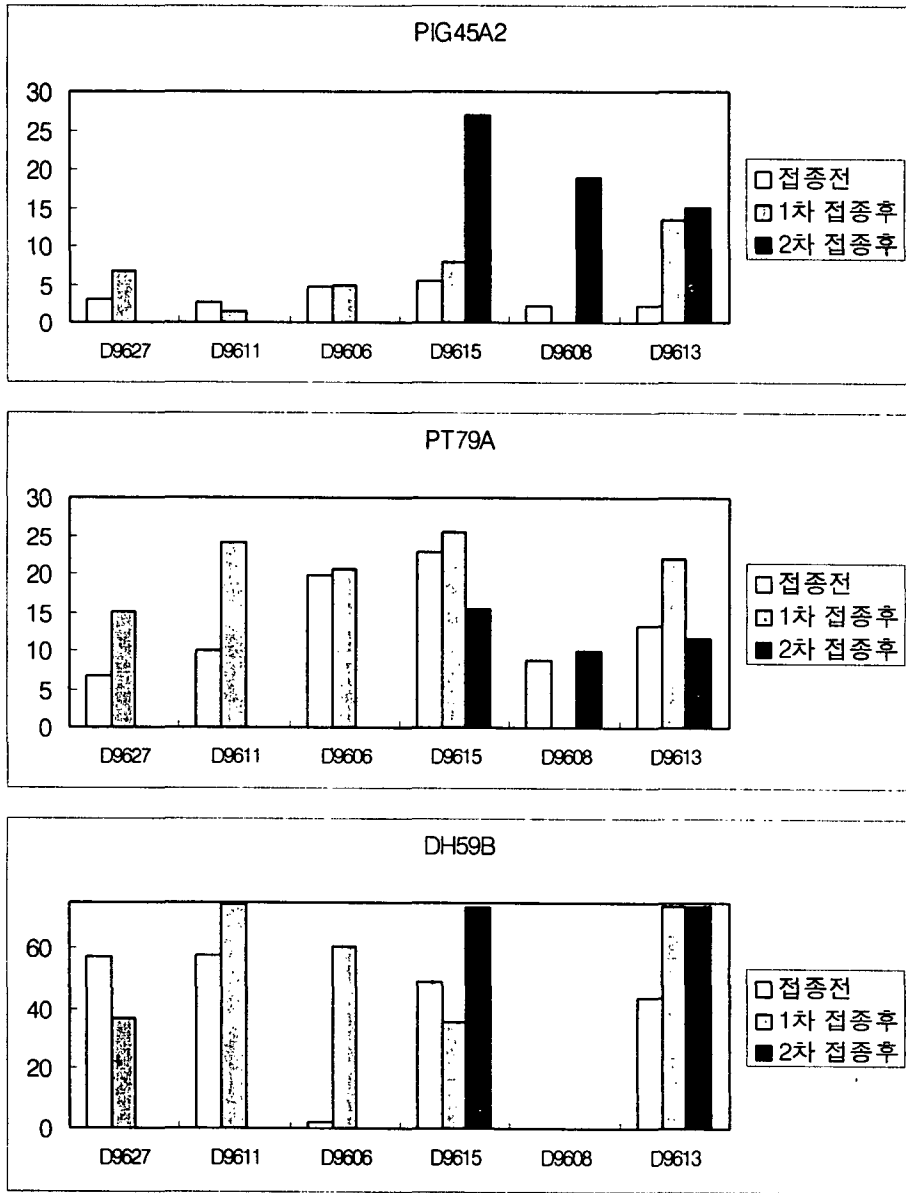


Fig 9. 면역증강제 투여농장의 접종전, 1차접종후 및 2차접종후별 면역세포의 분포 비율 변화

3. 결과요약

○ 면역증강제를 임신돈과 분만 모돈에 투여하여 모돈의 유분비 촉진과 그에 따른 자돈의 면역증강을 통한 성장에 따른 생산성 효과를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

○ 면역증강제를 투여하지 않은 대조군의 평균 생시 자돈 체중이 1.53kg, 평균 이유 체중이 5.67kg, 일당증체는 200g을 보였다. 면역증강제를 임신돈사에서부터 분만전까지 모돈사료 Ton 당 200g을 투여한 실험 I 군의 성장률은 평균생시자돈체중이 1.67kg, 일당증체는 211g을 보였다.

○ 면역증강제를 분만후부터 이유까지 모든 사료 Ton당 200g을 투여한 실험 II 군의 성장률은 평균 생시 자돈 체중이 1.47kg, 평균 이유 체중이 6.57kg, 일당증체는 216g을 보였다. 이유시까지의 일당증체에 따른 대조군에 대한 실험군의 개선율을 보면 실험 I 군이 5.5%, 실험 II 군이 23.5%, 실험 III 군이 8.0%를 보였다. (표 1)

○ 또한 모돈의 면역증강제 투여에 따른 자돈 설사 개선효과는 대조군은 이유시까지 평균 설사일이 0.7인데 반하여 실험 I 군은 0.11, 실험 III 군은 0 이었으며 대조군에서는 대장균 K88과 K99가, 실험 I 군에서는 대장균 K88이 분리되었다. (표 2)

○ 면역증강제 투여군의 숙주 면역세포 분포율을 조사하여 본 결과, 투여군에서는 비투여군에 비하여 외부 침입 미생물에 대한 1차적인 방어 세포인 macrophage등이 발현하는 주조직적합항원 (MHC-class II항원)의 분포가 2배이상 높았으며, 2차 면역기능에 주된 역할을 하는 T helper cell (CD4⁺) 및 바이러스 침입에 대항하는 T cytotoxic cell(CD8⁺)의 분포가 10-15%정도로 상승되었다.

○ 또한 면역항체의 생산에 역할을 하는 B 림프구의 표면 특이항원인 surface IgM (sIgM)의 분포 및 일반적인 기능은 확실히 밝혀져 있지는 않으나 숙주방어기전에 주된 역할을 하는 N 림프구 (Non T/Non B)의 분포도 비투여군에 비하여 약 2배가량 증가되었다.

이러한 실험실내 성적 및 현장적용성적을 종합하여 볼때 면역증강제의 모돈 투여에 따른 면역증강으로 자돈질병예방 및 생산성향상을 기여할 수 있으리라 믿어진다.

제 4 장 3차년도 연구결과 및 평가

제1절 서 설

1. 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

- 비특이 면역증강제 또는 세포면역활성 활성물질이용 숙주면역 기능 상승기술 개발
- 자돈 생산성 향상 종합기술 개발 지침 확립

나. 연구평가의 착안점

- 1) 비특이 면역증강제의 항생물질 대체 사용에 의한 국민건강 저해요인 제거
- 비특이 면역증강제 및 세포면역 활성물질 이용 숙주면역기능 상승기술개발
- 2) 첨단기업의 현장적용에 의한 양돈업 생산성의 국제경쟁력강화
- 모든 및 자돈 생산성 향상 및 종합기술 개발지침 확립

2. 연구개발 목표의 달성도

가. 비특이 면역증강제 또는 세포면역활성 활성물질이용 숙주면역 기능 상승기술 개발

비특이 면역증강제 투여에 따른 면역학적 특성 분석에 관한 연구수행; 비특이 면역증강제투여에 따른 돼지 체내 면역세포의 분포율 변화 및 유즙내 체세포수 증감효과를 조사하였음. 돼지 백혈구 표면 특이 단크론항체와 flow cytometry를 이용하여 B product 투여전후 혈액내 면역세포 즉 주조직적합체 (Major Histocompatibility Complex) 및 림프구 아집단 분포율에 미치는 영향과 유즙내 체세포수 증감효과를 조사하였음.

나. 자돈 생산성 향상 종합기술 개발 지침 확립

비특이 면역증강제 (B product) 의 돼지 콜레라 백신접종 돼지 숙주동물 면역세포변화를 분석하였음; 비특이 면역증강제를 이용하여 돼지 숙주의 면역을 증강시킬수 있었던 연구결과를 바탕으로 돼지의 생산성을 위협 또는 저하시키는 특정 병원체 (Hog Cholera virus) 에 대한 생체 면역 증강 효과를 확인하고자 실시하였음.

제2절. 연구수행 방법, 내용

1. 생체면역세포 기능분석 : 비특이 면역증강제 또는 세포면역 활성물질 이용
숙주면역 상승기술 연구: 본 연구는 비특이 면역증강제투여에 따른 돼지 체내
면역세포의 분포율 변화를 조사

- 돼지 백혈구 표면 특이 단클론항체와 flow cytometry를 이용하여 비특이 면역
증강제 (B product) 투여전후 혈액내 면역세포 즉 주조직적합체 (Major
Histocompatibility Complex) 및 림프구 아집단 분포율에 미치는 영향과 유즙내
체세포수 증감효과를 조사

가. 말초혈액으로부터 백혈구 분리

말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte; PBL)의 분리는 Davis 등(1987)의 방법으
로 실시하였다. 즉 전대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제 EDTA가 첨가된 시험관
에 혼합하여 잘 섞은 다음, 600rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심후 buffy coat층
을 채취한 후 Ficoll (Histopaque 1.119 Sigma)에 중층한 후 1500rpm에서 20분간 원심
분리한 후 Ficoll과 혈장과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS로 3회 세척하여
PBS에 부유시킨 다음 tryphan blue exclusion technique에 의해 생존 세포수를 측정
한 후 최종농도가 1×10^7 /ml 정도로 조절하여 이용하였다.

나. 백혈구 아집단 검사용 단클론항체

B product 투여전 후의 면역학적 특징을 조사하기 위하여 백혈구 세포 표면 분자(cell
surface molecules)에 특이적인 단클론항체 즉 class I MHC , class II MHC , CD2,
CD4, CD8 및 surface IgM, Non T/Non B, CD11a, CD45에 특이적인 백혈구 표면 단클
론항체 등 총 11종을 실험에 사용하였다.

Table 11. A panel of monoclonal antibodies specifically reactive with swine leukocyte differentiation antigens

Leukocyte differentiation antigen	Monoclonal* Antibodies	Representative cells	References
class I MHC	PT85A	All nucleated cell	Davis et al
class II MHC	H42A	Antigen presenting cell	"
	TH81A5	"	"
PoCD2	MSA4	T cells	Hammerberg & Schurig
PoCD4	PT90A	T h/i cells	"
PoCD8	PT81B	T c/s cells	"
sIgM	PIg45A	B cells	Davis et al
$\gamma\delta$ TCR α N.	PT79A	N cells	"
PoCD11a	MUC76A	B, T, N	"
PoCD45	74-9-3	T, N, B	"
G/M	DH59B	granulocyte & monocyte	"

* Monoclonal antibodies that specifically react with swine leukocyte differentiation antigen.

다. 형광세포 유출장치 분석(flow cytometry analysis)

백혈구 아군별 분포율 분석은 Davis 등(1990)의 방법에 준해서 flow cytometry를 이용하여 실시하였다. 즉 conical bottom microplate의 한 well당 단크론항체 50 μ l(15 μ g/ml)와 혈액에서 분리한 1×10^7 /ml의 백혈구를 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 잠작시킨 다음 4 $^{\circ}$ C의 first washing buffer (PBS 450 ml, ACD 50 ml, 20% Na₃N 5 ml, gamma globulin free horse serum 10 ml, 250mM EDTA 20 ml, 0.5% phenol red 1 ml)로 3회 원심(2,000 rpm, 3분, 4 $^{\circ}$ C) 세척한 후 상층액을 버리고 밑부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다. 부유된 백혈구는 secondary antibody로 단일 염색을 하기 위하여 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody (caltag, Lab, Inc, San Francisco, U.S.A)를 200배 희석한 후 각 well에 100 μ l씩 첨가하였다. 이를 다시 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 잠작시킨 다음 4 $^{\circ}$ C의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한것)로 3회 원심 세척한 다음 2% PBS-formalin(38% formalin 20 ml, PBS 980 ml)용액을 200 μ l/well 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사때까지 모두 냉암소(4 $^{\circ}$ C)에 보관하였다.

염색이 완료된 재료는 flow cytometry를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton-Dickinson사의 FACS-Calibur 및 Cell Quest program을 이용하여 실시하였다.

라. 돈유의 체세포수 검사

돈유중 체세포수를 조사하기 위하여 먼저 유즙분비를 촉진시키기 위하여 옥시토신을 근육주사한 다음 유두로부터 유즙을 채취하여 멸균된 시험관에 우유시료를 채취하였다. 그후 냉장 운반한 다음 Somacount 300(Bentley Co. Minnesota, USA)기기를 이용하여 체세포수를 측정하였다.

제3절. 시험결과

1. 시험결과

표-12) 비특이 면역증강제(B product) 1차 투여전후 말초혈액중 백혈구 아군별 분포율

백혈구 표면 특이 항원	MoAb	양성율(mean %)				
		투여전	투여후 1차			
			대조군	주사군	사료첨가군	주사군 + 사료첨가
MHC-class I	PT85A	94.0	95.4	92.1	97.2	95.3
class II	H42A	34.8	11.3	10.3	8.0	11.6
class II	TH81A5	43.7	13.1	14.8	8.8	12.4
CD2	MSA4	71.5	82.1	68.4	74.8	81.2
CD4	PT90A	32.7	40.5	33.3	30.3	38.1
CD8	PT81B	45.4	33.1	21.9	37.6	34.2
sIgM	PIg45A	7.4	5.1	3.9	5.0	5.8
N cell	PT79A	17.4	4.5	10.3	12.1	8.0
CD11a	MHC76A	90.4	96.9	89.7	96.3	97.1
CD45	74-9-3	96.4	99.2	93.8	97.1	99.1
G/M	DH59B	6.9	10.8	7.8	9.6	9.2

표-13) 비특이 면역증강제(B product) 투여에 따른 돈유종 평균 체세포수 증감효과 조사

구 분	평균 체세포수(× 1,000)		
	투여전	1차 투여후	2차 투여후
대 조 군	1,186	1,401	1,234
주사 + 사료 첨가	608	2,122	494
주 사 군	915	2,755	278
사료 3% 첨가군	684	198	330

표-14) 비특이 면역증강제 (B product) 2차 투여후 백혈구 아집단 분포율 조사

백혈구 표면 특이 항원	MoAb	양성율(mean %)			
		대조군	주사군	사료첨가군	주사군 + 사료첨가
MHC-class I	PT85A	94.8	96.4	96.9	94.2
class II	H42A	10.5	8.9	14.4	10.0
class II	TH81A5	14.6	10.0	15.1	13.2
CD2	MSA4	87.1	74.2	87.0	86.7
CD4	PT90A	37.5	33.3	37.1	40.3
CD8	PT81B	45.2	33.0	52.5	43.2
sIgM	PIg45A	5.2	3.9	9.1	6.9
N cell	PT79A	11.9	7.7	9.8	7.0
CD11	MHC76A	95.4	97.1	N.D	91.5
CD45	74-9-3	98.7	97.6	96.3	96.1
G/M	DH59B	7.6	7.8	6.3	7.0

* : N.D : Not determined

2. 시험결과 요약

가. 비특이 면역증강제 (B product)를 투여한 모돈군에서는 개체별로 다소 다른 결과를 보이고 있으나, 숙주면역체계의 주된 기능을 하고 있는 MHC-class II 항원 발현 면역세포의 분포가 유의성 있게 증가되었으며, CD2 표면항원 발현 T 림프구와 함께 CD 4⁺ T helper cell 및 T cytotoxic cell의 비율도 증가되었음이 관찰되었다.

나. T 림프구는 물론 항체생산과 관련된 B 림프구 및 반추류 등 동물의 세포성 면역반응에 깊게 관여하고 있다고 연구된 N 림프구의 비율도 크게 증가되었음이 인정되었다.

다. 반면에 1차면역반응에 관여하는 것으로 알려진 granulocyte / monocyte 의 비율은 개체마다 차이가 큰 차이를 보였으며, 미소한 감소추세를 나타내었다.

● 이상의 결과로 미루어보아 비특이 면역증강제 (B product)의 모돈에 대한 영향은 모돈의 면역세포의 기능을 향진시킬수 있는 것으로 판단되며, 특히 T 림프구의 활성화를 유도시킬 수 있으리라 생각된다. 반면에 비특이적인 면역반응인 granulocyte 및 monocyte에 의한 방어기전은 변화가 없거나 상대적으로 다소 약화될 수 있음을 시사하고 있다. 이러한 일차 면역기능약화의 가능성은 일반적인 면역증강제를 병용함으로써 회복될 수도 있으며, 주된 반응은 T 림프구를 통한 세포성면역 기능향진의 유지에도 좋은 영향을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

2. 모든유 체세포수 측정 및 생체면역 증강 연구 : 비특이 면역증강제 투여에 따른 돼지 특정 질병 방어능 측정: 비특이 면역증강제 (B product) 의 돼지 콜레라 백신접종 돼지 숙주동물 면역세포변화 시험을 실시 하였음.

본 시험은 그동안 비특이 면역증강제를 이용하여 돼지 숙주의 면역을 증강시킬수 있었던 연구결과를 바탕으로 돼지의 생산성을 위협 또는 저하시키는 특정 병인체 (Hog Cholera virus) 에 대한 특이적인 면역 증강 효과를 확인하고자 하였음.

- 돼지 백혈구 표면 특이 단크론항체와 flow cytometry를 이용하여 B product 투여전 후 및 Hog Cholera vaccine 접종과 Hog Cholera virus로 challenge한 후 각각의 혈액 내 면역세포, 즉 구조적적합체(Major Histocompatibility Complex) 및 림프구 아집단 분포율에 미치는 영향을 조사하였다.

가. 말초혈액으로부터 백혈구 분리

말초혈액 백혈구(peripheral blood leukocyte ; PBL)의 분리는 Davis 등(1987)의 방법으로 실시하였다. 즉 돼지 전대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제 EDTA가 첨가된 시험관에 혼합하여 잘 섞은 다음, 1500 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심후 buffy coat층을 채취한 후 Ficoll(Histopaque 1.119, Sigma)에 중층한 후 1500 rpm에서 20분간 원심분리한 후 Ficoll과 혈장과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS로 3회 세척하여 PBS에 부유시킨 다음 tryphan blue exclusion technique에 의해 생존 세포수를 측정한 후 최종농도가 $1 \times 10^7/ml$ 정도로 조절하여 이용하였다.

나. 백혈구 아집단 검사용 단크론항체

면역증강제 투여전 후의 면역학적 특징을 조사하기 위하여 백혈구 세포 표면 분자 (cell surface molecules)에 특이적인 단크론항체 즉 class I MHC , class II MHC , CD2, CD4, CD8 및 surface IgM, Non T/Non B, CD11a, CD45, granulocyte와 monocyte에 특이적인 백혈구 표면 단크론항체 등 총 11종을 실험에 사용하였다 (Table 1).

Table 15. A panel of monoclonal antibodies specifically reactive with swine leukocyte differentiation antigens

Leukocyte differentiation antigen	Monoclonal* Antibodies	Representative cells	References
class I MHC	PT85A	All nucleated cell	Davis et al
class II MHC	H42A	Antigen presenting cell	"
	TH81A5	"	"
PoCD2	MSA4	T cells	Hammerberg & Schurig
PoCD4	PT90A	T h/i cells	"
PoCD8	PT81B	T c/s cells	"
sIgM	PIg45A	B cells	Davis et al
$\gamma\delta$ TCR α N.	PT79A	N cells	"
PoCD11a	MUC76A	B, T, N	"
PoCD45	74-9-3	T, N, B	"
G/M	DH59B	Granulocyte & Monocyte	"

* Monoclonal antibodies that specifically react with swine leukocyte differentiation antigen.

다. 형광세포 유출장치 분석(flow cytometry analysis)

백혈구 아군별 분포율 분석은 Davis 등(1990)의 방법에 준해서 flow cytometry를 이용하여 실시하였다. 즉 conical bottom microplate의 한 well당 단크론항체 $50\mu\text{l}$ ($15\mu\text{g/ml}$)와 혈액에서 분리한 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 의 백혈구를 첨가한 후 4°C 에서 30분간 감각시킨 다음 4°C 의 first washing buffer (PBS 450 ml, ACD 50 ml, 20% NaN_3 5 ml, gamma globulin free horse serum 10 ml, 250mM EDTA 20 ml, 0.5% phenol red 1 ml)로 3회 원심(2,000 rpm, 3분, 4°C) 세척한 후 상층액을 버리고 밑부분에 모인 백혈구의 pellet을 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다.

부유된 백혈구는 secondary antibody로 단일 염색을 하기 위하여 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody (caltag Lab, Inc, San Francisco, U.S.A)를 200배 희석한 후 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 이를 다시 4°C 에서 30분간 감각시킨 다음 4°C 의 secondary washing buffer(first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한것)로 3회 원심 세척한 다음 2% PBS-formalin(38% formalin 20 ml, PBS 980 ml)용액을 $200\mu\text{l/well}$ 되게 가하여 고정

시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사때까지 모두 냉암소(4℃)에 보관하였다. 염색이 완료된 재료는 flow cytometry를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton-Dickinson사의 FACSCalibur 및 Cell Quest program을 이용하여 실시하였다.

라. 시험결과

- B product 투여군 (A, B, C 집단)에서 Hog Cholera 백신 및 공격접종후 모두 대조군 (D 집단)에 비하여 면역세포 비율이 상승되는 것이 확인되었다 (Table 2 및 Fig.10, 11, 12, 13, 14, 15, and 16).

- 특히 숙주면역 기능의 증추적인 역할을 하는 MHC-class II 및 CD4+ 항원 발현세포는 1,2차 백신접종후 비율이 크게 증가하였으며, Hog Cholera 바이러스 공격접종후에도 대조군에 비하여 높은 수준으로 유지되었다.

- 또한, 숙주면역기능중 1차 방어기전에 참여하는 granulocytes/monocytes의 비율과 항체 형성에 관여하는 B 림프구의 비율도 대조군에 비하여 B product 투여군에서 월등히 높은 경향을 나타내었다.

- B product 투여군 (A, B, C 집단)중에서도 0.05% spray 방법에 의한 사료를 급여한 A, B 집단이 액상 형태의 B product 투여군 (C 집단)에 비하여 숙주 면역효과가 우수한 것으로 나타났으며, 이는 바이러스공격접종 이후에도 높은 수준으로 유지됨을 확인할수 있었다.

마. 결과요약

- 0.05% B product spray 사료 (A, B 집단) 및 3% B product 발효 사료 급여한 돼지집단 (C 집단)과 B product가 첨가되지않은 사료급여 집단 (D 집단, 대조군)을 대상으로 돼지 콜레라 백신접종 (2회)과 공격바이러스 접종에 따른 돼지 콜레라에 대한 B product의 돼지 숙주 면역 증강효과를 조사하여본 결과, B product 첨가 사료를 투여한 돼지는 백신 접종후 대조군에 비하여 월등히 높은 면역세포 분포를 나타내었고, 이러한 경향은 공격 바이러스 접종후에도 대조군에 비하여 높은 수준으로 지속되고 있음이 입증되어, 돼지콜레라 백신 접종과 함께 비특이 면역증강제 (B product) 함유 사료 급여시 상승효과에 의해 돼지 콜레라에 대하여 보다 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 판단됨.

Figure Legends

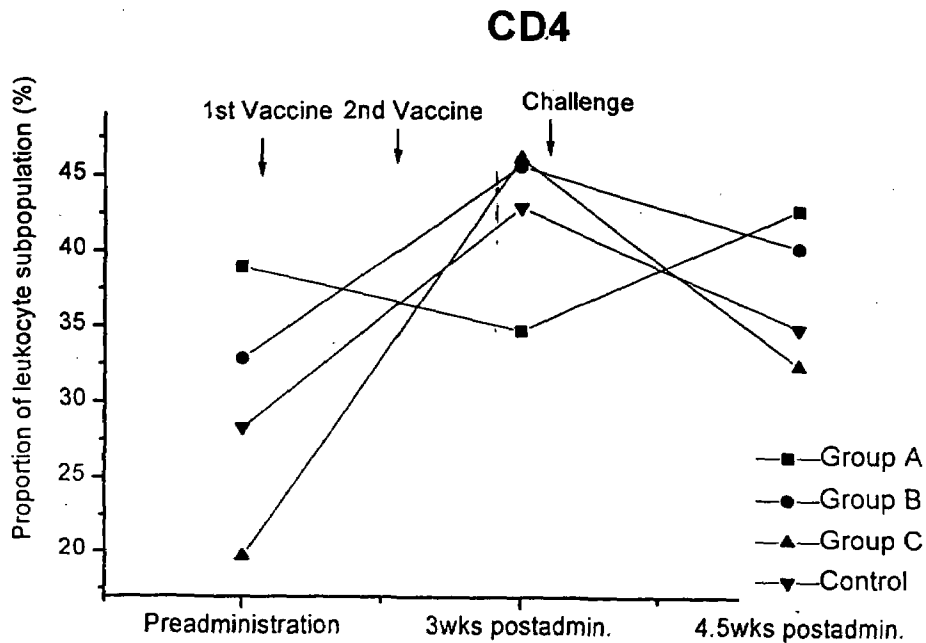
Fig. 10, 11, 12, 13, 14, 15, & 16.

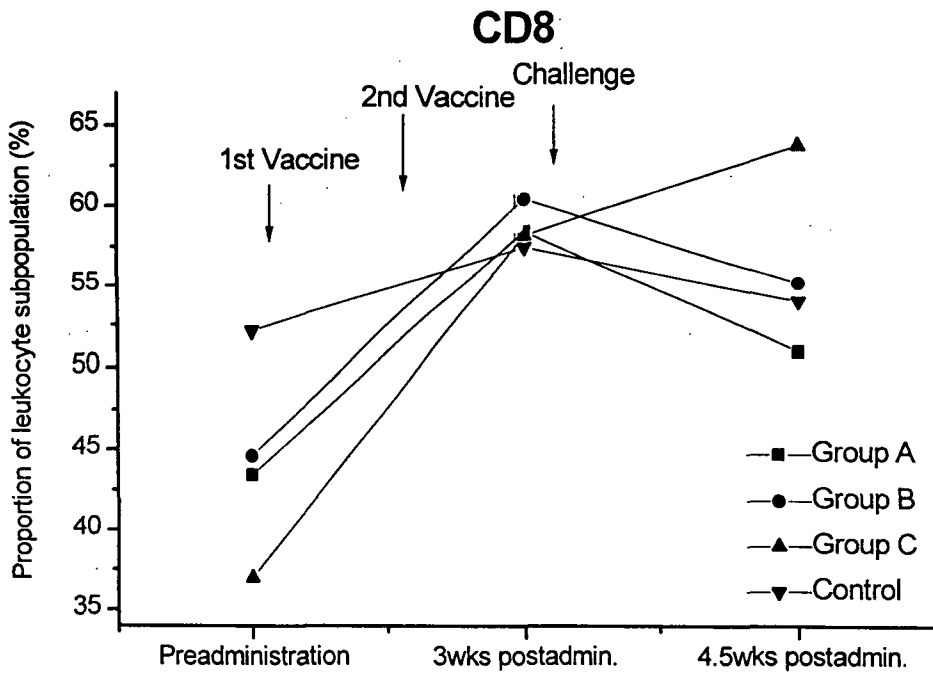
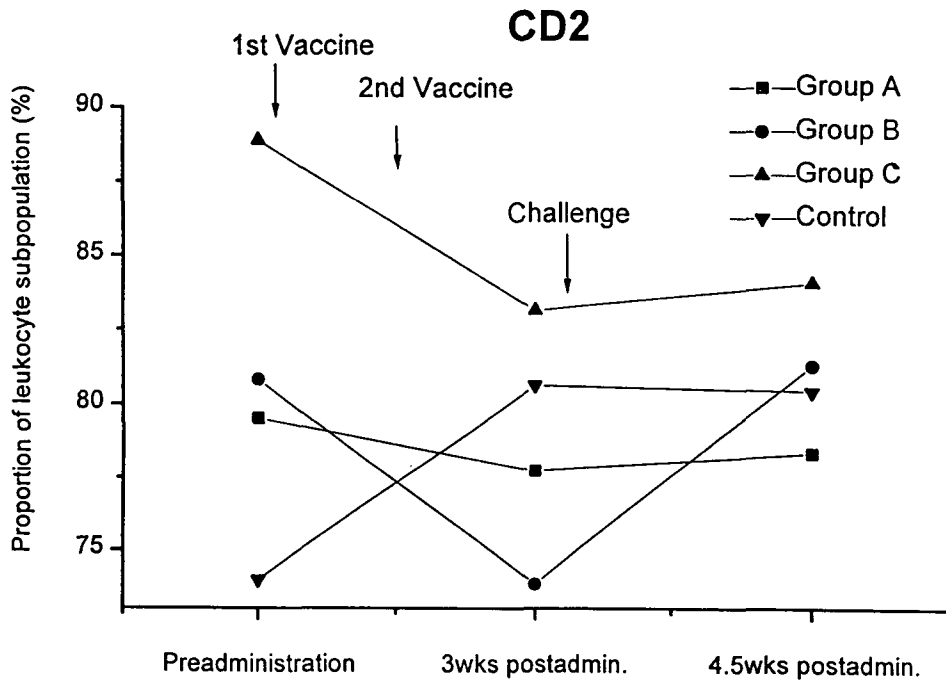
Changes of proportion of porcine leukocyte subpopulations in peripheral blood of pigs at preadministration of B product, 3 weeks and 4.5 weeks postadministration of B product with 0.5%-B product spray-treated feeding for first 20 days (Group A), 0.5%-B product spray-treated feeding during whole period of experiment (Group B), 3%-B product fermented feeding (Group C) and Control Group (Group D, No B product-added feed), respectively.

1st vaccine: First vaccination with Hog Cholera vaccine

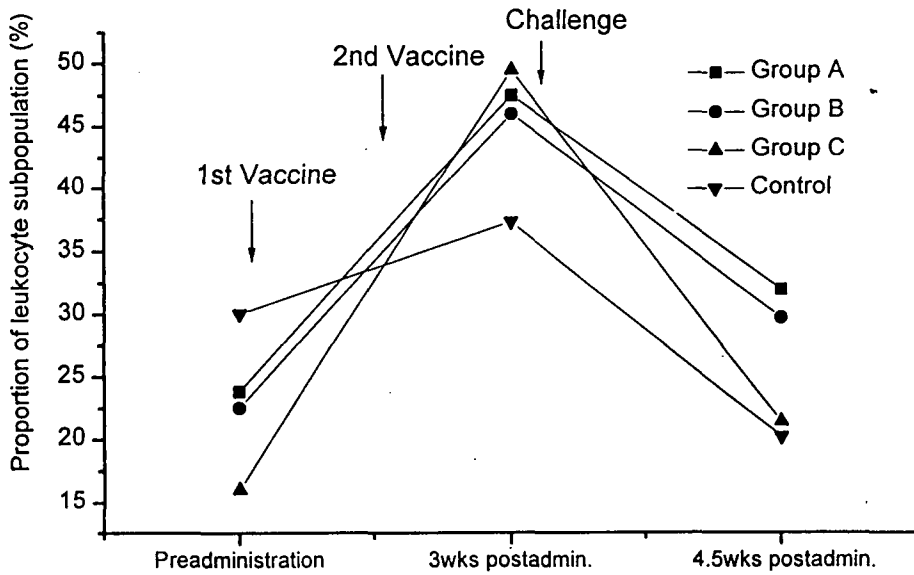
2nd vaccine: Booster vaccination with Hog Cholera vaccine

Challenge: Challenge with Hog Cholera virus

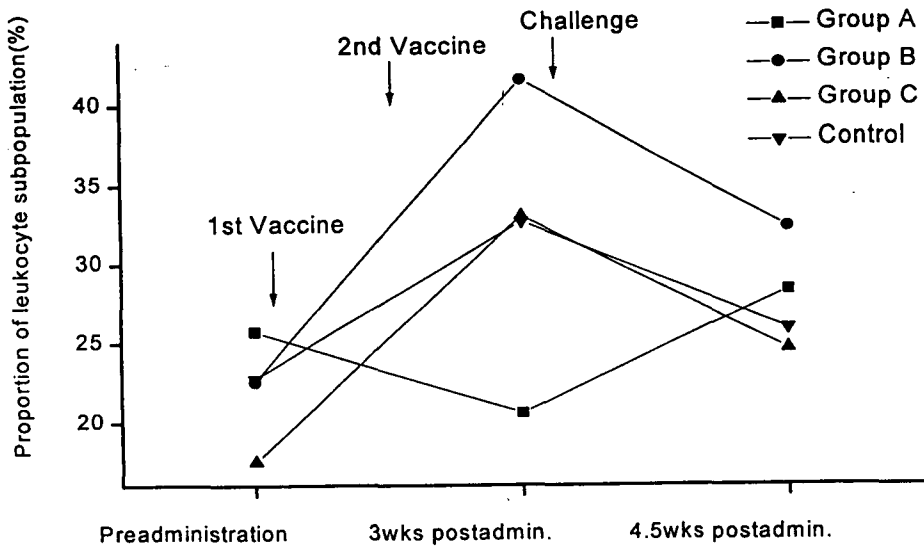




N cell



MHC CL II



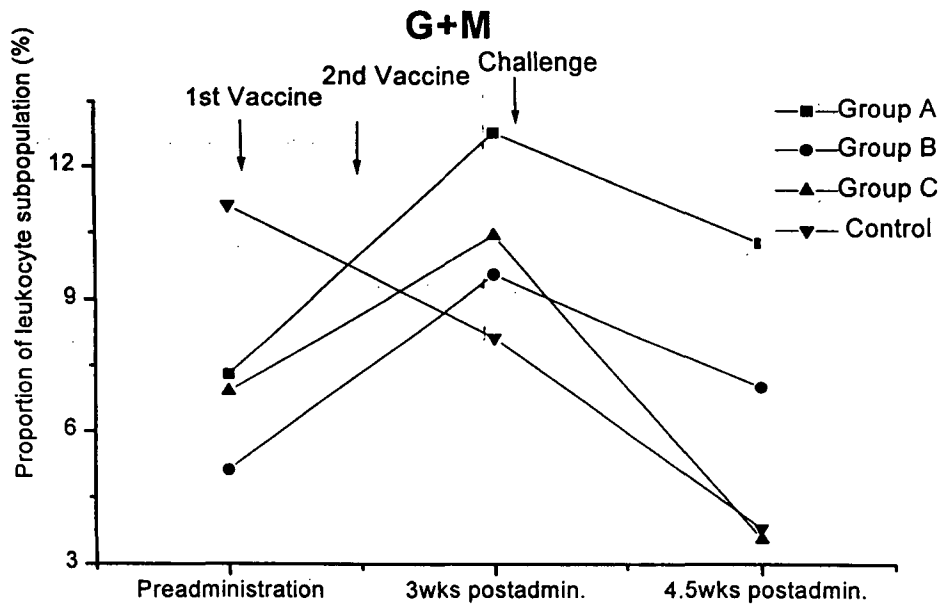
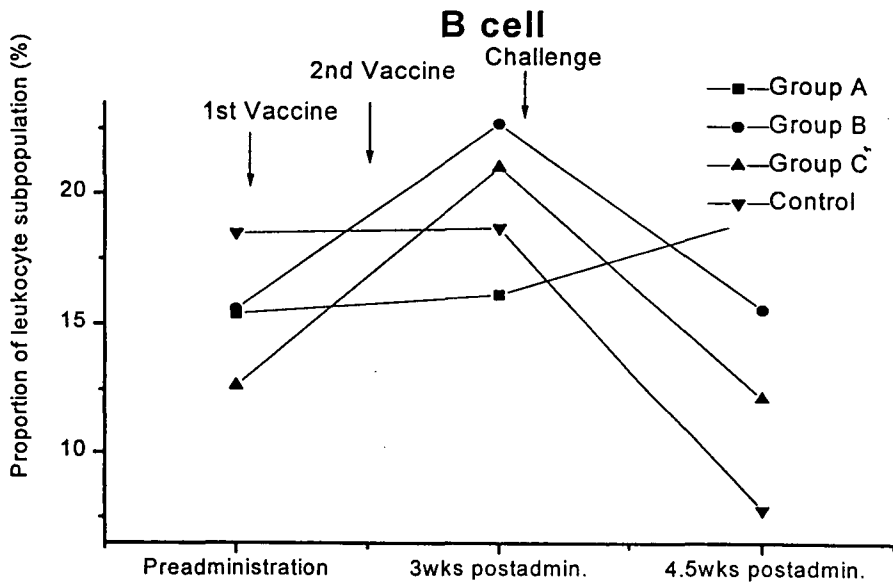


Table 16. Changes of average proportion of porcine leukocyte subpopulations in peripheral blood of pigs at preadministration of B product, 3 weeks and 4.5 weeks postadministration of B product with 0.05%-B product spray-treated feeding for first 20 days (Group A), 0.05%-B product spray-treated feeding during whole period of experiment (Group B), 3%-B product fermented feeding (Group C) and Control Group (Group D, No B product-added feed), respectively

Class II	Group A	Group B	Group C	Group D
Preadministration	25.73	22.6	17.5	22.8
3wks postadministration	20.62	41.56667	32.95	32.6
4.5wks postadministration	28.27143	32.24286	24.56	25.85

CD2	Group A	Group B	Group C	Group D
Preadministration	79.53	80.85	88.9	73.98
3wks postadministration	77.74	73.85	83.15	80.65
4.5wks postadministration	78.34286	81.3	84.08333	80.45

CD4	Group A	Group B	Group C	Group D
Preadministration	38.97	32.9	19.7	28.33
3wks postadministration	34.74	45.7	46.2	42.95
4.5wks postadministration	42.75714	40.27143	32.43333	34.9

CD8	Group A	Group B	Group C	Group D
Preadministration	43.4	44.58	36.95	52.13
3wks postadministration	58.46	60.5	58.2	57.5
4.5wks postadministration	50.92587	55.17143	63.85	54

N Cell	Group A	Group B	Group C	Group D
Preadministration	23.83	22.53	16.05	30.03
3wks postadministration	47.5	46	49.45	37.3
4.5wks postadministration	31.97143	29.7	21.38333	20.2

B Cell	Group A	Group B	Group C	Group D
Preadministration	15.4	15.58	12.65	18.47
3wks postadministration	16.125	22.66667	21	18.65
4.5wks postadministration	19.07143	15.54286	12.16667	7.8

G+M	Group A	Group B	Group C	Group D
Preadministration	7.3	5.12	6.9	11.13
3wks postadministration	12.775	9.56667	10.45	8.15
4.5wks postadministration	10.27143	7	3.56667	3.8

3. 양돈건강 관리 종합기술개발 : 비특이 면역증강제 (B product)를 이유자돈에 투여함으로써 자돈기에 문제시될 수 있는 질병을 예방하여 자돈생산성을 향상하고 일반 양돈장에서 응용할 수 있는 자돈기의 질병예방 종합기술을 개발하고자 함
 연구내용은 크게 돼지콜레라에 대한 예방효과와 생산성 향상에 대한 실험과 모돈의 바이러스성 설사 백신효능 증강에 대한 비특이성 면역증강제(B product) 효과에 관한 연구로 구분된다. 먼저

가. 전년도 임신모돈에 비특이 면역증강물질을 투여하여 유질을 향상시켜 포유자돈 생산성개선을 보인 양돈장에서 이유자돈에게 비특이 면역증강제 (B product)를 사료첨가하여 최근 국내에서 많은 피해를 주고 있는 돼지콜레라에 대한 예방효과와 생산성 향상을 도모하고자 본 연구를 실시하였다.

- 일반적으로 실험군은 4개군으로 구분하여 실시하였다 (표 1). 실험동물은 35일령 이유자돈 26두를 대상으로 하였고 35일령과 50일령에 각각 돼지콜레라백신을 실시하였다.
- 비특이 면역증강제(B product)를 이유자돈에 사료첨가한후 강독의 돼지콜레라바이러스를 접종한 다음 돼지콜레라에 대한 예방효과와 생산성을 검사하였고 (표 2, 3, 4) 병리조직학적 검사도 함께 수행하였다.

표-17) 실험설계

실험군	실험동물	두수	방 법
시험군 A	이유자돈	7	20일간 0.5% 비특이 면역증강제 사료첨가후 HCV 공격접종한 다음 10일간일반사료 교체급여 후 부검
시험군 B	이유자돈	7	20일간 0.5% 비특이 면역증강제 사료첨가후 HCV 공격접종한 다음 계속 10일간 동일사료급여후 부검
시험군 C	이유자돈	7	20일간 3% 비특이 면역증강제 사료첨가후 HCV공격접종한 다음 10일간 일반사료 교체급여후 부검
대조군	이유자돈	5	20일간 일반사료 급여후 HCV 공격접종한 다음 10일간 동일사료 급여후 부검

표-18) 비특이 면역증강제 투여에 의한 성장효과

내용 \ 실험군	시험군 A	시험군 B	시험군 C	대조군
두수	7	7	7	5
사료급여일	30	30	30	30
총개시체중(kg)	60.9	60.4	59.5	41.5
평균두당개시체중(kg)	8.7	8.6	8.5	8.3
총종시체중(kg)	181.3	173.9	179.8	100.4
평균두당종시체중(kg)	25.9	24.8	25.7	20.1
총증체량(kg)	120.4	113.5	120.3	100.4
두당일당증체(kg)	0.573	0.540	0.573	0.393
사료섭취량(kg)	154.9	154.5	151.4	109.7
사료요구율	1.29	1.36	1.26	1.86
폐사율(%)	0/7(0)	0/7(0)	0/7(0)	0/7(0)

표-19) 비특이 면역증강제 투여에 따른 혈액학적 결과

(mean ± S.D.)

검사항목	시험군 A			시험군 B			시험군 C			대조군		
	1일	3주	4주	1일	3주	4주	1일	3주	4주	1일	3주	4주
WBC	13.2	26.3	19.4	12.4	16.8	19.9	13.0	15.5	22.5	13.1	16.0	17.9
(10 ³ /μl)	±0.1	±6.8	±3.8	±1.9	±1.9	±3.7	±0.2	±2.2	±4.8	±0.1	±2.5	±5.4
Lymphocyte	36.0	56.7	63.7	32.6	68.5	72.3	45.5	68.6	56.7	41.0	57.2	58.6
(%)	±7.0	±11.8	±6.3	±6.3	±7.5	±3.5	±8.0	±3.1	±11.2	±9.3	±7.0	±7.5
Neutrophil	59.4	39.1	32.0	64.0	27.1	24.0	51.0	27.1	39.0	57.0	40.2	37.4
(%)	±5.5	±11.3	±6.6	±6.0	±6.5	±2.9	±8.5	±3.9	±12.6	±9.3	±7.0	±8.3
Eosinophil	0.1	2.6	1.9	0.1	2.3	2.0	0.8	2.7	2.6	0.1	1.0	2.2
(%)	±0.1	±2.2	±1.6	±0.2	±1.4	±0.9	±0.8	±2.0	±1.3	±0.1	±0.8	±1.1
monocyte	4.5	1.6	2.4	3.3	2.0	1.7	2.5	1.7	1.7	2.0	1.6	1.8
(%)	±1.5	±0.6	±0.9	±0.4	±1.0	±0.7	±0.5	±0.9	±1.0	±0.1	±0.9	±1.4
RBC	5.2	8.1	6.9	5.3	6.6	8.9	5.5	7.9	10.0	6.5	8.0	8.8
(10 ⁶ /μl)	±0.2	±1.9	±0.4	±0.2	±0.3	±1.8	±0.6	±1.4	±2.2	±0.3	±0.8	±0.9
Hemoglobin	13.2	15.0	12.5	13.2	11.9	13.3	13.2	12.0	14.0	13.2	12.7	13.0
(g/dl)	±0.2	±3.9	±0.4	±0.2	±0.6	±1.3	±0.2	±0.5	±0.9	±1.7	±0.9	±0.7
PCV (%)	29.3	46.9	38.2	29.1	38.5	48.8	28.5	44.2	53.5	36.2	46.4	49.6
	±1.8	±11.2	±1.1	±1.8	±1.3	±10.4	±5.5	±7.3	±11.2	±0.4	±5.3	±5.9
Platelets	155.5	183.1	146.6	112.8	121.7	149.6	131.0	210.0	219.1	161.0	145.2	178.2
(10 ³ /μl)	±31.8	±38.7	±54.2	±38.8	±39.3	±31.5	±54.8	±66.6	±58.1	±45.3	±46.6	±36.6
			2			5						6

표-20) 비특이 면역증강제 투여에 따른 돼지콜레라 혈청가

시험군	시험군 A	시험군 B	시험군 C	대조군
시험전	2 ⁶⁻⁷	2 ⁶⁻⁷	2 ⁶	2 ⁶
HCV접종전	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁵
시험종료	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁴

표-21) 임신모돈의 소화기백신접종에 대한 비특이 면역증강제 투여에 따른 성장효과
(경기도, 안성 K농장)

내용	실험군		
	A	B	C
모돈두수	4	3	2
모돈평균산차	5.3	6.3	3.0
모돈당 총산자수	12.3	14.7	9.0
모돈당 포유개시두수	11.0	12.3	8.0
평균이유두수	9.5	7.7	7.0
평균이유전 폐사두수	2.0	5.3	1.0
평균자돈생시체중(kg)	1.4	1.2	1.4
평균자돈이유체중(kg)	6.8	6.3	6.1
이유일령(일)	25	25	25

- 상기농장은 국내 양돈장 중 사양관리가 잘되는 농장으로 최근 많은 피해를 주고있는 바이러스성 설사병에 대한 예방책의 일환으로 임신 모돈에 분만 4주전과 2주전에 2회 바이러스성 소화기백신을 접종함으로써 초유와 상유를 통한 포유자돈의 바이러스성 설사병에 대한 면역력을 형성케 함으로써 포유자돈의 폐사와 더불어 이유체중의 증가를 관찰하기 위하여 비특이성 면역증강제를 분만 4주전부터 이유시까지 사료첨가하여 투여하였다.

- 비특이성 면역증강제를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 모돈평균산차가 5.3인데도 불구하고 평균이유두수가 9.5두, 평균자돈이유체중이 6.8kg을 보였다. 비특이성 면역증강제를 모돈사료에 3%미강발효처리하여 급여한 B군은 평균이유두수가 7.7두이나 이유시까지 포유자돈의 폐사가 없었고 평균자돈이유체중이 7.0kg을 보여 비특이성 면역증강제를 모돈사료에 투여하지 않은 C군이나 임신모돈에 바이러스성 설사병에 대한 백신접종을 실시하지 않고 또한 모돈사료에 비특이성 면역증강제를 투여하지 않은 D군에 비하여 성장효과가 있음을 알 수 있었다

표-22) 임신모돈의 소화기백신에 대한 비특이 면역증강제 투여에 따른 성장효과
(경기, 용인, D농장)

내 용	실 험 군			
	A	B	C	D
모돈두수	4	4	4	3
모돈평균산차	5.3	3.8	2.0	2.0
모돈당 총산자수	13.0	8.7	8.7	11.5
모돈당 포유개시두수	9.8	7.7	7.7	10.5
평균이유두수	9.5	7.7	7.3	8.5
평균이유전 폐사두수	0.3	0	0.3	2.0
평균자돈생시체중(kg)	1.3	1.7	1.7	1.5
평균자돈이유체중(kg)	6.8	7.0	6.7	6.7
이유일령(일)	20	20	20	20

- 상기 농장은 여러 가지 여건상 사육환경과 위생적인 사양관리가 잘 안되는 농장으로 최근 많은 피해를 주고있는 바이러스성 설사병에 대한 예방책의 일환으로 임신 모돈에 분만 4주전과 2주전에 2회 바이러스성 소화기백신을 접종함으로써 초유와 상유를 통한 포유자돈의 바이러스성 설사병에 대한 면역력을 형성케 함으로써 포유자돈의 폐사와 더불어 이유체중의 증가를 관찰하기 위하여 비특이성 면역증강제(B product)를 분만 4주전부터 이유시까지 사료첨가하여 투여하였다.

비특이성 면역증강제를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 모돈평균산차가 5.3인데도 불구하고 평균이유두수가 9.5두, 평균자돈이유체중이 6.8kg을 보였다. 비특이성 면역증강제를 모돈사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군은 평균이유두수가 7.7두이나 이유시까지 포유자돈의 폐사가 많았으나 평균 자돈이유체중이 6.3kg을 보였으며 비특이성 면역증강제를 모돈사료에 투여하지 않은 C군에 비하여 성장효과가 있음을 알 수 있었다.

- 따라서 상기 2개 양돈장의 임신모돈에 있어서 바이러스성 설사병에 대한 백신접종시에 비특이 면역증강제를 사료첨가 하였을 경우에 비특이 면역증강제를 급여하지 않은 경우에 비하여 포유자돈의 성장면에서 뚜렷한 효과 있었음을 알 수 있었다.

나. 모돈의 바이러스성 설사·백신효능 증강에 대한 비특이성 면역증강제(B product) 효과에 관한 연구

1). 시험목적

국내의 포유자돈에 있어서 가장 많은 피해를 주고 있는 질병은 바이러스성 설사병이다. 포유자돈의 바이러스성 설사병의 병원체는 Coronavirus계인 TGEV(transmissible gastroenteritis virus)와 PEDV(porcine epidemic diarrhea virus) 또한 ROTA virus로서 어린 일령의 포유자돈 일수록 높은 폐사율을 보여 국내 양돈산업에 막대한 피해를 주고 있다. 또한 이들 바이러스에 대한 치료법은 없으며 예방대책으로 백신접종법이 일반적으로 실시되고 있으나 아직까지 확실한 예방방법이 되지 못하고 있다. 현재까지 이들 바이러스성 설사병에 대한 면역방법은 모돈에 분만 5-4주전과 분만 3-2주전에 2회 백신접종 후 모체이행항체를 통하여 포유자돈을 면역시키는 방법이 실행되어지고 있으나 모돈의 영양, 사육관리 및 위생관리 등이 제대로 이루어지지 않는 관계로 이들 바이러스에 대한 백신의 효능이 제대로 형성되지 않아 지속적으로 피해를 보고있는 실정이다. 따라서 본 연구는 모돈에 다목적 신물질로 알려진 비특이성 면역증강제인 액상원적외선 방사체 음이온 알칼리 에너지(B product)를 사료첨가하여 투여함으로써 임신모돈과 포유모돈의 면역증강을 유도하여 모체이행항체수준을 상승시켜 이들 바이러스에 대하여 백신접종에 따른 방어력을 향상시키코자 하였다.

2). 시험방법

실험 모돈은 모돈관리가 주간단위로 실시하는 경기도 안성 K농장의 임신돈 15두와 모돈관리가 주간단위로 실시되지 못하고 포유자돈의 바이러스성 설사병이 발생되어 지속적으로 문제시 되고 있는 경기도 용인 D농장의 임신돈 9두를 포함하여 돼지 바이러스성 설사병에 대한 백신을 실시하지 않은 분만 4-5주전 임신모돈을 산차를 고려하여 총 24두와 분만한 포유자돈을 대상으로 하였다. 실험군은 포유돈사료에 0.05% B product spray처리군(집단 A)과 3% B product 미강발효처리군(집단 B) 및 일반 포유돈사료를 급여한 대조군(집단 C 또는 D)으로 대분하여 실시하였다(표 23과 표 24). 돼지 바이러스성 설사병을 일으키는 바이러스에 대한 백신(TGE+ROTA-killed vaccine, PED-live vaccine)은 분만 4-5주전과 분만 2-3주전에 각각 근육주사하였다. B product 처리군은 B product첨가한 포유돈사료를 백신을 접종하기 3일전부터 시작하여 분만 후 이유때까지 급여하였다. 모돈에서 백신효과를 검증하기 위하여 혈액과 초유를, 포유자돈에서는 시기별 모체이행항체를 알기 위하여 혈액을 채취하여 혈청검사를 실시하였다(그림 17). 또한 시기별로 돈유를 통한 포유자돈의 국소면역상을 관찰하기 위하여 소장외각 부위에서의 면역글로불린 형성세포(IgA)도 형태학적으로 검사하였다.

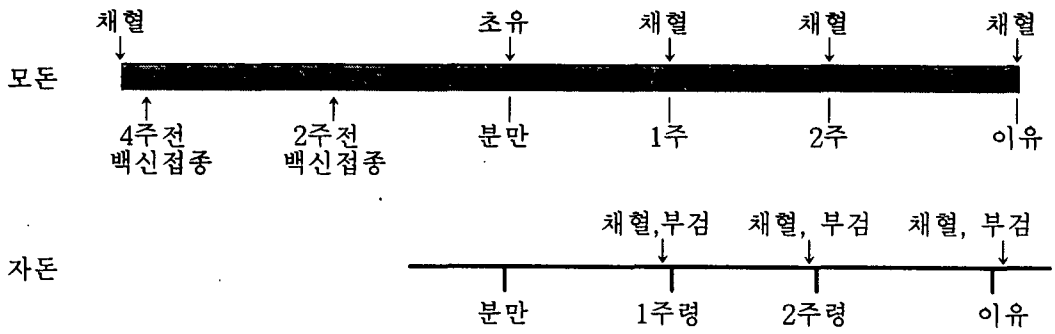
표-23). 실험설계(경기도, 안성 K농장)

시험군	모돈수 (평균산차)	포유자돈수 (평균)	백신접종	처리방법
A	4(5.3)	52(13.0)	TGE(+ROTA) PED백신, 분만 4-5주전과 분만 2-3주전, 근육주사	0.05% B product spray처리한 포유돈사료를 백신접종 3일전부터 이유때까지 급여
B	4(3.8)	35(8.8)	TGE(+ROTA) PED백신, 분만 4-5주전과 분만 2-3주전, 근육주사	3% B product 미강발효처리한 포유돈사료를 백신접종 3일전부터 이유때까지 급여
C	4(2.0)	35(8.8)	TGE(+ROTA) PED백신, 분만 4-5주전과 분만 2-3주전, 근육주사	일반포유돈사료를 백신접종 3일전부터 이유때까지 급여
D	3(2.0)	35(11.6)	백신미접종	일반포유돈사료를 백신접종 3일전부터 이유때까지 급여

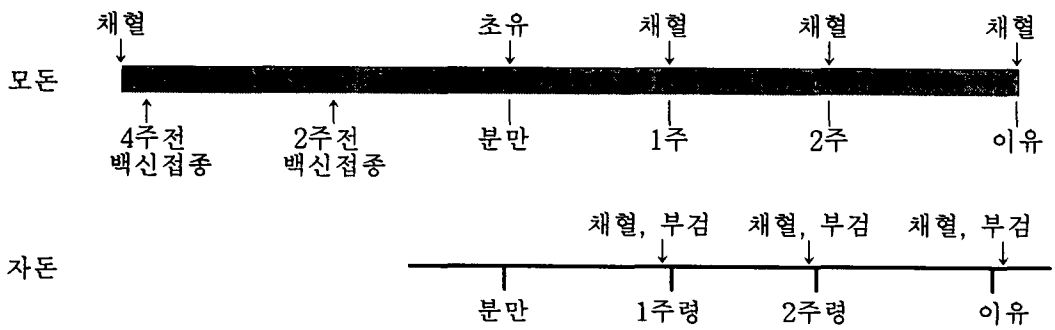
표-24). 실험설계(경기도, 용인 D농장)

시험군	모돈수 (평균산차)	포유 자돈수 (평균)	백신접종	처리방법
A	4(5.3)	49(12.3)	TGE(+ROTA) PED백신, 분만 4-5주전과 분만 2-3주전, 근육주사	0.05% B product spray처리한 포유돈사료를 백신접종 3일전부터 이유때까지 급여
B	3(6.3)	44(14.7)	TGE(+ROTA) PED백신, 분만 4-5주전과 분만 2-3주전, 근육주사	3% B product 미강발효처리한 포유돈사료를 백신접종 3일전부터 이유때까지 급여
C	2(3.0)	18(9.0)	TGE(+ROTA) PED백신, 분만 4-5주전과 분만 2-3주전, 근육주사	일반포유돈사료를 백신접종 3일전부터 이유때까지 급여

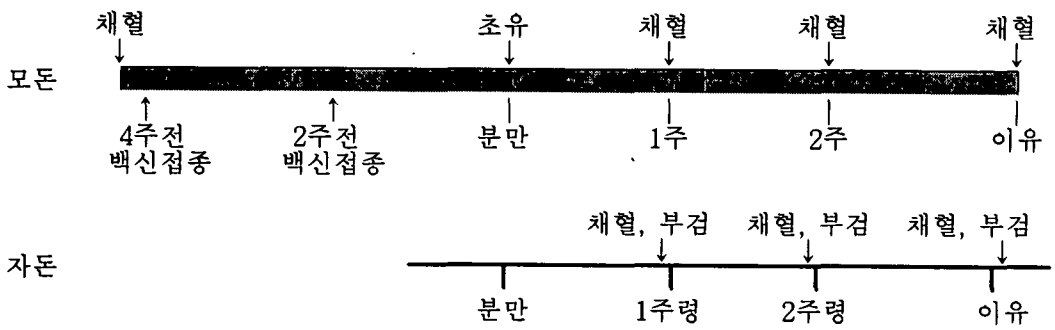
A군



B군



C군



D군

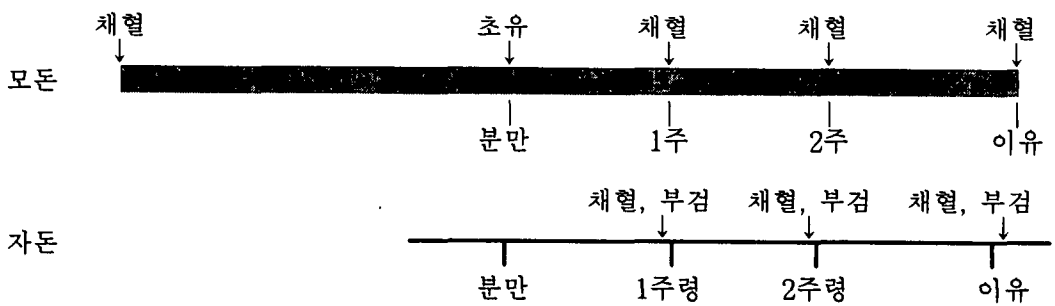
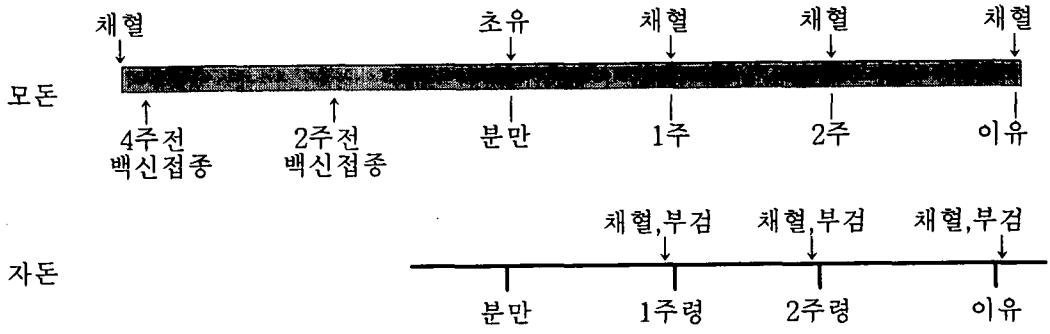
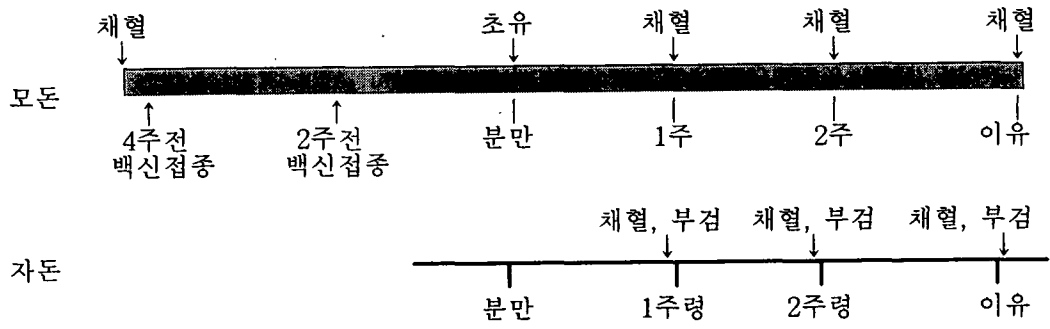


그림 17. 실험설계 (경기도 안성 K농장).

A군



B군



C군

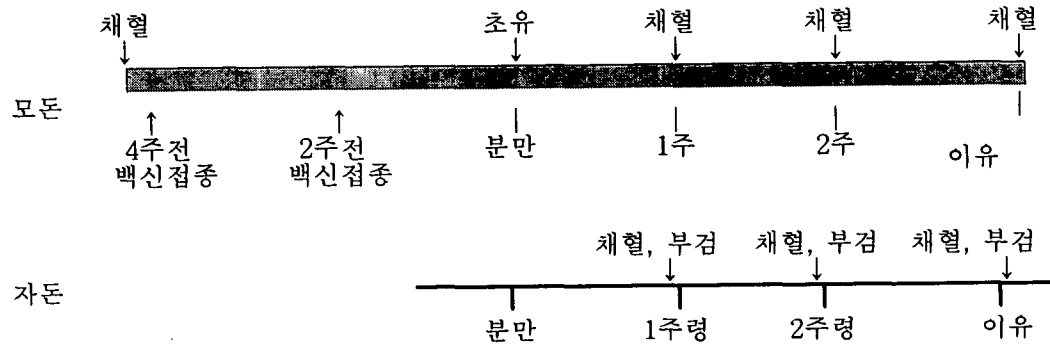


그림 18. 실험설계 (경기도 용인 D농장).

3). 검사사항

가) 모돈

- @ 건강상태 - 발열, 식욕부진, 번식장애 및 기타 임상소견
- @ 번식성적 - 산자수와 이유두수 등
- @ 이유후 발정여부
- @ 돈유(초유)와 혈청의 항체가 측정
- @ 혈액내 면역세포 활성화 측정

나) 포유자돈

- @ 건강상태 - 발열, 설사 등 기타 임상소견
- @ 성장률 - 생시체중과 이유체중
- @ 혈청의 항체가 측정
- @ 혈액내 면역세포 활성화 측정
- @ 소장의 면역글로블린형성세포에 대한 형태학적 검사
- @ 설사소견을 보인 자돈소장의 형광항체검사

4) 결 과

가). 모돈과 포유자돈에 있어서의 성장효과본 실험에 있어서 사용되어진 임신모돈 총 24두는 분만에서 이유후까지 실험전기간동안에 발열, 식욕부진 및 번식장애 등의 임상소견을 보이지 않았다.

경기도 안성 K농장은 모돈이 약 320두 규모로 국내 양돈장 중 사양관리가 보편적으로 잘 되는 농장이다. 본 양돈장은 최근들어 많은 피해를 주고있는 바이러스성 설사병에 대한 예방책의 일환으로 임신 모돈에 분만 4주전과 2주전에 각각 바이러스성 설사병백신(TGE+ROTA, PED)을 접종하여 초유와 상유를 통한 포유자돈의 바이러스성 설사병에 대한 면역력을 형성케 하므로써 포유자돈의 폐사감소와 더불어 이유두수와 이유체중의 증가를 관찰하기 위하여 비특이성 면역증강제(B product)를 분만 4주전부터 이유시까지 사료첨가하여 투여하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다(표 25).

- 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 모돈평균산차가 5.3인데도 불구하고 평균이유두수가 9.5두, 평균자돈이유체중이 6.8kg을 보였다. 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군은 평균이유두수가 7.7두이나 이유시까지 포유자돈의 폐사가 없었고 평균자돈이유체중이 7.0kg을 보여 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 투여하지 않은 C군이나 임신모돈에 바이러스성 설사병에 대한 백신접종을 실시하지 않고 또한 모돈사료에 비특이성 면역증강제(B product)를 투여하지 않은 D군에 비하여 성장효과가 있음을 알 수 있었다.

- 본 양돈장에서 모돈당 평균총산자수에 비하여 모돈당 평균포유개시두수와 평균이유두수에서의 차이는 분만시 사산, 혹자 및 미이라와 분만후 압사, 기아 등의 질병에 의한 것이 아니고 통상적인 분만사에 있어서의 포유자돈폐사에 의한 것이며 실험 전기간에 걸쳐 실험 전군에서 임상적으로 포유자돈의 설사소견은 보이지 않았다.

표-25). 임신모돈의 바이러스성 설사병백신접종에 대한 비특이성 면역증강제(B product)투여에 따른 성장효과 (경기도, 안성 K농장)

내 용	시 험 군			
	A	B	C	D
모돈두수	4	4	4	3
모돈평균산차	5.3	3.8	2.0	2.0
모돈당 평균총산자수	13.0	8.8	8.8	11.7
모돈당 평균포유개시두수	9.8	7.7	7.7	10.5
평균이유두수	9.5	7.7	7.3	8.5
평균이유전 폐사두수	0.3	0	0.3	2.0
평균자돈생시체중(kg)	1.3	1.7	1.7	1.5
평균자돈이유체중(kg)	6.8	7.0	6.7	6.7
이유일령(일)	20	20	20	20

- 경기도 용인 D농장은 상시 모돈이 130두로서 여러가지 여건상 사육환경과 위생적인 사양관리가 잘 안되는 농장으로 최근 많은 피해를 주고있는 바이러스성 설사병에 대해 피해를 보았으며 재발이 자주되어 지속적인 피해를 보았다. 본 양돈장에서도 예방책의 일환으로 임신 모돈에 분만 4주전과 2주전에 각각 바이러스성 설사병백신을 접종하므로써 초유와 상유를 통한 포유자돈의 바이러스성 설사병에 대한 면역력을 형성케하므로써 포유자돈의 폐사감소와 더불어 이유두수와 이유체중의 증가를 관찰하기 위하여 비특이성 면역증강제(B product)를 분만 4주전부터 이유시까지 사료첨가하여 투여하였던 바 다음과 같은 결과를 보였다(표 26).

- 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 모돈평균산차가 5.3인데도 불구하고 평균이유두수가 9.5두, 평균자돈이유체중이 6.8kg을 보였다. 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군은 평균이유두수가 7.7두이나 이유시까지 포유자돈의 폐사가 많았으나 평균자돈이유체중이 6.3kg을 보였으며 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 투여하지 않은 C군에 비하여 성장효과가 있음을 알 수 있었다.

- 본 양돈장에서 모돈당 평균총산자수에 비하여 모돈당 평균포유개시두수와 평균이유두수의 차이는 분만시와 분만후 통상적인 분만사의 포유자돈의 폐사와 더불어 포유자돈의 설사에 의한 폐사도 있었다. 실험 각군당 1 - 3두의 포유자돈의 설사병에 의한

폐사를 보였으나 주로 대장균증(Colibacillosis)과 콕시듐증(Coccidiosis)이었으며 여러가지 진단법을 이용하였으나 TGE virus, PED virus 및 ROTA virus가 검출되지는 않았다.

표-26). 임신모돈의 바이러스성 설사병백신에 대한 비특이면역증강제(B product) 투여에 따른 성장효과 (경기, 용인, D농장)

내용	시 험 군		
	A	B	C
모돈두수	4	3	2
모돈평균산차	5.3	6.3	3.0
모돈당 평균총산자수	12.3	14.7	9.0
모돈당 평균포유개시두수	11.0	12.3	8.0
평균이유두수	9.5	7.7	7.0
평균이유전 폐사두수	2.0	5.3	1.0
평균자돈생시체중(kg)	1.4	1.2	1.4
평균자돈이유체중(kg)	6.8	6.3	6.1
이유일령(일)	25	25	25

- 따라서 상기 2개 양돈장의 임신모돈에 있어서 바이러스성 설사병에 대한 백신접종과 더불어 비특이성 면역증강제(B product)를 사료첨가하였을 경우에 비특이성 면역증강제(B product)를 급여하지 않은 경우에 비하여 포유자돈의 성장효과 있었음을 알 수 있었다.

나). 모돈과 포유자돈에 있어서 혈청 및 초유 역가

- 실험전기간에 걸쳐 모돈에 있어서 바이러스성 설사병에 대한 예방책으로써 비특이성 면역증강제와 더불어 접종한 바이러스성 소화기백신(TGE+ROTA, PED)에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 모돈의 초유와 혈액을 주기적으로 채취하였다. 또한 모돈으로부터 포유자돈으로의 모체이행항체형성여부를 관찰하기 위하여 포유자돈의 혈액을 이유때까지 주기적으로 채취하였다.

- 경기도 안성 K농장에 있어서 비특이성 면역증강제(B product)를 사료첨가와 더불어 바이러스성 설사병 백신접종에 따른 모돈의 혈청과 초유에 대한 평균역가와 자돈의 시기별 평균혈청가는 다음 표 27와 표 28과 같다.

- 바이러스성 설사병백신에 대한 모돈과 자돈의 혈청과 초유의 평균역가를 비특이성 면역

증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군과 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군 및 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 투여하지 않은 C군이나 임신모돈에 바이러스성 설사병에 대한 백신접종을 실시하지 않고 또한 모돈사료에 비특이성 면역증강제(B product)를 투여하지 않은 D군을 비교하였던 바 live vaccine인 PED백신에 있어서는 비특이성 면역증강제(B product)를 투여한 처리군의 모돈에서 백신접종후 강한 면역을 형성하여 초유를 통하여 자돈에게 수동면역을 형성시켜줌을 알 수 있었다. 그러나 처리군(A군, B군 및 C군)간의 차이는 모돈군과 자돈군 모두에서 발견되지 않았으나 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군의 모돈군에서는 실험기간동안 다른 처리군에 비하여 꾸준하고 안정된 면역형성이 이루어지고 있음을 알 수 있었다. Killed vaccine인 TGE백신접종에 있어서는 면역반응은 처리군간의 차이는 없으며, 백신에 의한 면역형성이 크게 영향을 주지 못하였으나 전실험기간동안 방어력을 부여할 수 있는 항체를 유지하였다. 또한 killed vaccine인 ROTA백신접종에 대한 결과는 처리군간의 차이를 인정할 수 없었다.

표-27). 임신모돈의 바이러스성 설사병백신에 대한 모돈의 혈청 및 초유의 평균역가 (경기도 안성 K농장)

시기	접종백신	시 험 군			
		A	B	C	D
접종전	PED	74	36	16	11
	TGE	96	112	81	88
	ROTA	<2	<2	96	48
초유	PED	≥256	≥256	≥256	192
	TGE	52	28	176	149
	ROTA	64	208	60	64
분만후 1주	PED	144	176	≥256	NT
	TGE	208	200	107	NT
	ROTA	192	112	≥256	NT
분만후 2주	PED	112	96	144	64
	TGE	144	104	17	35
	ROTA	80	88	24	75
이유시	PED	160	85	96	32
	TGE	136	107	112	75
	ROTA	≥256	≥256	≥256	≥256

NT : not tested.

표-28). 임신모돈의 바이러스성 설사병백신에 대한 자돈의 시기별 평균 혈청가 (경기도 안성 K농장)

자돈연령	접종백신	시 험 군			
		A	B	C	D
1주령	PED	85	171	NT	NT
	TGE	53	48	NT	NT
	ROTA	171	139	NT	NT
2주령	PED	43	128	53	NT
	TGE	64	213	48	NT
	ROTA	53	64	25	NT
이유	PED	136	144	≥256	NT
	TGE	80	96	96	NT
	ROTA	48	64	48	NT

NT : not nested.

- 경기도 용인 D농장에 있어서 비특이성 면역증강제(B product)를 사료첨가와 더불어 바이러스성 설사병 백신접종에 따른 모돈의 혈청과 초유에 대한 평균역가와 자돈의 시기별 평균혈청가는 다음 표 29과 표 30과 같다.

- 바이러스성 설사병백신에 대한 모돈과 자돈의 혈청과 초유의 평균역가를 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군과 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군 및 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 투여하지 않은 C군을 비교하였던 바 live vaccine인 PED 백신에 있어서는 비특이성 면역증강제(B product)를 투여한 처리군의 모돈에서 백신접종후 강한 면역을 형성하여 초유를 통하여 자돈에게 수동면역을 형성시켜줌을 알 수 있었다. 그러나 실험군간의 차이는 모돈군과 자돈군 모두에서 발견되지 않았으나 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 다른 실험군에 비하여 모돈뿐만 아니라 자돈에서도 실험전기간동안 꾸준하고 안정된 면역형성이 이루어지고 있음을 알 수 있었다. Killed vaccine인 TGE백신접종에 있어서는 면역반응은 초유에 있어서 처리군간의 뚜렷한 차이를 보였으나 전반적으로 백신에 의한 면역형성이 크게 영향을 주지 못하였으나 전실험기간동안 방어력을 부여할 수 있는 항체를 유지하였다. 또한 killed vaccine인 ROTA백신접종에 대한 면역은 초유를 통하여 강하게 나타났으나 처리군간의 차이를 인정할 수 없었다.

표-29). 임신모돈의 바이러스성 설사병백신에 대한 모돈의 혈청 및 초유의 평균 역가
(경기도 용인 D농장)

시기	접종백신	시 험 군		
		A	B	C
접종전	PED	60	37	12
	TGE	≥256	≥256	≥256
	ROTA	85	23	9
초유	PED	≥256	≥256	≥256
	TGE	≥256	144	64
	ROTA	≥256	136	≥256
분만후 1주	PED	172	75	≥256
	TGE	192	53	64
	ROTA	136	109	128
분만후 2주	PED	148	112	192
	TGE	92	181	48
	ROTA	176	139	20
이유시	PED	128	128	75
	TGE	≥256	≥256	192
	ROTA	≥256	≥256	≥256

표-30). 임신모돈의 바이러스성 설사병백신에 대한 자돈의 시기별 평균 혈청가
(경기도 용인 D농장)

자돈연령	접종백신	시 험 군		
		A	B	C
1주령	PED	165	77	141
	TGE	172	72	112
	ROTA	224	149	218
2주령	PED	78	96	85
	TGE	32	128	64
	ROTA	144	139	33
이유	PED	64	19	53
	TGE	213	101	75
	ROTA	59	92	≥256

- 따라서 상기 2개 양돈장의 임신모돈에 있어서 바이러스성 설사병에 대한 백신접종과 더불어 비특이성 면역증강제(B product)를 사료첨가하였을 경우에 방어할 수 있는 면역항체가 형성에 관한 효과면에서는 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 실험군이 비특이성 면역증강제(B product)를 급여하지 않은 실험군에 비하여 모돈의 혈청과 초유에서 방어력을 부여할 수 있는 항체가를 갖고 있었으며 자돈에 있어서도 초유와 상유를 통하여 포유자돈에서 높은 폐사를 동반하는 설사병 바이러스에 대한 방어면역을 형성하고 있음을 관찰할 수 있었다. 그러나 모돈에

있어서 위생적인 사양관리와 영양관리가 모든의 포유자돈에 대한 성장과 질병면에 있어서 중요함을 알 수 있었다.

다). 자돈 소장의 면역글로블린(IgA)형성세포 분포 및 출현분포에 대한 형태학적 소견

- 돼지바이러스성 설사병 백신접종과 비특이성 면역증강제(B product)를 투여한 분만 모든의 포유자돈에 대한 성장시기별 1주령, 2주령 및 이유시 자돈의 소장 각부위에 있어서 국소면역에 관한 면역글로블린(IgA)형성세포의 분포에 관하여 알아보기 위하여 자돈을 시기별로 각 실험군당 2두씩을 무작위 추출하여 부검을 실시하였다. 소장을 10% 중성포르말린에 고정을 한 후 파라핀 포매과정을 거쳐 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

파라핀조직을 탈파라핀시킨 다음 0.3% H₂O₂를 함유한 무수메탄올에 30분간 처리하고 normal serum으로 30분간 반응시켰다. 일차항체는 anti-porcine IgA(Serotec Ltd., England)를 10배 희석하여 37°C에서 3시간 처리한 후 차가운 PBS(pH 7.4)로 수세하였다. 이차항체는 biotinylated goat anti-mouse IgG(Vector Lab. Inc., USA)를 30분간 반응시키고 avidin-biotin complex Elite kit(Vector Lab. Inc., USA)로 30분간 실온에서 적용시킨 다음 DAB(3,3'-diaminobenzidin tetrachloride)로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 핵대조염색을 실시하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

- 경기도 안성 K농장에 있어서 비특이성 면역증강제(B product)를 사료첨가와 더불어 바이러스성 설사병 백신접종에 따른 분만모든의 포유자돈의 시기별 소장 각부위에 있어서 국소면역에 관한 면역글로블린(IgA)형성세포의 분포 및 출현빈도에 대한 결과는 다음 표 31과 같다.

- 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 1주령 자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria하단부위에서 중등도와 용모부위에서는 극소수를(사진. 1a), 공장에서는 lamina propria하단부위에서 극소수를 관찰하였고(사진. 1b) 회장에서도 Peyer's patches에서 소수의 출현빈도를 보였다(사진. 1c). 2주령 자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 중등도를, 용모부위에서는 극소수를 관찰하였고 공장에서는 lamina propria부위에서 소수를 관찰하였다. 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 소수 내지 중등도를 관찰하였다. 이유자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 다수와 용모부위에서는 소수를 관찰하였고(사진. 1d) 공장에서는 lamina propria부위에서 중등도를 관찰하였다(사진. 1e). 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 중등도의 출현빈도를 보였다(사진. 1f).

- 비특이성 면역증강제(B product)를 모든사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군은 1주령 자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria하단부위에서 중등도와 용모부위에서 극소수를(사진. 2a), 공장에서는 극소수를 관찰하였으며(사진. 2b) 회장에서는 Peyer's patches에서 극소수의 출현빈도를 보였다(사진. 2c). 2주령 자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 다수를, 공장에서는 lamina propria부위에서 중등도를 관찰하였다. 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 소수에서 중등도의 출현빈도를 보였다. 이 유자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 다수와 용모부위에서는 소수를 관찰하였고(사진. 2d) 공장에서는 lamina propria부위에서 중등도를 나타내었다(사진. 2e). 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches부위에서 중등도의 출현빈도를 보였다(사진. 2f).

비특이성 면역증강제(B product)를 모든사료에 투여하지 않은 C군은 1주령 자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서 lamina propria하단부위에서 다수와 용모부위에서 소수를(사진. 3a), 공장에서는 lamina propria하단부위에서 극소수 내지 중등도를(사진. 3b), 회장에서는 Peyer's patches와 lamina propria에서 소수 내지 중등도의 출현빈도를 보였다(사진. 3c). 2주령 자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 소수 내지 다수를 관찰하였고 공장에서는 lamina propria부위에서 소수 내지 중등도를 보였다. 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 소수 내지 중등도의 출현빈도를 보였다. 이 유자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장과 공장에서는 lamina propria부위에서 소수 내지 중등도를 관찰하였고(사진. 3d, 3e) 회장에서도 lamina propria와 Peyer's patches부위에서 소수의 출현빈도를 보였다(사진. 3f).

비특이성 면역증강제(B product)를 모든사료에 투여하지 않고 분만모돈에 돼지 바이러스성 설사병백신을 접종하지 않은 D군은 1주령 자돈의 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서 lamina propria하단부위에서 소수를(사진. 4a), 공장에서는 lamina propria하단부위에서 극소수를(사진. 4b), 회장에서는 Peyer's patches와 lamina propria에서 극소수 내지 소수의 출현빈도를 보였다(사진. 4c). 2주령 자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 소수 내지 중등도를 관찰하였고 공장에서도 lamina propria부위에서 소수 내지 중등도를 보였다. 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 소수 내지 중등도의 출현빈도를 보였다. 이 유자돈에서 면역글로블린(IgA)형성세포는 십이지장과 공장에서는 lamina propria부위에서 극소수 내지 소수를 관찰하였고(사진. 4d, 4e) 회장에서도 lamina propria와 Peyer's patches경계부위에서 극소수 내지 소수의 출현빈도를 보였다(사진. 4f).

- 바이러스성 설사병백신에 대한 자돈 소장의 각 부위에서 극소면역에 관여한다고 알려진 면역글로블린(IgA)형성세포의 분포와 출현빈도를 비특이성 면역증강제(B product)를 모든

사료에 0.05% spray하여 급여한 A군과 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군 및 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 투여하지 않은 C군과 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 투여하지 않고 분만모돈에 돼지 바이러스성 설사병백신을 접종하지 않은 D군을 비교하였던 바 비특이성 면역증강제(B product)를 투여한 처리군(A군과 B군)의 자돈 1주령 소장에서 대조군인 C군과 D군에 비하여 면역글로불린(IgA)형성세포의 분포 및 출현빈도는 비교적 낮게 관찰되었으나 자돈 2주령과 이유일령에서는 높게 관찰되었다.

표-31). 임신모돈의 바이러스성 설사병백신에 대한 자돈의 시기별 소장의 면역글로불린(IgA)형성세포의 분포 및 출현빈도 (경기도 안성 K농장)

시험군	자돈연령	자 돈 소 장		
		십이지장	공 장	회 장
A	1주령	± - +++	±	+
	2주령	± - ++	+	+ - ++
	이유	+++	++	++
B	1주령	± - ++	±	±
	2주령	+ - +++	++	+ - ++
	이유	+ - +++	++	++
C	1주령	+ - +++	± - ++	± - ++
	2주령	+ - +++	± - ++	+ - ++
	이유	+ - ++	++	+
D	1주령	+	±	± - +
	2주령	± - ++	± - ++	+ - ++
	이유	± - +	± - +	± - +

* : ± ; 극소수, + ; 소수, ++ ; 중등도, +++ ; 다수.

- 경기도 용인 D농장에 있어서 비특이성 면역증강제(B product)를 사료첨가와 더불어 바이러스성 설사병 백신접종에 따른 분만모돈의 포유자돈의 시기별 소장 각부위에 있어서 국소면역에 관한 면역글로불린(IgA)형성세포의 분포 및 출현빈도에 대한 결과는 다음 표 32와 같다.

- 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군은 1주령 자돈에서 면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장과 공장에서는 lamina propria하단 부위에서 극소수를 관찰하였으나 회장에서는 Peyer's patches에서 소수 내지 중등도의 출현빈도를 보였다. 2주령 자돈에서 면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 중등도를, 용모부위에서는 소수를 관찰하였고 공장에서는 lamina propria부위에서 중등도를, 용모부위에서는 소수를 관찰하였다. 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 소수를 관찰하였다. 이유자돈에서

면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 다수와 용모부위에서는 소수를 관찰하였고(사진. 5a) 공장에서는 lamina propria부위에서 중등도를 관찰하였다(사진. 5b). 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 중등도의 출현빈도를 보였다(사진. 5c).

비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군은 1주령 자돈에서 면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria하단부위에서 극소수 내지 소수를, 공장에서는 극소수를 관찰하였으며 회장에서는 Peyer's patches에서 극소수 내지 중등도의 출현빈도를 보였다. 2주령 자돈에서 면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 소수를 관찰하였고 공장에서는 lamina propria부위에서 극소수를 관찰하였다. 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 소수에서 중등도의 출현빈도를 보였다. 이유자돈에서 면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 다수를, 용모부위에서는 소수를 관찰하였고(사진. 6a) 공장에서는 lamina propria부위에서 중등도를 나타내었다(사진. 6b). 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches부위에서 소수 내지 중등도의 출현빈도를 보였다(사진. 6c).

비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 투여하지 않은 C군은 1주령 자돈에서 면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장과 공장에서는 lamina propria하단부위에서 극소수 내지 중등도를, 회장에서는 Peyer's patches와 lamina propria에서 소수 내지 중등도의 출현빈도를 보였다. 2주령 자돈에서 면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 소수 내지 중등도를 관찰하였고 공장에서는 lamina propria부위에서 소수 내지 중등도를 보였다. 회장에서는 lamina propria와 Peyer's patches의 경계부위에서 소수의 출현빈도를 보였다. 이유자돈에서 면역글로불린(IgA)형성세포는 십이지장에서는 lamina propria부위에서 소수 내지 중등도를(사진. 7a), 공장에서는 lamina propria부위에서 소수를 관찰하였고(사진. 7b) 회장에서도 lamina propria와 Peyer's patches부위에서 소수의 출현빈도를 보였다(사진. 7c).

- 바이러스성 설사병백신에 대한 자돈 소장의 각 부위에서 국소면역에 관여한다고 알려진 면역글로불린(IgA)형성세포의 분포와 출현빈도를 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 0.05% spray하여 급여한 A군과 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 3% 미강발효처리하여 급여한 B군 및 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 투여하지 않은 C군을 비교하였던 바 비특이성 면역증강제(B product)를 투여한 처리군(A군과 B군)의 자돈 1주령 소장에서 대조군인 C군에 비하여 면역글로불린(IgA)형성세포의 분포 및 출현빈도는 비교적 낮게 관찰되었으나 자돈 2주령과 이유일령에서는 높게 관찰되었다.

표-32). 임신모돈의 바이러스성 설사병백신에 대한 자돈의 시기별 소장의 면역글로블린 (IgA)형성세포의 분포 및 출현빈도 (경기도 용인 D농장)

시험군	자돈연령	자 돈 소 장		
		십이지장	공 장	회 장
A	1주령	±*	±	+ - ++
	2주령	++	± - +	+
	이유	+++	++	++
B	1주령	± - +	±	± - ++
	2주령	+	±	+ - ++
	이유	+++	++	++
C	1주령	+ - ++	± - ++	+ - ++
	2주령	± - ++	+ - ++	+
	이유	+ - ++	+	+

* : ± ; 극소수, + ; 소수, ++ ; 중등도, +++ ; 다수.

따라서 상기 2개 양돈장의 임신모돈에 있어서 바이러스성 설사병에 대한 백신접종과 더불어 비특이성 면역증강제(B product)를 사료첨가하였을 경우에 돼지 소화기질병의 예방에 있어서 매우 중요한 국소면역과 밀접한 관련이 면역글로블린(IgA)형성세포에 관하여 면역조직화학을 이용하여 검사하였던 결과 비특이성 면역증강제(B product)를 모돈사료에 첨가하여 급여한 실험군이 비특이성 면역증강제(B product)를 급여하지 않은 실험군에 비하여 자돈의 소화기점막에서 높게 형성됨을 알 수 있었다. 아마도 이러한 결과는 포유자돈에서 높은 폐사를 동반하는 설사병 바이러스에 대한 방어면역을 형성하는데 효과가 있으리라 사료된다. 그러나 앞으로 반드시 지속적으로 자돈의 소화기 점막에서 면역글로블린 중에서 IgA뿐만 아니라 소화기질병에 대한 방어기전으로써 중대한 역할을 하는 sIgA 및 전신면역과도 관련이 있는 IgG와 IgM도 면역조직화학을 이용한 형태학적으로 검사하여 IgA와의 돼지 바이러스성 설사병의 방어기전에 있어서의 상관관계를 확실하게 규명하여야 한다.

사 진 설 명

경기도 안성 K농장

1. A군

a) 1주령 자돈의 소장

사진 1a. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).

중등도의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 1b. 공장점막의 점막고유층.

극소수의 면역글로불린형성세포(화살표). x 400, ABC 염색

사진 1c. 회장의 Peyer소절(p).

소수의 면역글로불린형성세포(화살표). x 40, ABC 염색.

b) 이유자돈의 소장

사진 1d. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).

다수의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 1e. 공장점막의 점막고유층.

중등도의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 1f. 회장의 점막고유층과 Peyer소절(p).

중등도의 면역글로불린형성세포. x 200, ABC 염색.

1. B군

a) 1주령 자돈의 소장

사진 2a. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).

중등도의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 2b. 공장점막의 점막고유층.

극소수의 면역글로불린형성세포. x 200, ABC 염색.

사진 2c. 회장의 Peyer소절(p).

극소수의 면역글로불린형성세포(화살표). x 200, ABC 염색

b) 이유자돈의 소장

사진 2d. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).

다수의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 2e. 공장점막의 점막고유층.

중등도의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.
사진 2f. 회장의 점막고유층과 Peyer소절(p).

중등도의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

1. C군

a) 1주령 자돈의 소장

사진 3a. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).

다수의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 3b. 공장 of 점막고유층.

중등도의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 3c. 회장의 Peyer소절(p).

중등도의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

b) 이유자돈의 소장

사진 3d. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).

소수의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 3e. 공장 of 점막고유층.

소수의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 3f. 회장의 점막고유층과 Peyer소절(p).

소수의 면역글로불린형성세포. x 200, ABC 염색.

1. D군

a) 1주령 자돈의 소장

사진 4a. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).

소수의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 4b. 공장 of 점막고유층.

소수의 면역글로불린형성세포. x 400, ABC 염색.

사진 4c. 회장의 Peyer소절(p).

소수의 면역글로불린형성세포(화살표). x 40, ABC 염색

b) 이유자돈의 소장

사진 4d. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).

극소수의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 4e. 공장 of 점막고유층.

극소수의 면역글로불린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 4f. 회장의 점막고유층과 Peyer소절(p).
극소수의 면역글로블린형성세포. x 200, ABC 염색.

경기도 용인 D농장

1. A군

a) 이유자돈의 소장

사진 5a. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).
다수의 면역글로블린형성세포. x 400, ABC 염색.

사진 5b. 공장점막고유층.
중등도의 면역글로블린형성세포. x 400, ABC 염색.

사진 5c. 회장의 점막고유층과 Peyer소절(p).
중등도의 면역글로블린형성세포. x 400, ABC 염색.

1. B군

a) 이유자돈의 소장

사진 6a. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).
다수의 면역글로블린형성세포. x 400, ABC 염색.

사진 6b. 공장점막고유층.
중등도의 면역글로블린형성세포. x 400, ABC 염색.

사진 6c. 회장의 점막고유층과 Peyer소절(p).
중등도의 면역글로블린형성세포. x 400, ABC 염색.

1. C군

a) 이유자돈의 소장

사진 7a. 십이지장의 점막고유층(lamina propria).
중등도의 면역글로블린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 7b. 공장점막고유층.
소수의 면역글로블린형성세포. x 40, ABC 염색.

사진 7c. 회장의 점막고유층과 Peyer소절(p).
소수의 면역글로블린형성세포(화살표). x 200, ABC 염색

선발 비특이 면역증강제 (Nonspecific Immunostimulators; NIS) 내역

NIS 종류	주요성분	사용형태	예상효능
A product	Blood protein	animal feed additives	숙주면역기능향진
B product	SiO ₄ 등	animal feed additives	숙주면역기능향진
C product	Bacterial cell wall protein	animal feed additives	숙주면역기능향진
D product	Recombinant protein	injectable	모유생산증진을 통한 숙주면역 기능향진

