

최 종
연구보고서

동물용 vaccine의 면역효과 증강을 위한
신 adjuvant의 개발

Studies on the development of new adjuvant with
immunoadjuvant activity for the animal vaccine

한 동 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ 동물용 vaccine의 면역효과 증강을 위한 신 adjuvant의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 23 일

주관연구기관명 : 한동대학교

총괄연구책임자 : 김 종 배

세부연구책임자 : 이 관 희

연 구 원 : 강 태 봉

연 구 원 : 양 응 석

연 구 원 : 김 수 은

연 구 원 : 김 진 철

연 구 원 : 윤 성 민

연 구 원 : 유 지 영

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 여 상 건

요 약 문

I. 제 목

동물용 vaccine의 면역효과 증강을 위한 신 adjuvant의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구소에서는 현재까지 한국산 겨우살이 추출물의 추출방법, 항암성 및 면역자극 효과에 대하여 연구를 수행하여 왔다. 현재까지의 연구결과 면역계를 자극 활성화시키는 기능이 확인된 바 동물백신에 대한 adjuvant로서의 개발가능성이 강력히 시사되었다. 그리고 지표물질의 선정을 위하여 겨우살이 추출물로부터 활성물질인 lectin 성분의 분리 및 그에 대한 단일크론 항체를 생산하여 면역학적 활성을 나타내는 겨우살이 추출물의 지표물질 정량을 위한 면역분석법의 확립도 가능한 상태에 있다. 이러한 사실을 바탕으로 하였다.

본 연구에서는 그간 연구 개발된 기술을 기반으로 하되 산업화를 위한 기술을 중점적으로 개발, 보완하는 것에 초점을 맞추어 다음과 같은 기술들을 개발토록 한다.

1. 우수한 활성을 갖으면서 안전성이 있는 추출방법 확립을 위하여

- 1) 주 활성 성분인 lectin의 분리법 확립
- 2) Lectin 외의 활성성분 분리법 확립
- 3) 독성성분 제거법 확립
- 4) 새로운 adjuvant 조성물 확립과 이의 활성 조사를 위한 검색법 확립
- 5) 여러 숙주나무의 면역증강 활성의 조사,
- 6) 최종 제품의 Q.C를 위한 지표물질의 정량법(예, ELISA)을 확립한다.

2. 표준화된 면역증강제를 산업화 하기 위하여

- 1) 실험용 항체생산을 위한 adjuvant의 개발
- 2) 동물 vaccine용 adjuvant로서 한국산 겨우살이 추출물의 이용 가능성을 확립하고자 여러가지 항원에 대하여,
 - (1) 실험 및 목표 동물에 대한 체액성 면역증강 활성 조사
 - (2) 실험동물에서 세포성 면역증강 활성의 조사
 - (3) 실험 및 목적동물에서의 안전성 조사

3. 본 제재의 응용 차원에서

- 1) 경구용 adjuvant로서의 활용을 위한 기반 확립
- 2) 타 면역증강제와 겨우살이의 혼합된 새로운 adjuvant의 개발 가능성
- 3) 기능성 식품 내지 건강보조 약품으로서의 개발 가능성
- 4) 이후 인체용 개발을 위한 자료로 최대한 활용한다.

2. 연구개발의 필요성

단기간 내에 국제 경쟁력이 있는 제품을 개발한다는 것은 매우 어렵다. 무한 국제 경쟁체제하에서 식량, 의료, 에너지, 환경문제등 여러 방면에 대하여 세계의 여러나라에서 집중적인 투자와 연구개발이 이루어지고 있다. 개발된 신기술에 대하여 지식 재산권을 확보하여 보호하려는 움직임이 강해지고 있는 현재, 우리나라 특이성을 가지면서 세계적으로 경쟁력 있는 제품을 개발한다는 것은 중요한 의의를 가진다고 하겠다. 특히, 유용물질이나 신기술의 배타적 권리를 엄격하게 보호하려는 방향으로 국제질서가 전개되고 있는 요즈음 우리나라 특이성을 가지는 식물자원을 이용, 제품으로 발전시키는 것은 국가의 부 및 기술 축적의 차원에도 부합되리라 믿는다. 본 연구는 우리나라에서 널리 서식하는 겨우살이를 이용하여 동물용 백신의 면역증강을 위한 adjuvant를 개발하고자하는 목표를 달성하고자 하였다. 겨우살이의 경우 이미 기초 연구가 풍부히 되어 있을 뿐 아니라 현재 유럽에서는

항암제용 제약을 비롯해 건강보조식품 및 화장품에 이르기까지 다양하게 활용되고 있다. 여기에 한국산 겨우살이가 유럽산에 비교하여 활성 및 활성물질에 대한 차이가 있음이 보고되고 있으며 특히, 국내산의 경우 면역증강 환어에 대한 연구결과가 보고되기 시작하고 있다. 따라서 본 연구에서 추진하고자 하는 겨우살이를 이용한 동물 vaccine용 adjuvant로의 개발은 충분한 개발 가능성이 있는 시점에 있다. 특히 겨우살이로 부터 vaccine용 adjuvant를 개발 및 응용함은 외국에서도 실시된 바 없는 새로운 시도이기에 개발에 성공할 경우 산업적인 파급효과가 지대할 것으로 확신한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 1차년도

가. 제 1 세부과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 면역 증강제 조성물의 제조와 특성의 조사 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 겨우살이 추출물의 제조 2. Lectin 분획의 분리 및 대량생산 3. Toxin 분획의 분리 4. 기타 활성분획의 분리 5. 열매분획의 함량 결정 |
| <ul style="list-style-type: none"> 조성물 표준화 및 정량을 위한 기초 연구 | <ol style="list-style-type: none"> 1. lectin에 대한 mAb의 생산 2. Toxin에 대한 poly 항체 생산 3. 기타 활성분획에 대한 poly 항체의 생산 |

나. 제 2 세부과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|----------------------------|--|
| 추출물 및 구성 신규물질의 면역자극 활성화 조사 | 1. In vitro에서 면역담당세포에 미치는 활성화 1) 정상세포에 미치는 활성화 2) mitogen에 대한 반응성 조사 2. Macrophage 활성화 조사 ; cytokine의 유도능 측정 3. 항원 비특이적 방어효과 조사 |

다. 협동과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|------------------------------------|--|
| • 겨우살이 추출물에 의한 닭 전염병 예방백신의 특이면역 증강 | 1. 닭에 대한 lectin의 일반독성 분석 2. 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강효과조사 1) 뉴캐슬병 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 강독주 공격에 대한 방어능력 3. 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강 효과 조사 1) 전염성기관지염 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 강독주 공격에 대한 방어능력 |

2. 2차년도

가. 제 1 세부과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 지표물질 분석법 및 표준화 • 안전성 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 일반약리 실험 - 예비독성 실험 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 지표물질의 정량법 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) Lectin assay를 위한 sandwich ELISA 2) Toxin assay를 위한 competition ELISA 3) 기타 활성분획을 위한 면역분석법 2. Adjuvant의 표준화 <ol style="list-style-type: none"> 1) Lectin의 함량 결정 2) 기타 활성분획의 함량 결정 3) Toxin의 허용량 조사 1. 급성독성 2. 일반행동에 대한 영향 3. 중추신경계에 미치는 영향 4. 소화기계에 대한 영향 |

나. 제 2 세부과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 면역증강 활성의 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) Lectin에 의한 활성 조사 2) 표준화된 시료에 의한 활성 조사 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 체액성 면역기능 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 항원의 면역과 혈청의 수집 2) 항체의 역가 및 subisotype결정 3) Lymphocyte 자극 실험 4) Cytokine의 유도분비 조사 2. 세포성 면역기능 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 지연성과민반응의 측정 2) 세포독성 T-세포의 활성 측정 3. 항원 특이적인 방어효과 조사 |

다. 협동과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 겨우살이 추출물에 의한 돼지 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 돼지에 대한 lectin의 일반독성 분석 2. 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강 효과 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 오제스키병 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 자돈 면역시의 항체 형성상태 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 자돈 면역시의 세포성 면역 상태 조사 6) 강병원성주 공격에 대한 방어능력 |

3. 3차년도

가. 제 1 세부과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 혼합 면역증강제 개발 및 채취시기, 숙주별 활성물질 함량조사 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 시료의 표준화를 위한 test <ol style="list-style-type: none"> 1) 채취시기별 활성물질(KML-C)의 함량조사 2) 숙주별 활성물질(KML-C)의 함량 조사 2. KM-110과 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant의 개발 및 활성조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) Alum에 혼합한 형태로서의 체액성 면역증강 활성조사 2) Oil (squalene)에 혼합된 형태로서의 체액성 면역증강 활성조사 3. 임상적 의미를 갖는 항원들에 대한 특이적 면역증강능 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) Diptheria toxin에 대한 항체역가 증강효과 2) Influenza hemagglutinin에 대한 항체역가 증강효과 3) Hepatitis 항원에 대한 항체역가 증강효과 4. 시료의 안전성 시험 <p>약효를 나타낸 농도에서 실질장기에 대한 조직검사</p> 5. 겨우살이내 toxin 분획에 대한 정량조건 확립 <p>HPLC를 이용한 정량조건확립</p> |

나. 제 2 세부과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|---|--|
| <p>• 경구 투여용 vaccine adjuvant 의 가능성 조사</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. KM-110과 KML-C의 경구 급성 및 아급성독성조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) KM-110의 mice에서의 급성 및 아급성독성 2) KML-C의 mice에서의 급성 및 아급성독성 2. KM-110의 경구백신용 adjuvant로서의 가능성 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) Serum 과 장내의 항원특이항체역가 증강 효과 조사 2) 항원 특이항체의 isotype 조사 3) 항원 특이항체의 subclass 조사 4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine 유도능 조사 3. KML-C의 경구백신을 위한 adjuvant로서의 가능성조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) Serum 과 장내의 항원특이항역가 증강효과 조사 2) 항원 특이항체의 isotype 조사 3) 항원 특이항체의 subclass 조사 4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine유도능 조사 |

다. 협동과제

| 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|--|--|
| <p>•겨우살이 추출물에 의한 닭 뉴캐슬병 바이러스 유전자 발현 단백질 백신의 특이 면역 증강</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. HN 유전자 발현단백질 백신의 특이적 면역 증강 효과 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) HN 유전자 재조합 DNA clone 배양 2) HN 유전자 발현단백질 획득 3) Lectin 혼합 발현단백질 백신 생산 4) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 5) 항체의 바이러스 중화능력 조사 6) 강독주 공격에 대한 방어능력 조사 |

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과(성과)

가. 특허출원

- 현재 진행중인 특허(2002년 11월중 출원 완료 가능)
- 대상국 : 일차 국내 출원후 자료 보완하여 국외도 출원할 계획임.
- 제목 : 경구용 면역증강제의 활성을 가지는 한국산 겨우살이 렉틴성분
- 내용 : 본 과제 연구결과중 한국산 겨우살이 추출물(KM-110)과 lectin성분(KML-C)가 점막면역을 자극하여 면역기능을 증강시키는 효과에 근거하여 특허청구범위를 정하고 이를 이용할 경우 제약을 비롯한 다양한 제품을 개발할 수 있어 산업적인 가치가 매우 클 것으로 기대됨.

나. 특허출원 준비중

- 3개월 이내 출원 가능할 것으로 예상됨
- 대상국 : 한국 및 중국
- 제목 : 한국산 겨우살이 lectin성분이 함유된 백신용 면역증강제(adjuvant) 조성물
- 내용 : KM-110이나 KML-C가 체액성 및 세포성 면역증강효과를 나타내며 이를 이용하여 동물백신용 adjuvant로 활용할 수 있는 실재적인 조성물에 관한 내용

다. 논문 발표

특허출원 및 사업화를 위한 전략적인 면에서 그간 논문발표는 보류되어 왔지만 이제 그간의 결과들을 토대로 논문을 발표할 것임. 예상되는 주요 논문의 제목을 정리하면 다음과 같다.

- 1) 한국산 겨우살이에서 분획된 viscotoxin의 in-vitro 세포독성효과와 in-vivo 독성효과 비교
- 2) Humoral immunoadjuvant activity of KML-C
- 3) Cellular immunoadjuvant activity of KML-C
- 4) 한국산 겨우살이의 잎, 줄기 및 열매 내에 존재하는 lectin의 함량조사
- 5) Effects of mistletoe preparations in the mixture with other known adjuvants on the production of antibodies for the development of new adjuvant system
- 6) Mucosal adjuvant effect of Korean mistletoe in mice
- 7) Involvement of caspase and serine protease in cell death by mistletoe lectin
- 8) Immune enhancement effect of lectin for genetically engineered proteins
- 9) Enhancement of immunogenicity of inactivated vaccines of NDV and IBV
- 10) 돼지 오제스키병에 있어서 렉틴의 독성이 미치는 영향

2. 활용방안

가. 활용가능분야

1) 동물백신용 adjuvant

- 사람의 경우 alum이 유일하게 백신용 adjuvant로 사용되고 있지만 동물의 경우

다양한 adjuvant가 상품화 되어 있다. 그러나 국내의 경우 그나마 전량을 외국 수입에 의존하고 있는 바 수입을 대체할 수 있는 adjuvant의 개발은 상당한 의의를 갖는다.

○ 따라서 본 연구의 결과를 기반으로 하여 우선 닭에 사용할 수 있는 백신용 adjuvant를 2003년 내에 산업화 시키고 점차 이를 확대하여 다른 가축 또는 애완동물등에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

2) 동물용 단순 면역증강제 개발

○ 백신용 adjuvant가 아닌 단순히 면역력을 증강시킬 수 있는 면역증강제를 개발할 수 있을 것으로 전망된다.

○ 다양한 형태의 제품 개발이 가능할 것으로 기대됨. 특히 겨우살이 제품을 주사제가 아닌 경구용이나 비점막자극제로 개발할 경우 전염병이 만연될 시 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

○ 2003년에는 사업화 할 수 있을 것으로 기대됨

3) 사람 백신용 adjuvant개발

○ 현재 유일하게 alum만이 사용되고 있기 때문에 사람용으로 개발될 경우 그 파급효과가 매우 클 것으로 기대된다.

○ 먼저 동물에 적용하여 충분한 자료를 확보한 뒤 사람에게 적용한다면 여러모로 장점이 있을 것으로 확신한다.

○ 주사제뿐만 아니라 경구백신용 adjuvant로 사용할 수 있을 경우 그 파급효과가 지대할 것으로 예상된다.

○ 그러나 사람의 경우 제약화에 소모되는 경비와 기간이 너무 길기 때문에 장기적인 과제로 충분히 진행할 수 있을 것으로 예상된다.

4) 경비용 면역증강제 개발

- 앞에서 언급하였듯이 주사제나 경구제보다 더 강점이 있는 것이 경비용이다. 제약화를 위해 요구되는 각종 시험자료에 있어서도 다른 것들에 비해 매우 간단하다.
- 2003년부터 국내 제약사 또는 중국의 제약사와 협동으로 경비용 면역증강제 개발을 시작할 계획이다.

5) 사람을 위한 항암제 개발

- 현재 독일등지에서는 겨우살이를 이용한 항암제를 널리 사용하고 있고 국내에서도 수입하고 있다.
- 이미 사용을 하고 있기 때문에 항암제로 개발할 경우 상당한 수입대체효과를 갖을 수 있다. 무엇보다도 개발에 소요되는 경비를 절감할 수 있다.
- 새로운 항암제로 활용가능 : 기존 항암제와 병용 투여할 시 상승효과를 얻을 수가 있다. 특히 겨우살이 성분은 면역적인 기전에 근거한 효과이기 때문에 다른 기전에 기초한 항암제와 병용 사용할 시 매우 큰 상승효과를 기대할 수가 있다. 현재 이런 개념에 의거 새로운 항암제를 개발 중국의 하르빈 의과대학과 공동으로 추진하고 있음.
- 상기 과제가 성공적으로 추진될 경우 한국산 겨우살이를 사용해야 함으로 본 과제의 결과가 미치는 영향도 매우 클 것으로 기대함.
- 한국산 겨우살이가 새로운 농가 소득원으로 활용될 수 있을 것으로 또한 기대됨

6) 건강보조 식품으로의 활용

- 2001년 8월에 식약청으로부터 겨우살이가 식품원료로 사용할 수 있다는 허가를 득하였기 때문에 향후 겨우살이를 이용한 건강보조식품이 다양하게 개발되어 실용화 될 것으로 전망된다.
- 이미 당뇨와 고혈압에 효과가 있는 제품이 개발되어 시판되고 있음.
- (주)한국야쿠르트에서는 무하유란 제품을 출시하여 좋은 호응을 얻고 있다.

○ 건강보조식품에 대한 활용이 확대될 경우 이 도한 농가 소득에 지대한 공로가 있을 것으로 기대됨.

7) 사료첨가제로 활용

○ 겨우살이 성분은 면역효과가 탁월하다. 특히 경구로 투여하였을 경우 장점막세포를 자극하여 면역기능을 증가시키는 효과가 탁월하기 때문에 사료첨가제로 활용할 수 있는 이론적인 근거가 충분하다.

○ 가축뿐만 아니라 양어용에도 사용할 수가 있어 사료첨가제로서의 이용가치가 매우 높다.

○ 최소한 2003년 후반기에는 산업화가 가능할 것으로 기대된다.

3. 산업화 계획 방안

가. 동물백신용 adjuvant 개발

○ 관련회사

- (주)미슬바이오텍 : 본 과제 참여회사

- (주)제노바이오텍 : 협력업체로서 공동 개발하기로 협약을 체결하였음

○ 시기 : 2003년 현장시험을 거쳐 후반부에 산업화 될 수 있도록 추진할 계획임.

○ 제품내용 : 일차 닭에 대한 것만 제한해서 제품을 개발하고 추후 이 결과에 의거하여 다른 동물(예;개등)에 활용할 계획임.

나. 동물용 면역증강제

○ 백신용 adjuvant와 같은 내용으로 개발할 계획임.

○ 제품 : 경구용, 경비용, 주사제등 다양한 제품을 개발할 계획임.

○ 관련회사 :

- (주) 미슬바이오텍

- (주) 제노바이오텍

- 중국 하르빈 의과대학과도 협력할 계획임.

○ 특히 경비용(spray형) 면역증강제는 조금만 더 기초적인 자료를 확보하면 획기적인 제품으로 활용될 수 있을 것으로 확신 되는 바 집중적으로 투자, 개발할 것임.

4. 전망

겨우살이는 이미 외국에서 그 가치를 인정 받고 있고 현재 항암제등 다양한 제품으로 시판되고 있어 앞으로 그 전망은 매우 밝을 것으로 생각된다. 더욱이 한국산은 다른 나라의 겨우살이에는 없는 성분을 함유하고 있기 때문에 경쟁력이 충분히 있다고 자신함.

겨우살이는 다양한 효능(예; 항암성, 항고혈압, 항당뇨, 면역증강효과등)을 갖고 있으며 무엇보다도 이들에 대한 과학적인 근거가 확실히 확보되어 있다는 것은 최대의 장점이다.

다양한 효능에 근거하여 다양한 제품을 개발할 수가 있다. 동물은 물론 사람에게 까지 적용할 수가 있어 더욱 폭 넓은 제품을 개발할 수가 있다.

동물에 먼저 활용을 하고 동물에 사용한 자료들을 바탕으로 사람에게 적용할 수 있는 제약까지 활용한다면 실로 겨우살이를 근거로 한 상당한 경제적인 가치를 유발할 수 있을 것으로 확신한다. 현재 중국 하르빈 의과대학과 항암제 및 면역증강제 개발을 위한 합작회사를 추진하고 있는 바(2002년 11월 29일 계약 예정) 본 과제의 결과가 향후 이런 일을 추진함에 있어 근간을 이루는데 일조를 할 것으로 확신함.

SUMMARY

- **Title of Project** : Studies on the development of new adjuvant with immunoadjuvant activity for the animal vaccine
- **Key Words** : Mistletoe, Adjuvant, Mucosal immunity, Vaccine
- **Institute** : Handong Global University
- **Project Leader** : Kim Jong Bae
- **Associated Company** : Mistlabiotec Ltd.,
- **Project period** : 1999.11 ~ 2002. 11.
- **Abstract** :

It has been well known that mistletoe has various biological activities such as anti-cancer and immunological activities including adjuvant activity. The ultimate purpose of this project is to develop a new adjuvant for animal vaccine.

For this, we have investigated the following studies and the results are summarized as followed :

1. Investigation of the optimal conditions for the preparation of extract(KM-110) and purification of lectins from Korean mistletoe.

1) We have established the optimal conditions for the preparation of extract(KM-110), which contains lectins with immunological activities and the highest yield.

2) The conditions for the isolation and purification of lectins from Korean mistletoe were also established : fraction containing two different kinds of lectins namely KML-C by hydrolyzed Sepharose-4B colum; purification of lectins in a single component by immunoaffinity chromatography using monoclonal antibody.

3) Isolation of viscotoxin by various methods

2. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to KML-IIU for the development of ELISA for the assay of KML-IIU and for the making of immunoaffinity column.

1) We have got several hybridoma secreting monoclonal antibodies to KML-IIU. The antibodies were characterized in terms of titer and specificity. One of them was very specific to KML-IIU, which did not cross react with other lectins.

2) Two-sites sandwich ELISA method for the measurement of KML-IIU was development using monoclonal and polyclonal antibodies, which can be used as a Q.C method.

3) Immunoaffinity chromatography was established for the isolation of KML-IIU with monoclonal antibody.

3. Preliminary toxicity and general pharmacology of KML-C were investigated in terms of determination of LD₅₀ , general behaviors hexobarbital-induced sleeping time, pentylenetetrazole-induced convulsion etc : no significant effects

1) Acute toxicities of toxin fraction and heparine-binding protein fraction were also investigated.

2) Determination of the effective dose of KML-C : 250ng/kg was the minimum dose showing immunological activity whereas 12.5-25ug/kg might be the highest dose which did not show any serious side effects.

4. Immunological activities :

- 1) Effect of cytotoxicity in vitro on the normal cell(spleen cells)
- 2) Mitogenic activity with and without other mitogens such as con-A and LPS
- 3) Induction of cytokine from macrophage with KML-IIU and IIL, viscotoxin HBP.

5. Non-antigen specific resistance effects in experimental animal : challenge test with several bacterial strains including *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* etc.

6. Development of a new adjuvant for the production of antibody

- 1) Effect of KM-110 on the adjuvant activity of aluminium hydroxide and ASA25 : KM-110 showed synergistic effects on the titer of antibody produced
- 2) Development of new oil adjuvant containing KM-110 : when KM-110 was administered with conventional and the most typical oil adjuvant FIA and FCA, it showed significant synergistic effect on the raising of the antibody titer

7. Effects of KM-110 and KML-C on the humoral immuno-activity

- 1) Determination of the optimal amounts showing adjuvant activities through comparison studies with FIA and FCA
- 2) Antigen-specific cytokine induction ability and subclass of antibodies produced were investigated to see whether their responses are Th1 or Th2
- 3) KML-C changed a population and surface marker of spleen lymphocytes : by flowcytometer, CD69 was increased while CD3 was decreased, indicating that it has lymphocyte activation activity.

8. KML-C showed also cellular-immuno activity such as DTH, which was further confirmed by showing that it induced IL-2 which is associated with the proliferation of T-cell.

9. Proliferation of spleen cells stimulated by antigen with KML-C previously was increased when stimulated with antigen in-vitro.

10. In order to develop a new formulation containing mistletoe preparation, several well-known components of adjuvant such as alum, squalene, FCA and FIA were mixed with KM-110 or KML-C and used for the immunization with various kinds of antigen and vaccines. We believe that mistletoe preparation has potentiality to be one of active components used for the adjuvant.

11. Mucosal routes for vaccine delivery have many advantages, however for this a powerful mucosal adjuvant is required. We have demonstrated that mistletoe preparation such as KML-C and KM-110 have a strong mucosal adjuvant activity.

12. To determine general toxicity in chickens, the 1.1 ng, 2.2 ng and 22.2 ng of the lectin per 1 g of body weight, respectively, were injected into legs of chicks of 1-week-old, intramuscularly. The chicks were observed for changes in blood and histopathology at 4-days' intervals during 16 days, and the results are summarized as follows.

: During the experimental period, no significant changes were observed in values of RBC, WBC, Hb, PCV, MCV, MCH, MCHC, GOT, GPT, BUN, creatinine and total protein in the chicks injected with lectin of 1.1-22.2/g of body weight, which mean the

lectin has no toxic effects on blood circulation and functions of liver and kidney. In hisopathological observation, no changes were found in the brain, liver, lung, spleen, kidney, thymus, bursa of Fabricius and muscle of leg in which the lectin was injected with dose of 2.2 ng /g of body weight.

13. In comparison of immune-enhancing effects of lectin (4.4 ng/g of body weight) and $Al(OH)_3$ on inactivated vaccines of NDV in chicks of 1-week old, HI antibody titers by lectin-adjuvanted B1, LaSota and Ulster 2C were $\log_2 3.9$, $\log_2 4.8$ and $\log_2 5.3$, respectively, at 4 weeks after vaccination. Although the HI titers were lower than those in the same strains adjuvanted with $Al(OH)_3$ ($\log_2 7.3$, $\log_2 8.3$, $\log_2 9.3$, respectively), the chicks withstood challenge by the Kyojeongwon strain, a very virulent NDV, and the HI titers reached to high level as in the $Al(OH)_3$ -adjuvanted vaccines at 6 weeks after vaccination. The antibody induced by lectin-adjuvanted vaccines revealed reactivity to the NDV antigens as in the $Al(OH)_3$ -adjuvanted vaccines. It was, therefore, recognized that lectin increased immunogenicity of inactivated NDV vaccines.

14. The lectin (4.4 ng/g of body weight) also increased the immunogenicity of inactivated IBV vaccines of M1 and KM91 strains as in the $Al(OH)_3$ -adjuvanted vaccines of the strains. The HI antibody titers by lectin-adjuvanted vaccines of M41 and KM91 were $\log_2 3.8$ and $\log_2 4.4$, respectively, at 4 weeks after vaccination. The chicks withstood challenge by a virulent IBV strain, and the HI titers reached to high level as in the $Al(OH)_3$ -adjuvanted vaccines at 6 weeks after vaccination. It was, therefore, clear that lectin increased immunogenicity of inactivated IBV vaccines.

15. To determine general toxicity of lectin in pigs and reference to its concentration if it can enhance the immunogenicity of inactivated vaccines, the lectin in various concentrations was injected into post-weanling piglets intramuscularly. The piglets were observed for clinical signs and changes in blood and histopathology, and the results are summarized as follows.

: By lectin of 30 ng/g of body weight, there were signs such as systemic erythema, cutaneous hemorrhage, dyspnea, fever and death. Lesions such as centrilobular congestion, fat granules, necrosis, vacuolation and depletion of nuclei were also observed in liver. In kidney, vacuolation and necrosis in convoluted tubules and hyaline droplets in glomeruli were observed. By lectin of 7 ng/g of body weight, edema and cutaneous hemorrhage in the injected muscle, lameness and depression were observed. By lectin of 3-5 ng/g of body weight, signs of depression and inappetence, and congestion in the injected area were shown. Moreover, toxic changes were found in liver and kidney. By lectin of 0.5-0.7 ng/g of body weight, no significant changes were observed in values of RBC, WBC, Hb, PCV, BUN, creatinine, AST and ALT, while observed were swelling and vacuolation of convoluted tubules by 0.7 ng lectin and necrosis and fibrosis of muscular fibers by 0.5 ng lectin. Therefore, it was recognized that toxicity of the lectin was marked in pigs, and thus, the concentration of lectin for inactivated vaccines which will not exhibit toxicity was considered as less than 0.7 ng/g of body weight.

16. In determination of immune-enhancing effects of lectin (0.7 ng/g of body weight) on inactivated vaccines of ADV in post-weanling piglets, only population of B lymphocytes (sIgM+) increased among immunocompetent cells such as MHC class II, CD2+, CD4+, CD8+, B lymphocytes (sIgM+), NK cells and granulocytes, which meant no cellular immune response was activated. In serum neutralizing antibody titers (SN titers) by lectin (0.7 ng/g of body weight)-adjuvanted

vaccine, the SN titer at 4 weeks after vaccination was $\log_2 3.0$ as shown by vaccine without adjuvant. However, the piglets with such a low SN titer could withstand challenge by NYJ87-1 strain, a virulent ADV, while some of piglets showed slight diarrhea and fever for 1-2 days. The SN titers reached to level of $\log_2 5.0$ as in the vaccine without adjuvant at 5 weeks after vaccination. It is, therefore, concluded that lectin has marked toxicity and can not enhance the immunogenicity of inactivated ADV vaccine by low dose (0.7 ng/g of body weight) which exhibit no toxicity.

17. To produce HN gene protein of NDV, a recombinant DNA clone named pFBHN was constructed between HN gene (1.7 kb) and pFastBacHTa plasmid, a baculovirus expression vector (4.9 kb). The pFBHN DNA was transformed into competent DH10Bac cells, and HN DNA-recombinant bacmid was established by transferring the HN DNA to bacmid (baculovirus DNA) which was harbored in the DH10Bac. The HN DNA-recombinant bacmid was extracted and then infected into *Sf* cells using lipofectin. The protein expressed from HN DNA of the bacmid was determined by occlusion-negative morphology of the infected *Sf* cells and fluorescent antibody assay using NDV antiserum. The HN protein was extracted and used for the production of vaccine. Lectin-adjuvanted vaccines of HN protein were made in two formulas such as 200 ng of lectin plus 200 ng or 300 ng of HN protein per 0.5 ml injection dose. To compare the immune response, Al(OH)₃-adjuvanted HN protein vaccines was also produced with 200 ng of HN protein and Al(OH)₃ in 34% of the total volume. The vaccines were injected into 1-week old, SPF chicks, and the chicks were tested for titers and duration of HI antibody and immune response to challenge for six weeks.

18. In comparison on immune-enhancing effects of lectin and Al(OH)_3 on HN protein vaccines, HI antibody titers by lectin-adjuvanted and Al(OH)_3 -adjuvanted vaccines at 1 week after vaccination were almost equal as $\log_2 2.4$ and $\log_2 2.6$, respectively. At 4 weeks after vaccination, antibody of $\log_2 4.0$ was produced by lectin-adjuvanted vaccine, which was $\log_2 1.0$ lower than the titer of Al(OH)_3 -adjuvanted vaccine. After challenge by Kyojeongwon strain, a very virulent NDV, there were no cases of clinically ill and death in both groups of the chicks. At 1 week after the challenge, HI titers of lectin-adjuvanted and Al(OH)_3 -adjuvanted vaccines reached to $\log_2 6.2$ and $\log_2 7.4$, respectively, and the titers further reached to $\log_2 7.0$ and $\log_2 7.6$, respectively, at 6 weeks after vaccination. On the other hand, HN protein (200 ng) without adjuvant induced HI titers of $\log_2 1.6$, $\log_2 2.0$, $\log_2 2.8$ and $\log_2 3.0$ at post weeks 1, 2, 3 and 4, respectively, from which $\log_2 1.0$ difference was found when compared to the titers by lectin-adjuvanted HN protein at same time course. Moreover, some of the chicks immunized only with HN protein showed signs of depression and mild dyspnea for 2-3 days after challenge. It was, therefore, clearly recognized that the lectin enhanced immunogenicity of HN protein, which enabled chicks resistant to the challenge of virulent virus.

CONTENTS

| | |
|---|-----------|
| Chapter 1 : Summary of Project | 39 |
| 1. Purpose..... | 39 |
| 1) Yearly planning : aims and research contents..... | 39 |
| 2) Necessity of the project..... | 42 |
| Chapter 2 : State-of the-art researches..... | 47 |
| 1. State and problems associated related techniques..... | 47 |
| Chapter 3 : Research Contents & Results..... | 50 |
| 1. 1 st project : | 50 |
| 1) Aim, content and criteria of researches..... | 50 |
| 2) Methods..... | 51 |
| 3) Results..... | 65 |
| ○ 1 st year results..... | 65 |
| (1) Preparation of KM-110(crude extract) from Korean mistletoe containing seed | 65 |
| (2) Isolation and characterization of lectins from KM-110..... | 66 |

| | |
|---|-----------|
| (3) Production and chacterization of monoclonal and polyclonal antibodies specific to lectin(KML-IIU) purified from KM-110..... | 72 |
| (4) Fractination and production of antibody to toxin in KM-110..... | 74 |
| (5) Fractination of other components in addition to lectins and toxin : Heparin Binding proteins(HBP)..... | 75 |
| ○ 2nd year results..... | 78 |
| (1) Establishing assay methods for the leading compounds : ELISA for the measurement of KML-IIU..... | 78 |
| (2) Acute toxicity and general pharmacology of KML-C..... | 80 |
| (3) Toxicity of toxin fraction..... | 84 |
| (4) Acute toxicity of HBP..... | 85 |
| (5) Determination of optimal and effective dose..... | 85 |
| ○ 3rd year results..... | 86 |
| (1) Determination of lectin contents in a Korean mistletoe according to season and host trees..... | 86 |

| | |
|---|------------|
| (2) Formulation of adjuvants containing KM-110 and KML-C with well-known other adjuvants to develop new adjuvants..... | 87 |
| (3) Application of mistletoe products-based adjuvants to the practical vaccines which have been using clinically..... | 92 |
| (4) Safety test of KM-110 and KML-C..... | 95 |
| (5) Establishing assay methods to control toxins present in mistletoe preparations | 105 |
| 2. 2nd project..... | 106 |
| 1) Aim, contents and criteria of researches..... | 106 |
| 2) Methods..... | 107 |
| 3) Results..... | 116 |
| ○ 1st year results..... | 116 |
| (1) Investigating the immunological activities on immune cells..... | 116 |
| (2) Induction of cytokines from macrophase by lectins, vixcotoxin and HBP..... | 116 |
| (3) Effect of non-specific resistance in experimental animal..... | 120 |
| (4) In-vitro cytotoxicities of various preparations from seeds, leaves and stems of Korean mistletoe, and in-vivo toxicities of KM-110, KML-C and toxin fraction..... | 121 |

| | |
|--|------------|
| (5) Immunoadjuvant activities..... | 123 |
| - Synergistic effect of KM-110 on other adjuvants in the production of antibody | 123 |
| - Figures and tables..... | 124 |
| | |
| ○ 2nd year results..... | 127 |
| | |
| (1) Humoral immuno-activity of KM-110 and KML-C..... | 127 |
| - Comparision of adjuvant activity with other well-known adjuvants..... | 127 |
| - Formulation of new adjuvants containing of KM-110 and KML-C..... | 130 |
| - Induction of cytokines and determination of sub-isotypes of antibodies..... | 131 |
| - Effect of KML-C on the change of lymphocyte population and surface markers in spleen cells..... | 134 |
| - Humoral immuno-activity of HBP..... | 135 |
| | |
| (2) Cellular immuno-activity of KML-C..... | 135 |
| - DHT reaction..... | 136 |
| - Synergistic effect on the mitogens in mitogenicity..... | 137 |
| - Effect of KML-C on the antigen-specific proliferation of spleen cells..... | 139 |
| | |
| ○ 3rd year results..... | 139 |
| | |
| (1) Acute and subacute toxicity in oral administration of KM-110 and KML-C | 140 |
| (2) Mucosal adjuvant activity of KM-110 and KML-C for oral vaccine..... | 143 |

| | |
|--|------------|
| 3. Joint preject..... | 148 |
| 1) Aim, content and criteria of researches..... | 148 |
| 2) Methods..... | 149 |
| 3) Results..... | 160 |
| ○ 1st year results..... | 160 |
| (1) Toxicity of lectin in chickens..... | 160 |
| - Changes in blood counts and chemistry after injection of lectin..... | 160 |
| - Histopathological findings after injection of lectin..... | 168 |
| (2) Enhancement of lectin on immunogenicity of Newcastle disease virus vaccines..... | 171 |
| - Enhancement of lectin on immunogenicity of Newcastle disease virus vaccines..... | 171 |
| - Comparison of antibody titers between lectin-adjuvanted and Al(OH) ₃ -adjuvaanted vaccines..... | 176 |
| - Reactivity of antibodies induced by lectin-adjuvanted vaccines against antigen of Newcastle disease virus..... | 178 |
| (3) Enhancement of lectin on immunogenicity of infectious bronchitis virus vaccines.... | 180 |
| - Enhancement of lectin on immunogenicity of infectious bronchitis virus vaccines..... | 180 |
| - Comparison of antibody titers between lectin-adjuvanted and Al(OH) ₃ -adjuvaanted vaccines..... | 182 |
| (4) Conclusions..... | 185 |

| | |
|--|-----|
| ○ 2 nd year results..... | 188 |
| (1) General toxicity of lectin in pigs..... | 188 |
| - Clinical and pathological findings..... | 188 |
| - Distribution rate of immunocompetent cells for cellular immunity..... | 192 |
| - Proper dose of lectin enhancing immunogenicity of inactivated vaccines..... | 195 |
| (2) Enhancement of lectin on immunogenicity of Aujeszky' disease virus vaccines..... | 202 |
| - Cellular immune response..... | 203 |
| - Induction and titers of antibody..... | 207 |
| (3) Conclusions..... | 210 |
| ○ 3 rd year results..... | 212 |
| (1) Construction of HN DNA clone of Newcastle disease virus..... | 212 |
| (2) Propagation of HN DNA-recombinant clone pFBHN..... | 213 |
| (3) Extraction of HN protein..... | 217 |
| (4) Enhancement of immunogenicity of HN protein vaccine by lectin..... | 218 |
| (5) Reactivity of antibody against Newcastle disease virus antigen..... | 222 |

| | |
|----------------------|-----|
| (6) Conclusions..... | 223 |
|----------------------|-----|

Chapter 4 : Rating of achievement and contribution to the related fields.....225

| | |
|---|-----|
| 1. Achievement based on the original aims of research and points of evaluation | 225 |
| 2. Contribution to the related fields..... | 228 |

**Chapter 5 : What to do with results obtained through carrying out the project : planning of application for the industrilization
.....230**

| | |
|---|-----|
| 1. Necessity of further study..... | 230 |
| 2. Application to the other fields..... | 230 |
| 3. Direction of industrilization..... | 231 |

Chapter 6 : Technical information corrected from abroad during carrying out the project.....232

| | |
|--|-----|
| 1. Information about the mass production of lectin by recombinant DNA technology..... | 232 |
| 2. Mucosal adjuvant effect of mistletoe lectin..... | 232 |
| 3. General information about adjuvant..... | 233 |

Chapter 7 : Referances.....236

목 차

| | |
|-------------------------------|----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요..... | 39 |
| 제 1 절 연구목적..... | 39 |
| 1. 연차별 연구개발 목표와 내용..... | 39 |
| 가. 1차년도..... | 39 |
| 나. 2차년도..... | 40 |
| 다. 3차년도..... | 41 |
| 2. 연구개발의 필요성..... | 42 |
| 가. 기술적 측면..... | 42 |
| 나. 경제,산업적 측면..... | 43 |
| 다. 사회,문화적 측면..... | 45 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황..... | 47 |
| 제 1 절 국내,외 관련기술의 현황과 문제점..... | 47 |
| 1. 국내의 기술동향 및 수준..... | 47 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 2. 국외의 기술 개발현황..... | 47 |
| 가. 겨우살이 관련 기술 개발..... | 47 |
| 나. Adjuvant 관련 기술 개발..... | 47 |
| 3. 문제점..... | 48 |
| 4. 앞으로 전망..... | 48 |
| 5. 기술도입의 타당성..... | 49 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과..... | 50 |
| 제 1 절 제 1 세부과제..... | 50 |
| 1. 세부과제 목표 및 내용..... | 50 |
| 2. 연구개발 방법..... | 51 |
| ○ 1차년도..... | 51 |
| 가. 목표..... | 51 |
| 나. 면역증강제 조성물의 제조와 특성조사..... | 51 |
| 다. 조성물의 표준화 및 정량을 위한 기초연구..... | 55 |

| | |
|---|-----------|
| ○ 2차년도..... | 58 |
| 가. 목표..... | 58 |
| 나. 지표물질의 표준화 및 정량법 개발..... | 58 |
| 다. 예비독성 및 일반 약리 실험..... | 61 |
| | |
| ○ 3차년도..... | 63 |
| 가. 목표..... | 63 |
| 나. 시료의 표준화를 위한 test..... | 63 |
| 다. KM-110과 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant의 개발 및 활성조사..... | 63 |
| 라. 임상적 의미를 갖는 항원들에 대한 특이적 면역증강능 조사..... | 64 |
| 마. 시료의 안정성 시험..... | 64 |
| 바. 겨우살이내 toxin 분획에 대한 정량조건 확립..... | 65 |
| | |
| 3. 연구개발 내용 및 결과..... | 65 |
| | |
| ○ 1차년도..... | 65 |
| 가. 겨우살이 조 추출물 (crude extracts;KM-110)의 준비 및 열매의 함량결정..... | 65 |
| 나. 렉틴의 분리, 특성조사 및 항체의 생산..... | 66 |
| 다. Toxin분획의 분리와 항체의 생산..... | 74 |
| 라. 기타활성분획의 분리 및 항체의 생산..... | 75 |
| | |
| ○ 2차년도..... | 78 |
| 가. 지표물질의 정량법 확립..... | 78 |
| 나. KML-C의 mouse에서의 급성 독성시험 및 일반 약리시험..... | 80 |
| 다. Toxin분획에 대한 독성 시험..... | 84 |
| 라. Heparin binding 분획에 대한 급성독성시험..... | 85 |

| | |
|---|------------|
| 다. 제품의 표준화를 위한 유효용량 고찰..... | 85 |
| ○ 3차년도..... | 86 |
| 가. 시료의 표준화를 위한 test..... | 86 |
| 나. KM-110과 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant의 개발 및 활성조사..... | 87 |
| 다. 임상적 의미를 갖는 항원들에 대한 특이적 면역증강능 조사..... | 92 |
| 라. 시료의 안전성 시험..... | 95 |
| 마. 겨우살이내 toxin분획에 대한 정량조건 확립..... | 105 |
| | |
| 제 2 절 제 2 세부과제..... | 106 |
| | |
| 1. 세부과제 목표 및 내용..... | 106 |
| | |
| 2. 연구개발 방법..... | 107 |
| | |
| ○ 1차년도..... | 107 |
| 가. 목표..... | 107 |
| 나. <i>In vitro</i> 에서 면역담당세포에 미치는 활성 조사..... | 107 |
| 다. Macrophage로부터 cytokine의 유도분비 조사..... | 108 |
| 라. 실험동물의 항원 비특이적인 방어효과..... | 108 |
| | |
| ○ 2차년도..... | 109 |
| 가. 목표..... | 109 |
| 나. 체액성 면역 증강효과..... | 109 |
| 다. 세포성 면역기능 조사..... | 111 |
| 라. 항원 특이적인 겨우살이 추출물의 방어력 증진효과 조사..... | 112 |

| | |
|---|------------|
| 마. 기존 adjuvant와의 면역증강 활성의 비교..... | 112 |
| ○ 3차년도..... | 113 |
| 가. 목표..... | 113 |
| 나. KM-110과 KML-C의 경구 급성 및 아급성 독성조사..... | 113 |
| 다. KM-110의 경구용 백신을 위한 adjuvant로서의 가능성조사..... | 113 |
| 라. KML-C의 경구용 백신을 위한 adjuvant로서의 가능성 조사..... | 115 |
| 3. 연구개발 내용 및 결과..... | 116 |
| ○ 1차년도..... | 116 |
| 가. In vitro에서 면역 담당 세포에 미치는 활성의 조사..... | 116 |
| 나. Macrophage로부터 cytokines의 유도분비 조사..... | 116 |
| 다. 실험동물의 항원 비특이적인 방어효과..... | 120 |
| 라. 추출물 및 신규물질 중 활성분획의 탐색..... | 121 |
| 마. 추출물의 면역증강 효과..... | 123 |
| ○ 2차년도..... | 127 |
| 가. 겨우살이 추출물 (KM-110)과 그 활성분획 (KML-C)의 체액성 면역증강효과 | 127 |
| 나. KML-C의 세포성 면역증강효과..... | 135 |
| ○ 3차년도..... | 139 |
| 가. KM-110과 KML-C의 경구급성 및 아급성 독성조사..... | 140 |
| 나. KM-110 및 KML-C의 경구용 백신을 위한 adjuvant로서의 가능성 조사..... | 143 |

| | |
|---|-----|
| 제 3 절 협동과제..... | 148 |
| 1. 세부과제 목표 및 내용..... | 148 |
| 2. 연구개발 방법..... | 149 |
| ○ 1차년도..... | 149 |
| 가. 목표..... | 149 |
| 나. 겨우살이 추출물의 닭에 대한 일반독성 확인..... | 149 |
| 다. 겨우살이 추출물에 의한 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강 효과..... | 150 |
| 라. 겨우살이 추출물에 의한 전염성 기관지염 예방백신의 특이면역 증강효과..... | 152 |
| ○ 2차년도..... | 154 |
| 가. 목표..... | 154 |
| 나. 겨우살이 추출물의 돼지에 대한 일반독성 확인..... | 154 |
| 다. 겨우살이 추출물에 의한 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강 효과..... | 155 |
| ○ 3차년도..... | 158 |
| 가. 목표..... | 158 |
| 나. 뉴캐슬병 바이러스 HN유전자 재 조합 DNA clone의 작성..... | 158 |
| 다. 뉴캐슬병 바이러스 HN유전자 재조합 DNA clone 배양..... | 158 |
| 라. 발현단백질의 적혈구 응집 역가 검정..... | 158 |
| 마. HN유전자 발현단백질과 lectin의 혼합백신생산..... | 159 |
| 바. 병아리 면역..... | 159 |
| 사. 항체의 형성 수준 및 지속시간 조사..... | 159 |
| 아. 강병원성 바이러스 공격에 대한 방어능력..... | 159 |

| | |
|--|------------|
| 자. 항체 검사..... | 159 |
| 차. 중화항체의 정상 검사..... | 160 |
| 카. SDS-PAGE 및 western blotting..... | 160 |
| 3. 연구개발 내용 및 결과..... | 160 |
| ○ 1차년도..... | 160 |
| 가. 겨우살이 추출물의 닭에 대한 일반독성..... | 160 |
| 나. 겨우살이 추출물에 의한 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강효과..... | 171 |
| 다. 겨우살이 추출물에 의한 전염성 기관지염 예방백신의 특이면역 증강 효과..... | 180 |
| 라. 결론..... | 185 |
| ○ 2차년도..... | 188 |
| 가. 겨우살이 추출물의 돼지에 대한 일반독성..... | 188 |
| 나. 겨우살이 추출물에 의한 오제스키병 예방 백신의 특이면역 증강 효과..... | 202 |
| 다. 결론..... | 210 |
| ○ 3차년도..... | 212 |
| 가. 뉴캐슬병 바이러스 HN 유전자 재조합 DNA clone의 작성..... | 212 |
| 나. HN 유전자 재조합 pBFHN clone의 배양..... | 213 |
| 다. HN 유전자 발현 단백질의 추출 정제..... | 217 |
| 라. Lectin 혼합 HN단백질 백신의 특이면역 증강효과..... | 218 |
| 마. Lectin혼합 백신에 의하여 형성된 항체의 항원과의 반응성..... | 222 |
| 바. 결론..... | 223 |

| | | |
|-------|------------------------------------|-----|
| 제 4 장 | 목표달성도 및 관련분야에의 기여도..... | 225 |
| 제 1 절 | 연도별 연구 목표 및 달성도..... | 225 |
| 1. | 1차년도..... | 225 |
| 2. | 2차년도..... | 226 |
| 3. | 3차년도..... | 227 |
| 제 2 절 | 관련분야 기술 발전에의 기여도..... | 228 |
| 1. | 겨우살이에 관한 기초 연구분야..... | 228 |
| 2. | 기술에의 기여도..... | 229 |
| 제 5 장 | 연구개발결과의 활용계획..... | 230 |
| 제 1 절 | 추가연구의 필요성..... | 230 |
| 제 2 절 | 타 연구에의 응용..... | 230 |
| 제 3 절 | 기업화 추진 방향..... | 231 |
| 제 6 장 | 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보..... | 232 |
| 제 1 절 | 겨우살이 주성분 lectin의 대량생산에 관한 정보..... | 232 |
| 제 2 절 | 겨우살이 lectin의 점막면역 자극효과에 관한 정보..... | 232 |

제 3 절 Adjuvant에 관한 정보.....233

제 7 장 참고문헌.....236

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 목적

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

가. 1차년도

| 구 분 | 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 |
|--|--|---|
| 1 차 년 도 (과 제 1 9 9 협 동 과 제 | <ul style="list-style-type: none"> 면역 증강제 조성물의 제조와 특성의 조사 조성물 표준화 및 정량을 위한 기초 연구 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 겨우살이 추출물의 제조 2. Lectin 분획의 분리 및 대량생산 3. Toxin 분획의 분리 4. 기타 활성분획의 분리 5. 열매분획의 함량 결정 <ol style="list-style-type: none"> 1. lectin에 대한 mAb의 생산 2. Toxin에 대한 poly 항체 생산 3. 기타 활성분획에 대한 poly 항체의 생산 |
| | <ul style="list-style-type: none"> 추출물 및 구성 신규물질의 면역자극 활성 조사 | <ol style="list-style-type: none"> 1. In vitro에서 면역담당세포에 미치는 활성 <ol style="list-style-type: none"> 1) 정상세포에 미치는 활성 2) mitogen에 대한 반응성 조사 2. Macrophage 활성화 조사 ; cytokine의 유도능 측정 3. 항원 비특이적 방어효과 조사 |
| | <ul style="list-style-type: none"> 겨우살이 추출물에 의한 닭 전염병 예방백신의 특이면역 증강 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 닭에 대한 lectin의 일반독성 분석 2. 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강 효과 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 뉴캐슬병 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 강독주 공격에 대한 방어능력 3. 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강 효과조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 전염성기관지염 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 강독주 공격에 대한 방어능력 |

나. 2차년도

| 구 분 | 연구 개발 목표 | 연구 개발 내용 및 범위 | |
|-------|-----------|--|--|
| 2차년도 | 제 1 세부 과제 | <ul style="list-style-type: none"> • 지표물질 분석법 및 표준화 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 지표물질의 정량법 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) Lectin assay를 위한 sandwich ELISA 2) Toxin assay를 위한 competition ELISA 3) 기타 활성분획을 위한 면역분석법 2. Adjuvant의 표준화 <ol style="list-style-type: none"> 1) Lectin의 함량 결정 2) 기타 활성분획의 함량 결정 3) Toxin의 허용량 조사 |
| | 제 2 세부 과제 | <ul style="list-style-type: none"> • 안전성 실험 - 일반약리 실험 - 예비독성 실험 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 급성독성 2. 일반행동에 대한 영향 3. 중추신경계에 미치는 영향 4. 소화기계에 대한 영향 |
| 2000년 | 제 2 세부 과제 | <ul style="list-style-type: none"> • 면역증강 활성의 조사 1) Lectin에 의한 활성 조사 2) 표준화된 시료에 의한 활성 조사 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 체액성 면역기능 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 항원의 면역과 혈청의 수집 2) 항체의 역가 및 subisotype결정 3) Lymphocyte 자극 실험 4) Cytokine의 유도분비 조사 2. 세포성 면역기능 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 지연성과민반응의 측정 2) 세포독성 T-세포의 활성 측정 3. 항원 특이적인 방어효과 조사 |
| | 협동 과제 | <ul style="list-style-type: none"> • 겨우살이 추출물에 의한 돼지 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 돼지에 대한 lectin의 일반독성 분석 2. 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강 효과 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 오제스키병 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 자돈 면역시의 항체 형성상태 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 자돈 면역시의 세포성 면역 상태 조사 6) 강병원성주 공격에 대한 방어능력 |

다. 3차년도

| 구분 | 연구개발목표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|-------|---|--|
| 3차년도 | 제1세부과제 ·혼합 면역증강제 개발 및 채취시기,숙주별 활성물질 함량조사 | 1. 시료의 표준화를 위한 test 1) 채취시기별 활성물질(KML-C)의 함량조사 2) 숙주별 활성물질(KML-C)의 함량 조사 2. KM-110과 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant의 개발 및 활성조사 1) Alum에 혼합한 형태로서의 체액성 면역증강 활성조사 2) Oil (squalene)에 혼합된 형태로서의 체액성 면역증강 활성조사 3. 임상적 의미를 갖는 항원들에 대한 특이적 면역증강능 조사 1) Diphtheria toxin에 대한 항체역가 조사 2) Influenza hemagglutinin에 대한 항체역가 조사 3) Hepatitis 항원에 대한 항체역가 조사 4. 시료의 안전성 시험 약효를 나타낸 농도에서 실질장기 조직검사 5. 겨우살이내 toxin 분획에 대한 정량조건 확립 HPLC를 이용한 정량조건확립 |
| 2001년 | 제2세부과제 · 경구 투여용 vaccine adjuvant 의 가능성조사 | 1. KM-110과 KML-C의 경구 독성 조사 1) KM-110의 mice에서의 급성 및 아급성독성 2) KML-C의 mice에서의 급성 및 아급성독성 2. KM-110의 경구백신용 adjuvant로서의 가능성조사 1) Serum과 장내의 항원특이항체역가 증강 효과 조사 2) 항원 특이항체의 isotype 조사 3) 항원 특이항체의 subclass 조사 4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine 유도능 조사 3. KML-C의 경구백신을 위한 adjuvant로서의 가능성조사 1) Serum 과 장내의 항원특이항체역가 증강효과 조사 2) 항원 특이항체의 isotype 조사 3) 항원 특이항체의 subclass 조사 4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine유도능 조사 |
| 협동과제 | ·겨우살이추출물에 의한 닭 뉴캐슬병 바이러스 유전자 발현 단백질백신의 특이면역증강 효과 조사 | 1. HN 유전자 발현단백질 백신의 특이면역 증강 효과 조사 1) HN 유전자 재조합 DNA clone 배양 2) HN 유전자 발현단백질 획득 3) Lectin 혼합 발현단백질 백신 생산 4) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 5) 항체의 바이러스 중화능력 조사 6) 강독주 공격에 대한 방어능력 조사 |

2. 연구개발의 필요성

단기간 내에 국제 경쟁력이 있는 제품을 개발한다는 것은 매우 어렵다. 무한 국제 경쟁체제하에서 식량, 의료, 에너지, 환경문제등 여러 방면에 대하여 세계의 여러나라에서 집중적인 투자와 연구개발이 이루어지고 있다. 개발된 신기술에 대하여 지식 재산권을 확보하여 보호하려는 움직임이 강해지고 있는 현재, 우리나라 특이성을 가지면서 세계적으로 경쟁력 있는 제품을 개발한다는 것은 중요한 의의를 가진다고 하겠다. 특히, 유용물질이나 신기술의 배타적 권리를 엄격하게 보호하려는 방향으로 국제질서가 전개되고 있는 요즘 우리나라 특이성을 가지는 식물자원을 이용, 제품으로 발전시키는 것은 국가의 부 및 기술 축척의 차원에도 부합되리라 믿는다. 본 연구는 우리나라에서 널리 서식하는 겨우살이를 이용하여 동물용 백신의 면역증강을 위한 adjuvant로 개발하려는 목표로 실시예정이다. 겨우살이의 경우 이미 기초 연구가 풍부히 되어 있을 뿐 아니라 현재 유럽에서는 항암제용 제약을 비롯하여 건강보조식품 및 화장품에 이르기까지 다양하게 활용되고 있다. 여기에 한국산 겨우살이가 유럽산에 비교하여 활성 및 활성물질에 대한 차이가 있음이 보고되고 있으며 특히, 국내산의 경우 면역증강 활성에 대한 연구결과가 보고되기 시작하고 있다. 따라서 본 연구에서 추진하고자 하는 겨우살이를 이용한 동물 vaccine용 adjuvant로의 개발은 충분한 개발 가능성이 있는 시점에 있다. 특히 겨우살이로부터 vaccine용 adjuvant를 개발 및 응용함은 외국에서도 실시된 바 없는 새로운 시도이기에 개발에 성공할 경우 산업적인 파급효과가 지대할 것으로 확신한다.

가. 기술적 측면

- 현재 인간에 적용되는 vaccine용 adjuvant는 aluminium hydroxide나 aluminium phosphate와같은 'Alum'계통이 유일하다. 따라서 새로운 adjuvant 개발에 많은 연구를 투자하고 있으며, 임상면역학 분야의 최대 관심사 중 하나이다.
- 지금까지 개발된 것으로는 MDP, MDL, LPS, PT, Saponin, Quil A, QS21,

ISCOMS, Liposomes 등 다수가 있으나 문제점이 있어 아직 임상에 적용되지 못하고 있다.

○ 한편 수의학 분야에서는 가축의 각종 전염병 예방을 위하여 여러 가지의 생균 (생바이러스) 및 사균 (불활화 바이러스) 백신이 사용되고 있으나 효과면에서 장단점이 있다.

○ 즉, 생균 (생 바이러스) 백신은 면역원성은 인정되나 바이러스의 배설 및 발병의 위험이 내포되고 있어서 안전성에서의 문제가 있으며, 모체 이행항체를 가진 신생 가축에서는 백신 접종후의 면역반응이 방해를 받는다 (Guittet 등, 1993, Utterback와 Schwartz, 1973, Parede와 Young, 1990, Alexander, 1997.)

○ 또한 사균(불활화 바이러스) 백신은 안전성이 높고 모체 이행항체에 기인한 면역 반응 간섭현상은 없으나 면역원성이 낮아서 면역증강 효과가 우수한 adjuvant의 첨가가 필수적이며, 만족할 수준의 면역을 유도하기 위하여 수회의 추가접종을 필요로 하므로 노동력 수반이 큰 실정이다 (Alexander, 1997.)

○ 이와 같이 국내에서 동물백신의 면역효과 증강을 위한 adjuvant에 대한 개발연구가 미흡하여, 동물질병별 예방백신에 대한 특이면역을 유도할 수 있는 면역증강제 첨가된 백신의 개발이 절실히 요구되는 실정이다.

나. 경제·산업적 측면

○ WTO 체제하에서의 시장개방 압력에 대처할 수 있는 국제 경쟁력 있는 상품 개발에 있어서 가장 접근이 용이하고 가능성이 큰 것은 한국산 소재에 근거한 개발이다.

○ 생활수준이 향상됨에 따라 고기의 수요가 날로 증가하면서 가축의 소비가 증가함에 더불어 가축용 vaccine adjuvant 시장은 증가하고 있다.

예) 현재 국내 사육되는 가축의 수는 약 5,500만두 정도로서, 한 가지 vaccine을 2회 접종할 경우 겨우살이 추출액을 adjuvant로 사용할 때 1회에 10원의 이익이 있다고 가정하면 10억원 이상의 경제적 이익을 얻을 수 있다. 세계 시장을 감안할 경우

예상 이익은 가히 천문학적이다.

○ 대만에서 1997년도에 돼지의 구제역이 발생하였을 때 방역에 소모된 비용이 수조 원임을 감안할 때, 면역효과가 우수한 백신의 개발사용이 동물 전염병의 예방에 있어서 무엇보다도 선행되어야 할 것이다.

○ '99년도의 대일본 돈육 수출액을 1조 2,000억원으로 계획하고 있는 바, 돼지콜레라 발생으로 인한 수출 제한이 있게 되면 국내 양돈산업의 큰 위기가 예상되는 등, 각종 동물 전염병의 발생에 따른 피해는 막대하다.

○ 따라서 양축산업에 피해가 극심한 동물 전염병의 예방에 있어서 백신의 생산과 함께 면역증강 효과가 우수한 adjuvnat의 개발 및 보급이 병행되어야 함은 주지의 사실이다.

○ 현재 가축질병 예방 차원에서의 면역증강제의 경우 대부분 수입에 의존하고 있다.

수입판매하는 면역촉진제

| 제품명 | 제조사 | 성분 | 수입사 | 비고 |
|-----------|--------------|-------------------|-------|--------|
| Donon-L | KANDA(일본) | 불활화 Acrombacter | 한국동물 | 일반제품 |
| Duphamun | Duphar(네델란드) | 불활화 Orthopoxvirus | 불활화 | 일반제품 |
| B.S.K. | Atakast(독일) | Bacillus subtilis | 삼화동물 | 일반제품 |
| Ultracorn | Virbac(프랑스) | Corynebacterium | 조양축산 | 일반제품 |
| Gammasol | Apter(프랑스) | Saccaromyces 등 | 우양축산 | 일반제품 |
| Baypamun | Bayer(독일) | Parapox | 한국바이엘 | 생물학적제제 |

○ 이와 같이 Adjuvant 분야에서 아직 국내에서 개발되어 산업화된 예는 극히 드물다. 따라서 성공할 경우 그 파급효과는 매우 클 것이다.

○ 세계 시장이 개방된 경우 가장 취약한 부분의 하나가 축산 분야이며 따라서 이 분야에서의 국제경쟁력있는 산업도출 필요성은 절대적이다.

○ 폐사, 성장 지연, 사료 효율 감소 등을 야기하는 동물 질병의 지속적 발생과 이의 근절을 위한 근본 대책이 시급하다.

○ 국내 백신 생산 업체의 자생력 강화와 축산 농가의 생산성 향상을 위한 대책 마련의 시급한 상태에 있다.

다. 사회·문화적 측면

- 질병퇴치는 영원한 과제이다. 따라서 질병퇴치 관련 산업의 전망은 매우 밝다.
- 질병퇴치는 치료와 예방이 있지만 예방이 더욱 효과적이다. 예방으로서 가장 적극적인 방법이 백신의 접종인 만큼 백신관련 산업의 확대는 더욱 커질 것이다.
- 백신은 병원균 자체와 병원균에 대한 면역반응을 잘 일으키게 하는 adjuvant로 구성되어 있다. 병원균은 다양하지만 사용되는 adjuvant는 한가지로 사용될 수 있어 백신산업에서 adjuvant의 개발은 필수적이고 절대적이다.
- 민간에서 활성이 있다고 믿는 물질들에 대한 연구가 지속적으로 수행될 경우, 한국적 특이성을 가지면서 세계적으로 가치있는 다른 신물질이 개발될 가능성을 제시할 것이다.

본 연구소에서는 현재까지 한국산 겨우살이 추출물의 추출방법, 항암성 및 면역자극 효과에 대하여 연구를 수행하여 왔다. 현재까지의 연구결과 면역계를 자극 활성화시키는 기능이 확인된 바 동물백신에 대한 adjuvant로서의 개발가능성이 강력히 시사되었다. 그리고 지표물질의 선정을 위하여 겨우살이 추출물로부터 활성물질인 lectin 성분의 분리 및 그에 대한 단일크론 항체를 생산하여 면역학적 활성을 나타내는 겨우살이 추출물의 지표물질 정량을 위한 면역분석법의 확립도 가능한 상태에 있다. 이러한 사실을 바탕으로 하였다.

본 연구에서는 그간 연구 개발된 기술을 기반으로 하되 산업화를 위한 기술을 중점적으로 개발,보완하는 것에 초점을 맞추어 다음과 같은 기술들을 개발토록 한다.

1) 우수한 활성을 갖추면서 안전성이 있는 추출방법 확립을 위하여

가) 주 활성 성분인 lectin의 분리법 확립

나) Lectin 외의 활성성분 분리법 확립

다) 독성성분 제거법 확립

라) 새로운 adjuvant 조성물 확립과 이의 활성 조사를 위한 검색법 확립

마) 여러 숙주나무의 면역증강 활성의 조사,

바) 최종 제품의 Q.C를 위한 지표물질의 정량법(예, ELISA)을 확립한다.

2) 표준화된 면역증강제를 산업화 하기 위하여

가) 실험용 항체생산을 위한 adjuvant의 개발

나) 동물 vaccine용 adjuvant로서 한국산 겨우살이 추출물의 이용 가능성을 확립하고자 여러가지 항원에 대하여,

(1) 실험 및 목표 동물에 대한 체액성 면역증강 활성 조사

(2) 실험동물에서 세포성 면역증강 활성의 조사

(3) 실험 및 목적동물에서의 안전성 조사

3) 본 제제의 응용 차원에서

가) 경구용 adjuvant로서의 활용을 위한 기반 확립

나) 타 면역증강제와 겨우살이의 혼합된 새로운 adjuvant의 개발 가능성

다) 기능성 식품 내지 건강보조 약품으로서의 개발 가능성

라) 이후 인체용 개발을 위한 자료로 최대한 활용한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내의 기술동향 및 수준

백신 개발을 위한 연구소와 회사(예, 녹십자, 동신제약등)는 다수 있지만 adjuvant 개발에 관련하고 있는 회사는 거의 전무한 실정이다. 관련 논문도 본 연구진에 의해 발표된 것 외에는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 과제가 성공적으로 수행될 경우 국내 백신 산업에 일대 혁신을 기할 수 있어 국제 경쟁력을 확보할 수 있는 계기를 마련할 수 있다.

2. 국외의 기술 개발현황

가. 겨우살이 관련 기술 개발

유럽에서는 1920년대부터 항암 및 고혈압 치료제로서 민간에서 널리 사용되어 왔고 최근에는 항암 주사제로서 그리고 기능성 식품으로 개발되어 널리 사용되고 있으며 많은 기초 연구가 확립되어 있다. 그러나 adjuvant로서의 활성화에 관한 연구나 활용에 대해서는 거의 없다.

나. Adjuvant 관련 기술 개발

- o 최근 유전자재조합기술에 의해 생산된 제3세대의 백신인 소위 “subunit vaccine”은 안전성은 높지만 면역원성이 낮아 강력한 adjuvant의 사용이 필수적이다. 미국의 Chiron사에서 최근 개발한 MF-59이 좋은 예이나 아직 임상에 사용되고 있지는 않다.
- o 보다 광범위한 면역증강 효과를 갖는 제품 개발 : 기존의 제품은 주로 체액성 면역증강 효과만 가는 단점이 있다. 따라서 최근에는 세포성 면역효과도 갖는 제품 개발에 많은 연구를 하고 있다.

o 부작용이 적은 면역증강제 개발 : 기존의 대표적인 제품인 alum은 부작용이 있어 가장 많이 사용되는 어린이들에게는 부적합하다. 따라서 부작용이 적은 제품 개발에 많은 역점을 두고 연구를 하고 있다.

o 경구용(oral) 백신을 위한 adjuvant 개발 : 현재 사용되고 있는 백신의 대부분은 주사제이다. 만약 경구용 백신이 개발된다면 백신시장의 판도를 바꿀 수 있는 획기적 전환점을 마련할 수 있다. 투약의 간편성은 물론 부작용을 줄일 수 있기 때문이다. 경구용 백신 개발을 위한 선결과제의 하나는 바로 장면역 또는 점막면역 세포를 자극할 수 있는 adjuvant의 개발이다. 현재는 cholera toxine(CT)이 사용되고 있지만 적용범위가 극히 제한적이다. 본과제의 제품은 이런 측면에서 큰 장점이 된다.

3. 문제점

겨우살이 성분을 이용한 adjuvant의 개발에 있어 야기될 수 있는 문제점은 : 추출물의 표준화, 유효성분의 확인과 분자특성규명, 추출물에 존재할 수 있는 독성물질의 제거등이 있을 수 있으나 이들의 문제점을 극복할 수 있는 방안이 확립되어 있어 기술적으로 큰 문제는 없을 것으로 예상됨.

4. 앞으로 전망

o 동물 전염병 예방백신의 면역증강 유도물질 개발로 동물의 질병 예방효과 및 국내 동물백신 산업의 일대 전환의 계기가 될 것으로 예상됨.

o 1-2 년 내에 최소한 국내에서는 산업화가 가능할 것으로 예상되며, 이를 토대로 외국 license까지 획득하면 수출까지 가능할 것으로 확신되며 이로 인한 경제적 이익은 막대할 것으로 전망된다.

o 돼지, 개 등의 비특이적 면역증강 유도에 의한 전염성질병 발생율을 경감시켜 가축의 생산성을 제고시킬 수 있을 것으로 기대됨.

o 면역학, 특히 vaccine 개발 관련 분야에 미칠 영향이 매우 크다.

○ 겨우살이가 갖는 생물학적 활성 기전이 상당히 밝혀지고 있어, 이를 model로 하여 adjuvant로서의 역할 기전을 규명할 수 있는 계기 마련이 가능하다. 따라서, 특히 면역학 관련 기초 연구 분야에도 많은 영향을 미칠 것으로 예상된다.

5.. 기술도입의 타당성

○ 연구의 재료인 겨우살이 및 활성물질인 lectin의 분리는 국내산을 사용하기에 물질의 확보 및 이용면에서는 원료 도입의 필요성이 없고, 본 연구실에서는 유럽산 lectin의 분리법과는 다른 immunoaffinity chromatography법을 사용하기에 면역증강 물질의 정제법 역시 외국에 비하여 우수한 기술을 확보한 상태로 생각된다.

○ 활성물질인 Lectin의 정량을 위한 면역분석 기술수준은 이와 관련되어 연구하는 외국의 타 연구실에 비하여 우수한 기술을 확보한 상태에 있다.

○ 활성 및 면역관련 기전에 관한 연구도 국내의 기술로 충분할 것으로 사료된다.

○ 따라서 외국으로부터 특별한 기술도입의 필요성은 없음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 제 1 세부과제

1. 세부과제 목표 및 내용 (책임자 : 김종배)

| 목표 | 내용 및 범위 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 면역 증강제 조성물의 제조와 특성의 조사 • 조성물 표준화 및 정량을 위한 기초 연구 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 겨우살이 추출물의 제조 2. Lectin 분획의 분리 및 대량생산 3. Toxin 분획의 분리 4. 기타 활성분획의 분리 5. 열매분획의 함량 결정 <ol style="list-style-type: none"> 1. lectin에 대한 mAb의 생산 2. Toxin에 대한 poly 항체 생산 3. 기타 활성분획에 대한 poly 항체의 생산 |
| <ul style="list-style-type: none"> • 지표물질 분석법 및 표준화 • 안전성 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 일반약리 실험 - 예비독성 실험 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 지표물질의 정량법 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1) Lectin assay를 위한 sandwich ELISA 2) Toxin assay를 위한 competition ELISA 3) 기타 활성분획을 위한 면역분석법 2. Adjuvant의 표준화 <ol style="list-style-type: none"> 1) Lectin의 함량 결정 2) 기타 활성분획의 함량 결정 3) Toxin의 허용량 조사 1. 급성독성 2. 일반행동에 대한 영향 3. 중추신경계에 미치는 영향 4. 소화기계에 대한 영향 |
| <ul style="list-style-type: none"> • 혼합 면역증강제 개발 및 채취시기, 숙주별 활성물질 함량조사 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 시료의 표준화를 위한 test <ol style="list-style-type: none"> 1) 채취시기별 활성물질(KML-C)의 함량조사 2) 숙주별 활성물질(KML-C)의 함량 조사 2. KM-110과 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant의 개발 및 활성조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) Alum에 혼합한 형태로서의 체액성 면역증강 활성조사 2) Oil (squalene)에 혼합된 형태로서의 체액성 면역증강능 조사 3. 임상적 의미를 갖는 항원들에 대한 특이적 면역증강능 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) Diphtheria toxin에 대한 항체역가 증강효과 2) Influenza hemagglutinin에 대한 항체역가 증강효과 3) Hepatitis 항원에 대한 항체역가 증강효과 4. 시료의 안전성 시험 <ul style="list-style-type: none"> 약효를 나타낸 농도에서 실질장기에 대한 조직검사 5. 겨우살이내 toxin 분획에 대한 정량조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> HPLC를 이용한 정량조건확립 |

2. 연구개발 방법

o 1차년도 (1999)

가. 목표 ; 면역증강제 조성물의 제조와 특성 조사 및 조성물의 표준화 및 정량을 위한 기초연구

나. 면역증강제 조성물의 제조와 특성 조사

1) 겨우살이 추출물의 제조

본 실험에 사용한 겨우살이는 강원도 지방에서 참나무등 여러 숙주나무에 기생하여 자라는 겨우살이로서 1월에 채취한 것을 사용한다. 실험에 사용될 겨우살이는 1년 및 2년생으로서 PBS내에서 추출하고 10 mg/ml의 농도로 조정하여 stock solution으로 만든 후, -20℃에 저장하면서 실험에 사용한다.

2) Lectin 분획의 분리

가) Hydrolyzed Sepharose-4B column의 준비 및 lectin의 분리

겨우살이 단백질 분획으로부터 lectin성분의 분리는 유럽산 겨우살이로부터 lectin을 분리한 hydrolyzed sepharose-4B column chromatography 방법을 수정하여 실시한다. 평형 buffer는 PBS를, 용출 buffer는 lactose가 포함된 PBS를 사용한다. 용출분획은 적혈구 응집반응(hemagglutinating activity)을 실시하여 lectin 활성을 나타내는 fractions을 수집한다.

나) Immunoaffinity column에 의한 lectin의 대량 생산

Lectin에 대한 단일클론 항체를 이용하여 겨우살이의 단백질 분획에서 순수한 lectin 성분을 분리한다. Lectin 분획에 특이적으로 반응하는 항체를 선발하고 그 항체를 고정시킨 immunoaffinity column을 제조한다. 정제된 lectin 성분을 분리하기 위하여 겨우살이의 단백질분획을 column에 적용시킨다. Equalibrium buffer는 pH 7.4의 PBS를 elution buffer는 pH 2.7의 glycine-HCl buffer를 사용하며 280nm에서 OD값을 측정하여 용출 물질을 분리한다. 용출물질의 순도 및 분자량 결정은 전기영동과 isoelectric focusing(IEF)으로 조사한다.

다) Hemagglutination and inhibition assay

Hydrolyzed Sepharose 4B column에 의하여 분리되는 분획의 lectin 활성 확인은 적혈구(erythrocytes) 응집반응으로 실시한다. 분리된 분획을 원액부터 2배씩 희석하여 96 well round bottomed plate에 분주 한 후, 혈액으로부터 분리한 적혈구를 1×10^8 /ml의 농도가 되도록 PBS에 현탁시켜 각 well에 50 μ l씩 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양 후, 적혈구 응집반응이 일어났는지를 조사한다. 분리된 lectin의 당특이성을 조사하기 위하여 lectin 활성을 나타내는 분획을 여러가지 monosaccharide를 이용 hemagglutinating inhibition assay로서 조사한다.

라) Polyacrylamide Gel 전기영동

분리된 단백질성분의 전기영동은 일반적으로 사용하는 Laemmli법에 의한 SDS가 함유된 polyacrylamide gel을 사용하며, 전기영동용 sample buffer와 동량의 단백질 용액을 혼합하여 끓인 후, gel에 loading하고 150V의 일정한 전압하에서 1시간 동안 전개시킨다. 전개 종료 후 coomassie blue로 염색하고 표준 단백질 시료와 표준 단백질 시료와 비교하여 분자량과 단백질을 구성하는 subunit를 확인한다.

마) Amino acid sequence의 조사

분리된 lectin 분획의 amino acid sequence를 조사하기 위하여 N-terminal amino acid sequencing을 실시한다. 환원 상태의 SDS-PAGE하에서 분리된 lectin 분획의 A 및 B chain을 85 mA의 조건으로 70분간 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 전사시킨다. 전사된 단백질 band를 110°C에서 24시간 동안 6 M HCl로 가수분해한 후, Effendorf/Biotronic LC 3000 amino acid analyzer에 적용시켜 lectin 분획 각 chain의 amino acid sequence를 조사한다.

3) Toxin분획의 분리

유럽의 겨우살이에서 분자량 5000 정도의 viscotoxin 물질의 독성 및 활성을 보고하고 있다. 한국산 겨우살이 추출물에서도 이와 유사하거나 혹은 동일한 물질의 존재가 예상되는 바, 저분자 물질에 대한 특성조사가 요구된다. 본 연구에서는 이 물질의 분리, 정제 후 adjuvant 활성과 관련된 실험을 실시함과 동시에 *in vivo*에서의 독성실험을 병행실시하여 제품으로 개발 시 포함시키느냐 제거시키느냐 하는 문제를 명확하게 제시할 필요가 있을 것으로 사료된다. 따라서 제품의 Q.C.를 위하여 이물질에 대한 특성 조사 및 정량법에 대한 실험을 실시한다.

가) CM spharose cation exchange chromatography

Toxin의 분리를 위해 사용한 겨우살이의 잎과 줄기부분을 4% 희석 아세트산 용액을 첨가하고 균질화한 후 10,000 rpm에서 30 분간 원심분리 (Beckman, U.S.A.) 하고 그 상층액을 모아 동결건조 한다. 건조된 겨우살이 추출물은 25 mM의 acetate buffer에 녹이고 molecular weight cutt-off 3,500의 dialysis tube에 넣어 동일한 buffer에 대하여 투석을 실시한 후, polyethylene glycol 22,000을 이용하여 약 5 mL까지 농축한다. 농축액은 10,000 rpm에서 30 분간 원심분리한 후, 25 mM acetate buffer로 평형화시킨 CM sepharose 양이온 교환수지 (Pharmacia, Sweden)가 충전된 column에 loading 하였으며, 양이온 교환수지에 흡착되지 않은 성분은 acetate

buffer로 충분히 세척하고, buffer내에 NaCl (0 ~ 0.4 M) 농도를 점차적으로 증가시켜 흡착된 성분을 용출한다. 각 분획은 spectrophotometer를 이용 215 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하며, 이 분획들을 종양세포에 대한 세포독성 검사를 실시, 이중 활성을 나타내는 분획(CM 분획)을 수집한다.

나) Gel chromatography

CM spharose cation exchange chromatography에 의하여 수집, 건조된 적갈색의 CM 분획은 다시 증류수에서 충분히 투석한 후 시료의 양을 2 mL까지 농축하여 Sephadex G-50이 충전된 column에 loading한다. 시료의 용출을 위한 buffer로 증류수를 사용하고, 분취되는 용량은 5 mL로 하며 각각의 분획별로 세포독성 검사를 한 후 활성을 나타내는 분획을 수집하여 본 실험의 공시료로 사용한다.

다) Polyacrylamide gel 전기영동

KMT-1의 분자량 측정을 위해서는 SDS (sodium dodecyl sulphate) 가 포함된 15% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동하고, 전개완료가 완료된 gel은 Coomassie blue로 염색함으로써 분리된 물질의 분자량 및 정제도를 확인한다.

4) 기타 활성분획의 조사

lectin 성분이 제거된 단백질 분획에서 기타 활성물질의 탐색을 위하여 여러 가지 column chromatography법을 이용, 분획을 수집 한다. 수집된 분획의 여러 활성을 조사하여 lectin과의 생화학적인 비교 후, 활성을 나타내는 분획의 정제 및 특성을 자세히 조사한다. 먼저 비렉틴 분획을 heparin column에 적용하여 NaCl 강도에 따라 용출되는 분획을 확보하고, 그 후 각 분획에 대한 macrophage의 활성화에 미치는 활성을 조사토록 한다. Macrophage의 활성화는 각 분획에 의한 cytokine의 유도능을 조사함으로써 실시하고, cytokine의 유도능을 가지는 분획을 대량 생산토록 하며 가능한 한 이후의 정제과정을 통하여 단일성분이 되도록 정제토록 한다.

5) 열매 분획의 함량 결정

본 실험실에서 제조한 겨우살이 추출물은 겨우살이의 잎, 줄기 및 열매가 혼합된 형태의 조추출물이다. 차후 겨우살이 추출물의 표준화를 이룩하기 위한 기초 연구로서 열매의 첨가가 활성에 미치는 효과를 검토토록 한다. 추출물의 제조시 열매가 차지하는 비율을 0, 1, 3, 5, 10, 20%가 되도록 조정된 추출물을 준비한다.

o 추출물의 활성조사

겨우살이 추출물이 항원 비특이적인 면역자극 효과에 의하여 숙주의 방어계를 활성화 시키는 작용을 함은 잘 알려져 있다. 열매 분획의 함량을 달리하는 조추출물의 면역자극 효과는 본 연구실에 잘 확립되어 있는 종양의 전이 모델에 적용시켜 그 활성을 조사토록 한다. 면역증강제의 활성은 교과서적으로 숙주의 면역계를 활성화시키는 작용에 의한 항종양 효과를 포함하기에 실험동물에 의한 항종양 효과로서 in vivo 면역자극 활성을 조사하는 것은 다른 항원을 이용한 방법보다 더 확실한 결과를 나타낼 것으로 생각한다. 본 실험을 위한 종양 전이 모델은 colon 26-M3.1 lung carcinoma를 이용하여 실시토록 한다.

다. 조성물의 표준화 및 정량을 위한 기초연구

1) Lectin에 대한 단일클론 항체(mAb) 생산과 그 특성 조사

순수한 lectin의 분리, 면역활성 기전의 연구, 정량법 개발등 기초 연구를 위하여 lectin 분획에 대한 단일클론 항체를 생산한다.

가) 면역원의 준비 및 면역화

Balb/c 마우스에 PBS에 용해된 20 $\mu\text{g}/100$ ml의 KML-C에 동량의 Complete Freund's adjuvant를 유화시켜 복강에 면역주사 한 후 14일 후에 동량의 항원을 Incomplete Freund's adjuvant에 유화시켜 1회 더 면역시키고, 최종 면역 10

일 후에 마우스의 눈으로부터 소량의 혈액을 채취하여 혈청을 얻어 ELISA로 항체의 역가를 확인 후, adjuvant 없이 항원만을 복강내에 booster injection한다.

나) 단일클론 항체의 생산

Lectin 분획을 면역한 Balb/c마우스의 비장세포와 P3U1 골수종을 PEG를 이용하여 융합 후, HAT 배지로 hybridoma를 선별한 후, lectin 분획에 대한 항체를 생산하는 hybridoma 세포를 ELISA로 선택하고 96 well plate에서 well 당 1개의 hybridoma가 되도록 분주(cloning)하고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 colony를 형성하며 성장할 때까지 배양한다. Colony를 형성하며 성장한 hybridoma의 배양 상등액을 ELISA로 측정하여 Lectin분획에 대한 항체를 생산하는 hybridoma를 선별(screening) 하며, 이러한 cloning과 screening를 1회 더 반복하여 Lectin 분획에 대한 단일클론 항체를 생산하는 hybridoma 세포를 선택한다. 항체를 대량 생산하기 위하여 pristane을 주입한 마우스의 복강에 hybridoma 세포를 주사하여 ascitic fluid를 얻고, 항체의 정제를 위하여 ascitic fluid를 protein-G affinity column(Pharmacia, USA)에 적용하여 항체를 분리한다.

다) Western blotting

10% SDS-PAGE에서 단백질을 분리 후, PVDF membrane에 전사시킨다. 전사가 완료된 membrane을 1% BSA, 0.1% Tween 20을 함유하는 PBS에서 blocking 후, Lectin분획에 대한 mAbs(X2,000~20,000)을 넣고 2시간 동안 상온에서 반응 시킨다. PBS-Tween으로 membrane로 4회 세척 후, goat-anti-mouse IgG1-HRP(Zymed Lab. INC. USA; X2,000)을 넣고 상온에서 1시간 동안 반응후, membrane을 세척 하고, ECL kit(Amrsham, Inc, Co)으로 membrane을 발색시켜 Lectin 분획과 특이적으로 반응하는 mAb를 확인 한다.

2) Toxin에 대한 항체의 생산

분리된 toxin 분획을 이용하여 toxin에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하여 이후 면역분석법 및 toxin 분획의 간편한 분리에 응용토록 한다.

o 항체의 생산

분리한 toxin 1 μ g을 Freund's complete adjuvant에 유화시켜 마우스 혹은 토끼에 피하주사로 면역한다. 최초면역 2주 후에 booster 면역을 하여 충분히 역가가 상승된 항체를 생산하여 다른 물질과의 교차반응을 비롯한 항체의 특성을 조사한다.

항체의 특성조사에서 다른 물질과의 교차반응은 lectin과 분리된 다른 활성 물질과의 교차반응을 ELISA로 조사토록 한다. 교차반응을 통하여 겨우살이의 다른 성분과의 교차반응을 조사 후에 Toxin 항체를 이용한 immunoaffinity column을 제조하여 조 추출물에서 toxin이 제거된 분획을 확보토록 한다.

3) 기타 활성분획에 대한 poly 항체의 생산

Heparin column을 통하여 cytokine의 유도능이 있는 분획을 수집 후 마우스 혹은 토끼를 이용하여 위와 동일한 방법에 의하여 항체를 생산토록 한다. 생산된 항체를 이용하여 겨우살이 조 추출물, lectin 분획, toxin 분획과의 교차반응을 western blotting 혹은 ELISA로 조사한다. 그 후 생산된 항체를 이용하여 활성을 나타내는 heparin column 분획의 면역분석법 개발에 응용토록 한다.

o 2차년도 (2000년)

가. 목표 ; 지표물질의 표준화 및 정량법 개발과 안전성 조사

나. 지표물질의 표준화 및 정량법 개발

1) Adjuvant의 표준화

천연물을 이용하여 약제화 할 경우에서 가장 큰 난점중의 하나가 제품의 표준화이다. 본 연구의 대상물질인 겨우살이의 경우도 보고에 의하면 채취시기, 숙주별, 채취지역등에 따라 구성하는 성분에 차이가 있음이 보고된 바 있다. 따라서 겨우살이 추출물이 높은 면역증강 활성을 가진다 하더라도 제품의 표준화가 되지 않을 경우 시판에는 큰 어려움이 있음은 당연하다 하겠다. 이 문제를 해결하기 위하여 제 1차년도에서 표지물질로서의 lectin 성분 및 기타 다른 활성물질의 탐색에 대한 연구를 실시하였고 각 지표물질의 함량을 측정하기 위한 기초연구로서 각 물질에 대한 항체를 생산하였다. 본 연구에서 주로 수행되는 겨우살이는 우리나라의 전역에서 가장 흔히 볼 수 있는 참나무 숙주의 겨우살이를 이용한다.

현재 면역증강 효과가 있을 것으로 예상하는 성분으로서 주 활성물질인 lectin, 그리고 기타 활성물질로서 단백질 분획을 예상하고 있으며, 제거해야 할 물질로 저분자 독성물질 분획이 있다고 예상하고 있다. 그러나 현재까지 겨우살이에 대한 다른 나라의 연구결과 toxin 분획은 그 자체로서는 독성을 나타내지만 lectin과 함께 존재시 lectin의 활성을 높여주는 상승작용을 한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 이들 각각 분획에 대한 면역자극 활성에 대한 연구가 선행되어야 한다고 생각한다. 따라서 본 연구를 위한 시료로 대조군으로 겨우살이 추출물을 실험군으로 lectin, 기타 단백질 분획(KMHBP), Toxin 분획의 활성을 조사한다.

가) 면역자극 활성의 조사

주로 in vivo에서의 외래물질에 대한 방어능을 실험동물을 통하여 조사한다.

o 세균인 *B. bronchiseptica*에 대한 숙주의 방어효과

실험동물로는 ICR 마우스를 사용한다. 마우스에 각 분획을 복강 혹은 피하 주사하고 1-3일 후에 마우스에 치사량이 되는 양의 *B. bronchiseptica* 세균을 접종한다. 세균 접종에 의하여 1주일 후에 시료를 투여한 군에서 생존한 마우스 비율을 대조군과 비교하여 각 분획에 의한 숙주의 방어능을 측정토록 한다,

o 종양전이 억제효과

면역증강제의 활성중에서 항종양 활성이 있다. 따라서 실험전이 동물모델을 이용하여 각 분획의 면역자극 활성을 구한다. 본 실험에 사용되는 종양세포는 B16-BL6 melanoma 혹은 colon26-M3.1 lung carcinoma를 사용한다. 복강 및 정맥을 통하여 접종하며 시료를 접종하지 않은 대조군 마우스와 비교하여 방어능을 조사토록 한다. 시료의 투여는 종양접종 2일전에 하고 종양접종 14일 후에 폐에 전이된 종양의 수를 시료를 처리하지 않은 마우스의 종양수와 비교함으로써 시료에 의한 면역자극 활성을 조사한다.

나) 각 분획의 표준화 실험

각각의 분획에 의하여 유도된 면역자극능의 결과로 각 분획의 유효량을 정한다. 그 후 각 분획을 서로 혼합하여 동일한 실험을 수행함으로써 가장 우수한 활성을 나타내는 새로운 조성비를 구하도록 한다. 그러나 예상하지 않은 기타 활성분획의 존재 가능성을 배제할 수 없기에 본 실험은 각 분획의 첨가에 의한 상승작용의 유도에 초점을 맞추어 실시한다. 다만, toxin 분획에 의한 상승작용의 유도여부를 조사 후 표준화 물질의 제조시 이 분획의 제거여부를 결정토록 한다, 실험을 위한 대조군으로는 각각의 분획 단독 및 겨우살이 조 추출물을 사용한다.

2) 물질의 분석법 및 Adjuvant의 표준화

가) 지표물질 lectin에 대한 Immunoassy법 개발

제약의 개발에 있어 지표물질의 선정 및 이의 정량법 확립은 정도관리(Q.C.)에 있어서 매우 중요하다. 본 연구실에서는 유럽산과는 생화학적, 생물학적 특성이 다른 한국산 특이적인 lectin을 분리, 정제하였으나 두 가지 lectin성분이 함유되는 것으로 생각되는 바, 각 lectin 분획에 특이적으로 반응하는 항체를 생산토록 한다. 이 항체를 이용 각 lectin양을 정량할 수 있는 ELISA 면역분석법의 개발하여 vaccine adjuvant로 겨우살이 추출물을 사용할 때 물질의 Q.C.를 할 수 있는 근거를 확립한다.

• Two-site sandwich법

항원에 대한 항체 중 다른 항원결정기(epitope)를 인식하는 두가지의 항체를 이용하여 항원의 양을 분석하는 방법으로, 본 실험에서는 enzyme으로 HRP(horseradish peroxidase)를 사용하며 한국산 lectin에 특이성을 나타내는 단일클론항체에 conjugation시킴으로 겨우살이 추출물내의 lectin 함량을 구한다.

실험법을 약술하면 lectin에 대한 단일클론 항체(#1)을 ELISA plate에 coating하고 BSA를 이용blocking 한다. 그 후 표준물질로서 여러농도로 조정된 lectin을 첨가 후 HRP가 conjugation된 항체(#2)로 반응한다. HRP의 발색을 위한 기질로는 TMB 용액을 사용한다. 조 추출물에 존재하는 lectin의 함량을 구하기 위하여 lectin 대신에 조추출물을 첨가하고 그 결과 나온 OD 값을 lectin에 대한 표준곡선에 적용함으로써 조추출물에 함유되는 lectin의 양을 측정토록 한다.

나) Toxin 및 KMHBP에 대한 정량법

1차년도에 생산된 각 분획에 대한 항체를 이용 경쟁반응에 원리를 둔 competition ELISA법을 확립토록 한다. Toxin 및 KMHBP 분획에 대한 항체를 생산, 각 항체와 다른 겨우살이 분획들과의 교차 반응을 조사 후, 교차반응을 나타내지 않을 시, toxin에 HRP를 cojugation시켜 toxin분획과 경쟁반응에 의한 competition assay를 개발한다.

다. 예비독성 및 일반약리 실험

분리정제된 지표물질들을 이용, 안전성 조사를 실시한다. 실험동물로는 ICR 마우스 혹은 랫드를 이용한다. 시료의 *in vivo* 독성조사를 위하여 정맥 혹은 복강주사로 시료를 투여 후 의형상 나타나는 특성을 조사하고, 세분화된 조직의 변화들은 중추신경계, 순환계 및 혈액응고계에 미치는 효과를 조사한다.

1) 정맥 급성독성

생산된 adjuvant의 급성독성 실험은 Group당 5마리의 마우스(ICR)에 체중 Kg당 다섯군의 다른 용량의 시험물질을 강제로 1회 정맥투여한다. 시험물질은 PBS에 녹여 Kg당 5 ml의 용액을 마우스의 꼬리정맥에 투여하며 대조군은 PBS만을 투여한다. 시험물질의 투여 직후 및 시간별로 7일간 시험동물을 관찰하여 부작용의 발현여부 및 치사율등을 조사한다.

2) 일반행동에 대한 영향

생산된 adjuvant를 활성을 나타내는 농도를 기준으로 여러농도로 조정하여 음성 ICR 마우스(약 25g)에 정맥주사하고 15분, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 후에 Irwin의 다차우너 관찰법을 변형하여 일반행동의 변화, 신경증상 및 중독증상을 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 조사한다.

3) 중추신경계에 미치는 영향

가) 진통작용에 미치는 영향

생산된 adjuvant를 활성을 나타내는 농도를 기준으로 여러농도로 조정하여 웅성 ICR 마우스(약 25g)의 복강에 주사하고 3분 후부터 10분간 writhing의 횟수를 조사한다.

나) 수면시간에 미치는 영향

생산된 adjuvant를 활성을 나타내는 농도를 기준으로 여러농도로 조정하여 웅성 ICR 마우스(약 25g)에 정맥주사하고 15분 후에 50mg/kg의 pentobarbital을 복강에 투여한다. Pentobarbital 투여 후 정사방향(righting reflex)의 소실시점으로부터 회복시점까지를 수면시간으로 하여 대조군과 비교한다.

다) 항경련작용

생산된 adjuvant를 활성을 나타내는 농도를 기준으로 여러농도로 조정하여 군당 10마리의 웅성 ICR 마우스(약 25g)에 정맥주사하고 15분 후에 용량 65mg/kg의 pentyleneterazole (Sigma)을 복강내에 투여하고 관찰되는 강직성 경련발현 및 사망 유무를 측정한다.

4) 소화기계에 대한 영향

가) 장관수송능에 미치는 영향

24시간 절식시킨 웅성 ICR 마우스에 시료를 정맥을 통해 투여하고 15분 후 charcoal meal (탄소말을 함유한 0.5% CMC)을 마리당 당 0.2 ml 씩 경구투여 한다. 그리고 20분 후에 각 마우스를 희생시킨 후, 위장관을 적출하여 유문부에서의 맹장 입구까지의 이동거리를 측정한다. 이도율은 다음식을 사용하여 계산한다. 이동을

(%)=(유문부에서 탄소말의 이동거리/유문부에서 직장까지의 거리) x 100

나) 위액분비에 미치는 영향

24시간 절식시킨 랫드를 ether로 마취시킨 후 복강을 절개하여 유분무를 결찰한 후 여러농도의 시료를 정맥주사하고 4시간 후에 위액을 채취하여 위액의 양과 pH를 조사한다.

o 3차년도 (2001)

가. 목표 ; 혼합 면역증강제 개발 및 채취시기별 숙주별 활성물질 함량조사

나. 시료의 표준화를 위한 test

1,2차년도 연구에서 겨우살이 내의 활성물질인 렉틴의 정량법을 개발한 바 있다. 따라서 이를 이용 원재료의 균질성을 조사하고 표준화 조건을 확립하기 위해 매일 채취시기 와 숙주가 다른 겨우살이 내의 활성물질인 렉틴 함량의 함량을 2차년도에 확립된 sandwich ELISA법을 이용하여 조사한다.

다. KM-110 과 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant 의 개발 및 활성조사

1) Alum에 혼합한 형태로서 면역증강활성조사

지금까지 adjuvant 중에서 상대적으로 안전성이 확보되어 인간에 적용할 수 있는 adjuvant인 alum 에 KM-110과 KML-C를 혼합하여 항원(KLH)과 함께 2주간격으로 2회 피하를 통해 투여하고 2차 투여 1주후에 각 group별로 혈액을 수집하여

- Serum내의 항원 특이항체에 대한 역가조사와
- 항원의 subclass 조사하여

Alum만을 adjuvant로 사용한 group와 비교하고 항원특이적 항체의 역가상승에

synergistic 효과가 있는지 혹은, 주로 Th2 response를 유발하는 alum 의 단점을 극복할 수 있는지의 여부를 조사한다.

2) Oil과 혼합된 형태로서의 면역증강활성조사

2차년도에서 squalene과 혼합시 KML-C가 adjuvant 효과를 지닐수 있음을 확인한 바 있다. 따라서 이러한 squalene과 다양한 농도의 KM-110혹은 KML-C를 혼합된 형태를 adjuvant로 사용하여 항원(KLH)과 함께 mice에 2주간격으로 2차에 걸쳐 면역하고 항원 특이적인 항체 역가를 조사하고 최적농도를 확인한다.

한편 체액성 면역증강효과의 확인은 지연성과민반응(delayed type hypersensitivity; DTH)의 유도여부를 통해 조사하며, squalene과 다양한 농도의 KM-110혹은 KML-C를 혼합된 형태로 항원과 함께 면역한 후 항원만을 재 면역하여 유도되는 swelling 정도를 조사한다.

라. 임상적 의미를 갖는 항원들에 대한 특이적 면역증강능 조사

1,2차년도 연구결과에서 나타난 KM-110 과 KML-C의 항원에 대한 항체 titer상승효과가 실제 임상항원들에게도 유효한 효과를 지니는지의 여부를 조사한다.

이때 사용되는 항원은 Hepatitis B Pre-s region, Diphtheria toxin, 그리고 Influenza agglutinin이며 KM-110 혹은 KML-C와 함께 mice에 면역하고 5주-7주에, 항원에 특이적인 항체의 역가를 indirect ELISA 법을 통해 조사하여 이들 임상항원에 대한 KM-110과 KML-C의 체액성 면역증강 활성을 조사한다.

마. 시료의 안전성 시험

전년도 연구를 통해 mice에 대한 독성시험과 일반약리 시험을 완료하였으나, 좀 더 명확히 시료의 안전성을 확보하고자, 유효한 adjuvant효과가 인정된 농도의 KM-110 혹은 KML-C를 투여하고, 투여 1주, 2주, 4주후에 mice를 희생하여 주사부위 및 주요실질장기 (폐, 간, 신장, 위)들에 대한 병리조직검사를 실시하여 안전

성여부를 조사한다.

바. 겨우살이내 toxin분획에 대한 정량조건 확립

2차년도의 연구에서, 겨우살이내의 독성분획에 대한 면역분석법 개발이 기술적으로 용이하지 않음을 확인 한 바 있다. 따라서 당해연도에서는 HPLC를 이용한 고효율 column을 통해 겨우살이내의 toxin 분획에 대한 정량조건확립을 실시할 것임

3. 연구개발 내용 및 결과

○ 1차년도 (1999)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|--------------|-------|------------|
| 한동대학교 생의학연구소 | 김종배 | 25,000,000 |

가. 겨우살이 조 추출물(crude extracts;KM-110)의 준비 및 열매의 함량결정

한국산 겨우살이의 물 추출물이 adjuvant effect를 지닌 이미 보고한 바 있다(연구 계획서). 그러나 겨우살이는 형태적으로 잎, 줄기, 그리고 열매로 구성되어 있으며 이들 부분중 어느 부분에 활성물질들이 많이 분포되었는지에 대해서는 확인되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 부위별 활성의 차이를 확인하고자 우선 열매의 함량을 달리한 겨우살이의 물 추출물의 활성의 차이를 확인하고자 하였다. 먼저 열매가 각각 0, 5, 10, 20, 100%(W/W)가 함유된 겨우살이에서 증류수를 이용하여 추출한 추출물을 동결건조하여 그 수율을 확인하였으며, 아울러 겨우살이내의 가장 강력한 활성후보물질로 사료되는 렉틴의 함량을 조사하였다. 그 결과 그 수율에 있어서는 1-20%의 열매가 함유된 겨우살이추출물들은 약 11-12%정도의 수율을 나타내었고 열매추출물은 약 15-16%의 수율을 나타내어 잎,줄기 보다는 좀 더 높은 수율을 나타내었다. 한편 렉틴의 함량조사는 각 추출물을 10mg/ml수준으로 PBS에 부유하여 1ml내에 함유된 렉틴의 함량을 ELISA법에 의해 정량하였으며 표1.에 나타난

바와 같이 열매의 함량이 증가할수록 렉틴의 함량은 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 잎이나 줄기에 비해 열매속에 함유되어 있는 렉틴의 함량이 상대적으로 적기때문으로 사료되었으나 열매만으로 추출한 추출물에서도 렉틴이 함유되어 있음을 확인할수 있었다.

따라서 렉틴이 활성물질로 판명될 경우 이는 차후 adjuvant를 위한 fomula를 만드는데 중요한 자료가 될 것으로 사료되었으며 이들 추출물에 대한 활성시험을 위해 2과제에 시료를 제공하였다.

표 1. 열매의 함량을 달리하는 겨우살이(10g)으로부터 물 추출물(KM1110)의 수율과 렉틴의 함량

| 열매함량(%) | 0 | 5 | 10 | 20 | 100 |
|---------------------------|-----------|-----------|--------|-----------|-----------|
| 추출물건조중량(g)/수율(%) | 1.19/11.9 | 1.19/11.9 | 1.2/12 | 1.13/11.3 | 1.56/15.6 |
| Lectin의 함량(μ g/10mg) | 11.3 | 11.1 | 10.7 | 10.7 | 8.4 |

나. 렉틴의 분리, 특성조사 및 항체의 생산

1) 겨우살이로부터 렉틴 분리를 위한 최적조건의 확립

본 과제수행에 있어 가장 강한 활성을 지닐 것으로 사료되는 렉틴의 최적 분리조건의 확립과 그 수율을 높일수 있는 조건의 확립은 차후 본 과제를 수행하는데 있어서나 산업적인 응용을 고려할 때 대단히 중요하고 긴급한 일이었다. 따라서 본 연구에서는 NaCl의 함량이나 각종 완충액, 즉, pH의 변화가 렉틴의 추출에는 어떠한 영향을 미치는지에 대해 조사하였으며 렉틴분리를 위해 기존에 사용되어오던 hydrolyzed-Sepharose4B column보다 더욱 효율이 높은 chromatography법을 확립하고자 하였다.

가) 겨우살이 렉틴 추출에 있어 NaCl이 수율(yield)과 pattern에 미치는 영향

추출용매에 함유된 NaCl의 함량이 렉틴의 수율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 NaCl이 각각 0, 0.5, 0.85, 1%가 함유된 증류수를 이용하여 겨우살이의 잎, 줄기를 추출하여 HCl-treated Sepharose column을 이용하여 렉틴을 분리 하였다. 이 과정에서 추출을 위한 용매를 제외하고는 전 과정을 동일하게 실시 하였으며 추출물 동량을 전기영동하였을 때 그림 1 에서보듯이 NaCl의 농도가 증가함에 따라 렉틴의 추출량이 증가되는 경향을 보여 주었다. 그러나 0.85%와 1%에서는 현저한 차이는 발견되지 않은 점으로 보아 렉틴의 추출을 위한 NaCl의 농도는 생리식염 농도 (0.15M)가 적당한 것으로 사료되었다.

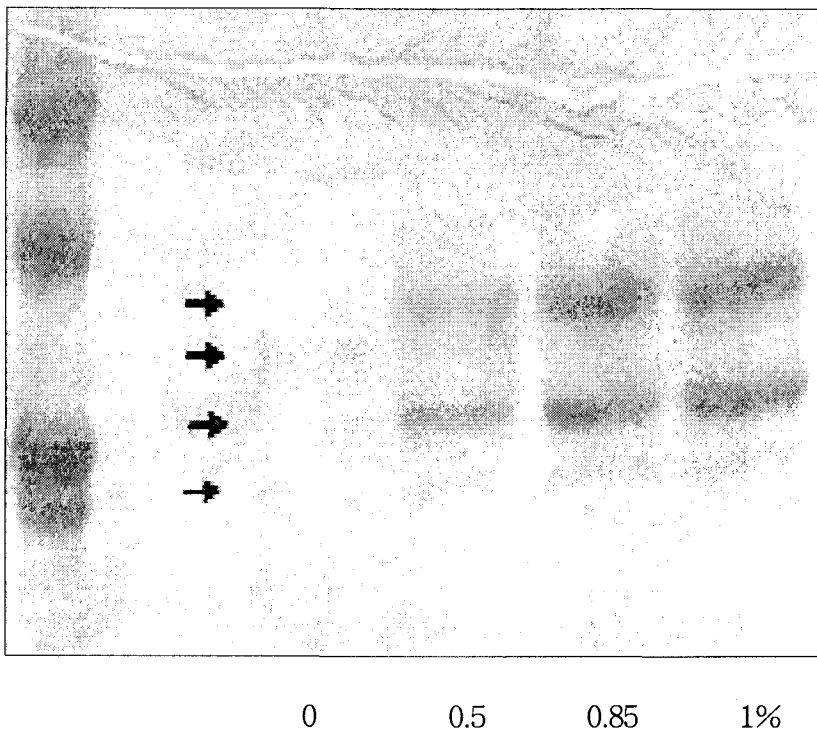


그림1. NaCl함량에 따른 렉틴의 분리 chromatogram 및 전기영동패턴

나) 겨우살이 렉틴분리에 있어 완충액이 그 수율에 미치는 영향

위의 결과에서 NaCl이 렉틴 추출에 있어 중요한 인자임을 확인하였던 바, NaCl 이외에 추출용매의 pH가 렉틴의 수율에 미치는 영향을 조사하고자 증류수, 생리식염수, 0.1M 초산용액(0.1M Acetic acid, 0.15M NaCl, pH3.0) 인산완충용액(PBS, pH7.0), Tris buffer(pH 8.0, 0.15M NaCl)에서 동일한 조건에서 겨우살이 잎.줄기를 추출하여 추출물에서 총 단백질 함량, 혈구응집능, 그리고 렉틴의 함량을 조사하였다.

(1) 단백질함량

먼저 각 추출물에서의 단백질함량은 ml당 함유된 단백질의 양을 BCA method를 통해 조사하였으며 증류수 추출물에서는 7.9mg/ml, 생리식염수 추출에서는 9.5mg/ml, 0.1M 초산용액 에서는 13.7mg/ml, PBS에서는 10.3mg/ml, 그리고 Tris액 추출물에서는 11.2mg/ml수준의 단백질이 용출되어 단백질 양만으로 비교할 때 초산용액, Tris액, PBS액, 생리식염수 순으로 나타났으며 단순히 증류수로만 추출한 것이 다른 추출액에 비해 가장 적은 양의 단백질 함량을 나타내었다.

(2) 혈구응집능

이상의 단백질 정량에서 나타난 결과가 렉틴의 함량과의 상관 관계를 알아보하고자 각 추출물의 적혈구 응집능을 조사하였다. 그 결과 초산용액추출물은 원액의 4배 희석액에서도 응집효과를 지녔던 반면 생리식염수, PBS액, Tris액 추출물은 2배 희석액에서만 응집효과를 띄었고 증류수 추출물에서는 2배 희석액에서도 응집효과가 확인되지 않았다.

(3) 렉틴의 정량

상기의 실험 결과에서 총 단백질 함량과 렉틴의 함량은 상관관계가 있을 것으로 사료되었으며 이를 좀 더 명확히 확인하고자 추출물내에 포함된 렉틴의 함량을 ELISA를 통해 조사하였다. 그 결과 혈구응집능시험에서 나타난 바와 같이 초산용액 추출물에서 가장 높은 양의 렉틴이 함유되어 있었으며 흥미롭게도 증류수 추출액내의 렉틴의 함량은 다른 것들에 비해 10배정도 현저히 낮은 함량을 나타내었다. 이는 이전의 결과에서도 확인 되었듯이 렉틴을 추출하는데 있어 NaCl이 중요한 역할을 할것으로 보였다.

다) 최적 column의 선정

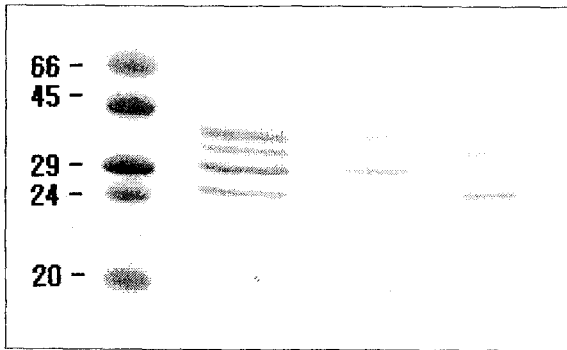
렉틴이 당과 결합할 수 있는 site를 지닌 점은 렉틴의 분리에 있어 중요한 특징이다. 본 연구에서도 이러한 점을 이용, 부분적으로 가수분해된 sepharose를 이용하여 겨우살이로부터 렉틴을 성공적으로 분리하였다. 그러나 hydrolyzed sepharose column은 HCl을 이용하여 hydrolyze시키는 전처리과정이 요구되고 이러한 과정에서 column의 효율이 결정되는 문제점이 있다. 본 연구를 진행하는 과정에서도 column의 효율이 batch에 따라 차이가 있음을 확인되어 이를 개선할수 있는 column의 선정이 요구되었다. 한편 분리된 렉틴의 특성을 규명하는 과정에서 한국산 겨우살이 렉틴이 lactose와 가장 강한 특이성을 지님을 확인하였던 바 lactose conjugated sepharose column을 이용하여 렉틴을 분리하고 그 효율을 비교하였다. 그 결과 기존의 HCl-treated sepharose column은 ml당 0.2mg 정도의 binding capacity를 지녔던데 비해 lactose-sepharose column은 ml당 4mg내외의 binding capacity를 지녀 효율이 상대적으로 월등히 우수한 것으로 나타났으며 전처리과정이 요구되지 않아 batch에 따른 효율의 차이도 거의 나타나지 않았다.

2) 겨우살이 렉틴의 분리, 특성조사 및 항체의 생산

가) 분리 및 특성조사

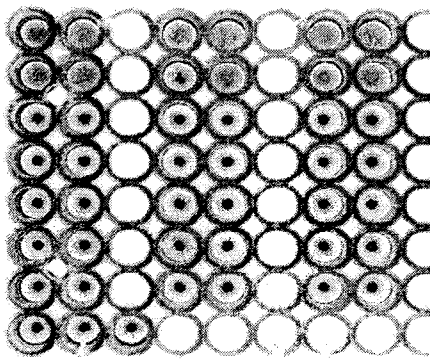
상기에서 나타난 결과를 기초로하여 겨우살이로부터 렉틴의 분리는 0.15M NaCl이 함유된 0.1M 초산용액을 이용, 겨우살이를 추출하고 ammonium sulfate를 이용 단백질 부분을 enrichment한 후, lactose-conjugated sepharose column에서 렉틴을 분리하고 전기영동을 통해 분리여부를 확인 하였다. 그 결과, 본 연구를 통해 분리된 렉틴(KML-C)은 각각 2개의 단위사슬을 가진 2개의 단백질로 구성되었음을 확인하였으며, 이들 2개의 단백질은 단일클론항체(그림2)를 이용한 immuno-affinity chromatography를 통해 각각 단일 단백질(KML-IIU, KML-III)로 분리 정제 하였다. 이들 단백질의 렉틴여부는 적혈구의 응집능을 통해 조사하였는데, 두 단백질 모두 유사한 농도에서 적혈구를 응집시키는 효과를 지니고 있었으며(그림 2) 그 응집 효과는 lactose, galactose, N-acetylgalactose에 의해 저해되었던 점으로 보아 이들 당에 특이성을 지니는 렉틴으로 사료되었다.

A



KML-C KML-IIU KML-III

B



KML-C KML-IIU KML-III

그림2. 한국산 겨우살이로부터 분리한 렉틴들의 전기영동(A)과 겨우살이 렉틴의 적혈구 응집효과(B)

나) 항체의 생산

(1) Polyclonal antibody의 생산

렉틴에 대한 항체는 mice를 이용하여 생산하였다. 먼저 KML-C를 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 Balb/c mouse에 마리당 $2\mu\text{g}$ 을 피하주사하고 3주또는 4주간격으로 추가 면역하였다. 항체의 생성여부는 ELISA또는 western blotting을 통해 확인하였다. 그 결과 (그림 3) KML-C에 특이성을 지니는 항체가 생성되었음을 확인하였다.

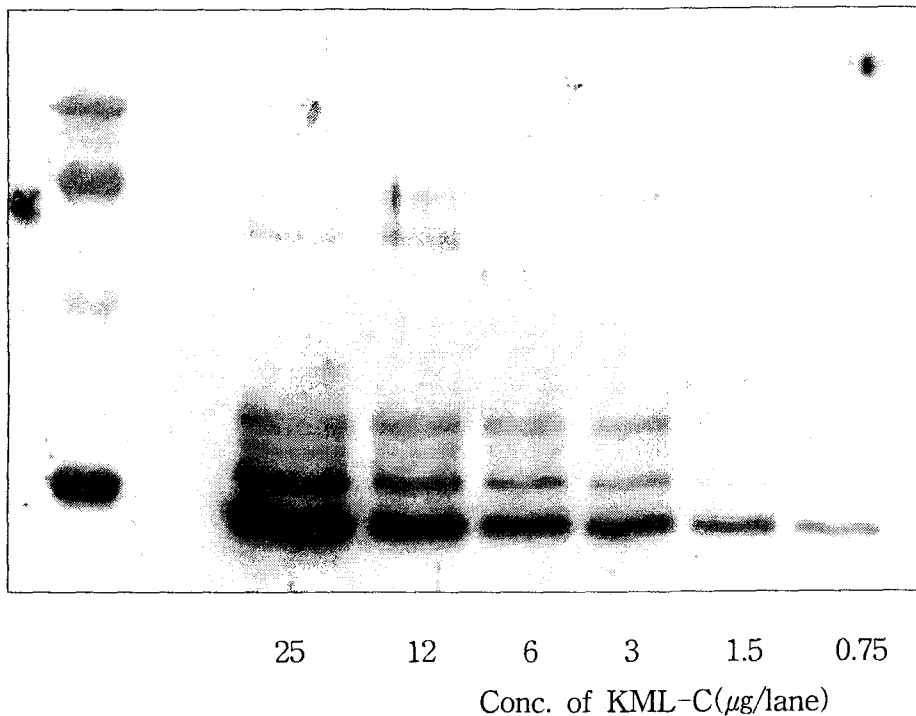


그림3. 렉틴 분획(KML-C)에 대한 polyclonal항체를 이용한 western blot.

(2) Monoclonal antibody의 생산

본 연구를 통해 분리된 렉틴에 대한 단일클론항체의 생산은 렉틴을 면역한 mice의 spleen cell 들을 mice의 myeloma cell과 융합시켜 수개의 hybridoma를 얻었으며 그들이 분비하는 항체의 특성을 조사하는 과정에서 두 개의 유용한 단일클론항체(9H7D10, 8B112C5)를 획득하였다. 9H7D10은 한국산 겨우살이 렉틴분획(KML-C)의 4개 band중 가장 높은 분자량을 지니는 band에만 반응하였으며 8B112C5는 상대적으로 작은 size를 가지는 두 개의 band에만 반응하였다(그림4). 따라서 이들을 이용하여 KML-C로부터 두 개의 단백을 각기 순수분리.정제할수 있었으며 렉틴의 정량 system을 구축할수 있었다.

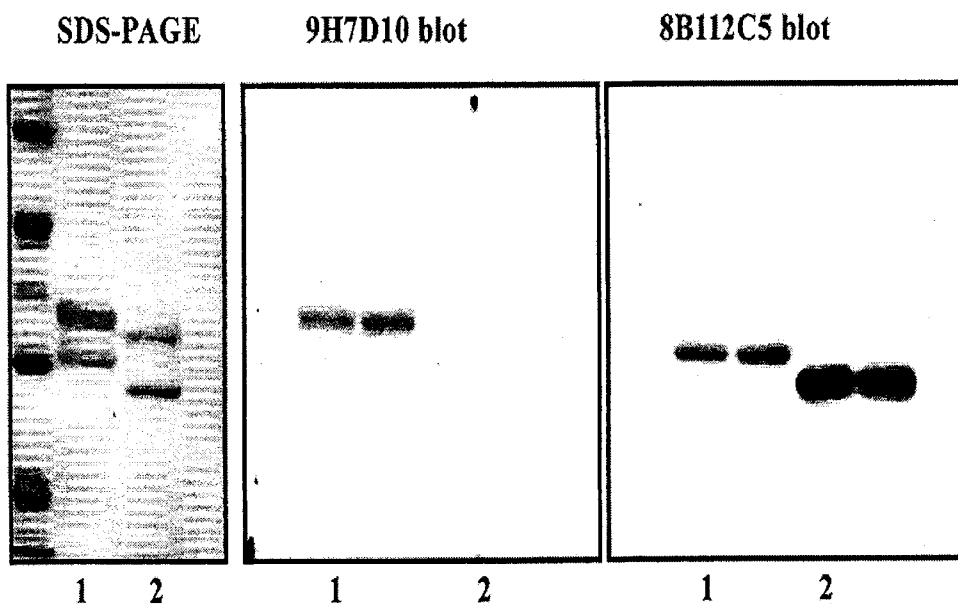


그림4.단일클론항체를 이용한 lectin의 western blot(1: KML-IIU 2: KML-IIL)

다. Toxin분획의 분리와 항체의 생산

1) Toxin의 분리

겨우살이로부터 toxin분획의 분리는 유럽산 겨우살이의 viscotoxin의 분리에 관한 논문인 Konopa등 방법을 약간 수정하여 실시하였다. 약술하면, 겨우살이를 3% acetic acide로 추출 후, 동결건조를 실시하여 crude extract를 제조하고, 25 mM의 Tris-acetate (pH4.8)에 대하여 투석을 실시하였으며, 동일한 buffer로 평형상태로 된 CM separeose cation exchange column에 loading하였다. 동일 buffer로 충분히 세척 후, resin에 결합한 성분을 1 - 0.4 M NaCl용액을 이용하여 순차적으로 용출(NaCl gradient)하였다. 그 후 세포독성을 나타내는 분획을 수집하였고, Sepadex G-50 column을 이용하는 gel filtration에 의하여 toxin 물질을 정제하여 정량법 개발을 위한 항체의 생산에 이용하였으며 활성측정을 위해 2세부과제에 제공하였다.

2) Toxin에 대한 poly 항체의 생산

Anti-mouse-toxin 항체에 대한 항체의 생성 여부와 역가의 조사는 ELISA 법을 이용하여 실시하였다(그림 5). 항체역가에 대한 곡선은 x 800의 혈청 희석비를 축으로 전형적인 bell 형 곡선을 나타냈으며, 따라서 x 800 이하의 농도에서는 ELISA 결과의 OD값은 혈청의 희석비에 비례하는 결과를 보여 toxin에 대한 항체가 생성되었음을 확인할수 있었으며 본 실험에서 생산된 항체의 역가는 약 10만이었다. 따라서 이 polyclonal 항체를 이용하여 이 후의 실험을 실시하였다.

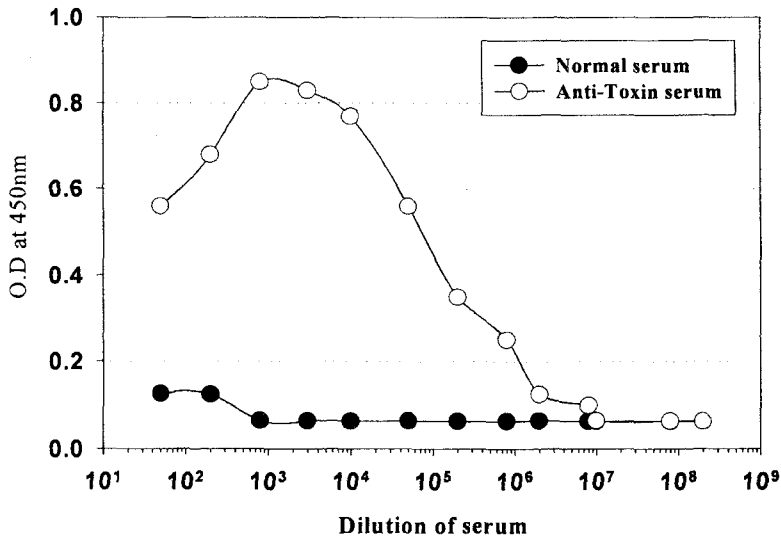


그림5. Anti-toxin polysera에 대한 titration curve

라. 기타활성분획의 분리 및 항체의 생산

1) Heparin-binding protein(HBP)의 분리

겨우살이내에 존재하는 후보 활성성분중 렉틴과 viscotoxin이외의 후보 성분을 도출하고자 렉틴을 분리하고 남은 겨우살이 추출물을 heparin-sepharose column에 적용하여 NaCl의 농도를 순차적으로 증가함으로써 column에 부착된 성분을 용출하여 5개의 분획을 얻었다(그림 6). 그리고 이들의 특징을 확인하고자 비 환원상태에서 전기영동을 실시하였다. 그 결과 (그림 7)에서 보여진 바와 같이 비록 다양한 size에서 단백밴드들이 확인되었으나, NaCl 50mM에서는 약 39kd과 22kd, 100mM에서는 24kd, 200mM에서는 26kd, 300mM에서는 36kd내외의 분자량을 지니는 단백질들이 major로 존재하는 분획들을 얻었으며 이들의 활성을 시험하기 위해 2과제에 시료를 제공하였다.

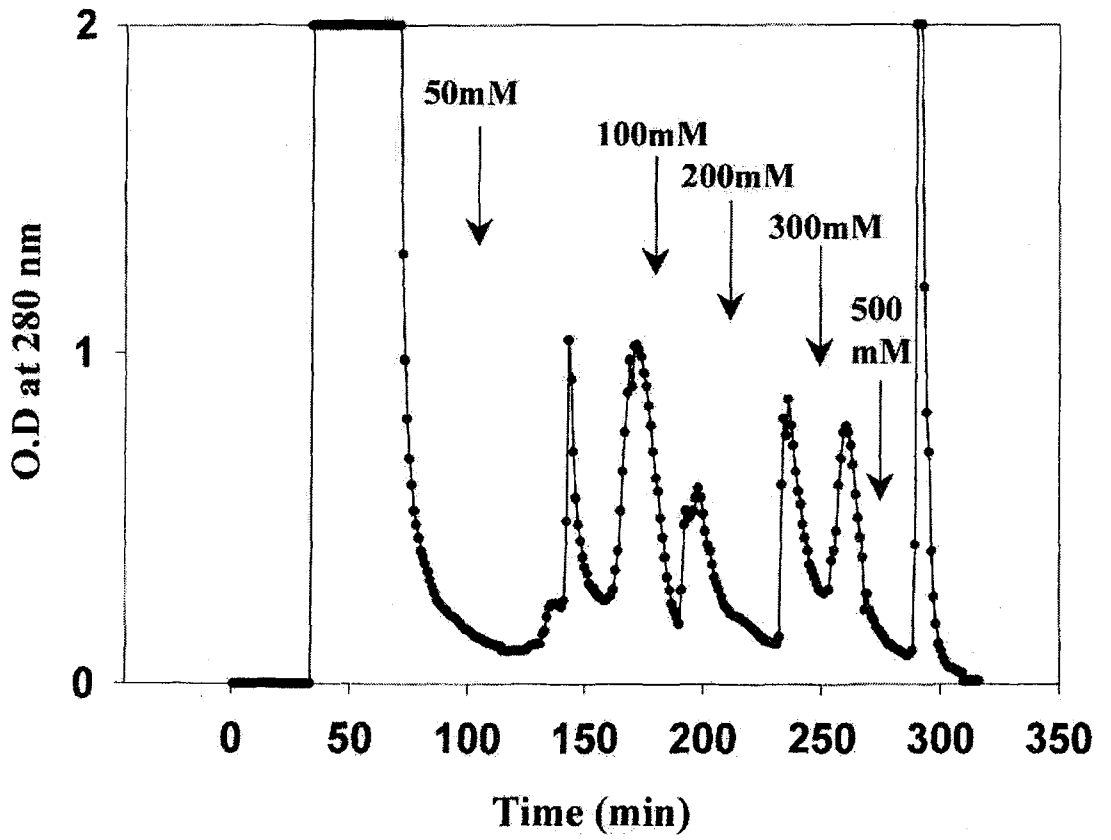


그림6. 겨우살이로부터 heparin-binding protein들의 분리 chromatogram

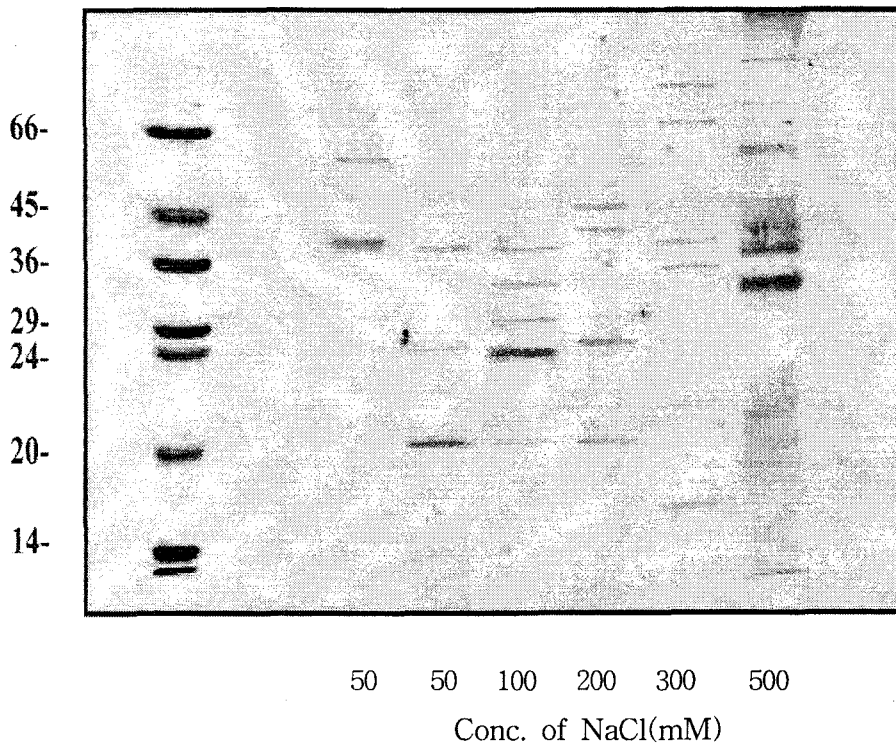


그림7. Heparin-binding 분획의 전기영동

2) Polyclonal antibody의 생산

위에서 분리한 HBP에 대한 항체의 생산은 제 2과제의 실험에서 활성을 지닐 가능성이 나타난 50mM 용출액의 2번째 분획(HBP-2)과 100mM 분획(HBP-3)를 대상으로 하여 우선적으로 실시하였다. 먼저 두 분획을 전기영동을 통해 분리하고 gel을 0.1M cold KCl에 담그어 각각 22kd와 24kd의 분자량을 지니는 밴드를 잘라 세절하여 토끼에 약 150 μ g의 양을 피하주사 하였으며 4주 후에 동일한 방법으로 boost하였다. 그리고 항체의 생성여부와 역가(titer)는 접종 1주일후에 혈액을 취하여 실시하였다. 그러나 수차례의 boost접종후에도 뚜렷한 항체의 생성이 확인되지 않았으며 이는 아마도 전기영동을 통한 시료의 정제 과정에서 어떠한 문제가 발생하였을 것으로 사료되어 전기영동을 거치지 않고 기존의 adjuvant(FCA)와 혼합하여 접종하는 형식으로 재실험을 실시하여 현재 진행중에 있으며 현재 1차 접종후에 HBP-3에

대해서는 항체의 생성이 확인되고 있으나 HBP-2에 대해서는 여전히 확인되지 않고 있다.

○ 2차년도 (2000)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|--------------|-------|------------|
| 한동대학교 생의학연구소 | 김종배 | 30,000,000 |

가. 지표물질의 정량법확립

활성물질인 KML-C의 정량을 위한 sandwich ELISA system을 이용 KML-C의 표준곡선은 Fig. 3에 나타내었다. 측정 가능한 최소농도는(detection limit: sensitivity)가 약 20ng/ well 수준으로 나타났으며 이는 겨우살이 식물체 1mg 내에 존재하는 렉틴의 양도 측정 가능한 수준으로서 차후 제품의 표준화 및 Q.C에 있어 중요한 정량법으로 활용 될 것으로 기대된다.

그리고 heparin binding 분획(HP)에 대한 정량은 HP를 면역하여 얻은 mouse 혈청(1:1000)을 coating 하고 HRP를 conjugate 한 HP와 농도를 알고 있는 HP를 함께 첨가하여 TMB를 이용하여 발색반응을 유도하고 표준곡선을 작성하였다 (그림. 1,2). 그 결과 5- 50ug/well 수준에서 측정가능한 범위가 산출되었다.

한편 toxin분획(VT)에 대한 정량체계도 HP와 동일한 방법으로 시도하였으나 system 구축에는 실패하였다. 이에 대한 원인은 아마도 VT에 대한 항체의 역가는 실험가능한 정도의 충분한 역가(>30,000)를 지니고 있었다는 점, VT분획은 분자량이 10000이하로 구성되어 있다는 점에서 볼 때, 아마도 HRP conjugation 과정에서 저분자물질에 conjugated 된 효소의 효율이 낮았기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서 VT정량을 위해서는 competition ELISA 보다는 단일클론항체를 이용한 sandwich ELISA가 보다 적합한 방법으로 사료되었다. 그러나 이를 위해서는 단일클론항체를 새롭게 생산해야하는 문제가 있어, ELISA system으로는 무리가 있을 것으로 판단되며 남은 기간 동안 HPLC를 이용한 정량조건확립을 시도할 것이며 당해

연도에 확립되지 않을 경우 3 차년도에도 계속적으로 VT정량조건시험을 실시할 것이다.

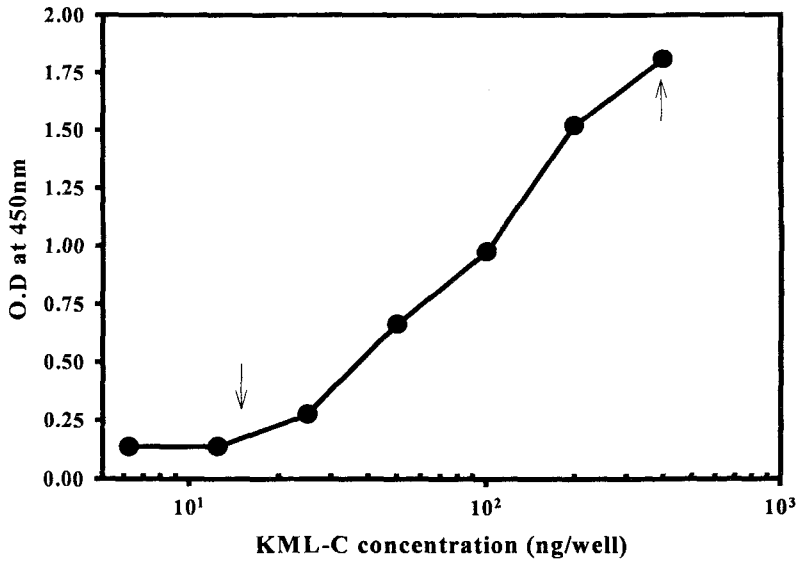


그림 1. Standard curve of KML-C

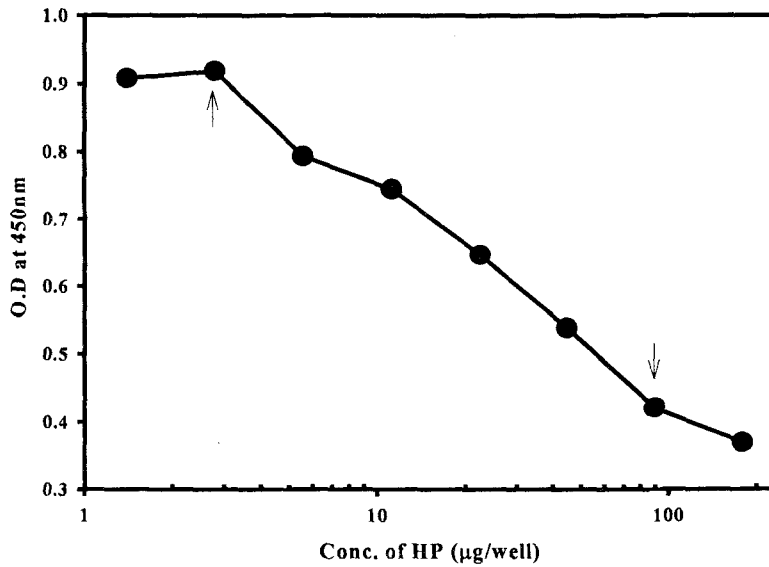


그림 2. Standard curve of HP

나. KML-C의 mouse에서의 급성 독성시험 및 일반약리시험

1) 다양한 투여경로에 따른 KML-C의 급성독성

생리식염수에 현탁된 KML-C를 ICR mice(25g 내외) 5-6마리를 group으로 하여 결과에 나타낸 농도를 피하, 복강, 정맥 또는 경구를 통해 주입하고 14일간 관찰하고 7일간의 결과를 표에 나타내었다.

그 결과 투여경로를 복강으로 하였을 때 KML-C의 LD₅₀은 25 μ g/kg 내외의 농도, 정맥투여시 LD₅₀치는 6.25~3.125 μ g/kg 사이, 피하를 통한 주사시 마우스에 대한 KML-C의 LD₅₀은 mice의 성에 따라 사소한 차이를 보였으나 50 μ g/kg 내외일 것으로 사료되어 정맥 주사시보다 약 4-6배정도 높은 농도에서 LD₅₀이 형성되어, 정맥, 복강, 피하 순으로 독성을 나타내었다(표 1,2,3,4). 한편 경구독성을 위한 농도는 800, 400, 200 μ g/kg 수준으로 투여하였으나 관찰기간(14일)동안 폐사한 mice는 발견되지 않았으며 투여군에 있어 어떠한 행동변화나 외형적 변화가 확인되지 않았다(data not shown). 따라서 KML-C는 경구로 투여될 경우 상당히 안전한 물질로 사료되었다.

한편, 독성시험 과정에 경구를 제외한 모든 투여 경로에서 KML-C 투여에 의해 농도에 의존적으로 극심한 입모현상이 발견되었으며 투여직후 즉사하는 경우와 7일-14일 사이에 폐사하는 경우는 확인되지 않았으며 투여 후 12시간이상에서 5일 사이에서 폐사되는 mouse가 확인되었다.

표 1. The survival of mice injected intraperitoneal with KML-C

| Dose (μ g/kg) | No. of animal | No. of death after administration | | | | | | | Survival rate(%) |
|--------------------|---------------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|--------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7(day) | |
| 200 | 6 | 6 | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 100 | 6 | 5 | 1 | - | - | - | - | - | 0 |
| 50 | 12 | - | 5 | 2 | 4 | - | - | - | 8 |
| 25 | 12 | - | - | 2 | 1 | 2 | 1 | - | 50 |
| 12.5 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 6.25 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |

표 2. The survival of mice injected i.v with KML-C

| Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | No. of animal | No. of the dead after administration | | | | | | | Survival rate(%) |
|-------------------------------------|------------------|--------------------------------------|---|---|---|---|---|--------|---------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7(Day) | |
| 25 | 6 | 1 | 3 | 1 | - | 1 | - | - | 0 |
| 12.5 | 6 | - | - | 1 | 2 | 3 | - | - | 0 |
| 6.25 | 12 | - | - | 4 | 2 | 1 | - | - | 42 |
| 3.12 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 1.6 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 0.8 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |

표 3. The survival of male mice injected s.c with KML-C

| Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | No. of animal | No. of death after administration | | | | | | | Survival rate(%) |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|--------|---------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7(Day) | |
| 100 | 6 | - | - | - | 2 | 4 | - | - | 0 |
| 50 | 6 | - | - | - | 4 | - | - | - | 16.7 |
| 25 | 6 | - | - | - | - | 1 | - | - | 83.3 |
| 12.5 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |

표 4. The survival of female mice injected s.c with KML-C

| Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | No. of animal | Death | | | | | | | Survival rate(%) |
|-------------------------------------|------------------|-------|---|---|---|---|---|--------|---------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7(Day) | |
| 0 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 12.5 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 25 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 50 | 5 | - | - | - | 1 | - | - | - | 80 |
| 100 | 5 | - | - | 1 | 2 | 2 | - | - | 0 |

2) KML-C의 일반약리시험

가) KML-C 투여가 mice의 일반행동에 미치는 영향

25g 내외의 ICR 웅성 mice 에 PBS에 부유시킨 KML-C를 각 군당 6마리의 mice에 20, 10 그리고 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 수준으로 피하를 통하여 주사하고 일반행동의 변화와 외형적 변화 및 체중의 변화를 관찰하였다.

그 결과 극심한 체중의 변화, 행동의 특이함이나 운동성의 변화는 확인되지 않

았으나 주사후 7일이 지나면서 주사부위에 농도에 의존적으로 주사부위의 경화 현상과 더불어 조직의 괴사현상이 확인되다가 시간이 경과하면 회복되는 현상이 관찰됨. 이는 주사부위에 local inflammation에 의한 조직의 손상에 의해 기인된 것으로 사료되었다.

나) KML-C의 일반약리시험

KML-C에 대한 일반약리효과를 조사하기 위하여 KML-C를 피하를 통해 투여하고 30분 후 50mg/kg hexobarbital을 복강을 통해 투여한 뒤 농도에 따른 수면시간을 조사하였다 (표 5). 그 결과 수면 개시시간에는 유의한 영향을 나타내지 않았으나 수면시간은 농도에 의존적으로 단축되는 현상이 관찰되었다. 또한, KML-C를 피하를 통해 투여하고 30분 후, pentylenetetrazole를 100mg/kg 수준으로 복강에 주사한 뒤 경련에 미치는 영향을 조사하였다 (표 6). 그리고 KML-C에 의한 장관 수송능 조사(표 7), 위액 분비능 조사(표 8), 진통효과(표 9)를 조사하였다. 장관수송능을 조사하기 위하여 24시간 절식시킨 mice에 (ICR, 4weeks, male) KML-C를 피하를 통해 투여하고 30분후, charcoal meal (탄소말을 함유한 0.5% CMC) 경구투여하고 30분후에 mice를 희생시킨후 위장관을 적출 탄소말의 이동거리를 측정하였다. 위액 분비능 조사는 KML-C에 의해서 위액에서 분비되는 pH의 변화정도를 알아보고자 측정하였다. 진통효과 조사실험은 KML-C를 주사하고 30분이 경과한 뒤 1% acetic acid를 복강으로 투여하여 진통 효과를 조사하였다.

표 5. Effect of KML-C on hexobarbital-induced sleeping time in mice

| Drug | Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | No. of animal | Mean \pm SD(min) |
|-------|-------------------------------------|---------------|--------------------|
| PBS | 0.9% saline | 7 | 14.2 \pm 4.6 |
| KML-C | 10 | 8 | 11.1 \pm 5.3** |
| | 5 | 6 | 11.9 \pm 5.2* |
| | 2.5 | 6 | 12.8 \pm 6.9 |

** p<0.005 * p<0.05

Æ 6. Effect of KML-C on convulsion induced by pentylenetetrazole

| Drug | Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | No. of animal | convulsion | | Mortality |
|---------|-------------------------------------|------------------|------------|-------|-----------|
| | | | clonic | tonic | |
| control | 0.9% saline | 7 | 7 | 7 | 6 |
| KML-C | 10 | 7 | 7 | 7 | 5 |
| | 5 | 7 | 7 | 6 | 5 |
| | 2.5 | 7 | 7 | 6 | 4 |

Æ 7. Effect of KML-C on intestinal propulsion in mice

| Drug | Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | No of animal | Propulsion(%) |
|---------|-------------------------------------|--------------|-----------------|
| Control | 0.9% saline | 6 | 49.5 \pm 17.9 |
| KML-C | 10 | 8 | 54.2 \pm 13.8 |
| | 5 | 10 | 51.6 \pm 10.9 |
| | 2.5 | 8 | 50.3 \pm 12.9 |

Æ 8. Effect of KML-C on gastric secretion in mice

| Drug | Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | No. of animal | pH | Volumn(ml) |
|---------|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| control | 0.9% saline | 7 | 1.6 \pm 0.2 | 5.8 \pm 1.2 |
| KML-C | 10 | 5 | 1.5 \pm 0.3 | 6.1 \pm 2.1 |
| | 5 | 5 | 1.4 \pm 0.2 | 7.1 \pm 2.4 |
| | 2.5 | 5 | 1.4 \pm 0.2 | 6.1 \pm 2.3 |

표 9. Effect of KML-C on writhing syndrom induced by acetic acid

| Drug | Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | No of animal | Writhing |
|---------|-------------------------------------|--------------|-----------------|
| Control | 0.9% saline | 13 | 25.4 \pm 6.8 |
| KML-C | 10 | 8 | 27.1 \pm 6.6 |
| | 5 | 9 | 30.5 \pm 5.7 |
| | 2.5 | 10 | 31.8 \pm 12.8 |

다. Toxin 분획에 대한 독성 시험

Toxin 분획에 대한 독성은 생리식염수에 부유시킨 toxin 분획을 피하를 통해 주사하고 주사후 7일간 실험동물의 폐사유무를 조사하였다. 4, 2mg/kg에서는 모두 폐사하였으며 1mg/kg 농도에서는 절반이 폐사하였으며 그 이하의 농도에서는 모두 생존하여 LD₅₀은 1mg/kg 인 것으로 나타났다. 특히 VT의 경우, 폐사농도에서는 mouse에서 대단히 급진적이고 발작성이 있어 아마도 중추신경계에 영향을 줄 것으로 판단되며 산업화를 위한 제품의 개발시 toxin 성분의 오염여부를 확인하여야 할 것으로 보인다.

표 10. The survival of mice injected s.c. with VT

| (mg/kg) | No. of animal | Death after administration | | | | | | | Survival rate(%) |
|---------|---------------|----------------------------|---|---|---|---|---|--------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7(Day) | |
| Saline | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 4 | 6 | 6 | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 2 | 6 | 6 | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 1 | 6 | 3 | - | - | - | - | - | - | 50 |
| 0.5 | 6 | 1 | - | - | - | - | - | - | 83.3 |
| 0.25 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |

라. Heparin binding 분획(HP)에 대한 급성독성시험

HP에 대한 급성독성은 5, 2.5, 1.25 mg/kg의 용량을 mouse의 피하를 통해 주사하였으며 5mg/kg 에서는 주사후 1시간 이내에 모두가 폐사하였고, 2.5mg/kg에서 1마리만이 주사후 1시간이내에 사망하여 5-2.5mg/kg 사이에서 LD₅₀ 이 나타났다. 그리고 HP 역시, 폐사농도에서는 mouse에서 대단히 급진적인 경향을 보여 아마도 중추신경계에 영향을 줄 것으로 사료되었다.

표 11. The survival of mice injected s.c. with HP

| Dose (mg/kg) | No. of animal | Death after administration | | | | | | | Survival rate(%) |
|--------------|---------------|----------------------------|---|---|---|---|---|--------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7(Day) | |
| Saline | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 5 | 6 | 6 | - | - | - | - | - | - | 0 |
| 2.5 | 6 | 1 | - | - | - | - | - | - | 83.3 |
| 1.25 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | 100 |

마. 제품의 표준화를 위한 유효용량 고찰

이상의 독성시험 결과와 2과제의 활성 시험결과를 종합해 볼 때 투여경로를 피하로 고려할 때 KML-C의 경우 면역증강 활성을 나타내기 위해서는 mouse에서 최소 250ng/kg의 농도가 요구되며 mouse의 생존에 영향을 주지 않는 농도는 12.5-25 ug/kg 사이인 것으로 보인다. HP는 mouse에서 125µg/kg이하에서 생존에 영향을 주지 않는 농도로 보이며 VT의 경우는 500µg/kg 정도의 용량이 mouse에 대해 안전한 농도인 것으로 보인다. 독성용량에서의 mice 폐사형태는 KML-C를 투여하였을 경우에는 주사후 극심한 입모현상이 동반되면서 3-4일 후에 폐사하는 반면, HP와 VT에 대해서는 주사직후 급작스런 폐사가 나타나는 경향을 보였다. 한편, HP의 경우 면역활성증강이 확인되었으나(제2과제 실험결과) 활성을 나타내는 농도에서 심각한 조직손상이 확인되었고, KML-C에 비해 상대적으로 그 활성이 떨어지고, 활성을 지니는 용량 또한 상대적으로 많은 양이 요구되는 것으로 보여 HP와 VT의 경우 제품화에 오히려 불리하게 작용할 것으로 보였다.

○ 3차년도 (2001)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|--------------|-------|------------|
| 한동대학교 생의학연구소 | 김중배 | 25,000,000 |

가. 시료의 표준화를 위한 test

1,2차년도 연구에서 겨우살이 내의 활성물질인 렉틴의 정량법을 개발한 바 있다. 따라서 이를 아용 원재료의 균질성을 조사하고 표준화 조건을 확립하기 위해 매월 채취시기 와 숙주가 다른 겨우살이 내의 활성물질인 렉틴 함량의 함량을 2차년도에 확립된 sandwich ELISA법을 이용하여 조사한 결과 계절별로는 여름철 렉틴의 함량이 낮게 나타나고 겨울철과 봄에는 높게 나타나는 것으로 조사되었다 (그림 1). 또한 숙주에 따른 렉틴의 함량은 돌배, 대추, 밤, 벚, 미루, 모과, 배의 8가지 숙주에서 조사를 하였다. 그결과 숙주별 렉틴의 함량은 돌배,대추,밤, 벚나무가 모과나 배에 비해서 높은 함량을 보였다 (그림 2).

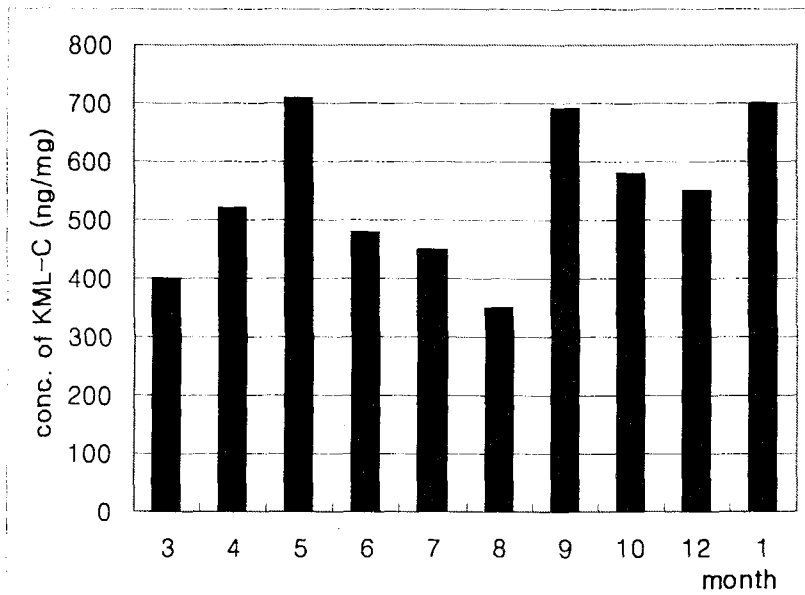


그림 1. 계절별 렉틴의 함량변화 조사

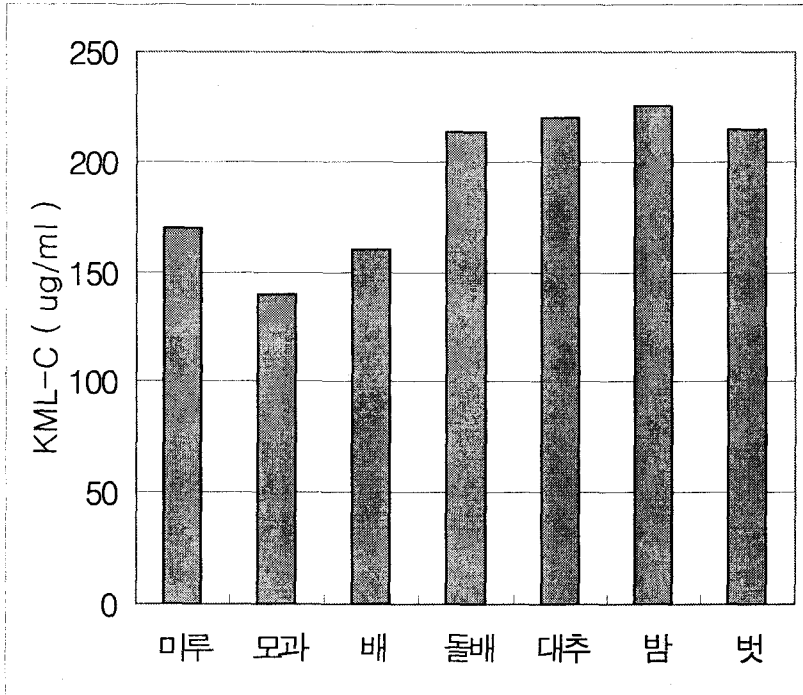


그림 2. 숙주에 따른 렉틴 함량 차이 조사

나. KM-110 과 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant 의 개발 및 활성조사

1) Alum에 혼합한 형태로서 면역증강활성조사

지금까지 adjuvant 중에서 상대적으로 안전성이 확보되어 인간에 적용할 수 있는 adjuvant인 alum 에 KM-110과 KML-C를 혼합하여 항원(KLH)과 함께 2주간격으로 2회 피하를 통해 투여하고 2차 투여 1주후에 각 group별로 혈액을 수집하여 Serum내의 항원 특이항체에 대한 역가조사와 항원의 subclass 조사하여 Alum만을 adjuvant로 사용한 group와 비교하고 항원 특이적 항체의 역가 상승에 synergistic 효과가 있는지 여부를 조사하였다. 그 결과 alum과 KML-C 혹은 KM-110을 항원과 같이 섞은 그룹에서 synergistic effect는 발견할 수 없었으나 유의성 있는 결과는 얻을 수 있었다. 따라서 alum과 KML-C혹은 KM-110을 혼합한 adjuvant로서의 효과는 그다지 크지는 않지만 유의성 있는 증가를 보였다 (그림 4).

전반적으로 항체의 titer는 증가하는 경향을 보였고 8주이후에는 동일한 경향을 보이다가 감소하는 형태를 나타내었다(그림 3).

Alum과 혼합한 adjuvant

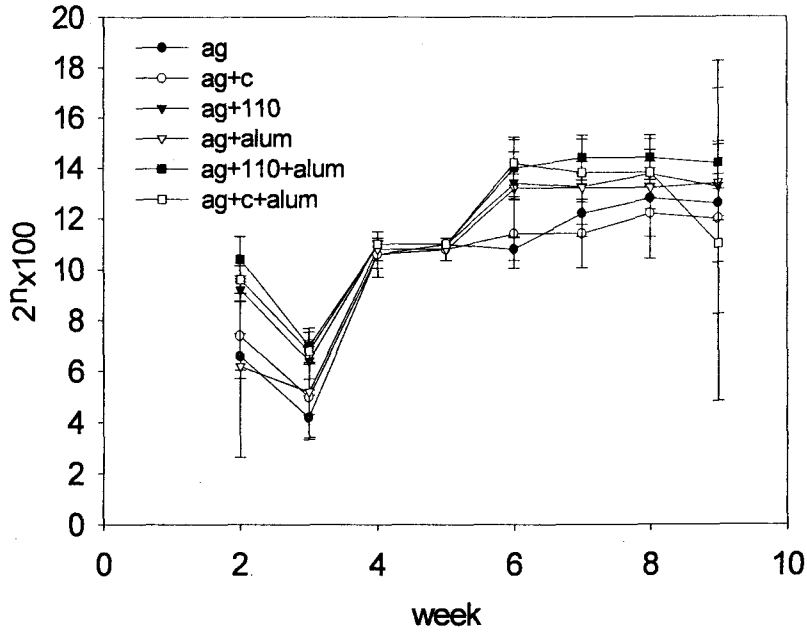


그림 3. alum과 혼합한 상태의 adjuvant 효과

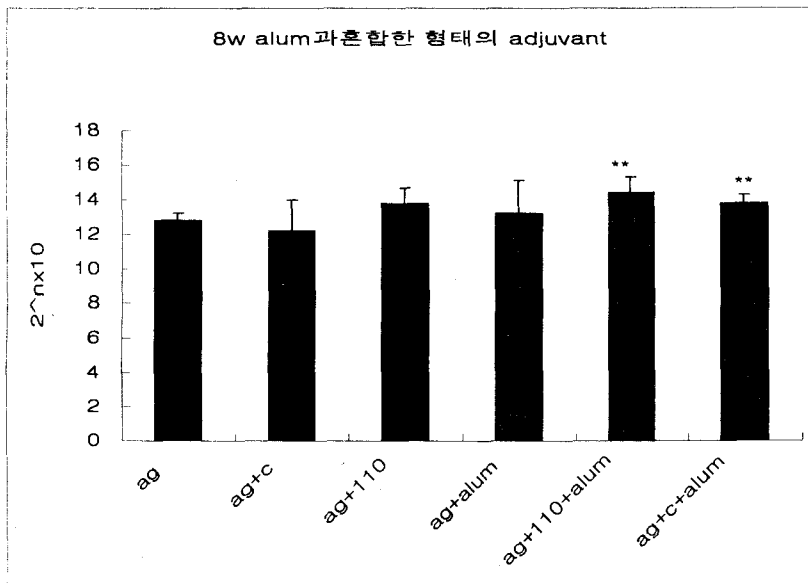


그림 4. 8주째 항체 titer 비교

2) Oil과 혼합된 형태로서의 면역증강활성조사

2차년도에서 squalene과 혼합시 KML-C가 adjuvant 효과를 지닐수 있음을 확인한 바 있다. 따라서 이러한 squalene과 다양한 농도의 KM-110혹은 KML-C를 혼합된 형태를 adjuvant로 사용하여 항원(KLH; 20ug/mouse)과 함께 mice에 2주간 격으로 2차에 걸쳐 면역하고 항원 특이적인 항체 역가를 조사하고 최적농도를 확인하였다 (그림 5,6). 이를 위해서 KM-110의 경우 100ug/head, 10ug/head, 1ug/head로 희석하여 최적농도를 결정하였고 (100ug/head), KML-C의 경우에는 50ng/head, 5ng/head, 0.5ng/head로 희석하여 최적농도를 결정하였다 (50ng/head). Squalene과 혼합한 상태의 항체 titer가 항원 단독으로 주사한 경우보다 높기는 하였으나 기존에 사용되는 FCA와 비교하였을 경우에는 그다지 좋은 효과를 나타내지 못하였다 (그림 7).

체액성 면역 증강효과를 확인하기 위하여 지연성 과민반응 (delayed type hypersensitivity ;DTH)의 유도 여부를 조사하였다. 이를 위하여 KML-C와 KM-110에 대해서 다양한 농도로 실시하였다. KML-C의 경우 항원 KLH에 대해서 KML-C 50ng/mouse, 5ng/mouse, 0.5ng/mouse로 각각 injection하였으며 (그림 8), KM-110의 경우는 100ug/mouse, 10ug/mouse, 1ug/mouse로 각각 injection하였다(그림 9).

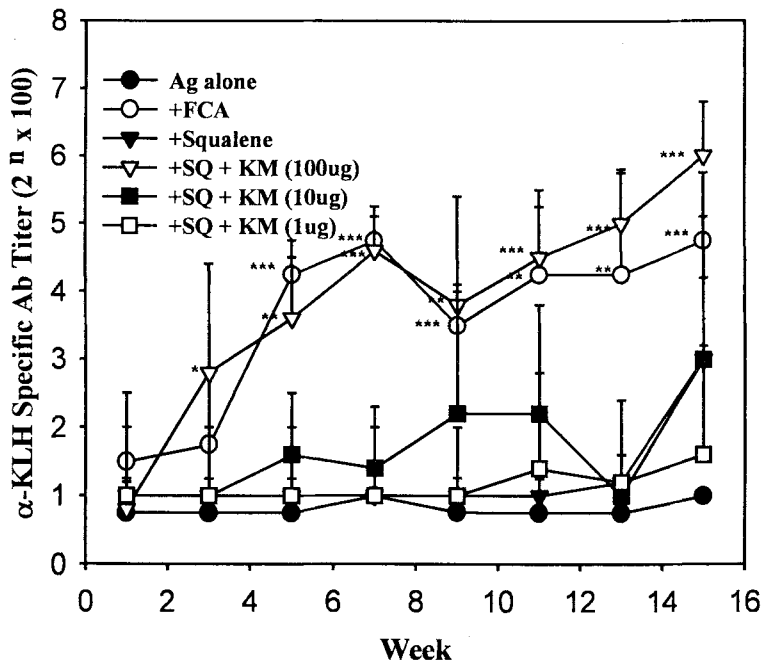


그림 5. KM-110과 Squalene의 혼합 adjuvant 농도결정

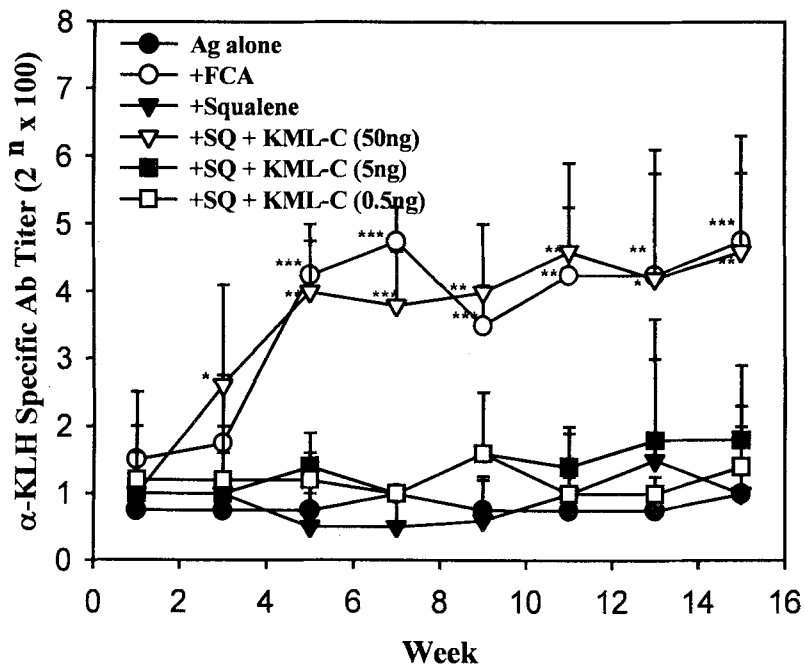


그림 6. KML-C와 Squalene의 혼합 adjuvant 농도결정

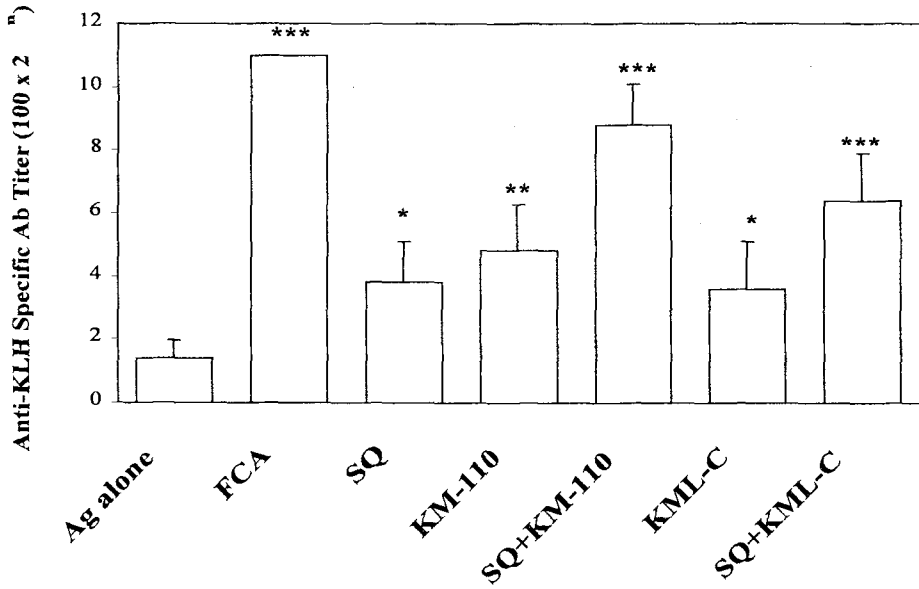


그림 7. 최적농도 KM-110 (100ug/mouse)과 KML-C (50ng/mouse)와의 혼합 adjuvant

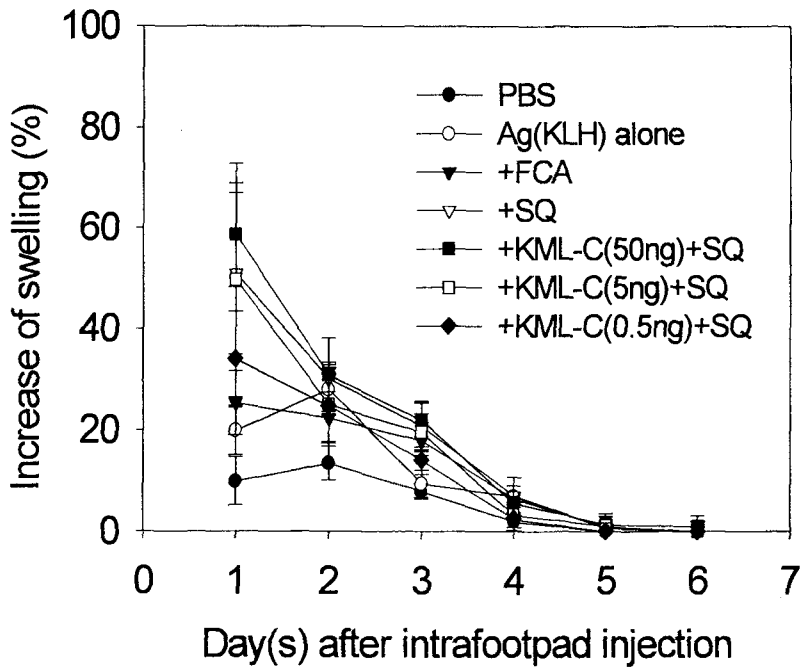


그림 8. KML-C에 대한 DTH

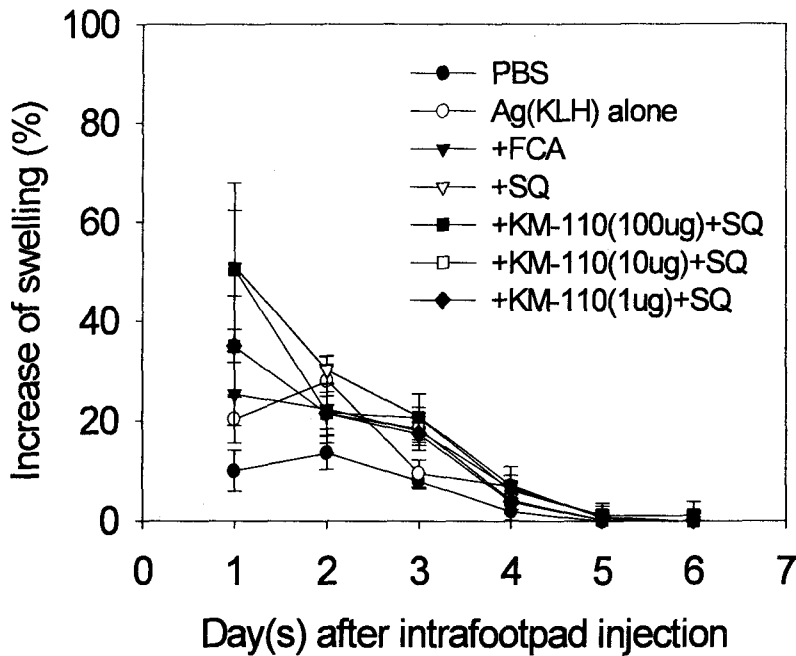


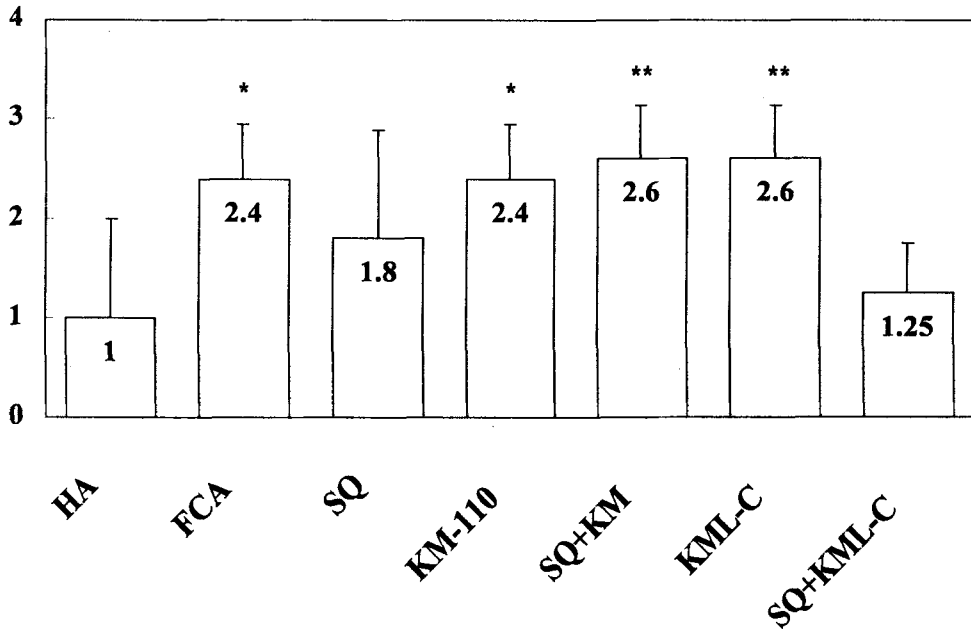
그림 9. KM-110에 대한 DTH

다. 임상적 의미를 갖는 항원들에 대한 특이적 면역증강능 조사

1,2차년도 연구결과에서 나타난 KM-110 과 KMI-C의 항원에 대한 항체 titer상승효과가 실제 임상항원들에게도 유효한 효과를 지니는지의 여부를 조사하였다.

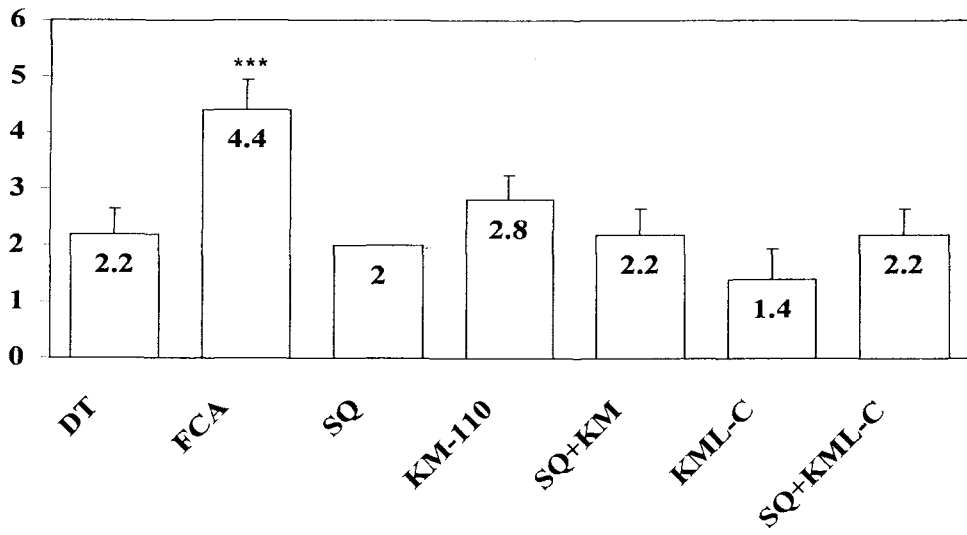
이때 사용되는 항원은 Hepatits B Pre-s region, Diphteria toxin, 그리고 Influenza agglutinin이며 KM-110 혹은 KML-C와 함께 mice에 면역하고 5주-7주에, 항원에 특이적인 항체의 역가를 indirect ELISA 법을 통해 조사하여 이들 임상항원에 대한 KM-110과 KML-C의 체액성 면역증강 활성을 조사하였다. 이를 위하여 DT항원은 1.5ug/mouse, HA항원은 0.3ug/mouse, HBsAg항원은 2ug/mouse로 하여 각각 KML-C 50ng/mouse, KM-110 100ug/mouse로 섞어서 비교하였다. 주사는 primary injection후 2주후에 booster injection을 실시하였고 항체가 조사는 5주차 serum을 취하여 실시하였다.

그 결과 각종임상적 의미를 갖는 항원들에 대해서 DT를 제외한 나머지 항원에 대해서 KML-C와 KM-110을 혼합하였을 경우 FCA보다 높거나 거의 비슷한 수준의 항체가를 나타내었다. DT의 경우에는 FCA에 비하여 높은 항체가를 보이지 못하였다 (그림 10,11,12).



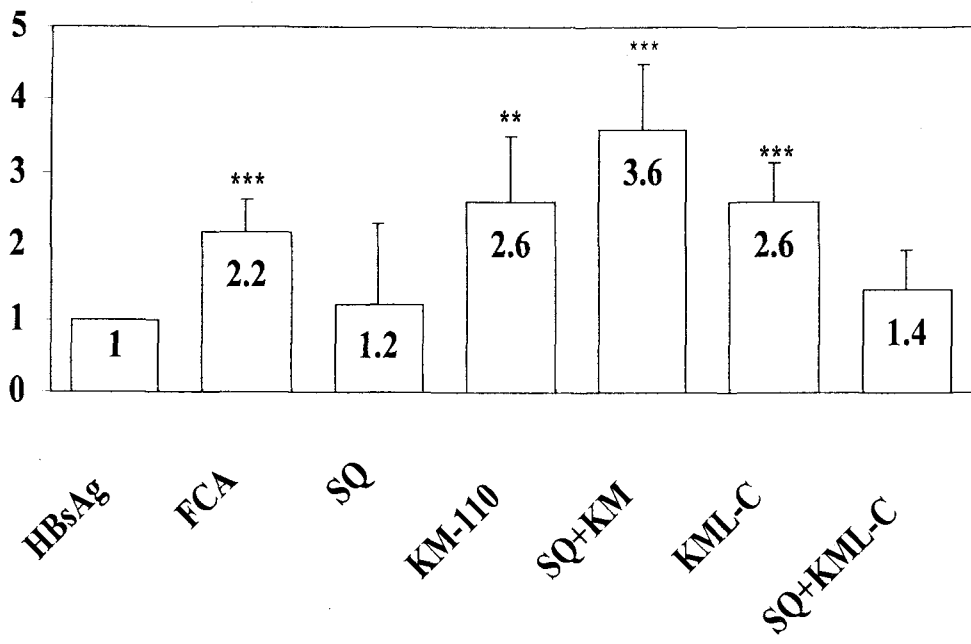
* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

그림 10. HA 항원과 혼합한 adjuvant



* p < 0.05 ** p < 0.05 *** p < 0.005

그림 11. DT항원과 혼합한 adjuvant



* p < 0.05 ** p < 0.005 *** p < 0.0005

그림 12. HBsAg 항원과 혼합한 adjuvant

라. 시료의 안전성 시험

전년도 연구를 통해 mice에 대한 독성시험과 일반약리 시험을 완료하였으나, 좀 더 명확히 시료의 안전성을 확보하고자, 유효한 adjuvant효과가 인정된 농도의 KM-110 혹은 KML-C를 투여하고, 투여 1주, 2주, 4주후에 mice를 희생하여 주사부위 및 주요실질장기 (폐, 간, 신장, 위)들에 대한 병리조직검사를 실시하여 안전성여부를 조사하였다. 이를위해 Balb/c mouse, male을 준비하여 group당 3마리로 하여 PBS, KML-C 50ng/mouse, KM-110 100ug/mouse로 하여 주사한 뒤 2주뒤에 booster injection을 실시하고 1주, 2주, 4주에 주요실질장기를 병리조직학적인 분석을 하였다.

1차 조직 검사결과 실험하는 동안 추석연휴 관계로 동물관리의 문제점으로 신뢰할 만한 결과를 얻을수가 없어 새로이 재 실험을 하였으며 재실험시에는 group당 2마리로 하여 실험을 실시하였다. 2차 재실험 결과, 간조직의 경우 control mouse에서 조직에 병변 및 공포현상이 관찰되었으며 salmonella균에 의한 변성현상들이 관찰되었다 (그림 13,14,15,16,). 이러한 현상은 시간이 지나감에 따라서 심하게 되는 양상을 보였다. 이는 실험에 사용한 동물의 상태가 좋지 않았던 이유라 생각되며 이미 salmonella균과 같은 세균에 감염된 mouse였던 것으로 사료된다. KML-C의 접종군의 간에서는 중심성조직 변성현상이 관찰되었고 (그림 17), KM-110의 접종군에서는 2주째에 vacuolar degeneration현상이 관찰되었다 (그림 18). 또한 4주가 되면서 vacuolar degeneration현상이 diffuse되었으며 (그림 19), 4주째 40x10으로 관찰한 간의 조직에서는 호산성 핵내 봉입체가 관찰되었다. 이는 주사한 시료와는 무관한 현상으로 사료되며 바이러스에 감염된 것으로 보인다 (그림 20). 신장의 경우 전반적으로 충혈되는 경향이 보였으며 control의 경우에도 병변현상이 관찰되었다 (그림 21). KML-C를 주사한 접종군에서는 1주째와 2주째 별다른 사항은 없었으나 조직이 약간 충혈되는 현상이 있었고, KM-110의 접종군에서는 1주와 4주를 관찰한 결과 역시 충혈현상이 관찰되었다 (그림 22,23,24,25). 폐의 경우 정상과 주사한 접종군에서 큰 차이를 보이지는 않으나 KML-C와 KM-110 접종군에서 약간의 충혈현상이 관찰되

었다 (그림 26,27,28). 위의 경우는 정상적으로 아무런 이상현상이 관찰되지 않았다 (그림 29,30). 결론적으로, 실험에 사용한 mouse자체의 문제가 있어 확실한 결론을 얻을 수 없었지만 그러나 control에 비해 특기할만한 병변현상이 관찰되지 않았기 때문에 조사한 겨우살이 추출물 KM-110이나 이로부터 분리한 lectin성분, KML-C가 심각한 병리적 현상을 야기시키지는 않는 것으로 평가된다.

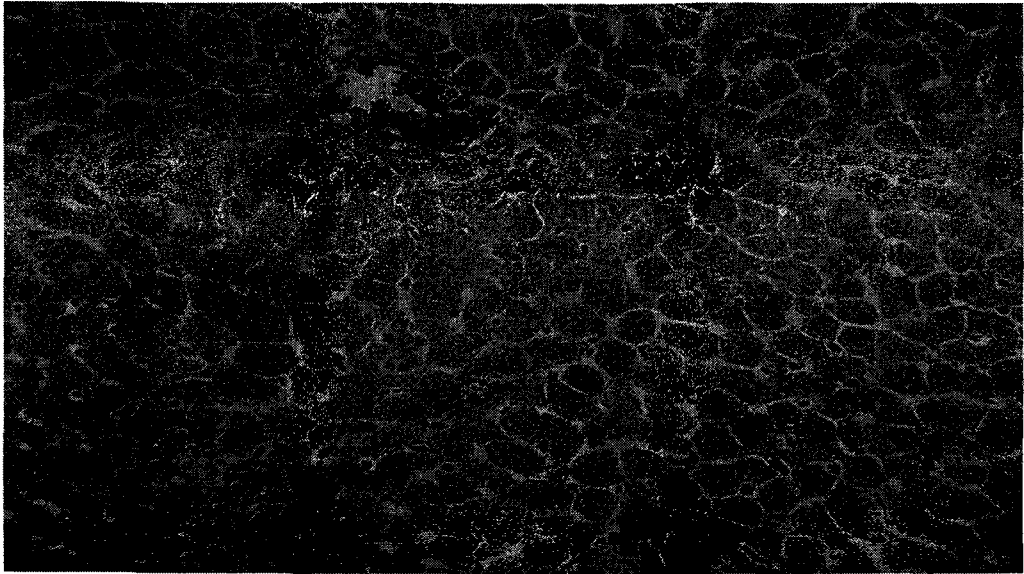


그림 13. Control liver; microgranuloma, 1주째, 20X10

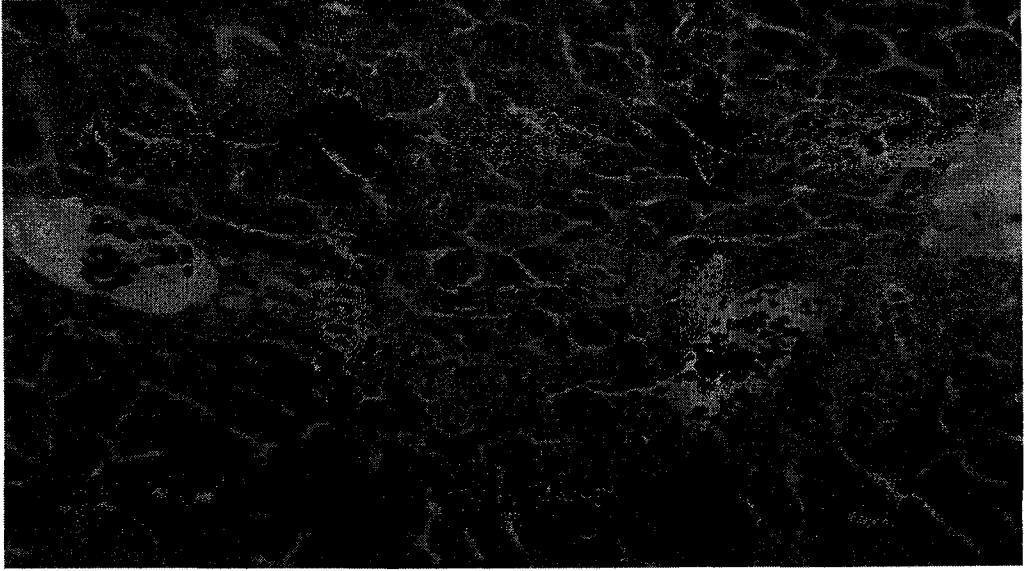


그림14. Control liver; microgranuloma, 2주째, 20X10

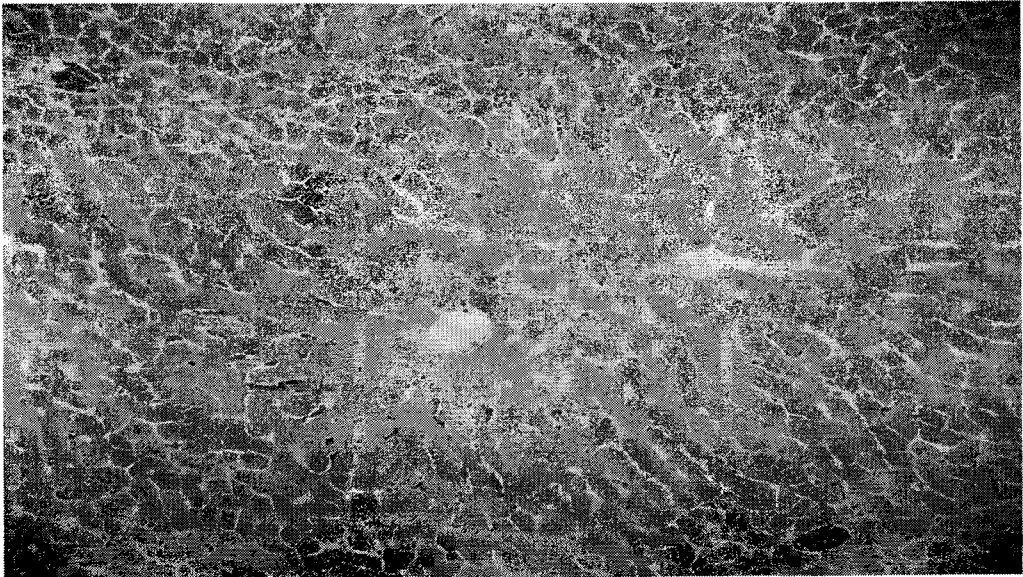


그림15. Control liver; slight centrilobular degeneration, 4주째, 10X10

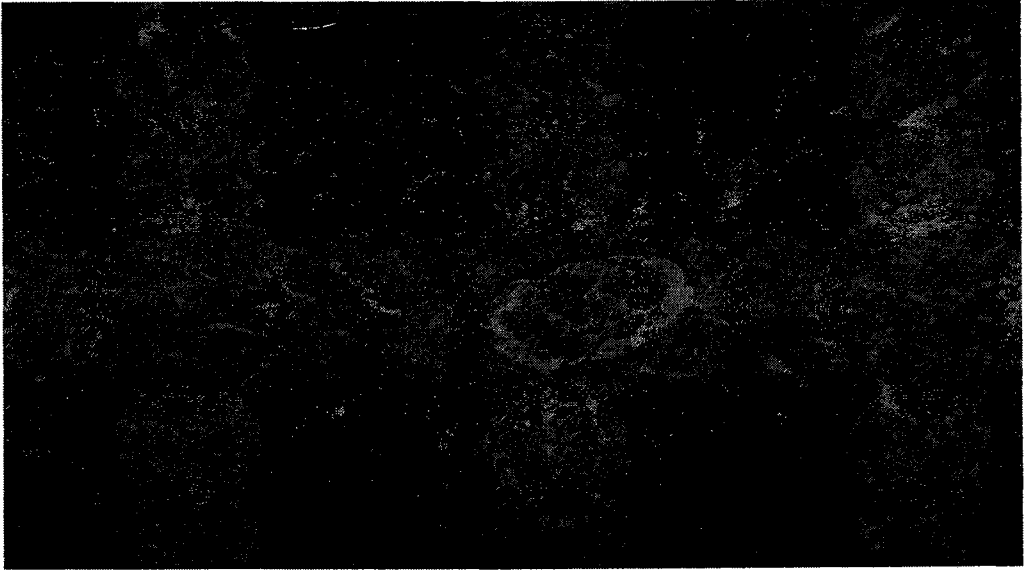


그림 16. Control liver; centrilobular vacuolation, 4주째, 20X10



그림 17. KML-liver; centrilobular degeneration, 2주째, 10X10

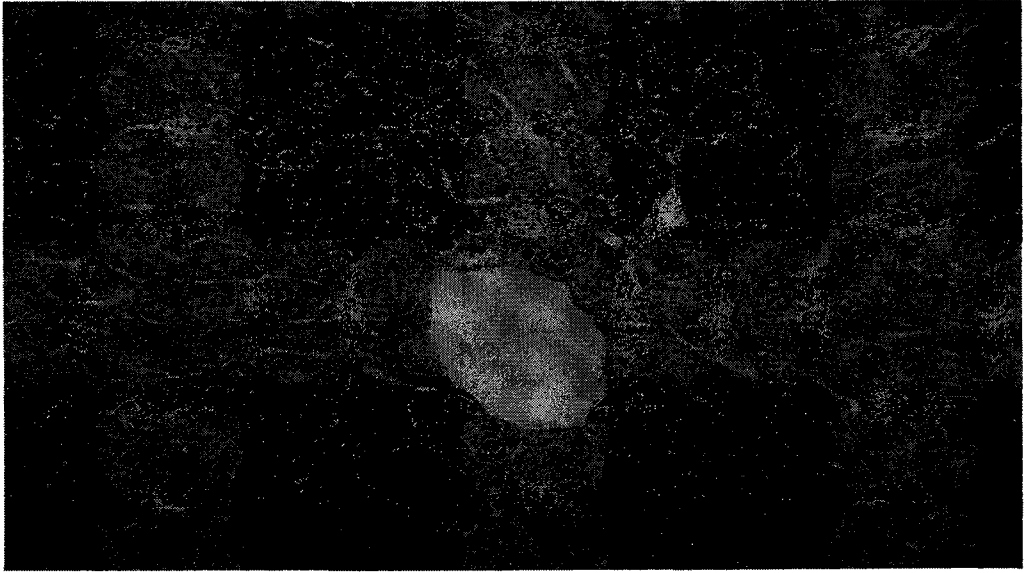


그림18.KM-liver;vacuolar degeneration, 2주째, 10X10



그림 19. KM-liver; diffuse vacuolar degeneration. 4주째, 20X10

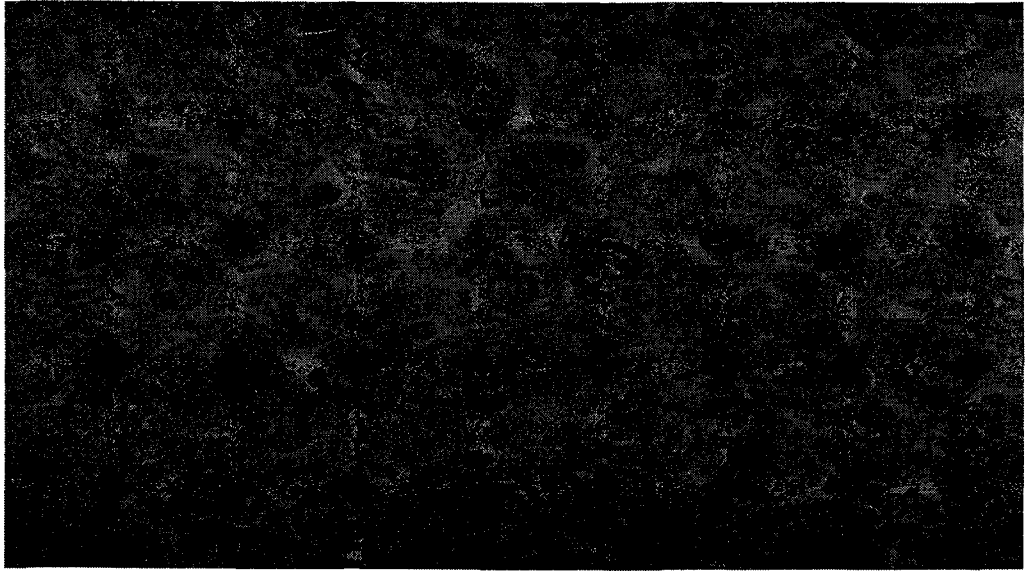


그림 20. KM-liver; eosinophilic intranuclear inclusion, 4주째, 40X10

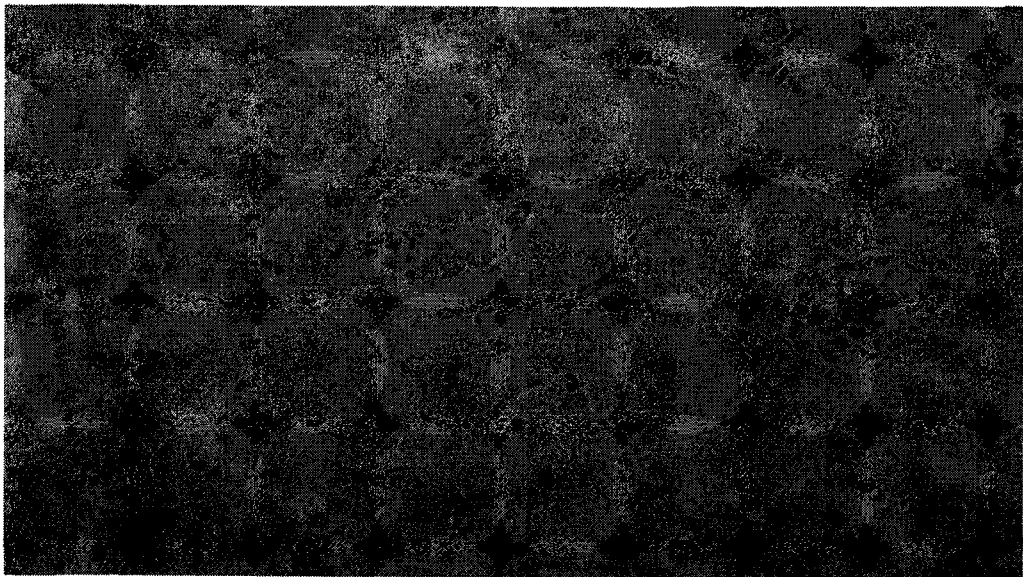


그림 21. Control kidney; normal structure, 2주째, 20X10

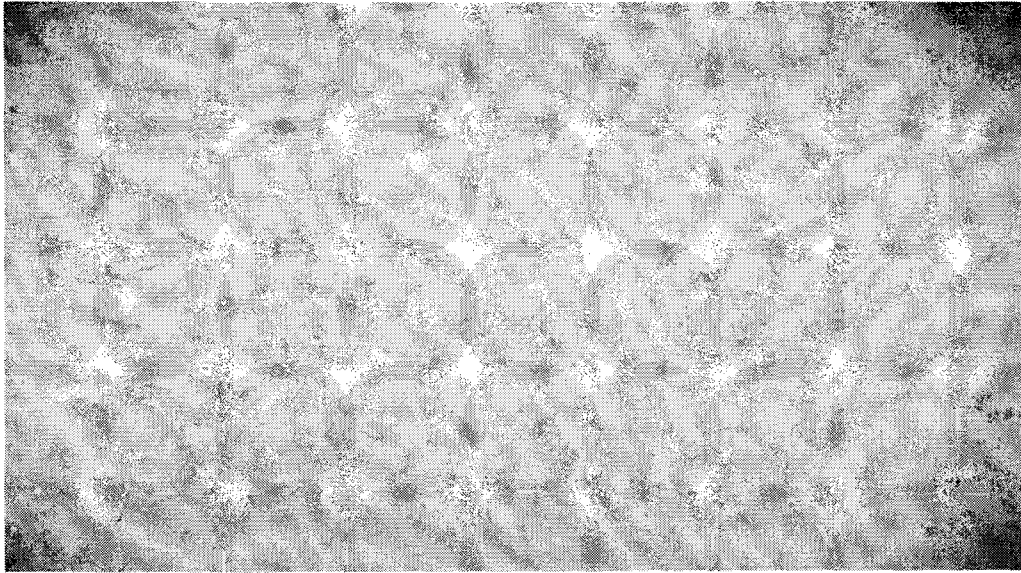


그림 22. KML-kidney; slightly congested, 1주째, 10X10

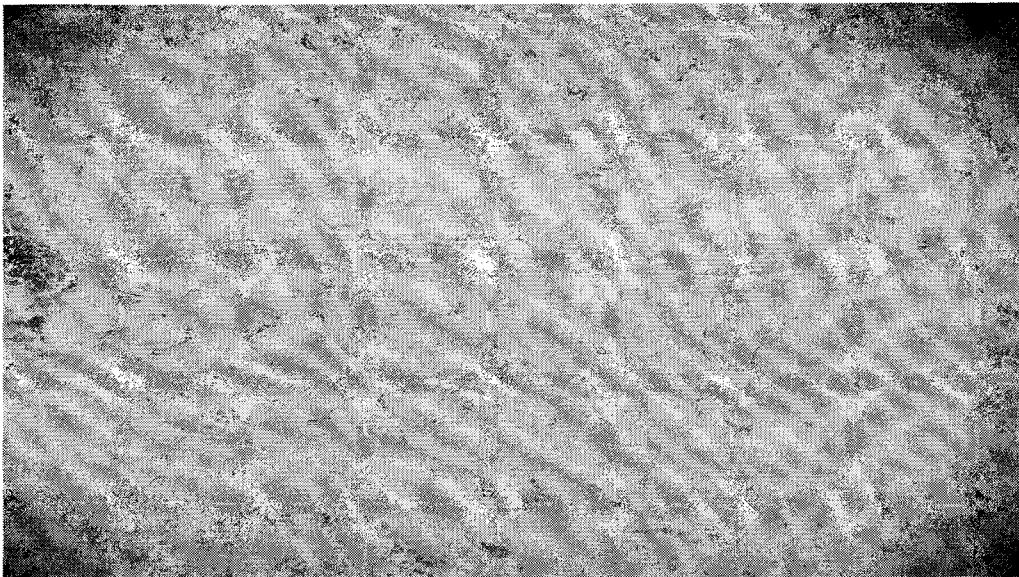


그림 23. KML-kidney; slightly congested, 2주째, 10X10



그림 24. KM-kidney; slightly congested, 1주째, 10X10

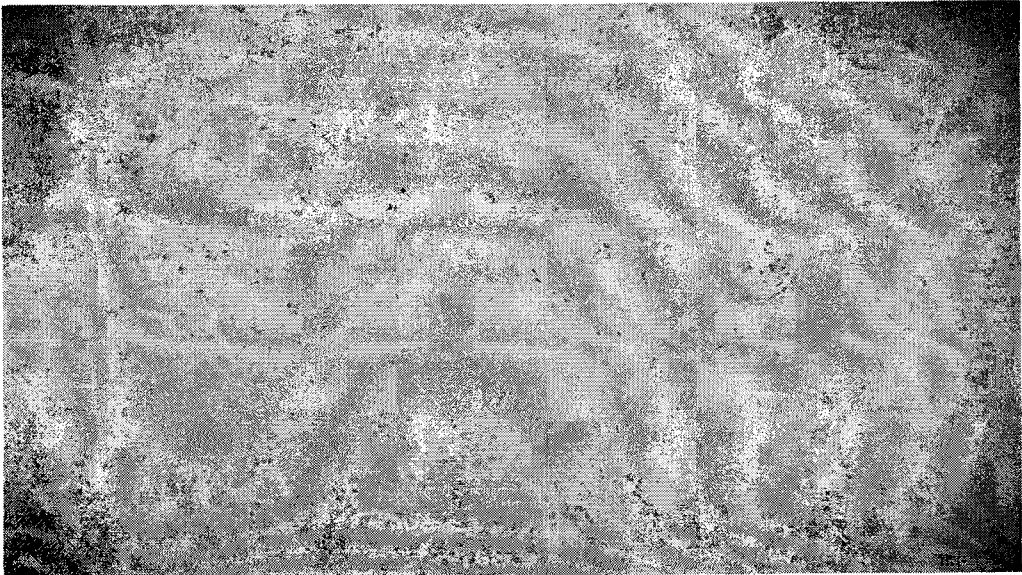


그림 25. KM-kidney; slightly congested, 4주째, 10X10

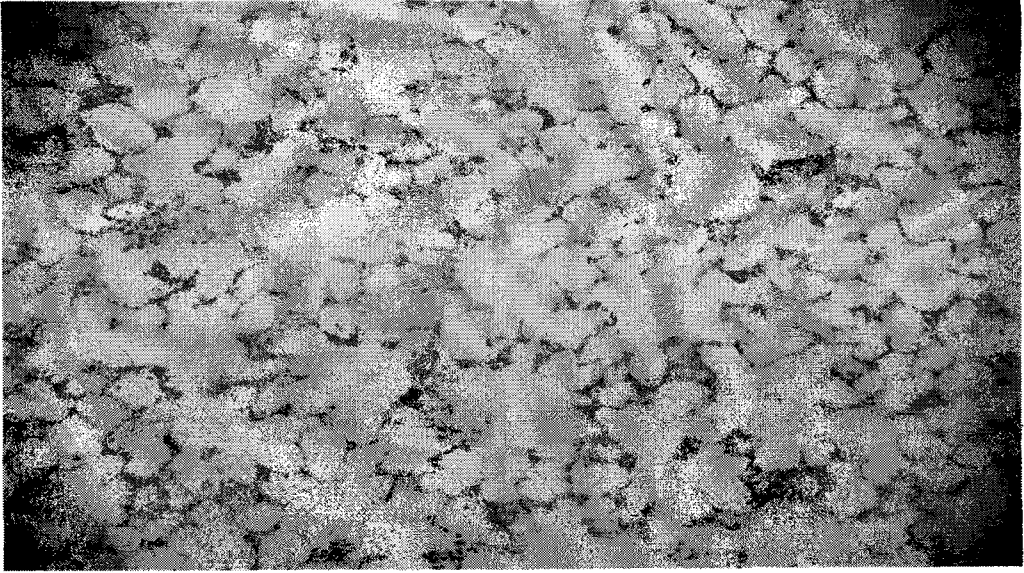


그림 26. Control-lung; normal structure, 2주째, 10X10

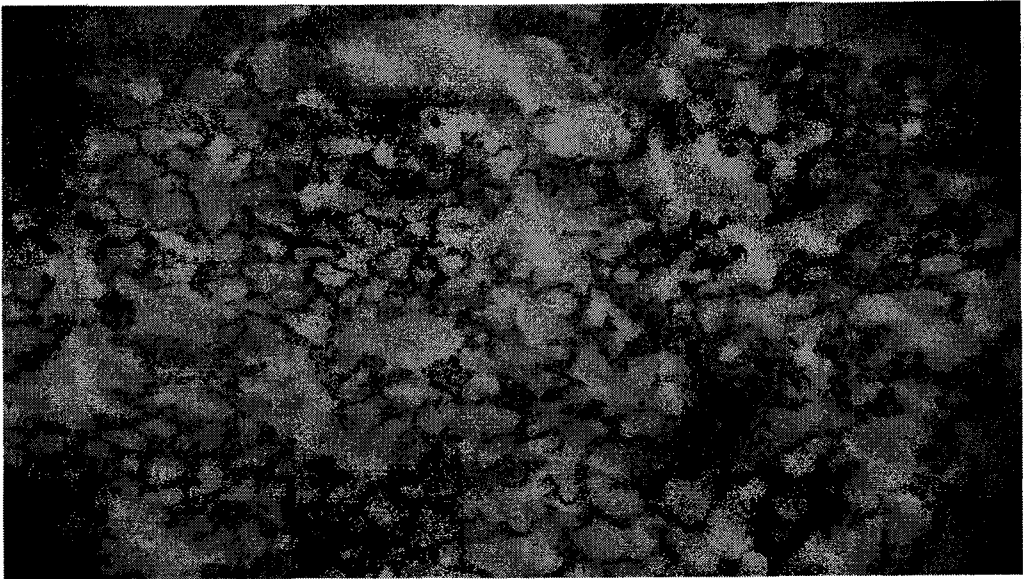


그림 27. KML-lung; congested, 4주째, 10X10

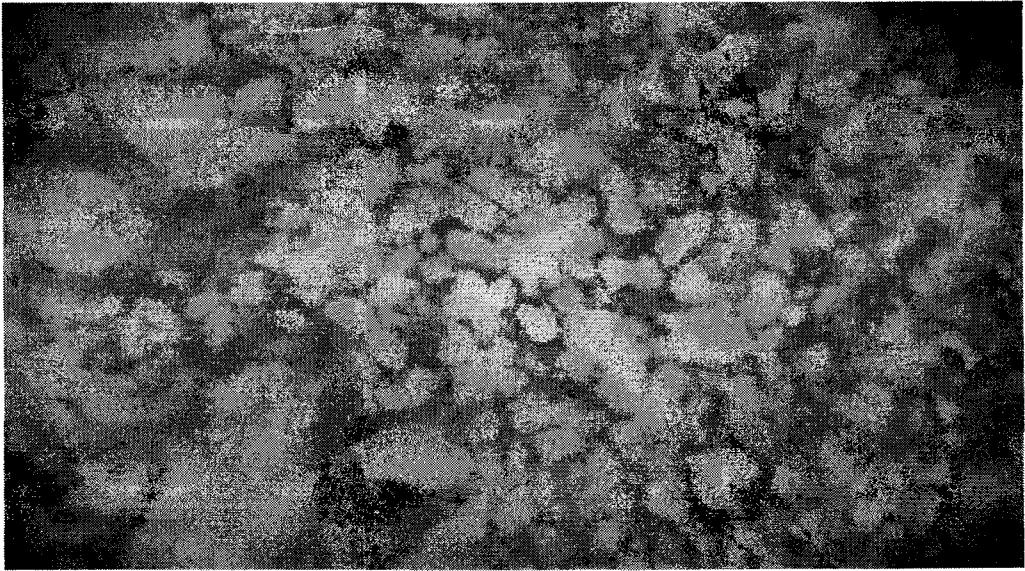


그림 28. KM-lung; slightly congested, 2주째, 10X10



그림 29. KML-stomach; normal structure, 2주째, 10X10

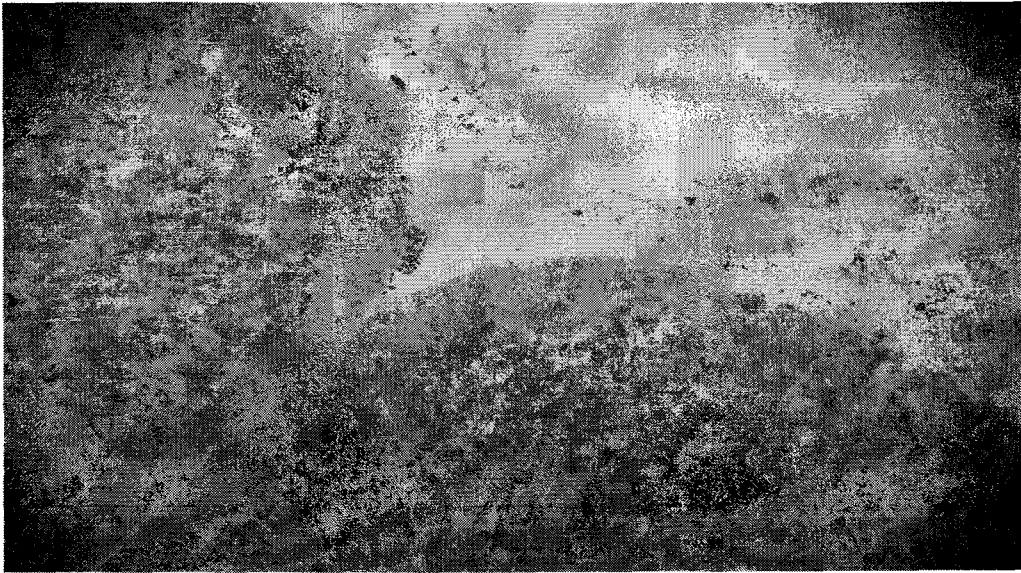


그림 30. KM-stomach; normal structure, 4주제, 10X10

마. 겨우살이내 toxin분획에 대한 정량조건 확립

2차년도 연구에서, 겨우살이내의 독성분획에 대한 면역분석법 개발이 기술적으로 용이하지 않음을 확인 한 바 있다. 따라서 3차년도에서는 HPLC를 이용한 고효율 column을 통해 겨우살이내의 toxin 분획에 대한 정량조건확립을 실시할 예정이었으나 조건실험 및 standard curve에 대한 조건을 확립하는 과정에서 standard로 사용할 수 있는 control이 없었고 한국산 겨우살이에 대한 정확한 조건을 잡기에는 문헌적으로도 한계가 있어 많은 애로사항들이 있어 완성을 하지 못하였다. 추후 계속해서 진행할 예정이다. 현재로서는 ELISA를 통한 방법으로 Q.C(quality control)를 수행하고 있다.

제 2 절 제 2 세부과제

1. 세부과제 목표 및 내용 (책임자 : 1,2차년도 송병두, 2,3차년도 이관희)

| 목표 | 내용 및 범위 |
|---|---|
| <p>·추출물 및 구성 신규물질 의 면역자극 활성화 조사</p> | <p>1. In vitro에서 면역담당세포에 미치는 활성화</p> <p>1) 정상세포에 미치는 활성화</p> <p>2) mitogen에 대한 반응성 조사</p> <p>2. Macrophage 활성화 조사 ; cytokine의 유도능 측정</p> <p>3. 항원 비특이적 방어효과 조사</p> |
| <p>·면역증강 활성화의 조사</p> <p>1) Lectin에 의한 활성화 조사</p> <p>2) 표준화된 시료에 의한 활성화 조사</p> | <p>1. 체액성 면역기능 조사</p> <p>1) 항원의 면역과 혈청의 수집</p> <p>2) 항체의 역가 및 subisotype결정</p> <p>3) Lymphocyte 자극 실험</p> <p>4) Cytokine의 유도분비 조사</p> <p>2. 세포성 면역기능 조사</p> <p>1) 지연성과민반응의 측정</p> <p>2) 세포독성 T-세포의 활성화 측정</p> <p>3. 항원 특이적인 방어효과 조사</p> |
| <p>· 경구 투여용 vaccine adjuvant 의 가능성 조사</p> | <p>1. KM-110과 KML-C의 경구 급성 및 아급성 독성조사</p> <p>1) KM-110의 mice에서의 급성 및 아급성독성</p> <p>2) KML-C의 mice에서의 급성 및 아급성독성</p> <p>2. KM-110의 경구백신용 adjuvant로서의 가능성 조사</p> <p>1) Serum 과 장내의 항원특이항체역가 증강 효과 조사</p> <p>2) 항원 특이항체의 isotype 조사</p> <p>3) 항원 특이항체의 subclass 조사</p> <p>4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine 유도능 조사</p> <p>3. KML-C의 경구백신을 위한 adjuvant로서의 가능성조사</p> <p>1) Serum 과 장내의 항원특이역가 증강효과 조사</p> <p>2) 항원 특이항체의 isotype 조사</p> <p>3) 항원 특이항체의 subclass 조사</p> <p>4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine유도능 조사</p> |

2. 연구개발 방법

o 1차년도 (1999)

가. 목표: 추출물 및 구성 신규물질의 면역자극 활성 조사

제 1 세부과제에서 연구된 겨우살이 추출물 및 분획 각각의 면역자극 활성을 조사토록 한다. 본 연구 목표인 백신 adjuvant의 개발을 위하여 각 분획물의 면역자극 활성을 조사하는 것은 차후 표준화된 adjuvant의 개발을 위한 기초연구로서 중요한 의미가 있다고 사료된다. 따라서 1차년도에서는 주로 분획 각각의 macrophage의 자극능을 in vitro에서 조사하고, 각 분획에 의한 in vivo에서의 항원 비특이적 방어효과는 실험동물로 마우스를 이용하여 항원(예; B. bronchiseptica DNT 혹은 세균: B. bronchiseptica)을 공격접종 후 생존율을 조사하거나 B16-BL6 melanoma 혹은 colon 26-M3.1 lung carcinoma 세포주를 이용하는 동물 실험모델에서의 항종양 활성을 조사토록 한다.

나. In vitro에서 면역담당세포에 미치는 활성의 조사

1) 정상세포에 미치는 활성

마우스에서 면역담당세포인 비장세포를 취하여 in vitro에서 각 분획을 첨가하여 배양 후 정상세포에 미치는 영향을 조사한다. 세포의 활성 화 및 직접독성 효과는 시료와의 배양 후 XTT 용액을 첨가하여 세포의 증식 및 독성 효과를 측정토록 하며 대조군으로는 조 추출물을 사용토록 한다.

2) 면역관련 세포의 mitogen에 대한 반응성 조사

각 분획이 성숙된 면역 세포인 lymphocyte의 증식에 관여하는 mitogenic response가 있는지 조사한다. 비장세포를 세포배양 plate의 각 well에 plating하고

T- 및 B-세포에 특이적으로 반응하는 Con-A 및 LPS를 첨가하고 동시에 각 분획을 첨가하여 mitogen의 활성을 증진시키는 synergistic activity가 유도되는지를 조사한다. 각 세포의 증식정도는 XTT assay를 실시한다.

다. Macrophage로부터 cytokines의 유도분비 조사

Thioglycollate를 주사한 마우스로부터 복강내 세포(peritoneal exudative cells; PEC) 혹은 clone화된 macrophage dls RAWtpvh를 이용하여 각 분획의 직접 macrophage의 자극에 의한 cytokines의 유도능을 조사한다. 실험방법으로는 수집한 macrophage를 24 well culture plate에서 배양하여 macrophage를 고정 후, 여러 농도로 조정된 각 시료를 첨가하여 macrophage를 자극한다. 시료로 자극된 macrophage 배양상등액에 유도, 분비된 각 cytokine(TNF- α , IL-1, IFN- γ , IL-6)을 cytokine 측정용 ELISA kit 혹은 bioassay를 통하여 조사한다.

o TNF- α 측정을 위한 bioassay

TNF- α 에 민감하게 작용하는 세포주인 L929을 1.5 X 10⁵/ml로 조정 후 plate의 각 well에 100 μ l씩 분주한다. 그후 macrophage 배양 상등액을 넣고 actinomycin의 최종농도가 1 μ g/ml이 되도록 조정하여 넣고 24시간 배양 하였다. 배양 완료 5시간 전에 XTT 용액을 첨가하고 생존한 세포의 활성은 배양 종료 후 620nm의 흡광도로 측정된 OD값으로 측정한다.

라. 실험동물의 항원 비특이적인 방어효과

각 시료(각 분획 및 대조군으로의 조추출)을 적정량 마우스에 주사하고 1-3일 후, 항원으로 세균 혹은 독신을 각기 마우스에 공격접종하고 5-7일간 관찰하면서 생존율을 조사한다. 실험에 사용하는 항원(세균: B. bronchiseptica, 독신: B. bronchiseptica DNT)은 협동연구자인 여상건 교수님 혹은 수의 검역원에서 기증받아 사용토록 한다.

시료의 항원 비특이적 방어능에 의해 유도되는 항종양 효과의 실험은 실험 동물 종양전이 모델을 이용하도록 한다. 먼저 적정량의 시료를 종양 접종 2일전에 마우스에 미리 주사 후, B16-BL6 melanoma 혹은 colon 26-M3.1 lung carcinoma를 미정맥 주사로서 종양의 colony를 셈하며 시료를 처리하지접종한다. 종양 접종 14일 후에 폐로 전이된 많은 대조군의 종양 수를 기준으로 시료에 의하여 억제된 종양의 전이정도를 조사토록 한다.

o 2차년도 (2000년)

가. 목표 : 면역증강 활성의 조사

지표물질로 선정된 lectin과 표준화된 시료를 사용하여 항원 특이적인 면역 증강 효과를 체액성 및 세포성 면역증강 효과를 조사하고 그 작동기전을 조사토록 한다.

나. 체액성 면역증강 효과

현재 사용하고 있는 각종 동물용 백신은 병원체에 따라서 면역 효과가 뛰어난 것도 있지만 효과가 낮은 것도 있어 현장에서 문제가 되는 경우가 있다. 이를 극복하기 위하여 병원체의 농도를 높여 백신을 생산하고 있으나 생산단가가 높아지는 단점을 가지고 있다. 따라서 효과가 우수한 면역 증강제의 개발에 백신 연구자들이 심혈을 기울이고 있다. 따라서, 본 연구에서는 동물 백신중에서 가축의 생산성과 관련된 몇가지 백신을 선별하여 한국산 겨우살이 혹은 그의 분획을 추가했을 경우, 백신 특이적인 면역 증진 효과를 분석하고자 한다. 이를 위하여 기존 백신을 선정하여 실험 동물을 이용, 시료의 면역증강활성을 분석한다.

○ 공시 항원

가축의 생산성과 직결되는 질병의 원인균을 항원으로 사용한다. 특히, 돼지 및 개의 호흡기 질병인 폐렴을 야기하는 주요 원인세균인 *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*를 실험에 적용한다.

○ 공시 **adjuvnat**: 표준화 겨우살이 추출물, Al₂O₃, 등

○ 실험 목적

마우스에 대하여 결정된 절대안전 농도에서 공시항원에 대한 면역증강 효과에 대한 기전의 연구와 공시항원의 공격에 따른 항원 특이적 방어능 검사를 조사한다.

1) 항원의 면역과 혈청의 수집

마우스에 공시항원을 PBS에 용해하여 여러 경로(피하, 복강, 정맥주사)로 면역한 후, 마우스의 혈액내에 유도된 항체의 역가를 ELISA로 측정한다. 체혈은 1회 면역 1주일 후부터 12주까지 1주 혹은 2주간격으로 마우스의 *etro-orbital sinus*로부터 수집하고, 항체역가의 측정시 까지 -20℃에 보관한다.

2) 항체의 역가 및 **subisotype** 결정을 위한 ELISA

항체의 측정은 *indirect ELISA*로 조사한다. 항원을 *coating* 후, 항 혈청을 여러농도로 조정하여 반응시킨다. 그 후 마우스 면역글로부린에 *peroxidase*가 *conjugation*된 2차 항체를 넣고 반응 후, OD 값을 측정한다. 항체의 역가는 정상 마우스의 혈청에 대한 OD 값의 2배가 되는 희석비로 결정하며, 각 시료에 의하여 역가가 증가된 항체의 *isotype*의 결정은 마우스 면역글로부린의 각 *isotype*에 대한 특이적인 2차항체를 이용한 ELISA로 조사 한다.

3) Lymphocyte 자극 실험

항원을 단독 혹은 각 시료와 면역한 마우스로부터 비장을 취하여 96-well culture plate에 분주한다. 비장세포가 분주된 각 well에 항원인 여러 농도로 조정하여 첨가하고, 단독 혹은 mitogen과 함께 배양한다. 항원특이적인 lymphocyte의 활성화는 XTT 혹은 cell counting kit로 조사한다

4) 항원 특이적인 Cytokines의 유도분비 조사

항원을 단독 혹은 각 시료와 면역한 마우스로부터 비장에 항원을 첨가하여 배양 후, 배양 상등액에 유도된 T-세포로부터의 cytokine profile(IL-2, IL-4 및 IL-10)을 각 cytokine에 대한 ELISA kit를 이용하여 조사함으로써 Th1 혹은 Th2 성향의 면역반응이 유도하는지를 조사한다.

다. 세포성 면역기능 조사

1) 지연성과민반응의 측정

각 시료가 항원에 대한 지연성과민반응(delayed type hypersensitivity; DTH)의 유도에 미치는 효과는 항원 단독 또는 adjuvant와 함께 면역 후, 항원을 주사하여 유도되는 주사부위의 swelling 정도를 조사한다.

2) 세포독성 T-세포(cytotoxic T lymphocyte; CTL)의 활성측정

항원에 대한 CTL의 유도는 uropium-유리법으로 측정한다. CTL의 유도를 위한 항원은 불활성화 된 종양세포를 이용한다. 즉, C57BL/6(H-2^b)에 P815 mastocytoma 세포(H-2^d)를 단독 혹은 시료와 혼합하여 피하주사로 면역 후의 마우스의 비장세포(effector cells)와 uropium이 표지된 P815 세포(target cells)를 같이 배양한다. CTL 활성을 측정은 CTL에 의하여 살해된 target 세포가 유리하는 uropium의 양을 조사하였고, 그 활성은 다음식에 의하여 구한다.

CTL 활성(%) = (uropium experimental release - uropium spontaneous release) / (uropium maximum release - uropium spontaneous release) X 100.

라. 항원 특이적인 방어 겨우살이 추출물의 방어력 증진효과 조사

각 시료를 백신과 혼합 접종시 백신의 방어능에 미치는 효과를 조사하기 위하여 돼지 의 폐렴을 유도하는 원인 세균인 *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 백신을 사용하며 실험을 위하여 백신 단독 혹은 백신과 표준화 adjuvant 혹은 lectin을 혼합하여 마우스에 접종하고 2주 후에 병원성 원인균으로 공격접종 후 10일간의 생존율을 조사한다.

마. 기존 adjuvant와의 면역증강 활성의 비교

현재 가장 널리 사용되는 aluminum hydroxide와 비교하여 겨우살이 추출물 혹은 lectin adjuvant의 장단점을 조사한다.

○ 면역반응 지속성 ; 체액성 면역의 유도에서 기존의 adjuvant인 alum과 비교토록 한다.

○ 항원의 용량(Dose) ; 유효한 체액성 면역반응을 유도하는 백신의 양을 겨우살이 adjuvant와 alum adjuvant와 상호 비교토록 한다.

o 3차년도 (2001)

가. 목표 ; 경구투여용 vaccine adjuvant의 가능성조사

안정성의 보장과 인건비의 감소측면에서 경구용 백신 개발에 지속적인 노력을 기울이고 있다. 여러 보고에서 경구용 백신은 면역 관용을 유도하는 것으로 알려져 있어 개발에 어려움이 있는 것으로 보고되고 있다. 한국산 겨우살이 추출물은 이전의 연구에서 경구 혹은 경비투여에 의한 종양전이의 억제 활성이 보고된 바 있어 경구투여에 의한 면역능이 상승된다는 가능성을 제시한 바 있다. 본 연구에서는 이 결과를 근거로 항원에 대한 면역능을 증가시키는 경구투여용 백신에 대한 adjuvant로서의 가능성을 조사하고자 본 연구를 실시한다.

나. KM-110과 KML-C의 경구급성 및 아급성 독성조사

KM-110과 KML-C의 경구급성독성은 5주령의 ICR mice에서 실시하며 다양한 농도의 시료를 PBS에 분산시킨 형태로 군당 10마리로 하여 sonde를 이용하여 위내로 강제 투여하고 2주간 폐사유무, 임상증상, 체중의 변화를 관찰한다.

아급성 실험 역시, 5주령의 ICR mice를 사용하며 급성독성시험결과 확인된 무영향량과 영향량을 포함하는 용량으로 위내로 1개월간 주 5회, 강제 투여하고 임상증상 및 체중의 변화, 폐사유무를 관찰한다.

다. KM-110 의 경구용백신을 위한 adjuvant로서의 가능성조사

KM-110이 경구투여에 의해서도 면역증강능을 지니는지에 대해 조사하기 위하여 독성시험을 통해 안전성이 확보된 농도의 KM-110을 항원과 함께 sonde를 이용, 위내로 강제 투여하고 항원만을 투여한 mice군과 아래에 나열된 사항에 대해 상호 비교한다. 이때 항원으로는 ovalbumin을 사용하며 mice에 대한 면역은 1주일 간격으로 3회를 실시하며 항체 역가 조사를 위한 채혈과 분변수집은 최초 면역후부터 일주일 간격으로 실시하며, 장세척수집은 최종면역 1주일 후에만 실시한다. 한편,

대조군으로는 경구적으로 투여시 adjuvant효과가 이미 인정된 cholera toxin-B를 사용하여 비교한다.

1) 경구투여에 의한 serum 과 장내의 항원특이항체 titer 증강효과 조사

항체의 역가조사는 ELISA법을 통해 실시하며 total immuno-globulin의 역가를 조사

2) 항원 특이항체의 isotype 조사

항원에 특이적으로 생성된 항체가 IgA 혹은 IgG 인지의 여부를 각 항체에 대한 특이항체를 이용하여 ELISA법으로 조사.

3) 항원 특이항체의 subclass 조사

만약 항원에 특이적인 항체가 IgG type이 주된 항체일 경우 IgG1, 혹은 IgG2a 에 특이적인 항체를 이용하여 ELISA법에 의해 조사

4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine 유도능 조사

KM-110을 항원과 함께 경구를 통해 면역한 후 비장을 취하여 항원 혹은 mitogen(Con-A)으로 in vitro에서 재자극하였을 때 비장세포의 증식정도를 XTT법으로 조사하여 항원만을 면역한 mice의 비장세포와 비교하며 비장 배양액을 취하여 배양액으로 유리된 cytokine들(TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-4)의 양을 조사한다.

라. KML-C의 경구백신을 위한 adjuvant로서의 가능성조사

경구투여에 따른 KML-C의 면역증강 활성화도 KM-110에서와 동일한 방법으로 면역 및 serum과 분변, 장세척액을 취하여 아래의 사항에 대해 조사한다.

1) 경구투여에 의한 serum 과 장내의 항원특이항체 titer 증강효과 조사

항체의 역가조사는 ELISA법을 통해 실시하며 total immuno-globulin의 역가를 조사

2) 항원 특이항체의 isotype 조사

항원에 특이적으로 생성된 항체가 IgA 혹은 IgG 인지의 여부를 각 항체에 대한 특이항체를 이용하여 ELISA법으로 조사.

3) 항원 특이항체의 subclass 조사

만약 항원에 특이적인 항체가 IgG type이 주된 항체일 경우 IgG1, 혹은 IgG2a 에 특이적인 항체를 이용하여 ELISA법에 의해 조사

4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine 유도능 조사

KM-110을 항원과 함께 경구를 통해 면역한 후 비장을 취하여 항원 혹은 mitogen(Con-A)으로 in vitro에서 재자극하였을 때 비장세포의 증식정도를 XTT법으로 조사하여 항원만을 면역한 mice의 비장세포와 비교하며 비장 배양액을 취하여 배양액으로 유리된 cytokine들(TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-4)의 양을 조사한다.

3. 연구개발 내용 및 결과

○ 1차년도 (1999)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|--------------|-------|------------|
| 한동대학교 생의학연구소 | 송병두 | 24,992,000 |

가. *In vitro*에서 면역담당세포에 미치는 활성의 조사

1) 정상세포에 미치는 활성

마우스에서 면역담당세포인 비장세포를 취하여 *in vitro*에서 1과제로부터 제 공받은 열매의 함량을 달리한 KM110분획들을 첨가하여 3일간 배양한 후 세포독성 혹은 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 열매가 함유된 분획들은 2-4 $\mu\text{g/ml}$ 정도의 유사한 수준에서 IC50치를 나타내었으나 잎, 줄기만으로 추출한 분획은 좀 더 강한 독성효과(IC50=0.4 $\mu\text{g/ml}$)를 지니는 것으로 나타났다.

2) 면역관련 세포의 mitogen에 대한 반응성 조사

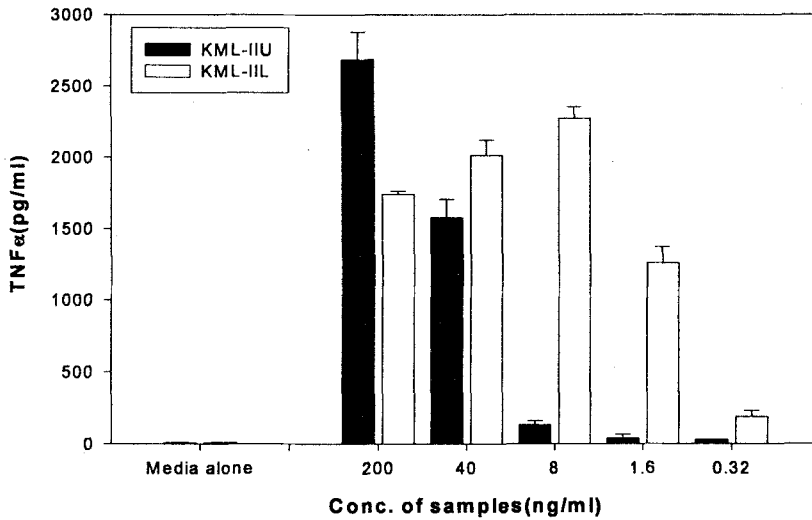
겨우살이 분획의 mitogen에 대한 반응성 조사는 KM-110과 KML-C를 이 용하여 실시하였다. 그 결과 두 분획을 주사한후 3일이 지난 마우스의 비장세포들은 정상 마우스의 비장세포들에 비해 con-A 나 LPS에 대한 반응성이 증가하여 활발한 증식이 일어나는 것으로 나타났다.

나. Macrophage로부터 cytokines의 유도분비 조사

본 연구를 통해 분리한 겨우살이의 추출물과 다양한 분획들이 macrophage 를 자극하여 cytokine들을 유도할 수 있는지의 여부에 대해 조사하였다.

1) 렉틴의 cytokines 유도능

렉틴의 TNF- α 유도능은 1과제에서 순수분리 정제된 KML-IIU와 KML-III를 대상으로 실시하였다. 그 결과 두 렉틴 모두 농도에 의존적으로 TNF- α 를 유도하였으며 항체에 의해 그 유도능이 저해되었다(그림 1). 그리고 흥미로운 사실은 KML-III이 상대적으로 낮은 농도에 까지 그 효과가 지속되고 있어 두 렉틴간의 활성에 있어서 차이를 나타내고 있음을 암시함과 동시에 아마도 이들 렉틴이 겨우살이 내에서 macrophage 자극성분중의 하나로서 면역증강효과를 지닐것으로 사료되며, 차후 산업화를 위한 adjuvant 조성에 고려해야할 중요한 인자로 사료되었다.



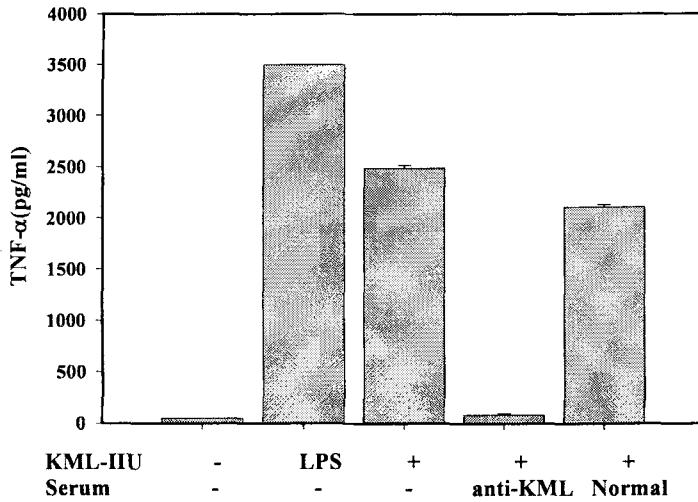


그림1.렉틴(KML-IIU, -IIL)에 의한 TNF- α 유도(위)와 항체에 의한 저해효과(아래)

2) Viscotoxin의 cytokine유도능

1과제에서 분리한 toxin 성분의 macrophage의 자극능을 조사하기 위하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 macrophage를 자극하여 얻은 배양상등액에 유리된 IL-1의 양을 조사하였으나 어떠한 농도에서도 활성을 지니지 않았다. 따라서 viscotoxin은 macrophage자극능이 없을 것으로 사료되었다.

3) HBP의 TNF- α 유도능

HBP의 유도능을 조사하기 위하여 각 분획의 농도를 10 $\mu\text{g/ml}$ 수준에서 10배 희석하여 1 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포주에 처리하고 1일간 배양한 후 배양 상등액을 취하여 ELISA assay법을 이용 배양상등액에 유리된 TNF- α 의 양을 조사하였다. 그 결과 (표 1) 전 분획이 농도에 의존적으로 TNF- α 를 유도하는 것으로 나타났으며, 일부 분획이(HBP-2, HBP-3, HBP-5)상대적으로 높은 활성을 지니는 것으로 나타났으나

전반적으로 각 분획별로 그 유도능에 있어서 커다란 차이가 나지 않았다. 그러나 1 과제의 전기영동 결과에서 나타나 있듯이, 각 분획별로 주된 물질에 있어서는 차이가 있음에도 불구하고 이러한 효과를 지녔다는 점은 전 분획이 모두 활성을 지닐 가능성도 배제할 수는 없으나 오히려 전기영동에서 나타나는 주된 단백질 보다는 각 분획에 적은양이 존재하는 단백질들의 효과나 아니면 렉틴의 오염, 그리고 endotoxin 의 오염도 배제할 수는 없었다. 따라서 본 결과를 명확히 하기 위해서는 우선 HBP분획에 포함된 렉틴이나 endotoxin의 오염여부가 확인되어야 할 것으로 사료되었다.

표 1. The TNF- α inducing effect of heparin-binding proteins(HBP) from Korean mistletoe

| Samples | concentration(μ g/ml) | TNF- α (pg/ml) in culture supernatant |
|-------------|----------------------------|--|
| Media alone | - | 323 |
| LPS | 0.1 | >8000 |
| KMI-110 | 100 | >4000 |
| | 10 | 1910 |
| | 1 | 877 |
| HBP-1 | 10 | 2170 |
| | 1 | 667 |
| | 0.1 | 516 |
| HBP-2 | 10 | >4000 |
| | 1 | 1261 |
| | 0.1 | 564 |
| HBP-3 | 10 | >4000 |
| | 1 | 1570 |
| | 0.1 | 632 |
| HBP-4 | 10 | >4000 |
| | 1 | 1463 |
| | 0.1 | 581 |
| HBP-5 | 10 | >4000 |
| | 1 | >4000 |
| | 0.1 | 1000 |

다. 실험동물의 항원 비특이적인 방어효과

항원 비특이적인 KM-110의 면역증강 효과는 마우스를 이용하여 검토하였다. KM-110(15 ug/mouse)를 복강 투여하여 항원 비특이적인 면역능을 증진시킨 후 2일 후에 원인균을 투여하였다. 그리고 14일간 관찰하면서 생존 마우스의 수를 측정하였다. 공격균주로는 세균으로서 돼지 호흡기 질환 균주인 *Bordetella bronchiseptica* (B.b), *Pasteurella multocida* A type (PA), *Pasteurella multocida* D type (PD)과 독신으로서 *Bordetella bronchiseptica* (B.bCDNT), *Pasteurella multocida* D type (PDCDNT) 피부괴사형 독신을 사용하였다. 그 결과 표2에 나타낸 바와 같이 KM-110은 B.b, PA, PD등의 돼지 호흡기 균주에 대하여는 4MLD(minimum lethal dose; 최소치사량)에서, 피부괴사형 독신인 B.bCDNT 및 PDCDNT에 대하여는 2MLD의 투여에서 KM-110의 투여한 마우스의 50%가 생존하였다. 그리고 인간의 요도감염균주인 *Serratia marcescens*1826E를 5MLD를 투여한 마우스에서도 KM-110을 투여한 군에서는 모두생존하였다. 이 결과는 KM-110이 강력하게 항원 비특이적인 면역자극 활성 유도하는 능력이 있다는 것을 보여주는 것으로서, 이후 외부로부터의 세균 및 독신의 감염에 대하여 유효하게 사용될 수 있음을 시사하였다.

표2. Effect of KM-110 in mice injected with bacteria and toxin

| Group | doses | Activity (survival/total mice) | |
|-------------------------------------|-------|--------------------------------|------------------|
| | | Control | KM-110 (15 ug) |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | 4 MLD | 0/10 | 5/10 |
| <i>Pasteurella multocida</i> A type | 4 MLD | 0/10 | 4/10 |
| <i>Pasteurella multocida</i> D type | 4 MLD | 0/10 | 5/10 |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | 2 MLD | 0/10 | 5/10 |
| <i>Pasteurella multocida</i> D type | 2 MLD | 0/10 | 4/10 |
| <i>Serratia marcescens</i> 1826E | 5 MLD | 0/5 | 5/5 ^a |

a: KM-110 100ug/head

라. 추출물 및 신규물질 중 활성분획의 탐색

1) in vitro 및 in vivo 독성 효과의 조사

가) KM-seed 및 KM-leave의 종양세포주에 대한 세포독성 효과

본 연구소의 여러 연구에서 KM-110의 세포독성 효과는 이미 여러 경로를 통하여 보고하였다. 본 연구에서는 열매 및 잎, 줄기 분획의 여러 가지 종양세포주에 대한 세포독성 효과를 KM-110과 비교하여 조사하였으나 상호간 현저한 차이는 발견하지 못하였으며 아마도 이는 1과제의 결과에서 보여주었듯이 열매에도 세포독성 효과를 지니는 렉틴이 존재하기 때문일것으로 사료되었다.

나) 각 분획들의 세포독성 효과

1과제에서 분리한 여러분획(KM-110, KML-C, toxin)의 종양세포주에 대한 in vitro 세포독성 효과를 관찰고 비교 하였다.그 결과(표 3) 각 분획을 colon 26-M3.1 lung carcinoma, Jurkat leukemia, HL-60 lymphoma 세포주에 대한 IC₅₀ 값을 통해 비교 하였을 때 KML-C는 상대적으로 강한 세포독성효과를 지녔으며 KM-110과 toxin은 유사한 세포독성 효과를 보였다.

표3. 각 분획의 종양 세포주에서의 세포독성효과

| 구 분 | IC50 value(ng/ml) | | |
|--------------|-------------------|-------|------------|
| | KM-110 | KML-C | Viscotoxin |
| Jurkat cells | 750 | 0.05 | 1100 |
| Colon26-M3.1 | 4100 | 1.1 | 850 |
| HL-60 | 4100 | 0.8 | 4200 |

다) 각 분획의 in vivo 독성 효과

각 분획의 in vivo 독성효과를 마우스를 이용하여 조사하였다. 즉 마우스에 여러농도의 분획들을 1회 정맥투여하였고 7일간 마우스의 폐사정도와 외형적인 변화를 조사하였다. 그 결과 표4 에 나타난 바와 같이 KML-C, toxin, KM-110순으로 강한독성을 나타내었으나 흥미로운 사실은 in vitro cytotoxicity에서 나타난 결과와는 달리 toxin분획은 in vivo에서의 독성이 KM-110에 비해 현저히 강한 것으로 나타났으며 KML-C는 in vitro에서는 toxin보다 5000배이상의 세포독성을 지녔으나 in vivo에서는 그 차이가 현저히 감소하였다. 따라서 toxin 분획은 in vivo에서 강력한 독성 활성이 있는 물질로 사료되며 이들의 활성조사뿐 아니라 제거방법에 대해서도 중요하게 고려해야할 것으로 보였다..

표4. 각 분획의 in vivo에서의 독성

| Group | Dose/kg | number of death/5head | | | | | | |
|------------|--------------|-----------------------|---|---|---|---|---|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7(일) |
| KM-110 | 50mg | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| KML-C | 250 μ g | 3 | 5 | - | - | - | - | - |
| | 125 μ g | 1 | 5 | - | - | - | - | - |
| | 62.5 μ g | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| | 31 μ g | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Viscotoxin | 2500 μ g | 5 | - | - | - | - | - | - |
| | 250 μ g | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 50 μ g | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

마. 추출물의 면역증강 효과

1) 기존 adjuvant에 대한 KM-110의 면역증강 상승작용

가) Aluminium hydroxide의 활성에서 KM-110의 상승작용

본 연구에서 추출한 겨우살이의 물추출물(KM-110)이 기존의 adjuvant와 혼합하여 사용하였을 경우 그 상승작용이 유도되는지의 여부를 조사하고자 실시하였다. 본 연구에서는 항원으로 mycoplasma를 사용하였고 기존의 adjuvant로는 aluminium hydroxide(alum)와 ASA 25를 사용하였으며 첫 번째 면역 후 14주까지의 항체 역가를 조사하였다. 본 실험에서의 항체의 역가는 정상마우스 혈청에 대한 OD 값의 3배가 되는 실험군 마우스 혈청의 희석비를 항체의 역가(titer)로 정하고 실시하였다. 그 결과(그림2) booster 면역 이후부터 최종 분석 시점인 14주 후까지 KM-110은 ASA 25에 비하여 우수한 항체생산 증진효과를 나타냄으로 KM-110 단독으로도 기존에 동물에 적용하는 adjuvant와 비교하여도 우수한 활성을 나타낼 수 있다는 가능성을 제시하였다. 한편 그림3에서 보여지는 바와 같이 KM-110이 혼합된 새로운 형태의 혼합 adjuvant 개발 가능성도 있을것으로 나타났다(그림3). 혼합 adjuvant의 구성은 기존에 사용하는 alum과 ASA25를 혼합한 형태(alum+ASA25)의 adjuvant를 대조군으로, 실험군으로는 여기에 KM-110을 혼합한 adjuvant(alum+ASA25+KM-110)를 사용하여 면역하고 항체생산에 관한 실험을 실시하여 alum+ASA25의 경우에 비하여 alum+ASA25+KM-110 adjuvant가 booster 면역 후부터 assay 종료시점인 14주까지 유의하게 높은 mycoplasma에 대한 항체생산 활성을 나타냄을 확인하였다.

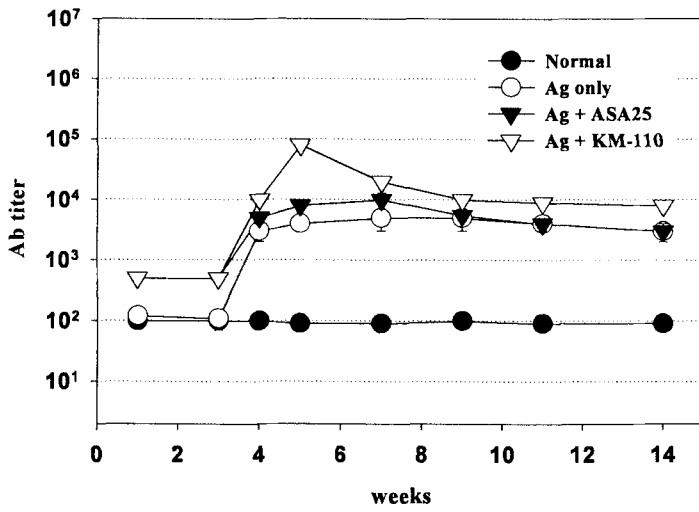
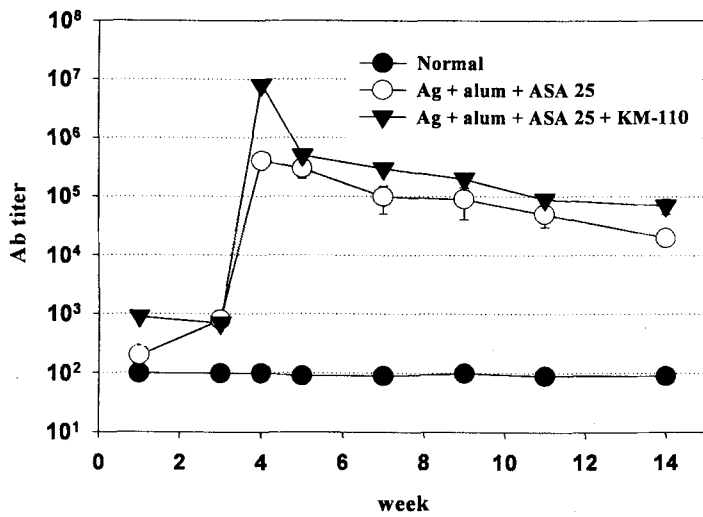


그림2. KM-110의 adjuvant 효과



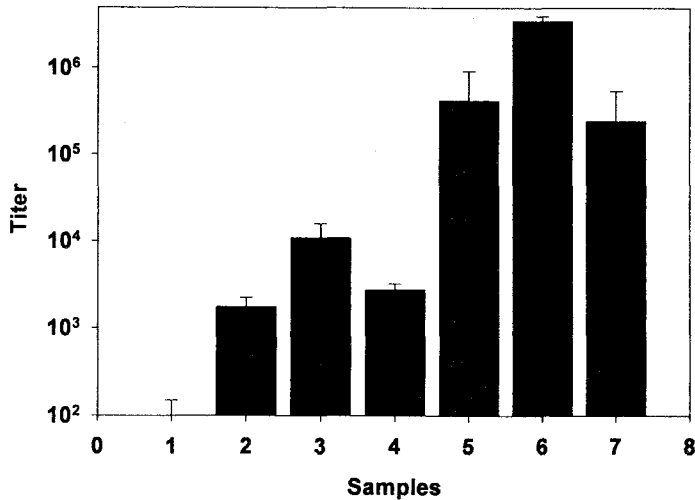


그림3. 기존 adjuvant와 병용시 KM-110의 상승효과
 1;PBS, 2;Ag(*Mycoplasma*) alone, 3;Ag+KM-110, 4;Ag+ASA25(3%),
 5;Ag+Alum+ASA25,6;Ag+KM-110+Alum+ASA25,
 7;Ag+KM-110 and Ag+ASA25+Alum

나) KM-110이 함유되는 새로운 형태의 oil adjuvant의 개발

실험실에서 항체생산시 주로 사용하는 adjuvant중에 가장 대표적인 adjuvant는 Freund's complete adjuvant(FCA)이다. 그러나 FCA는 높은 면역반응의 유도함에도 불구하고 지나친 발열반응 및 육종의 생성으로 임상뿐 아니라 가축에게도 그 사용이 제한되고 있다. 본 연구는 실험실에서 사용하는 실험용 새로운 adjuvant의 개발 혹은 FCA의 부작용을 억제할 수 있는지의 가능성을 타진하고자 oil 성분에 결핵균 대신에 KM-110을 첨가한 형태의 adjuvant를 제조하여 항체 생산능에 미치는 활성을 조사하였다. 본 실험에 사용된 항원은 OVA(ovalbumine)을 사용하였고 oil adjuvant로는 FIA(Freund's incomplete adjuvant)를 사용하였다. 그 결과 KM-110+FIA, FCA, FIA, KM-110순으로 그 효과가 나타났으며 가장 높은 항체 역가는 나타낸 5주제의 항체역가는 FIA+KM-110을 혼합하여 사용한 결과, FIA를 사

용한 결과에 비하여 약 2배 정도 높은 활성을 보였으며 FCA에 비하여도 유의하게 높은 활성을 나타냈다. 또한, 항체 생산의 지속성 면에서도 상당히 우수한 결과를 나타내어 실험 종료시점인 15주째의 결과는 KM-110+FIA를 사용한 경우가 FCA 및 FIA를 사용한 경우에 비하여 각각 2배 및 3배 이상의 높은 항체역가를 나타냈다(그림4).

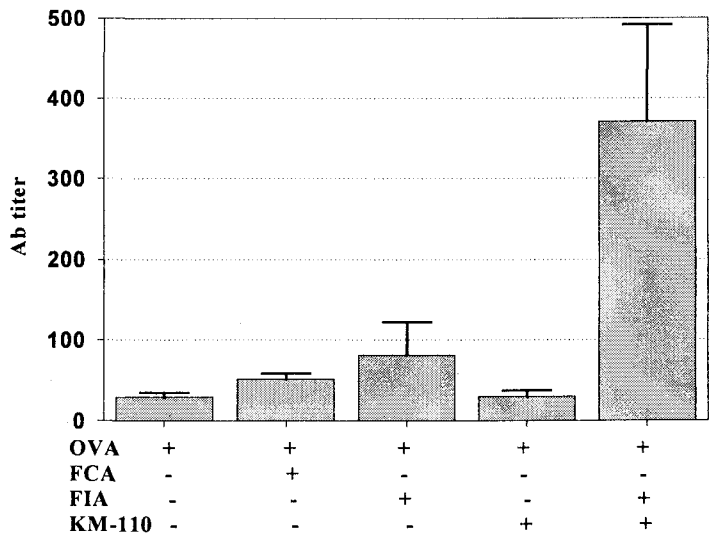


그림4. Oil-adjuvant와 혼합시의 KM-110의 adjuvant 효과

○ 2차년도 (2000)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|--------------|-------|------------|
| 한동대학교 생의학연구소 | 이관희 | 30,000,000 |

가. 겨우살이 추출물(KM-110)과 그 활성 분획(KML-C)의 체액성 면역증강효과

겨우살이 추출물과 그 활성 분획인 KML-C의 체액성 면역증강능에 대해서는 1차년도 결과에서도 확인 된 바 있다. 따라서 당해년도에서는 이들의 체액성 면역활성을 좀더 명확하게 확인하기 위하여 다양한 농도에서 그 효과를 조사하는 한편 체액성 면역과 관련한 주요 cytokine의 유도능을 확인, soluble adjuvant로서의 단점의 극복을 위한 KM-110 혹은 KML-C가 함유된 혼합형 adjuvant를 이용한 체액성 면역 증강효과를 FCA와 비교 조사하였다.

1) KM-110과 KML-C의 농도의존적 체액성 면역증강효과

KM-110의 경우 100ug/head 와 10ug/head에서 유의한 수준의 항원 (Keyhole Lympet Hemocyanin; KLH) 특이적인 항체 titer의 증가를 나타내었다(그림 1). 그리고 FIA와 혼합된 형태의 adjuvant로 사용시에는 FCA에 상응하는 효과를 지니고 있었으며 지속력도 7주까지 유지되어 KM-110만을 adjuvant로 사용했을 때 보다 항체 titer의 지속력이 연장되는 경향을 보였다(그림 2). KML-C 역시 5ng/head 까지는 농도에 의존적으로 항원특이적인 항체의 합성을 증가시키는 것으로 나타났으며(그림 3), FIA와 혼합한 형태로 사용시에도 좋은 활성을 보여주었다(그림 4). 특히, KML-C는 FIA와 혼합한 조성으로 사용시, KML-C 단독으로는 활성을 지니지 않았던 농도에서도 FIA보다 더 강한 활성을 나타내어(그림 5) 제품화시 조성을 조절함으로써 KML-C의 효과를 더 상승시키거나, 더 적은 양으로도 더 강한 활성을 나타낼수 있을 것이라 사료되었다. 그리고 비록 각각 독립된 실험을 통한 결과라서 직접적인 비교에는 무리가 있으나, KM-110 과 KML-C 공히, 단독으로도 활

성을 나타내는 최고농도에서는 FIA에 의해 그 상승효과가 현저하지 않는 것으로 보이며 이러한 oil성분의 첨가는 KM-110 이나 KML-C의 첨가량을 감소하거나 항체 titer 지속력을 연장시키는 효과가 있을 것으로 기대된다.

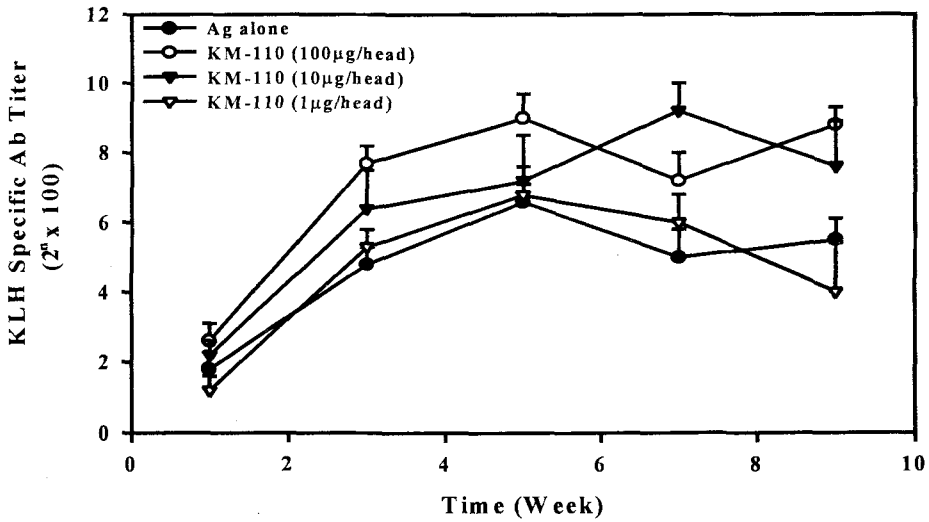


그림 1. Effect of KM-110 on the Ab response to KLH

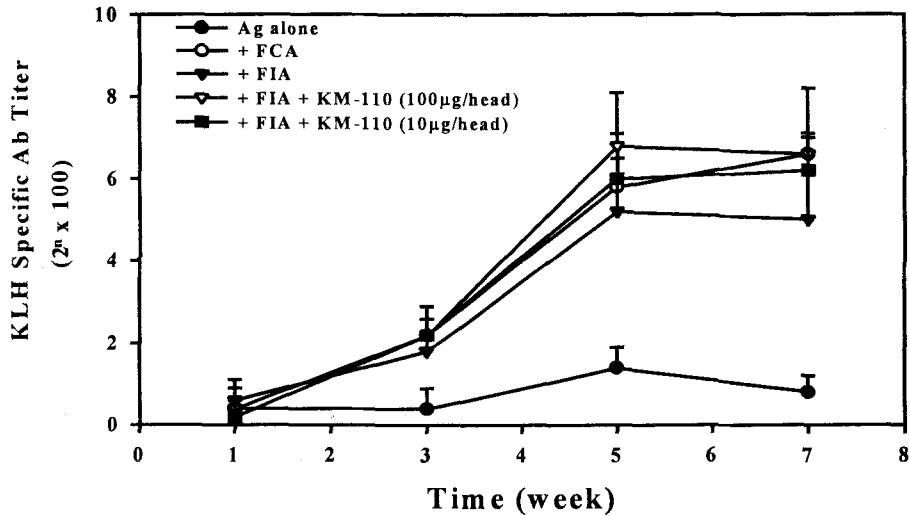


그림 2. Effect of KM-110 on the Ab response to KLH

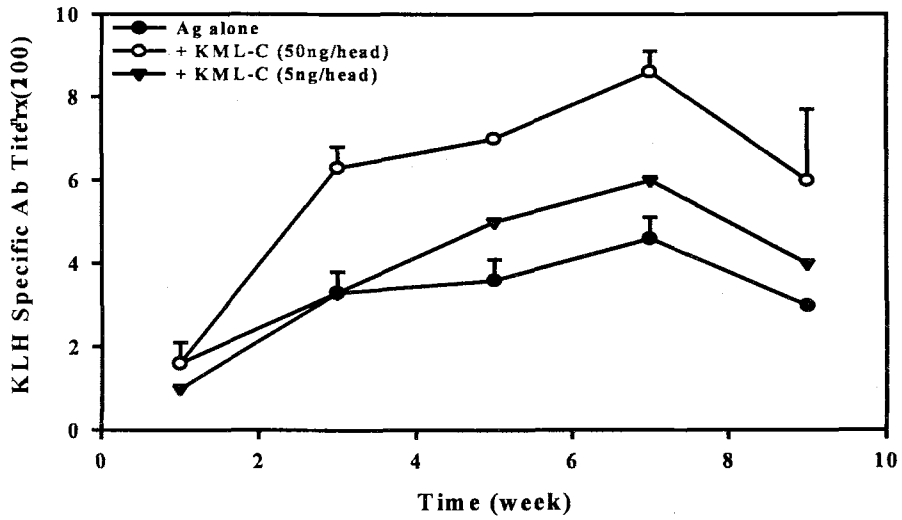


그림 3. Effect of KML-C on the Ab response to KLH

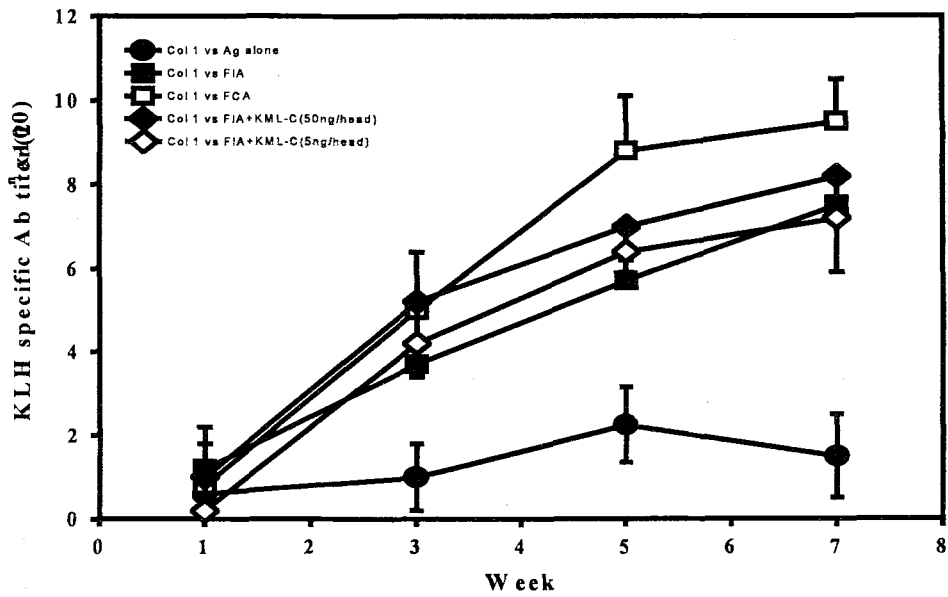


그림 4. Effect of KML-C on the Ab response to KLH

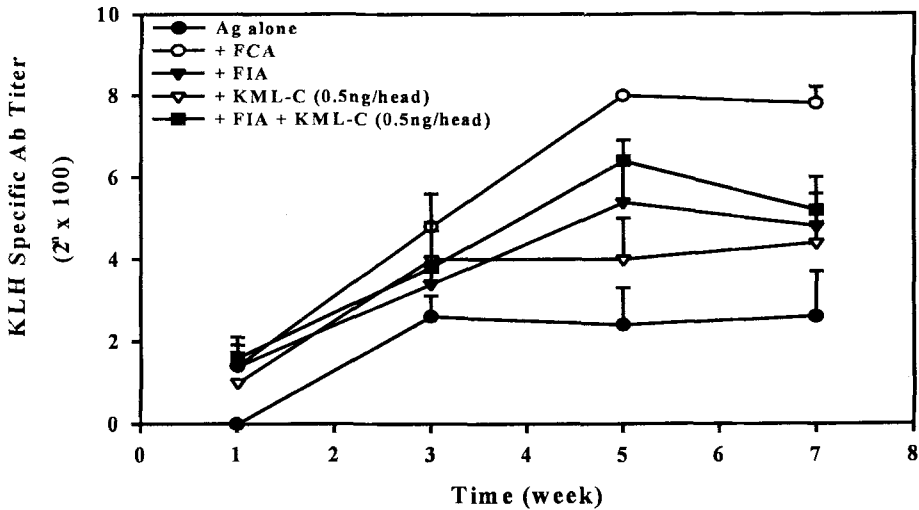


그림 5. Effect of KML-C on the Ab response to KLH

2) KM-110 혹은 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant의 체액성면역증강효과

한편, FIA 나 FCA의 경우 그 독성으로 인해 사용이 극히 제한되고 있는 실정이다. 따라서 FIA를 이용한 혼합형 adjuvant, 역시 사용이 제한적일 수 밖에 없다. 따라서 본 연구에서는 squalene를 tween80에 혼합시킨 adjuvant에 immune modulator로서 KM-110 혹은 KML-C를 혼합형 adjuvant를 이용하여 체액성면역반응 증강여부를 조사하였다. KM-110과 KML-C는 앞선 연구결과에서 최적 농도를 나타내었던 100 $\mu\text{g}/\text{head}$ 와 50ng/head 수준이 되게 조절하였다.

그 결과 KM-110 및 KML-C 모두에서 FCA에 상응하는 특이항체의 역가상승 활성이 나타났으며(그림 6) 항체의 titer 지속력 또한 9주째까지도 항체의 titer가 지속되는 현상을 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 KM-110 및 KML-C는 명확한 체액성 면역증강효과가 있는 것으로 보이며 단독으로 보다는 혼합형 형태로 사용시 그 효과를 높일수 있을 것으로 보인다. 그러나 본 연구결과에서는 항원성이 높은 항원만을 사용한 결과이고 항체생성에 있어서는 사용한 항원에 따라 많은 variation이 존

제하기 때문에 앞으로 다양한 항원에 대한 효과가 확인되어야 할 것으로 보인다.

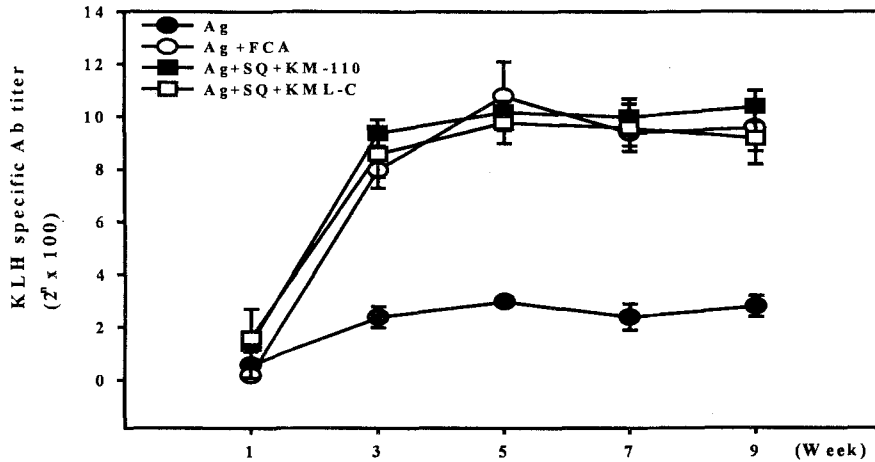


그림 6. Effect of KML-C & KM-110 on the Ab response to KLH

3) 항원특이적인 cytokine 유도능 확인 및 항체의 subclass 조사

KML-C adjuvant 사용시 항원특이적인 cytokine과 항체의 subclass의 변화를 확인하기 위하여 ovalbumin(OVA; 5 μ g/head)을 항원으로 하여 adjuvant로는 FIA, FCA 그리고 FIA+KML-C(50ng/head)를 각각 사용하여 2주간격으로 2차례 balb/c mice에 면역하고 최종면역 1주후 혈청을 취하여 titer와 IgE의 양을 조사하는 한편, 비장세포들은 in vitro에서 항원으로 재자극하여 48시간배양후 배양상등액에 유리된 cytokine들의 양을 조사하였다. 그 결과(그림 7) KML-C를 사용한 경우 비록 IL-10과 IL-4의 분비수준은 상당히 억제되었던 반면, IFN- γ 는 비록 유의한 수준은 아니었지만 약간 증가되는 경향을 나타내어 FIA나 FCA 보다는 KML-C가 TH1 type의 반응을 유도할 것으로 사료되었으나 serum 내에서의 IgE 수준이나(그림 8) 항원에 특이적인 항체는 주로 IgG1 type으로 나타나(그림 9,10) KML-C가 강력한 TH1 response를 유도하는 adjuvant로는 보이지는 않았다. 그러나 KML-C가 FIA에 혼합된 형태이고 FIA가 주로 TH2 type의 response를 유도한다는 점과 항체의

subclass type이 항원의 종류에 따라서도 크게 좌우된다는 사실에 비추어 볼 때 KML-C가 TH2 type의 response를 유도한다고 단정할 수는 없으며 이를 위한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

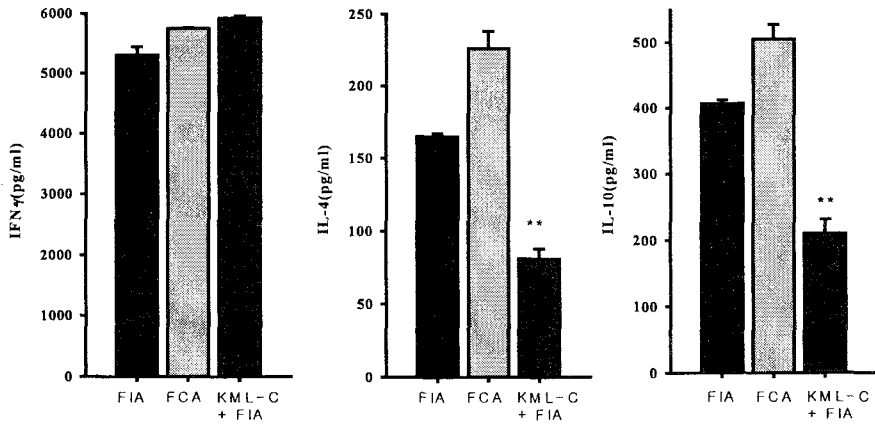


그림 7. Antigen- induced cytokine profiles.

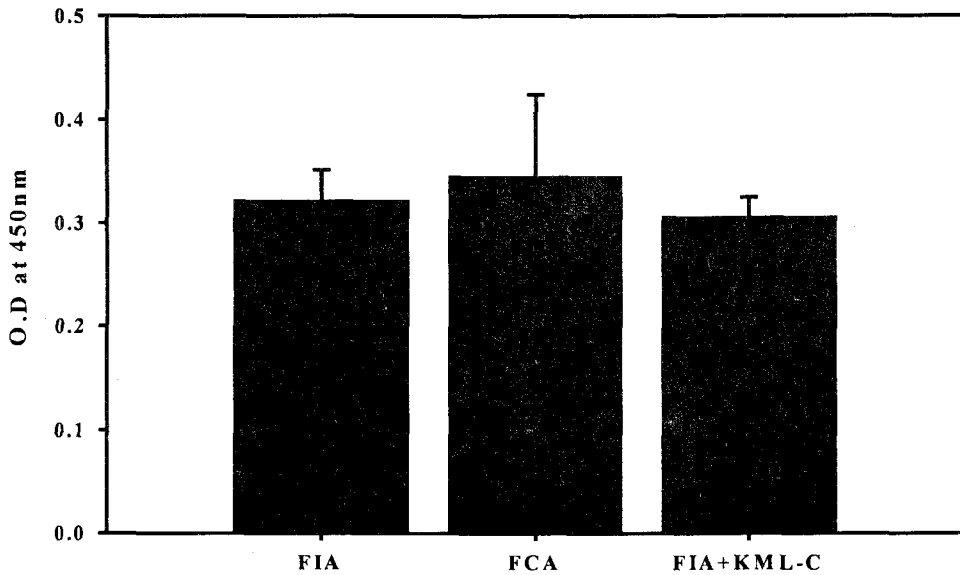


그림 8. Effect of KML-C on mouse serum IgE level.

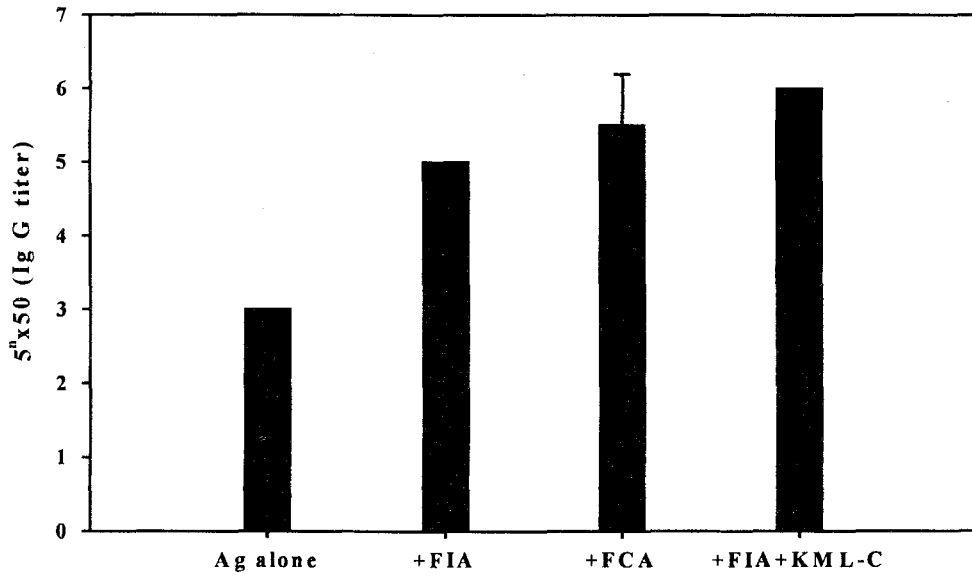


그림 9. Effect of KML-C on the Ab response to OVA

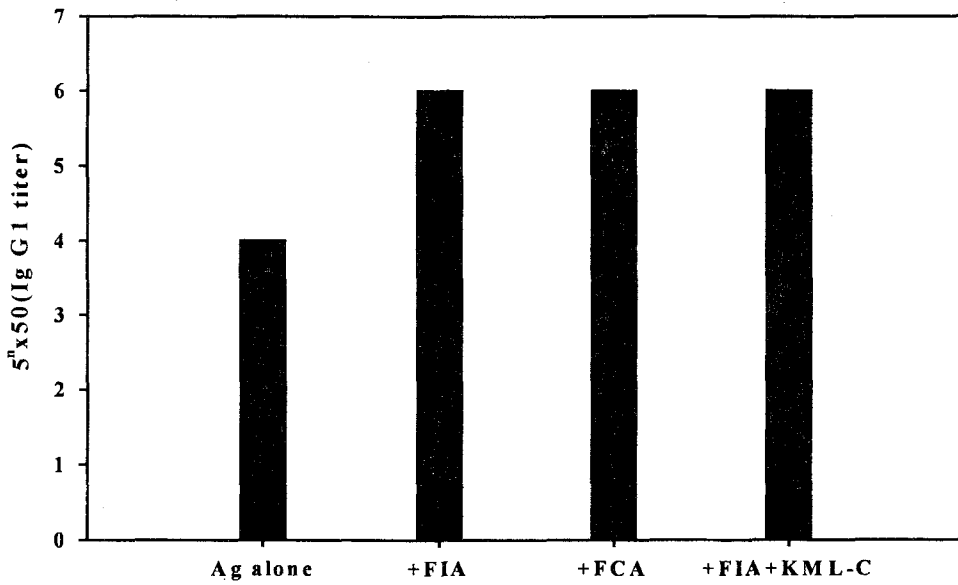


그림 10. Effect of KML-C on IgG1 response to OVA

4) KML-C adjuvant가 비장세포내 lymphocyte population과 surface marker의 변화에 미치는 영향

KML-C adjuvant가 비장세포내 lymphocyte population과 surface marker의 변화에 대한 평과는 flowcytomer(FCM)을 이용하여 조사하였다. 먼저 OVA(5ug/head)을 단독 혹은 KML-C(50ng/head)와 함께 Balb/C mice에 2주간격으로 2회 면역하고 최종면역 1주일후 비장세포를 회수하여 특이항체를 이용하여 FCM에서 분석하였다.

그 결과 (표 1), KML-C를 투여한 mice의 비장세포들은 상대적으로 CD19 cell과 CD69(early lymphocyte activation marker)의 비율이 상승하고 CD3의 비율이 감소하는 경향을 보여 주었다. 따라서 KML-C 투여가 in vivo에서 비장내의 B cell population을 확장시키는 동시에 전체적으로 lymphocyte의 activation을 유도하는 것으로 사료된다.

표 1. Alterations in expression of surface lymphocyte markers of spleen cells from KML-C-treated mice.

| | Saline | OVA alone | OVA+ KML-C |
|------|--------|-----------|------------|
| CD19 | 52 | 54.7 | 58.4 |
| CD3 | 36.3 | 33.3 | 30 |
| CD4 | 24.9 | 24 | 20.5 |
| CD8 | 14.6 | 14.7 | 14.2 |
| CD69 | 3.6 | 9 | 16.3 |

5) Heparin binding 분획의 체액성면역증강효과

HP역시 비록 KM-110이나 KML-C보다는 효과가 미약하였지만 50ug/head 까지 유의한 체액성 면역증강효과가 나타나(그림 11) 면역증강효과를 지닐 것으로 사료되었으나 시료를 주사한 부위에 극심한 조직괴사현상이 확인되어 HP단독으로 adjuvant 사용에는 제한이 있을 것으로 사료되었다.

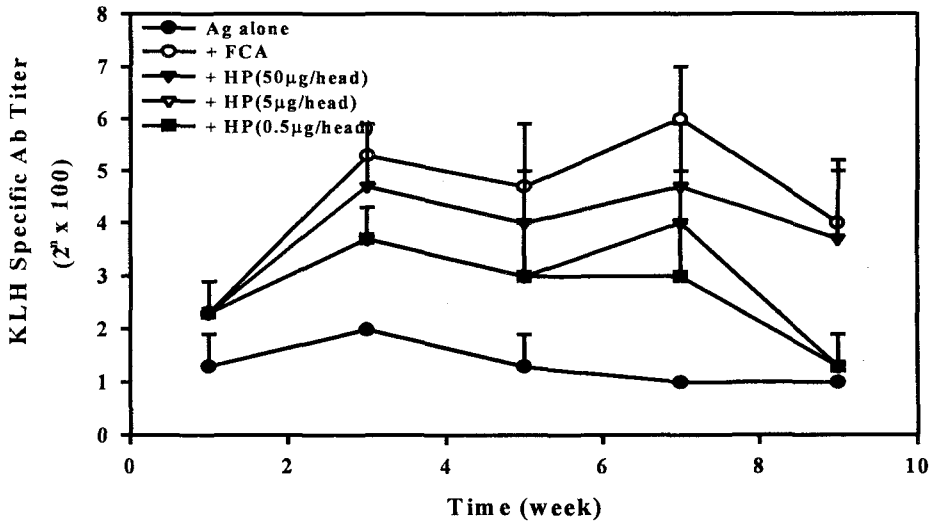


그림 11. Effect of HP on the Ab response to KLH

나. KML-C의 세포성 면역증강효과

특이면역증강작용에 있어서 체액성 면역증강 뿐 아니라 세포내에 살아있는 세균이나 바이러스를 제거하는데 가장 중요한 수단이 되는 세포성면역증강 또한 숙주의 방어기전에 있어 대단히 중요하다. 따라서 본 연구에서 KML-C가 체액성면역뿐 아니라 세포성 면역증강효과를 지니는지에 대해 조사하였다. 세포성 면역증강효과의 확인은 T cell들에 의해 매개되는 것으로 알려진 지연성 과민반응(delayed-type hypersensitivity; DTH)실험, mitogen에 대한 반응성, T cell proliferation 과 관련한 cytokine인 IL-2 유도능을 통해 조사하였다.

1) DTH reaction

먼저 항원을 단독 혹은 adjuvant와 혼합투여한 후 항원을 재 자극하여 그 swelling(팽창) 정도를 측정하였다. 그 결과 KML-C는 0.5 ng/head 까지도 농도 의 존적으로 DTH 효과를 지녔으며, 1ng/head 이상의 농도에서는 대조군으로 사용한 FCA 보다도 그 효과가 우수한 것으로 나타났다(그림 12). 그러나 2번의 독립실험 결과 반응시간에 있어서는 FCA와 다른 경향을 나타내었는데 KML-C의 경우 항원 주사후 2일째에 최고에 이르렀다가 점차 감소하였으나 FCA는 투여후 3일째에 최고치를 나타내어 KML-C가 FCA보다 빠른 DTH반응을 유도함을 확인하였다.

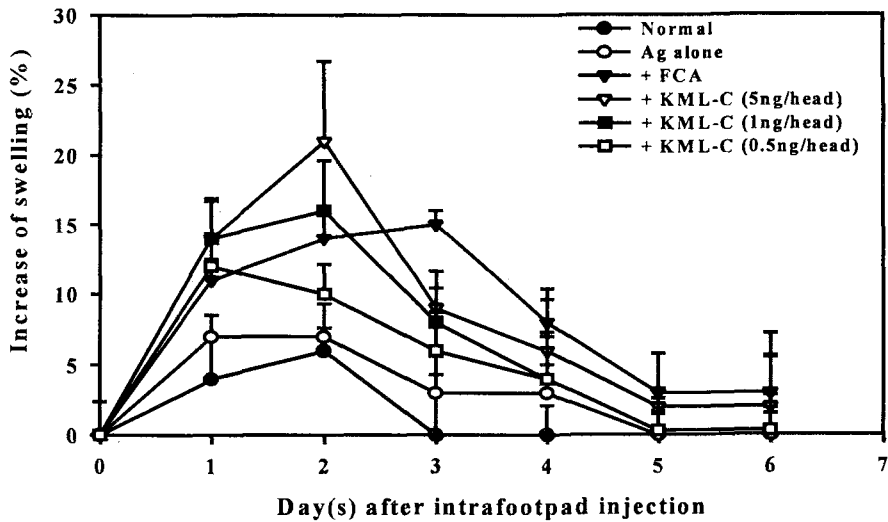


그림 12. Effect of KML-C on induction of KLH-specific DTH reaction.

2) Mitogen에 대한 반응성

KML-C가 투여된 mouse에서의 mitogen에 대한 반응성의 조사는 각각 T cell mitogen과 B cell mitogen으로 알려진 con-A, LPS의 자극에 의해 비장세포의 증식능을 조사하고, T cell의 growth factor중 하나인 IL-2의 유도수준을 측정함으로써 조사하였다. 그 결과 먼저 50ng의 KML-C혹은 대조군으로서 100 μ g 의 KM-110 혹은 PBS를 정맥을 통해 mouse에 주사하고 3일후에 무균적으로 비장을 취하여 1×10^5 cell/well 농도로 96well plate에 접종하고 5 μ g/ml 수준의 con-A를 처리하고 3일간 배양한 후 XTT method에 따라 세포의 proliferation 정도를 PBS만 주사한 mouse의 비장 세포와 비교 하였다. 그 결과 con-a를 처리한 경우 KM-110과 KML-C를 투여한 mouse로부터 취한 비장세포들은 대조군에 비해 각각 약 250%, 194%정도의 증식효과를 나타내었으며(그림 13), LPS로 자극한 경우에는 각각 약 192% 와 400% 정도의 증식능을 나타내어 KM-110, KML-C 모두 유의한 수준의 증식능을 나타내나고 있으며 KM-110은 T cell mitogen인 con-A에, KML-C는 LPS에 상대적으로 강한 효과를 나타내었다..

한편 KML-C가 con-A에 의한 T cell의 주요한 growth factor인 IL-2분비 유도능에 주는 영향을 확인하기 위하여 위와 동일한 방법으로 준비된 비장세포들을 1×10^7 농도로 24well plate에 접종하고 5 μ g/ml 수준의 con-A를 처리하여 2일간 배양하여 얻은 배양 상등액내의 IL-2의 양을 ELISA를 통해 정량한 결과 PBS만을 처리군 보다 KML-C 처리군이 약 40%정도의 IL-2 분비가 증가되는 것으로 나타났다(그림 14). 따라서, KML-C의 투여에 의해 mouse의 T cell의 growth factor의 합성이 증가됨과 아울러 T cell의 증식을 유도하는 것으로 사료되며, KML-C의 투여가 T cell들, 특히 TH1 세포들과 일부 CD8 세포에 의해 매개되는 것으로 알려진 DTH 반응을 유도했다는 점에서 볼 때 KML-C의 투여가 mice의 체내에서 T cell을 활성화를 유도할 것으로 사료되며, 이는 KML-C가 체액성면역뿐 아니라 세포성면역반응도 증가시킬수 있는 것으로 사료된다.

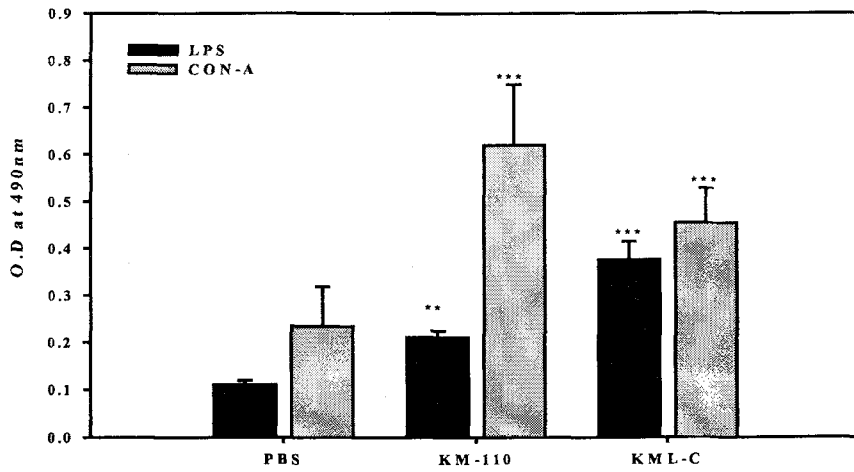


그림 13. Effect of KML-C on mitogen- induced spleen cell proliferation.

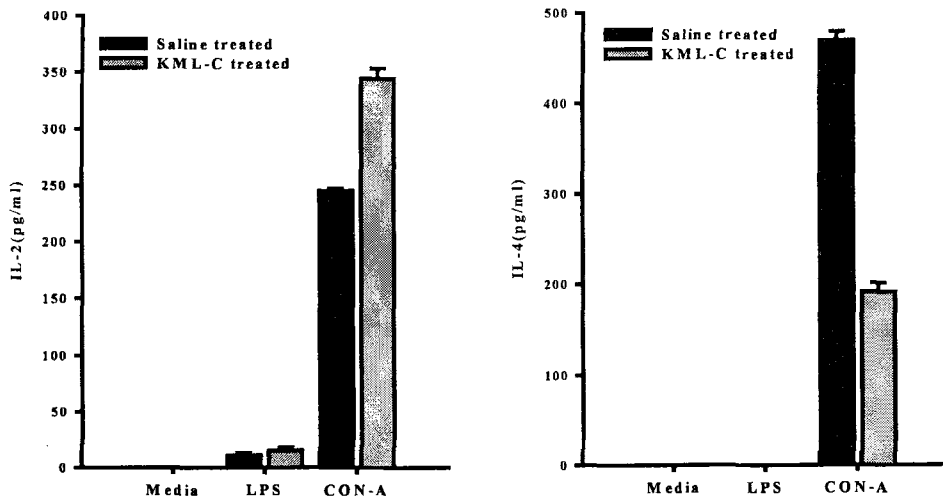


그림 14. Effect of KML-C on mitogen- induced cytokine induction.

3) 항원특이적인 비장세포의 활성화증가

KML-C의 항원 특이적인 면역활성을 조사하기 위하여, OVA(50ug/head) 단독 혹은 adjuvant로서 KML-C(50ng/head)와 함께 면역된 mice로부터 얻어진 비장세포를 in vitro에서 항원으로 재 자극하고 3일후에 세포의 증식을 XTT method를 통해 조사하였다. 그 결과 adjuvant로서 KML-C를 투여한 mice의 비장세포들은 항원만을 투여한 mice 비장세포에 비해 KML-C 농도와 재 자극하는 항원의 농도에 의존적으로 유의한 세포증식효과가 나타나(그림 15) KML-C가 in vivo에서 어떠한 경로를 통해 면역담당세포들의 항원에 대한 특이성을 높여주는 활성을 지닐 것으로 사료되었다.

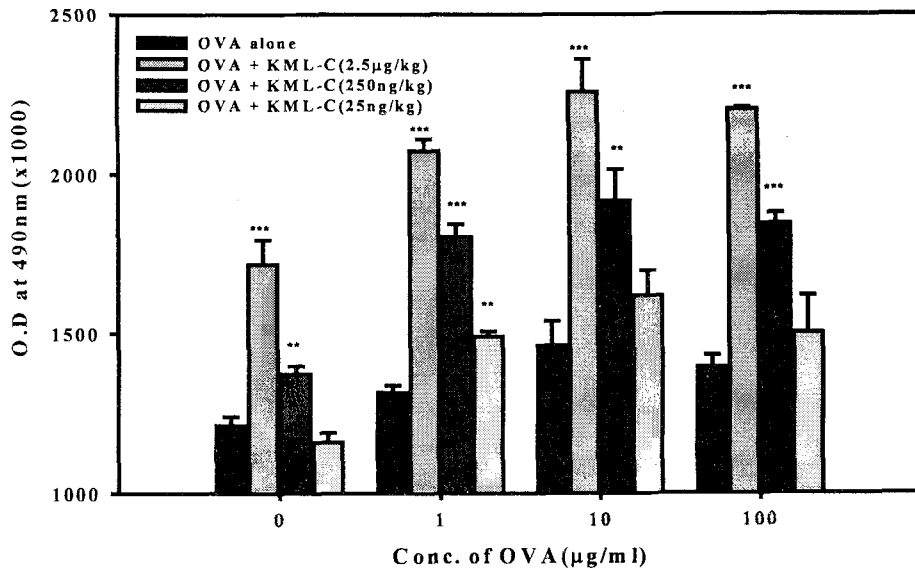


그림 15. Effect of KML-C on antigen-induced spleen cell proliferation.

○ 3차년도 (2001)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|--------------|-------|------------|
| 한동대학교 생의학연구소 | 이관희 | 25,000,000 |

가. KM-110과 KML-C의 경구급성 및 아급성 독성조사

KM-110과 KML-C의 경구급성독성은 5주령의 ICR mice에서 실시하며 다양한 농도의 시료를 PBS에 분산시킨 형태로 군당 10마리로 하여 sonde를 이용하여 위내로 강제 투여하고 2주간 폐사유무, 임상증상, 체중의 변화를 관찰하였다. 경구 급성독성의 경우 KML-C는 1mg/kg, 500 μ g/kg, 250 μ g/kg, PBS로 하여 관찰하였고, KM-110은 5g/kg, 2.5g/kg, 1.25g/kg과 PBS를 투여하여 관찰하였다. 결과는 최초 몸무게를 0으로 잡고 이후 증감된 체중을 그래프로 나타내었다. 경구 급성독성의 경우 체중의 변화정도가 KM-110의 경우 증감정도가 있으나 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었고 KML-C역시 체중에 있어서 증가하는 경향을 보였다(그림 1,2).

아급성 실험 역시, 5주령의 ICR mice를 사용하며 급성독성시험결과 확인된 무영향량과 영향량을 포함하는 용량으로 위내로 1개월간 주 5회, 강제 투여하고 임상증상 및 체중의 변화, 폐사유무를 관찰하였다. 그 결과 체중은 KML-C 25ug/head (1mg/kg ; 25g기준), 50ug/head (2mg/kg ; 25g 기준), PBS에서 모두 증가하는 경향을 보였고, KM-110역시 3mg/head (120mg/kg ; 25g기준), 30mg/head (1.2g/kg ; 25g 기준), PBS에서 모두 체중이 증가하는 경향을 보였다 (그림 3,4). 하지만 KML-C 경구 아급성을 조사하는 과정에서 50ug/head를 투여한 군에서 2마리가 사망하였으나 사망원인은 독성이 아닌 투여과정에서 실수로 밝혀져 KML-C 및 KM-110에 있어서 경구투여시 심각한 독성을 나타내는 것은 관찰되지 않았다.

Acute toxicity of KML-C

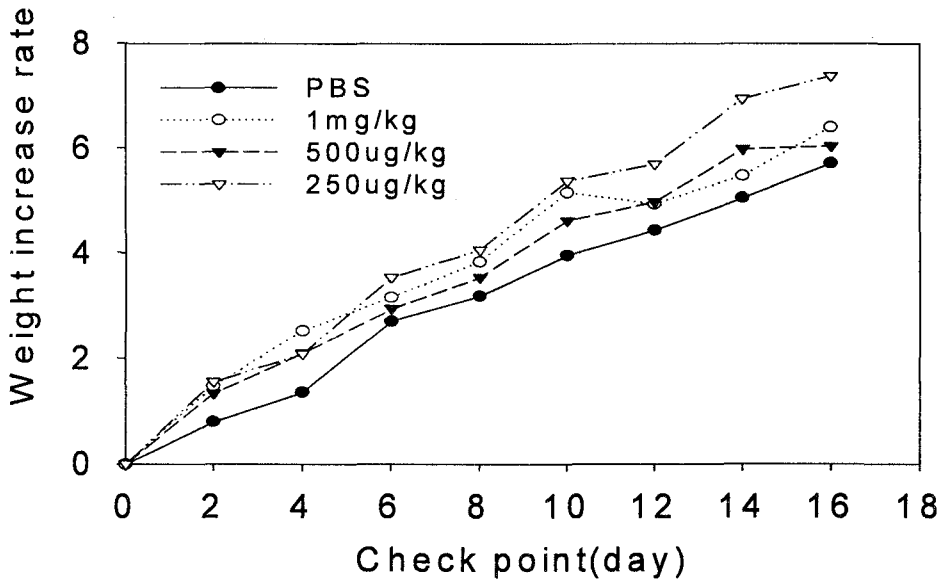


그림 1. KML-C 경구급성독성

Acute toxicity of KM-110

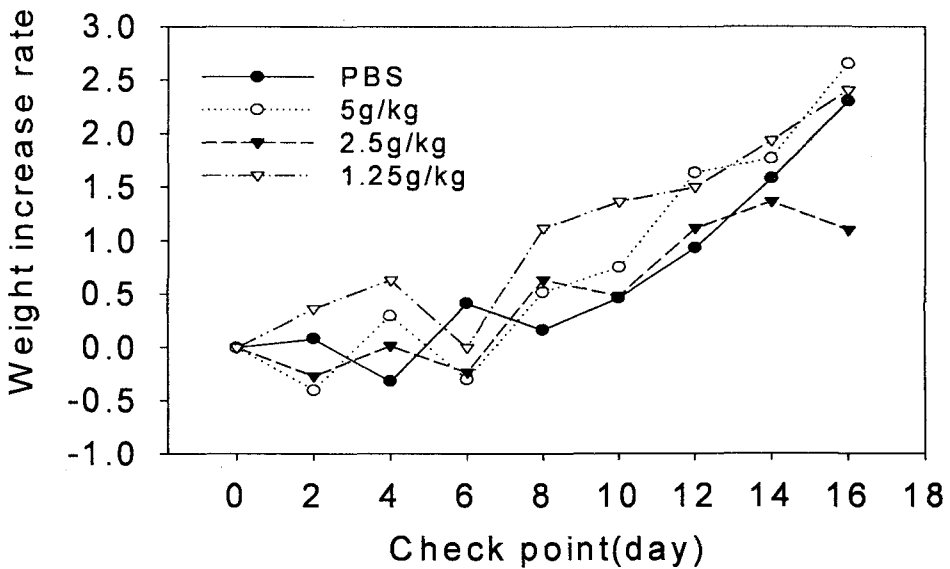


그림 2. KM-110 경구급성독성

Subcutetotoxicity of KML-C

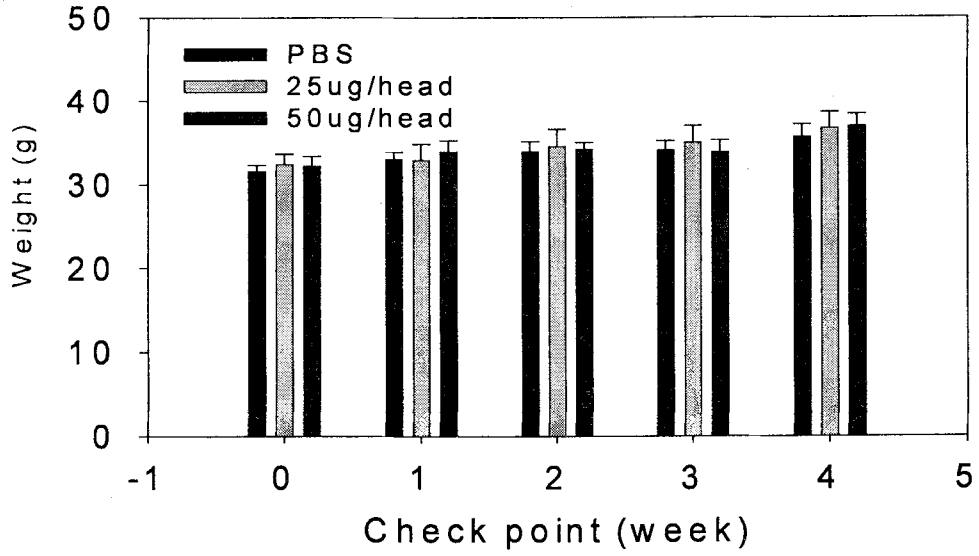


그림 3. KML-C 경구 아급성 독성

Subcutetotoxicity of KM-110

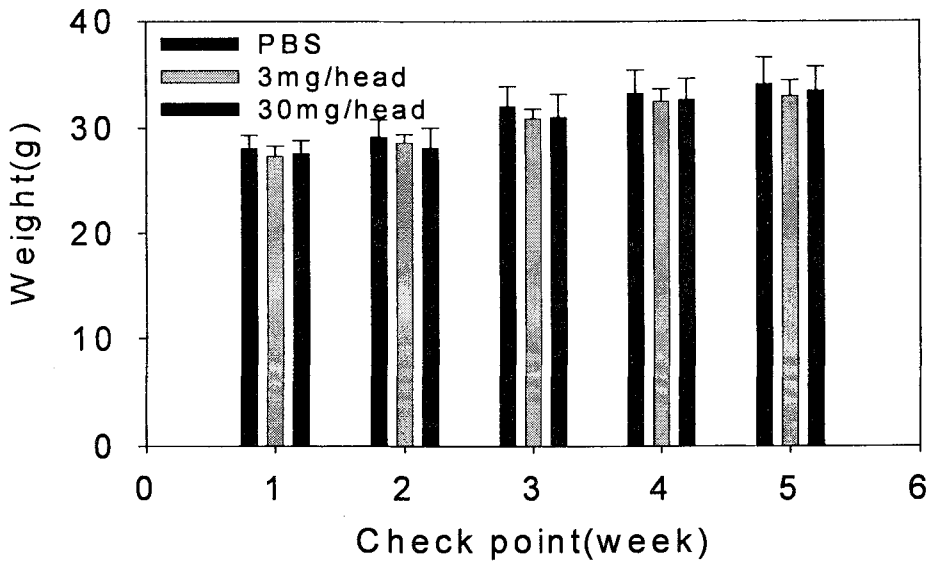


그림 4. KM-110 경구 아급성 독성

나. KM-110 및 KML-C의 경구용백신을 위한 adjuvant로서의 가능성조사

KM-110과 KML-C가 경구투여에 의해서 면역 증강능을 나타내는지 알아보기 위해서 독성실험을 통해서 안정성이 확보된 농도의 KML-C와 KM-110에 대해서 실험을 실시하였다. 항원으로는 Ovalbumin을 사용하였고 대조군으로 Cholera toxin B subunit을 사용하였다. KML-C의 경우 농도를 100ug/head 로 잡았으며 KM-110의 경우 50mg/head로 설정하였다. Cholera toxin B subunit의 경우 10ug/head로 농도를 설정하여 조사하였다.

1) 경구투여에 의한 serum 과 장내의 항원특이항체 titer 증강효과 조사

항체의 titer를 조사하기 위하여 2nd antibody로 HRP가 labeling 되어 있는 Ig G-A-M을 사용하였으며 96well microtiter plate에 OVA을 coating한 뒤 450nm에서 측정하였다. serum에 존재하는 항체의 titer는 7주에 가장 높게 나타났으며 (그림 5), 이를 토대로 다른 시료중에 있는 항체의 titer조사는 7주를 기준으로 조사하기로 결정하였다.

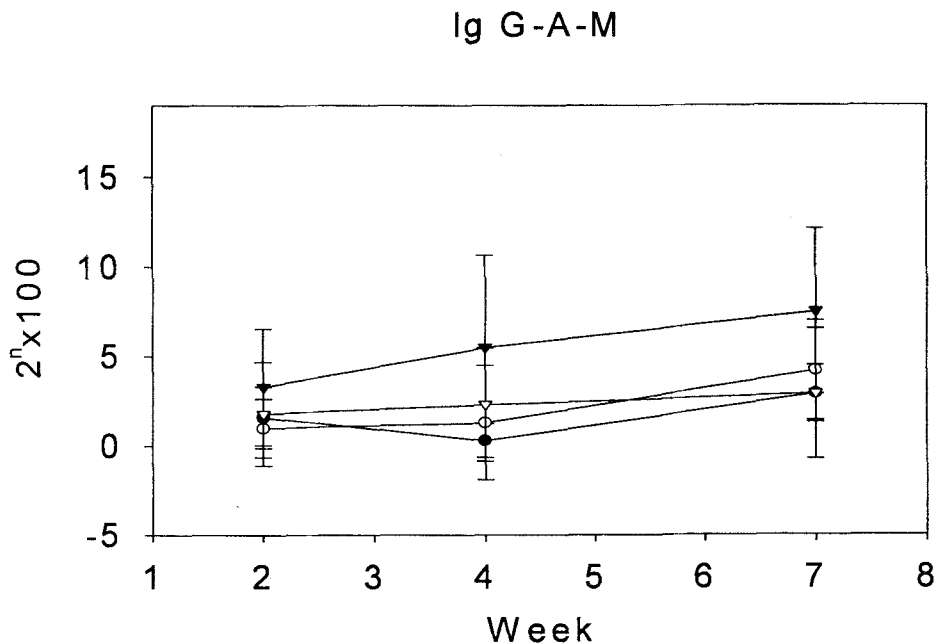


그림 5. Total Ig에 대한 항체 titer 조사

(● : OVA, ○ : +CT(10ug/head), ▼ : +KML-C(100ug/head), ▽ : +KM-110(50mg/head))

2) 항원 특이항체의 isotype 조사

항원에 특이적인 isotype을 조사하기 위해서 OVA를 coating 한 96well microtiter plate에 시료를 넣고 시료에 대해서 2nd antibody로 Ig A와 Ig G를 사용하였다. 그 결과 KML-C와 KM-110을 투여한 군이 CT보다 높은 titer를 나타내었다.

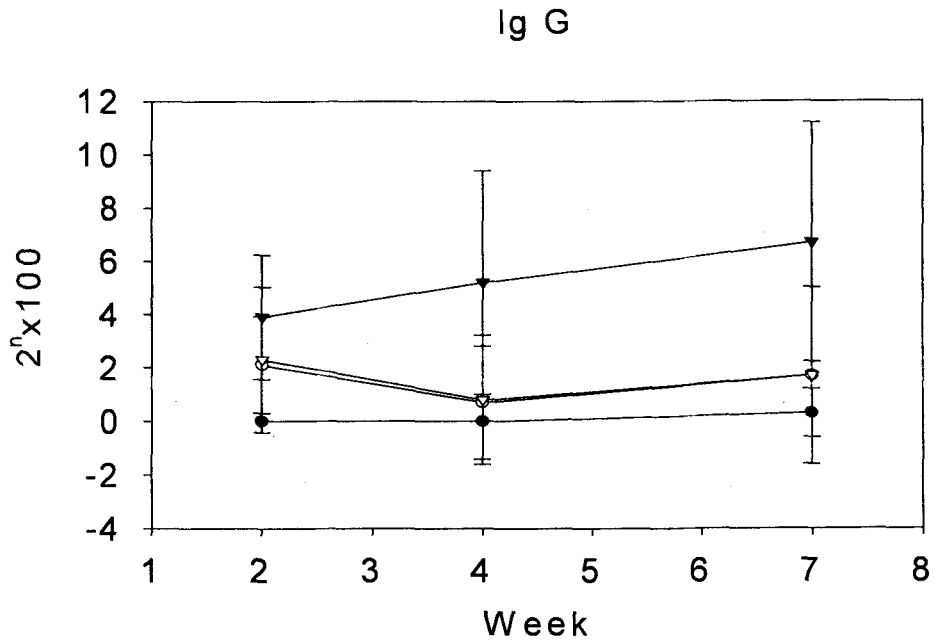


그림 6. Ig G 항체에 대한 titer 조사

(● : OVA, ○ : +CT(10ug/head), ▼ : +KML-C(100ug/head), ▽ : +KM-110(50mg/head))

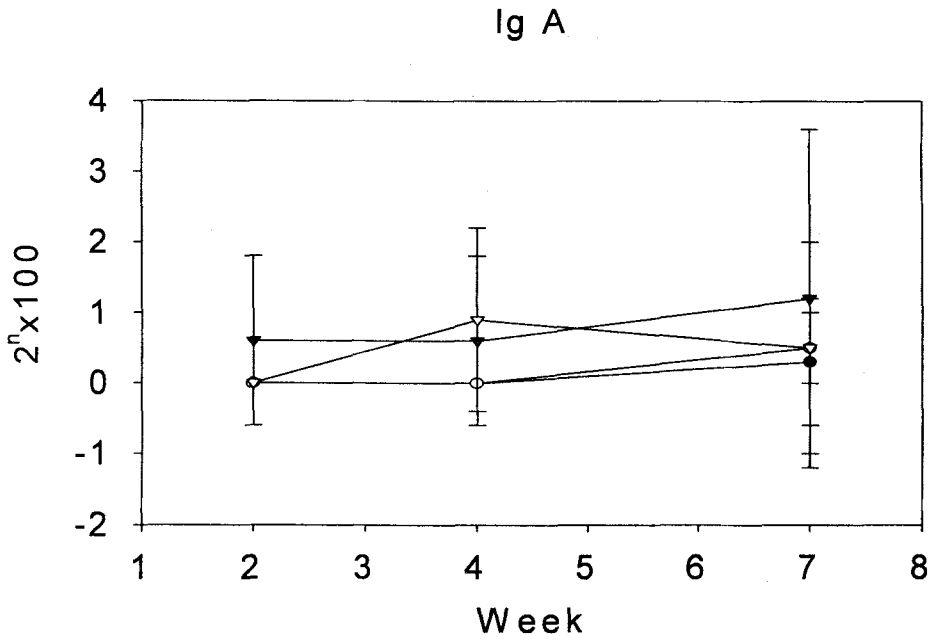


그림 7. Ig A 항체 titer 조사

(● : OVA, ○ : +CT(10ug/head), ▼ : +KML-C(100ug/head), ▽ : +KM-110(50mg/head))

3) 항원 특이항체의 subclass 조사

항원에 특이적인 isotype을 조사한 후에 Ig G class에서 subclass를 조사하였다. 이를 위해서 Ig G1과 Ig G2a를 사용하여 조사하였다.

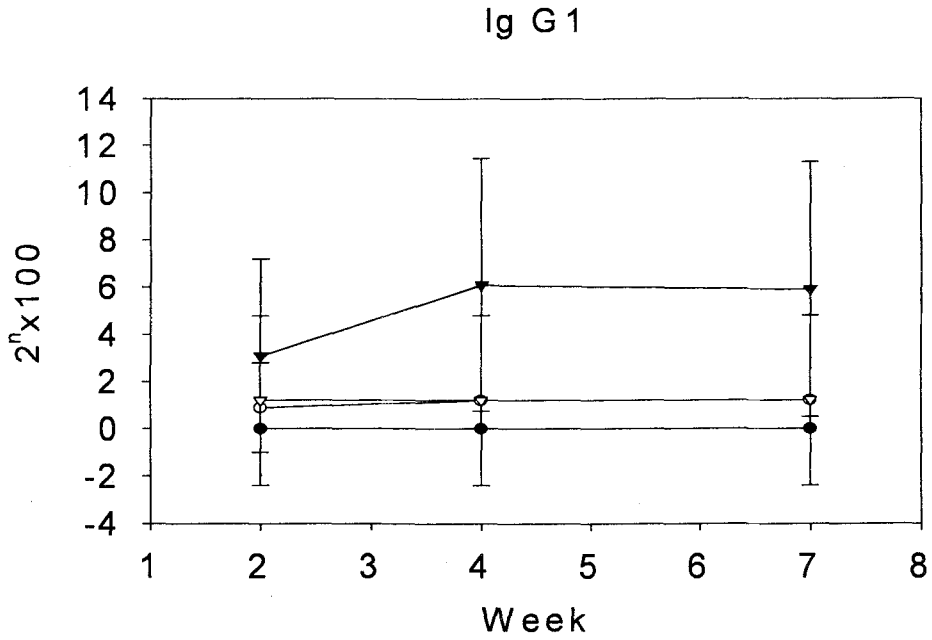


그림 8. Ig G1 항체에 대한 titer 조사

(● : OVA, ○ : +CT(10ug/head), ▼ : +KML-C(100ug/head), ▽ : +KM-110(50mg/head))

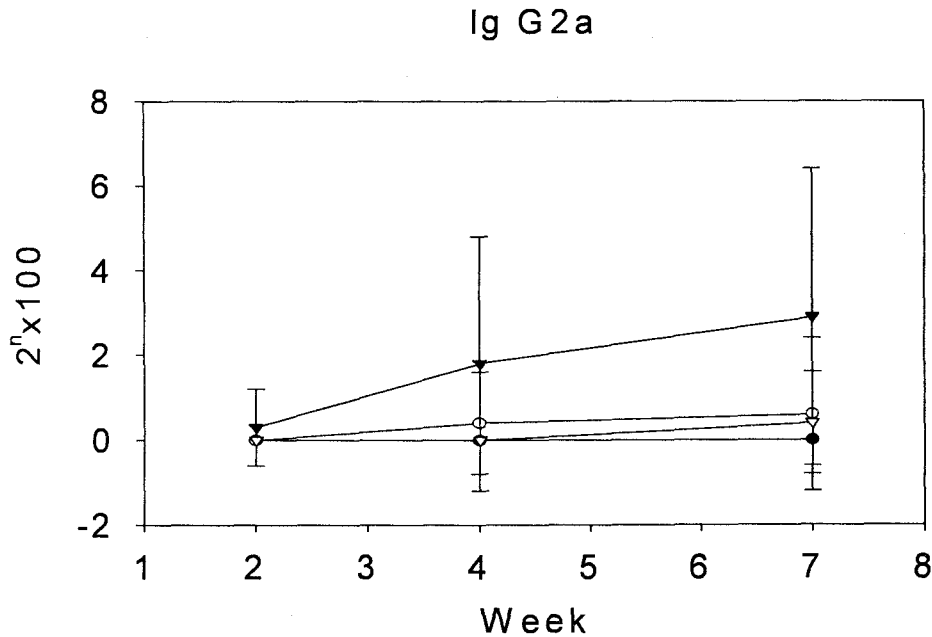


그림 9. Ig G2a에 대한 항체 titer조사

(● : OVA, ○ : +CT(10ug/head), ▼ : +KML-C(100ug/head), ▽ : +KM-110(50mg/head))

4) 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine 유도능 조사

KM-110을 항원과 함께 경구를 통해 면역한 후 비장을 취하여 취해진 spleen cell을 96well plate에 4×10^5 c/well의 밀도로 plating 하고 항원(Ovalbumin) 혹은 mitogen (Con-A)로 in vitro에서 재자극 한 뒤 비장세포의 증식정도를 XTT법으로 조사하였다. 한편 spleen cell을 48well plate에 2×10^6 c/well의 밀도로 plating 한 후 OVAfh 재자극 한 후 상등액을 48hr 후에 취하여 cytokine(IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10)을 정량하였다. 하지만 경구로 투여한 뒤 너무 오랜 시간이 지나서 비장세포의 민감성이 떨어짐과 동시에 cytokine의 분비가 초기와 비교하였을 때 없어진 것으로 사료된다. 따라서 비장세포의 증식정도나 cytokine에 대한 분비 정도 측정은 시간을 다르게 하여 경구투여 초기에 하는 것이 바람직 한 것으로 사료된다. 따라서 보다 정확한 mitogenic effect와 cytokine의 분비정도를 조사하기 위해서는 시기를 경구투여가 끝나기 전에 primary와 booster administration 사이에 조사하는 것이 바람직하다고 본다.

제 3 절 협동과제

1. 세부과제 목표 및 내용 (책임자 : 여상진)

| 목표 | 내용 및 범위 |
|--|--|
| <p>• 겨우살이 추출물에 의한 닭 전염병 예방백신의 특이면역 증강</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 닭에 대한 lectin의 일반독성 분석 2. 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강 효과 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 뉴캐슬병 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 강독주 공격에 대한 방어능력 3. 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강 효과 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 전염성기관지염 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 강독주 공격에 대한 방어능력 |
| <p>• 겨우살이 추출물에 의한 돼지 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. 돼지에 대한 lectin의 일반독성 분석 2. 오제스키병 예방백신의 특이면역증강 효과 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) 오제스키병 바이러스 배양 및 정제 2) Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 3) 자돈 면역시의 항체 형성수준 및 지속 기간 조사 4) 항체의 바이러스 중화능력조사 5) 강독주 공격에 대한 방어능력 |
| <p>•겨우살이 추출물에 의한 닭 뉴캐슬병 바이러스 유전자 발현 단백질 백신의 특이 면역 증강</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. HN 유전자 발현단백질 백신의 특이적 면역 증강 효과 조사 <ol style="list-style-type: none"> 1) HN 유전자 재조합 DNA clone 배양 2) HN 유전자 발현단백질 획득 3) Lectin 혼합 발현단백질 백신 생산 4) 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 지속기간 조사 5) 항체의 바이러스 중화능력 조사 6) 강독주 공격에 대한 방어능력 조사 |

2. 연구개발 방법

o 1차년도 (1999년)

가. 목표 : 겨우살이 추출물에 의한 닭 전염병 예방백신의 특이면역 증강 효과 조사
겨우살이 추출물로부터 정제된 lectin의 닭 뉴캐슬병 및 전염성기관지염 예방백신에 대한 면역증강 효과를 조사하며, 여기에 선행하여 닭에 대한 lectin의 일반적인 독성 여부를 조사한다.

나. 겨우살이 추출물의 닭에 대한 일반독성 확인

겨우살이 추출물 혹은 lectin의 닭에 대한 일반독성 여부를 다음과 같이 조사한다.

1) Lectin 접종

Lectin을 수립되는 일정 농도별로 근육주사 경로로 부화후 1주령의 병아리에게 접종한 후 2주동안 경시적으로 육안적 및 병리조직학적으로 관찰한다. 또한 lectin을 접종하지 않은 동일 일령의 병아리를 대조군으로 공시한다.

2) 병리조직 소견

접종부위의 조직소견, 염증반응과 함께 실질장기의 포르말린 고정 조직표본 상에서 병리소견을 관찰한다.

3) 체중 및 체온의 변화

접종후의 체중 및 체온의 변화 상태를 관찰하여 부작용 여부를 확인한다.

4) 혈액 화학치의 변화

혈액의 총적혈구수, 총백혈구수 및 각종 생화학치를 조사하여 lectin에 의한 부작용 여부를 관찰한다.

다. 겨우살이 추출물에 의한 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강 효과

불활화 뉴캐슬병 바이러스 백신에 대한 lectin의 면역증강 효과를 조사하기 위하여, lectin을 혼합시킨 뉴캐슬병 바이러스 불활화 백신을 병아리에게 접종한 후 항체의 형성수준 및 지속기간, 강독 바이러스 공격에 대한 방어능력 등을 조사한다.

1) 뉴캐슬병 바이러스의 배양

뉴캐슬병 바이러스 (F주 또는 LaSota주)를 Chambers와 Samson (1980)의 방법에 따라 부화 9~10일령 SPF (specific pathogen free) 발육란의 장요막강내에 접종하고 37°C의 부화기에서 3일 정도 증식시킨 후에 장요막강액을 무균적으로 채취한다. 이 액을 5,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 상청의 바이러스액을 수확한 다음 바이러스의 역가를 검정한다.

2) 바이러스 역가의 검정

Beard (1990)의 베타술식에 따라 96 well plate 상에서의 적혈구 응집반응을 실시하여 바이러스 배양 장요막강액의 적혈구에 대한 응집성 여부에 따라 바이러스 유무를 확인한다.

3) 바이러스의 불활화

일정 역가의 정제된 바이러스를 binary ethylenimine (BEI), formalin 또는 β -propiolactone 등으로 불활화 시킨다 (송창선과 이택주, 1988). 불활화 바이러스를 부화 9~10일령 SPF 발육란의 장요막강내에서 배양한 후, 베타술식 (Beard, 1990)에 의한 96 well plate 상에서의 적혈구 응집반응을 실시하여 장요막강액의 적혈구 응집

성 여부에 따라 불활화 상태를 확인한다.

4) 불활화 바이러스와 lectin의 혼합 백신 생산

불활화된 바이러스에 일정 농도의 lectin을 혼합하여 백신을 생산한 후 4℃에 보관하면서 공시한다.

5) 병아리 면역

SPF 계란을 부화시킨 후 1주일의 병아리 총 600수를 대상으로 하여, 150수를 1군으로 하고 3개군에 대하여 백신을 근육주사 경로로 접종한다. 이때 제 1군에는 lectin 혼합 불활화 백신을, 제 2군에는 기성 백신에 사용되는 adjuvant를 혼합한 불활화 백신을, 제 3군에는 불활화 바이러스를 단독으로 접종한다. 또한 대조군으로서 제 4군을 무접종군으로 하여 각 군에서의 면역반응을 비교 조사한다.

6) 항체의 형성수준 및 지속기간 조사

백신접종 후 시험군과 대조군을 6주동안 사육 및 육안 관찰하면서 매주 채혈하여 혈청을 무균적으로 분리한 후, 경시적인 항체의 형성수준 및 지속기간을 비교 조사한다.

7) 강독 바이러스 공격에 대한 방어능력

각 시험군과 대조군의 병아리 중 각 25수를 Kelleher 등 (1987)의 방법에 준하여 백신접종후 4주경에 강독성 뉴캐슬병 바이러스주 (교정원주 또는 Herts주)에 노출시킨 후 감염 또는 생존 여부, 항체 보유수준을 비교 조사한다. 이때 공격 바이러스의 역가는 Reed와 Muench (1938)의 방법에 따른 50% embryo lethal dose (ELD50) 산정에 의하여 결정한다.

8) 항체 검사

병아리 혈청내에서의 뉴캐슬병 바이러스에 대한 항체 소장여부 및 역가를 베타술식 (Beard, 1990)에 의한 96 well plate 상에서의 적혈구응집 억제반응으로 검사한다.

9) 중화항체의 성상 검사

병아리 혈청내에 형성된 항체의 뉴캐슬병 바이러스 중화 능력 여부 및 반응성을 Laemmli (1970)의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 및 western blotting 방법 (Harlow와 Lane, 1988)으로 검사한다.

10) SDS-PAGE 및 western blotting

뉴캐슬병 바이러스 (F주 또는 LaSota주) 배양액을 초원심 분리하여 바이러스를 정제 및 농축한 후 SDS-PAGE 상에서 항원 polypeptide를 전개시킨다. 이 polypeptide band를 nitrocellulose membrane에 전이시키고 혈청시료를 가한 후 항원 polypeptide와의 반응성을 확인한다.

라. 겨우살이 추출물에 의한 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강 효과

불활화 전염성기관지염 바이러스 백신에 대한 lectin의 면역증강 효과를 조사하기 위하여, lectin을 혼합시킨 전염성기관지염 바이러스 불활화 백신을 병아리에 게 접종한 후 항체의 형성수준 및 지속기간, 강독 바이러스 공격에 대한 방어능력 등을 조사한다.

1) 전염성기관지염 바이러스의 배양

전염성기관지염 바이러스를 Gelb (1990)의 방법에 따라 부화 9~10일령 SPF 발육란의 장요막강내에 접종하고 37°C의 부화기에서 3일 정도 증식시킨 후에 장요막강액을 무균적으로 채취한다. 이 액을 5,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하

여 상청의 바이러스액을 수확한 다음 바이러스의 역가를 검정한다.

2) 바이러스 역가의 검정

바이러스 배양 장요막강액을 초원심 침전시켜 바이러스를 분리한 후 Gelb (1990)의 방법에 따라 100배로 농축시키고 phospholipase C로 처리한다. 이 농축 바이러스액에 대하여 베타술식 (Beard, 1990)에 의한 96 well plate 상에서의 적혈구 응집반응을 실시하여 적혈구 응집성 여부에 따라 바이러스 유무를 확인한다. 또한 ED50를 산정하여 바이러스의 역가를 검정한다.

3) 바이러스의 불활화

일정 역가의 정제된 바이러스를 BEI, formalin 또는 β -propiolactone 등으로 불활화 시킨다 (송창선과 이택주, 1988). 불활화 바이러스를 부화 9~10일령 SPF 발육란의 장요막강내에서 배양한 다음 phospholipase C로 처리한 후, 베타술식 (Beard, 1990)에 의한 96 well plate 상에서의 적혈구 응집반응을 실시하여 장요막강액의 적혈구 응집성 여부에 따라 불활화 상태를 확인한다.

4) 불활화 바이러스와 lectin의 혼합 백신 생산

불활화된 바이러스에 일정 농도의 lectin을 혼합하여 백신을 생산한 후 4℃에 보관하면서 공시한다.

5) 병아리 면역

SPF 계란을 부화시킨 후 1주령의 병아리 총 600수를 대상으로 하여, 150수를 1군으로 하고 3개군에 대하여 백신을 근육주사 경로로 접종한다. 이때 제 1군에는 lectin 혼합 불활화 백신을, 제 2군에는 기성 백신에 사용되는 adjuvant를 혼합한 불활화 백신을, 제 3군에는 불활화 바이러스를 단독으로 접종한다. 또한 대조군으로서 제 4군을 무접종군으로 하여 각 군에서의 면역반응을 비교 조사한다.

6) 항체의 형성수준 및 지속기간 조사

백신접종 후 시험군과 대조군을 6주동안 사육 및 육안 관찰하면서 매주 채혈하여 혈청을 무균적으로 분리한 후, 경시적인 항체의 형성수준 및 지속기간을 비교 조사한다.

7) 강독 바이러스 공격에 대한 방어능력

각 시험군과 대조군의 병아리 중 각 25수를 Kelleher 등 (1987)의 방법에 준하여 백신접종후 4주경에 강독성 전염성기관지염 바이러스주에 노출시켜 감염 또는 생존 여부, 항체 보유수준을 비교 조사한다.

8) 항체 검사

병아리 혈청내에서의 전염성기관지염 바이러스에 대한 항체 소장여부 및 역가를 베타술식에 의한 96 well plate 상에서의 적혈구응집 억제반응 및 형광항체법으로 검사한다.

o 2차년도 (2000년)

가. 목적 : 겨우살이 추출물에 의한 돼지 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강 효과 조사

겨우살이 추출물로부터 정제된 lectin의 돼지 오제스키병 예방백신에 대한 면역증강 효과를 조사하며, 여기에 선행하여 돼지에 대한 lectin의 일반적인 독성여부를 조사한다.

나. 겨우살이 추출물의 돼지에 대한 일반독성 확인

겨우살이 추출물 (lectin)의 돼지에 대한 일반독성 여부를 다음과 같이 조사한다.

1) Lectin 접종

Lectin을 수립되는 일정 농도별로 근육주사 경로로 생후 1주령의 자돈에게 접종한 후 2주동안 경시적으로 육안적 및 병리조직학적으로 관찰한다. 또한 lectin을 접종하지 않은 동일 일령의 자돈을 대조군으로 공시한다.

2) 병리조직 소견

접종부위의 조직소견, 염증반응과 함께 실질장기의 포르말린 고정 조직표본 상에서 병리소견을 관찰한다.

3) 혈액 화학치의 변화

혈액의 총적혈구수, 총백혈구수 및 각종 생화학치를 조사하여 lectin에 의한 독성 여부를 관찰한다.

다. 겨우살이 추출물에 의한 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강 효과

불활화 오제스키병 바이러스 백신에 대한 lectin의 면역증강 효과를 조사하기 위하여, lectin을 혼합시킨 오제스키병 바이러스 불활화 백신을 자돈에게 접종한 후 항체의 형성수준 및 지속기간, 강독 바이러스 공격에 대한 방어능력 등을 조사한다.

1) 오제스키병 바이러스의 배양

오제스키병 바이러스 (NYJ87-1주 등)를 Moenning (1982)의 방법에 준하여 minimal essential medium (MEM)으로 유지배양 되고 있는 porcine kidney 15 (PK 15) 세포에 감염시켜 CO₂가 5%로 유지되는 37℃의 incubator에서 3~5일동안 증식시킨다. 배양세포를 동결·용해 및 5,000 rpm에서 30분동안 원심 분리하여 상청의 바이러스액을 무균적으로 수확한 후 바이러스의 역가를 검정한다.

2) 바이러스 역가의 결정

통상적인 Reed와 Muench법에 따라 PK 15 세포 배양계에서 바이러스의 median tissue culture infectious dose (TCID₅₀)를 산정하여 역가를 검정한다

3) 바이러스의 불활화

일정 역가의 정제된 바이러스를 binary ethylenimine, formalin 또는 β -propiolactone 등으로 불활화 시킨다. 불활화 바이러스를 PK 15 세포 배양계에 감염시키고 증식여부에 따라 불활화 상태를 확인한다.

4) 불활화 바이러스와 lectin의 혼합 백신 생산

불활화된 바이러스에 일정 농도의 lectin을 혼합하여 백신을 생산한 후 4°C에 보관하면서 공시한다.

5) 자돈 면역

출생후 모돈의 초유를 포유하지 않은 생후 1주령의 자돈 12두를 1군으로 하여 4개군에 대하여 백신을 근육주사 경로로 접종한다. 이때 제 1군에는 lectin 혼합 불활화 백신을, 제 2군에는 기성 백신에 사용되는 adjuvant를 혼합한 불활화 백신을, 제 3군에는 lectin과 기존 면역증강 물질을 동시 혼합한 불활화 바이러스를, 제 4군에는 불활화 바이러스를 단독으로 접종한다. 또한 대조군으로서 제 5군(12두)을 비접종군으로 하여 각 군에서의 항체가를 비교 조사한다.

6) 항체의 형성상태 조사

백신접종 후 시험군과 대조군을 5주 동안 사육 및 육안 관찰하면서 매주 각 군별 3두씩 5회 채혈하여 경시적으로 항체가를 비교 조사한다.

7) 세포성 면역 상태 조사

상기의 혈액재료를 이용하여 예방 접종 후 자돈에서 형성되는 세포성 면역의

상태를 경시적으로 조사한다.

8) 강병원성 바이러스 공격에 대한 방어능력

각 시험군과 대조군의 자돈 중 각 3두를 백신 접종후 4주경에 Jestin 등 (1990)의 방법에 따라 강병원성 오제스키병 바이러스에 노출시켜 감염 또는 생존 여부, 항체 보유수준을 비교 조사한다.

9) 항체 검사

자돈 혈청내의 오제스키병 바이러스에 대한 항체 소장여부 및 역가를 PK15 세포 배양계에서의 혈청중화시험 (Moenning, 1982, Schoenbaum 등, 1990)으로 검사한다.

10) 중화항체 검사

자돈 혈청내에 형성된 항체의 오제스키병 바이러스 중화 능력 여부 및 반응성을 sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) 및 western blotting 방법 (Harlow와 Lane, 1988)으로 검사한다.

11) SDS-PAGE 및 western blotting

오제스키병 바이러스 배양액을 초원심 분리하여 바이러스를 정제 및 농축한 후 SDS-PAGE 상에서 항원 펩타이드를 전개시킨다. 이것을 nitrocellulose membrane에 전이시키고 혈청시료를 가한 후 항원 펩타이드와의 반응성을 확인한다.

o 3차년도 (2001)

가. 목표 : 겨우살이 추출물에 의한 닭 뉴캐슬병 바이러스 유전자 발현단백질 백신의 특이면역 증강 효과 조사

뉴캐슬병 바이러스로부터 재 조합된 hemagglutinin-neuraminidase (HN) 유전자의 발현단백질을 면역원으로 하여 이에 대한 lectin의 면역증강 효과를 조사하기 위하여, lectin을 혼합시킨 발현단백질을 병아리에게 접종한 후 항체의 형성수준 및 지속기간, 강병원성 바이러스 공격에 대한 방어능력 등을 조사한다.

나. 뉴캐슬병 바이러스 HN 유전자 재 조합 DNA clone의 작성

실험실에 보유하고 있는 뉴캐슬병 바이러스 HN 유전자 재 조합 plasmid (cloning vector) DNA로부터 HN 유전자를 추출, 정제한 후 baculovirus expression vector DNA와 결합시켜 HN 유전자 재 조합 DNA clone을 작성한다.

다. 뉴캐슬병 바이러스 HN 유전자 재조합 DNA clone의 배양

뉴캐슬병 바이러스 HN 유전자 재조합 DNA (Nagy, E 등, 1990)를 Summers와 Smith (1987)의 방법에 따라 baculovirus와 함께 *Spodoptera frugiperda* 세포 배양계에서 증식시킨 후 배양 상청액을 5,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 발현단백질 액을 무균적으로 수확한 다음 역가를 검정한다.

라. 발현단백질의 적혈구응집 역가 검정

베타술식 (Beard, 1990)에 의한 96 well plate 상에서의 적혈구 응집반응을 실시하여, HN 유전자 발현단백질 액의 적혈구에 대한 응집성 여부에 따라 HN 단백질 여부를 확인한다. 또한 단백질 함량을 spectrophotometer로서 정량한다

마. HN 유전자 발현단백질과 lectin의 혼합 백신 생산

일정량의 HN 유전자 발현단백질을 일정 농도의 lectin과 혼합하여 백신 생산한 후 4℃에 보관하면서 공시한다.

바. 병아리 면역

SPF 계란을 부화시킨 후 1주령의 병아리 100수 (각 군당 필요한 최소의 병아리 수는 50수이며 폐사, 채혈실패 등에 대비한 병아리 수)를 1군으로 하여 3개 군에 대하여 HN 유전자 발현단백질 백신을 근육주사 경로로 접종한다. 이때 제 1군에는 lectin을 혼합한 백신을, 제 2군에는 기성 백신에 사용되는 adjuvant를 혼합한 백신을, 제 3군에는 HN 유전자 발현단백질을 단독으로 접종한다. 또한 대조군으로서 제 4군을 비 접종군으로 하여 각 군에서의 면역반응을 비교 조사한다.

사. 항체의 형성수준 및 지속기간 조사

백신접종 후 시험군과 대조군을 5주 동안 육안 관찰하면서 매주 5수씩 5회 채혈하여 혈청을 분리한 후 경시적인 항체의 형성수준 및 지속기간을 비교 조사한다.

아. 강병원성 바이러스 공격에 대한 방어능력

각 시험군과 대조군의 병아리 중 각 5수는 백신 접종 후 4주 경에 Kelleher 등 (1987)의 방법에 준하여 강병원성 뉴캐슬병 바이러스주 (교정원주 또는 Herts주)에 노출시킨 후 생존 여부, 항체 보유수준을 비교 조사한다.

자. 항체 검사

병아리 혈청 내에서의 뉴캐슬병 바이러스에 대한 항체 소장여부 및 역가를 베타 슬식 (Beard, 1990)에 의한 96 well plate 상에서의 적혈구응집 억제반응으로 검사한다.

차. 중화항체의 성상 검사

병아리 혈청 내에 형성된 항체의 뉴캐슬병 바이러스 중화 능력 여부 및 반응성을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) 및 western blotting 방법 (Harlow와 Lane, 1988) 으로 검사한다.

카. SDS-PAGE 및 western blotting

뉴캐슬병 바이러스 (B1주)를 Chambers와 Samson (1980)의 방법에 따라 부화 9~10일령 SPF (specific pathogen free) 발육란의 장요막강 내에 접종하고 37°C의 부화기에서 3일 정도 증식시킨 후에 장요막강 액을 채취한다. 이 액을 5,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 상청의 바이러스 액을 수확한 다음 초원심 분리하여 바이러스를 정제 및 농축한다. SDS-PAGE 상에서 바이러스 항원 펩타이드를 전개시킨다. 이 펩타이드를 nitrocellulose membrane에 전이시키고 혈청시료를 가한 후 항원 펩타이드와의 반응성을 확인한다.

3. 연구개발 내용 및 결과

○ 1차년도 (1999)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|-------------|-------|------------|
| 경상대학교 수의과대학 | 여상건 | 25,000,000 |

가. 겨우살이 추출물의 닭에 대한 일반독성

1) Lectin 접종후 닭의 혈액학치 및 혈액화학치 변화

SPF 종란 (미국 Charles River사)을 부화시킨 후 1주령의 병아리를 경상대학교 무균 동물사육실에서 사육하면서, 1 실험군당 15수로 하여 겨우살이 추출물인 lectin

을 제1군에는 1수 당 50 ng, 제2군에는 1수 당 100 ng, 제3군에는 1수 당 1000 ng을 대퇴부 근육 내에 접종하였다. 즉, 병아리 (평균 체중: 45 g) 체중 1 g 당 접종량으로 환산하면 각각 1.1 ng, 2.2 ng 및 22.2 ng 수준의 투여량이었다. 제4군은 대조군으로서 증류수를 접종하였다. 접종전 및 접종후 16일 동안 매 4일 마다 각 군당 3수로부터 혈액을 채취 (채혈 후 부검 실시)하여 혈액학치 및 혈액화학치를 조사하였다.

즉, 적혈구 및 백혈구 총수는 Neubauer 계산판을 이용한 통상의 방법에 의하여 산출하였으며, 혈구용적 (packed cell volume, PCV)은 microhematocrit법으로서, 혈색소 (hemoglobin, Hb)는 혈색소 측정기 (Hemocue, B-hemoglobin, Sweden)를 사용하여 측정하였다. 또한 상법에 따라 평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구 혈색소량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH) 및 평균 적혈구 혈색소농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)를 산출하였다. 혈액화학치는 혈액화학분석기 (Auto dry chemistry analyzer, spot chem SP-4410, 일본)를 이용하여 혈청 glutamic-oxaloacetic transaminase 효소 (GOT), 혈청 glutamic-pyruvic transaminase 효소 (GPT), 혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN), creatinine 및 총단백 함량을 측정하였다. 각 분석치는 student t-test에 의한 유의성을 검정하였다.

그 결과 전 실험기간 동안 각 농도별 lectin 접종군과 대조군에서 총 적혈구 (Fig. 1), 총백혈구 (Fig. 2) 및 Hb (Fig. 3) 수치의 유의적인 변화가 나타나지 않았다. PCV치 (Fig. 4)는 유의한 감소가 인정되었으나 이러한 변화는 정상범위 내에서의 변화이었다. MCV (Fig. 5), MCH (Fig. 6) 및 MCHC (Fig. 7) 수치 역시 실험기간 동안 정상범위 내에서의 변화를 나타내었다. 또한 GOT (Fig. 8), GPT (Fig. 9) 함량에서 실험기간 동안 유의한 변화가 인정되지 않아 간 기능의 이상이 없음을 알 수 있었고, BUN (Fig. 10), creatinine (Fig. 11), 총단백 (Fig. 12) 함량 역시 실험기간 동안 유의한 변화가 인정되지 않아 신장 기능에도 이상이 없음을 관찰하였다.

따라서 lectin (체중 1 g 당 1.1-22.2 ng)의 근육내 접종시에 병아리에서 혈액의 정상, 간기능 및 신장기능의 이상 변화를 나타내는 혈액학적 독성이 나타나지 않았

다.

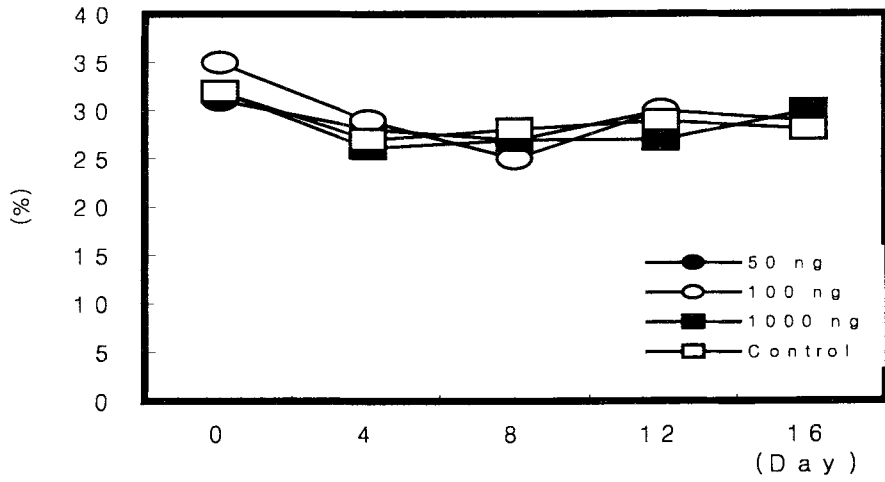


Fig. 1. RBC counts in chicks after injection of lectin.

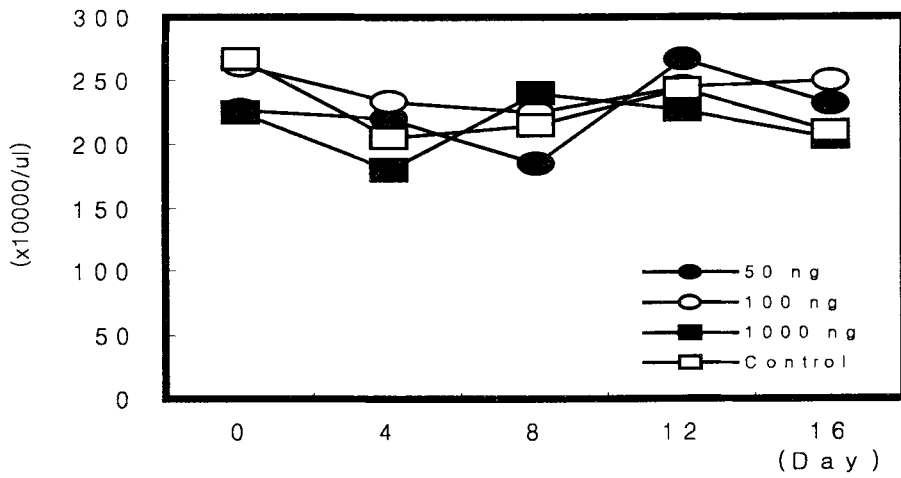


Fig. 2. WBC counts in chicks after injection of lectin.

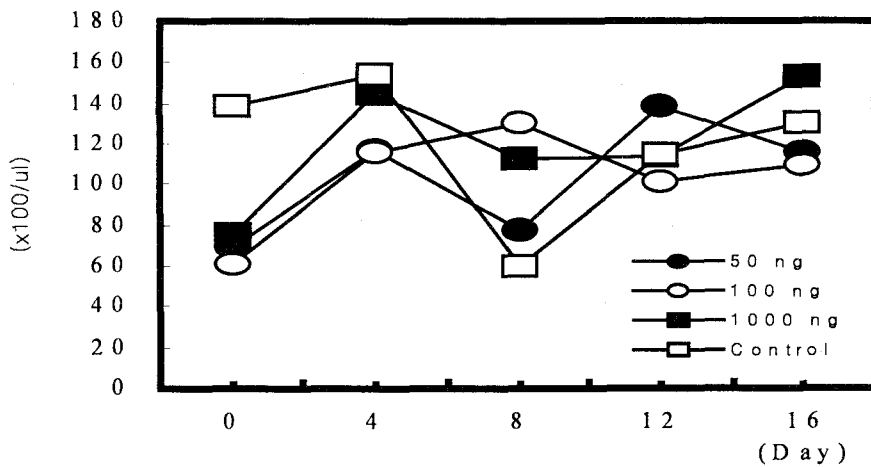


Fig. 3. Hb values in blood of chicks after injection of lectin.

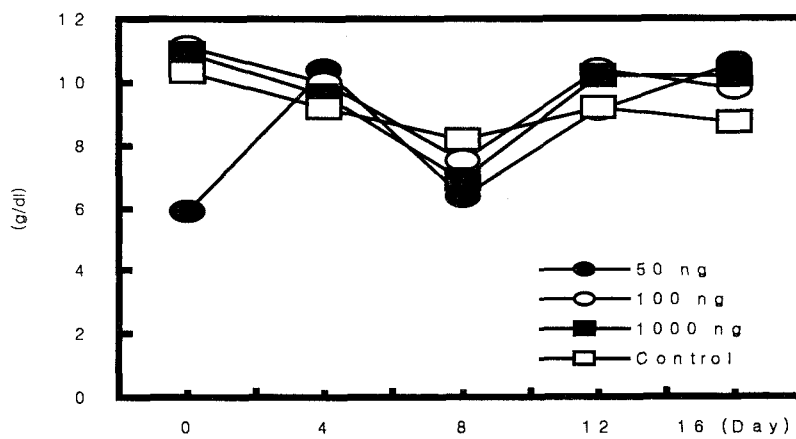


Fig. 4. PCV in blood of chicks after injection of lectin.

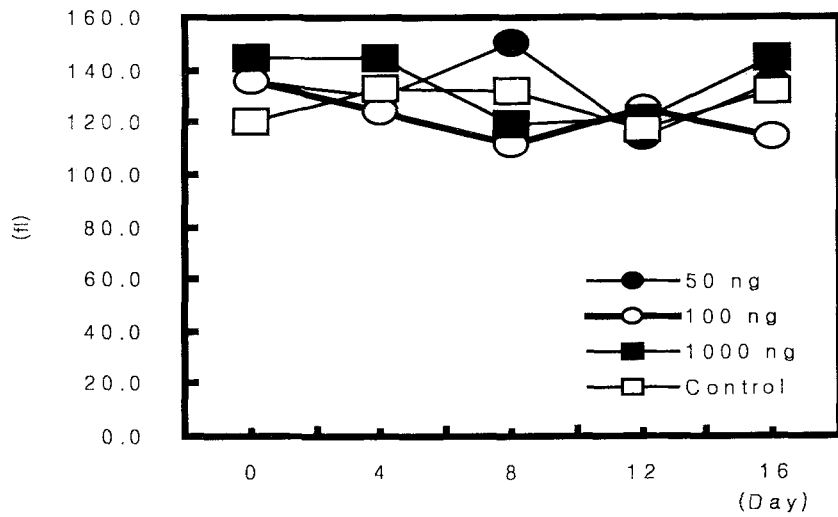


Fig. 5. M CV in blood of chicks after injection of lectin.

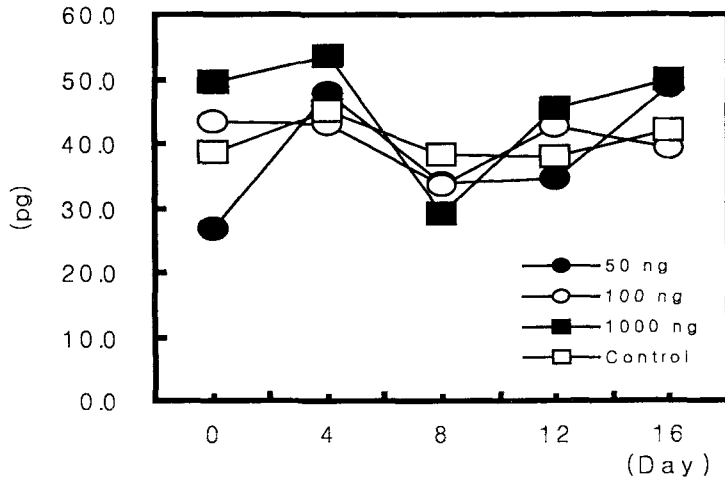


Fig. 6. M CH in blood of chicks after injection of lectin.

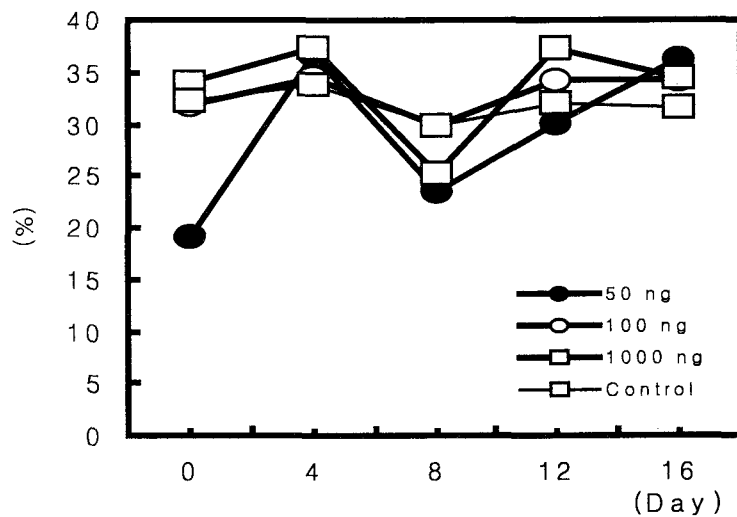


Fig. 7. MCHC in blood of chicks after injection of lectin.

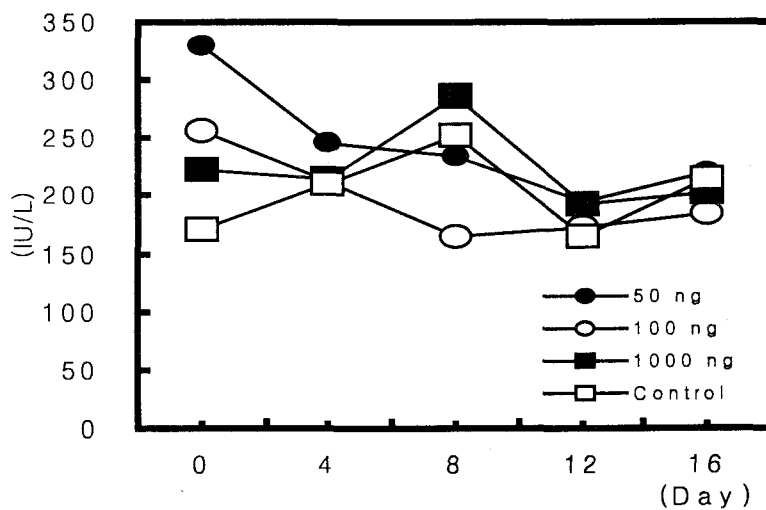


Fig. 8. GOT values in blood of chicks after injection of lectin.

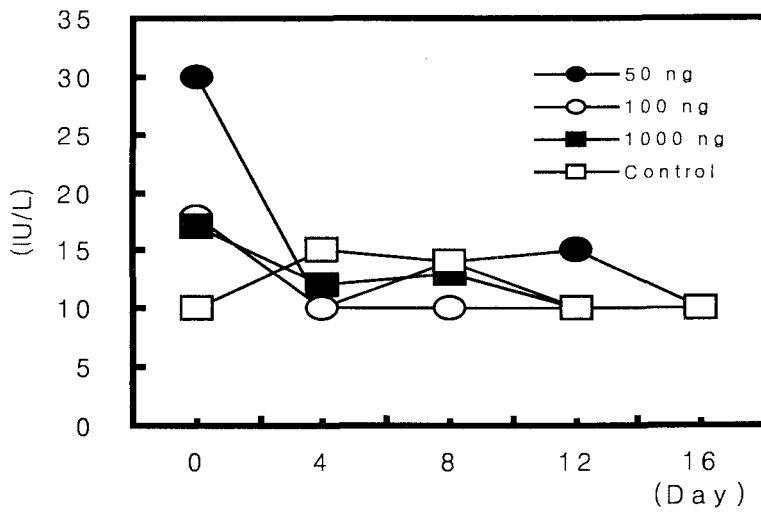


Fig. 9. GPT values in blood of chicks after injection of lectin.

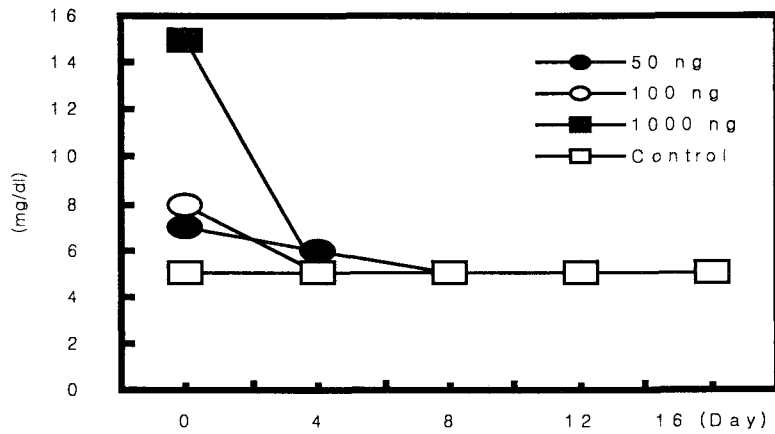


Fig. 10. BUN values in blood of chicks after injection of lectin.

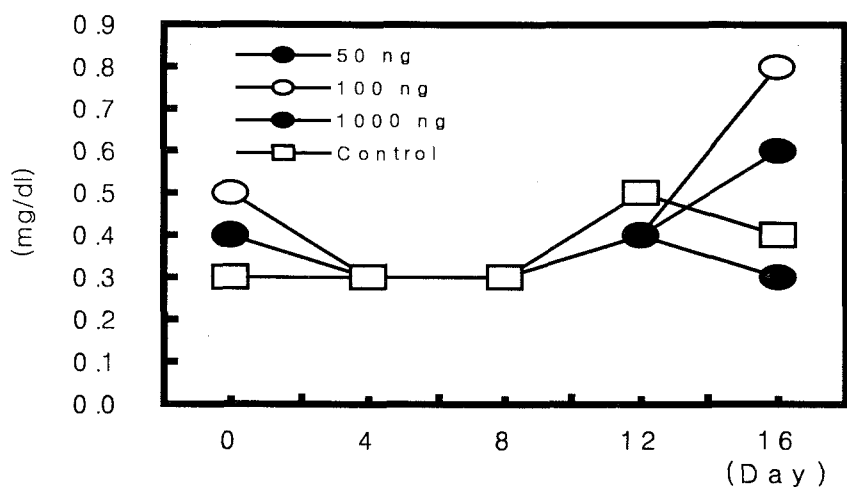


Fig. 11. Creatinine values in blood of chicks after injection of lectin.

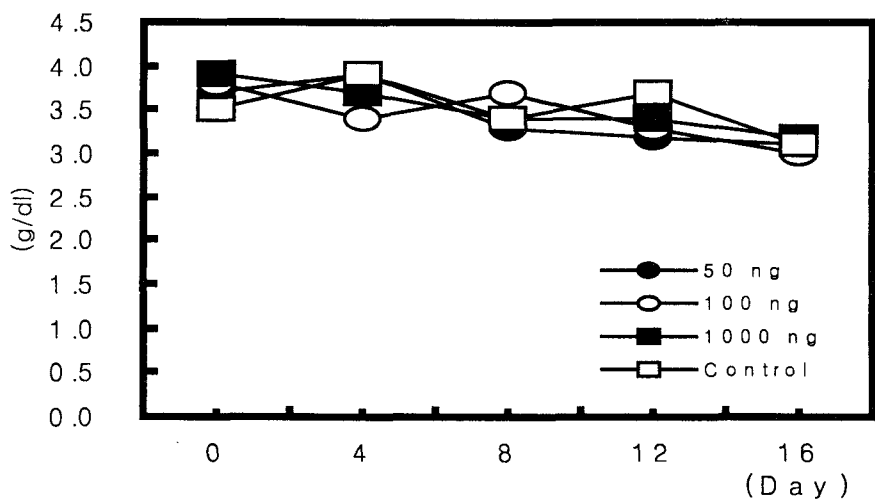


Fig. 12. Total protein values in blood of chicks after injection of lectin.

2) Lectin 접종후 병리조직학적 소견

Lectin 접종 전과 접종 후 매 4일마다 실험군별 3수의 병아리를 부검하여 각 실질장기 및 접종부위인 대퇴부 근육조직을 채취하고 10% 중성 포르말린으로 고정한 후, 조직절편 재료를 제작하여 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 한 후 병리소견을 조사하였다.

그 결과 실험기간 동안 전 실험군의 뇌, 간, 심장, 폐, 비장, 신장, 흉선, F낭의 조직소견은 정상이었다 (Table 1). 또한 근육조직에서는 실험기간 동안 체중 1 g 당 1.1 ng 및 2.2 ng 접종군과 대조군에서의 소견은 정상이었다 (Photo 1). 이에 비하여 체중 1 g 당 22.2 ng 접종군에서는 4일째에 정상이었으나 8일째에는 조사된 3수 전부에서 출혈, 수종, 소수의 염증세포 침윤 등의 염증소견이 관찰되었다 (Photo 2). 12일째에는 3수 전부에서 출혈, 수종, 대식세포 침윤, 근섬유의 응고괴사 소견 현저하였고 (Photo 3), 16일째에는 염증이 회복되는 과정으로서 단핵구성 세포의 침윤 및 섬유화 소견이 관찰되었다 (Photo 4 및 5).

이와 같이 병아리 체중 1 g 당 1.1-2.2 ng 접종시에 뇌 등의 각 실질장기와 접종부위인 대퇴부 근육조직에서 병리학적 독성이 관찰되지 않았으나, 22.2 ng의 접종시에는 뇌 등의 실질장기는 정상이었지만 접종부위에서의 염증반응이 있음이 구명되었다. 현재까지 국·내외적으로 닭에 대한 lectin의 독성여부를 조사한 결과는 알려진 바가 없으므로 독성 유발 최저농도를 산정하기 어려우나, 이 연구의 결과로 볼 때 백신에 혼합 시에 독성을 나타내지 않는 lectin의 양은 병아리 체중 1 g 당 2.2 ng 수준이 적합할 것으로 생각되었다.

따라서 lectin의 닭에 대한 면역활성 능력을 알지 못하므로 이점을 고려하여 이후의 뉴캐슬병 및 전염성기관지염 예방백신의 면역증강 효과 조사를 위한 lectin의 함량을 병아리 체중 1 g 당 4.4 ng으로 결정하였다.

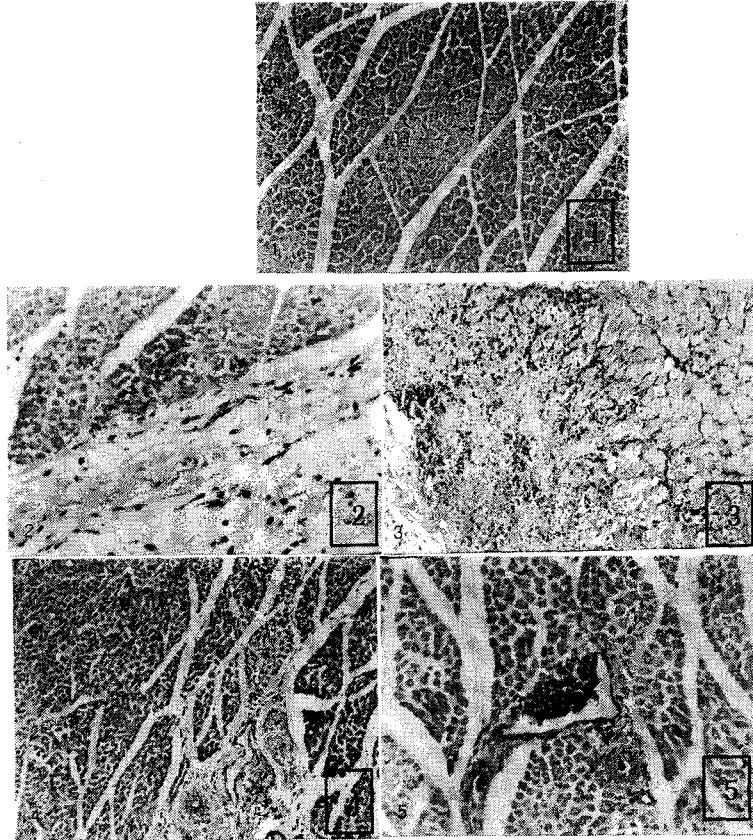
Table 1. Histopathological findings in chickens after inoculation of lectin into thigh muscle

| Dose of Lectin Inoculated (ng/g body) | No. of Chicks Tested | Days After Injection | Lesions* | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------|-------|-------|------|--------|--------|--------|---------|--------------|-----|
| | | | Brain | Liver | Heart | Lung | Spleen | Kidney | Thymus | F Bursa | Thigh Muscle | |
| 1.1 | 15 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2.2 | 15 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22.2 | 15 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ |
| | | 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ |
| | | 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ |

*Each three chicks were autopsied by sacrificing at 4-days' intervals.

-: No lesions were observed.

+: Lesions were observed.



Histopathological findings on thigh muscles of chicks after injection of lectin.

Photo 1. No pathological findings by lectin of 1.1 ng and 2.2 ng/g body weigh.
H&E, X200.

Photo 2. Congestion, edema and infiltration of inflammatory cells observed by lectin
of 2.2 ng/g body weight at 8 days post injection. H&E, X200.

Photo 3. Hemorrhage, edema, infiltration of macrophages and coagulation necrosis of
muscle fibers observed by lectin of 22.2 ng/g body weight at 12 days post
injection. H&E, X200.

Photo 4. Infiltration of mononuclear cells and fibrosis observed by lectin of 22.2
ng/g body weight at 16 days post injection. H&E, X200.

Photo 5. Infiltration of mononuclear cells observed by lectin of 22.2 ng/g body
weight at 16 days post injection. H&E, X400.

나. 겨우살이 추출물에 의한 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강 효과

1) Lectin에 의한 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강 효과

Lectin에 의한 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강 효과를 조사하고 동시에 기존 면역증강 물질인 $Al(OH)_3$ 의 면역증강 효과와 비교하고자 다음과 같이 백신을 제조하여 예방접종한 후 항체가를 조사하였다. 뉴캐슬병 바이러스 B1주, LaSota주 및 Ulster 2C주를 Chamber와 Samson (1980)의 방법에 따라 부화 9-10일령의 SPF 발육란 (미국 Charles River사)의 장노막강에 접종하고, 37°C의 부화기에서 3일 동안 증식시킨 후 바이러스가 함유되어 있는 장노막강액을 무균적으로 채취하였다. 이 액을 5000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상층의 바이러스액을 수확한 다음 Reed와 Muench (1938)의 방법에 따라 EID_{50} 를 산정하여 바이러스 역가를 검정하였다.

이 바이러스 액으로 백신제조 회사의 통상적인 백신생산 방법에 따라 불활화 바이러스 백신을 제조하였다. 즉, 역가가 10^7 EID_{50}/ml 수준인 B1주, LaSota주 및 Ulster 2C주 바이러스 액에 각각 포르말린을 0.2% 되게 가하고 37°C에서 48시간 동안 교반하여 바이러스를 불활화시켰다. 먼저 $Al(OH)_3$ 혼합 백신은 백신액의 총량에 대하여 불활화 바이러스를 34%, $Al(OH)_3$ 및 PBS (pH 7.2)를 각각 32%와 34% 되게 혼합하여 제조하였다. Lectin 혼합 백신은 이와 같은 구성 비율중 32%의 $Al(OH)_3$ 대신에 lectin을 병아리 1수 (평균체중 45 g) 당 200 ng/0.5 ml (4.4 ng/체중 1 g)이 접종되도록 가하고 부족한 비율만큼은 PBS로 충족시켜 제조하였다. 또한 국내 분리 강병원성 주인 교정원주를 동일한 방법으로 배양하고 역가를 검정한 후 공격시험에 사용하였다.

부화후 1주령의 SPF 병아리 (미국 Charles River사)를 경상대학교 무균 동물사육실에서 사육하면서 30수를 1군으로 하고 1수당 0.5 ml의 백신을 대퇴부 근육 내에 접종하였다. 즉, 백신 접종군은 9개 군으로서 lectin을 혼합한 B1, LaSota, Ulster 2C 백신, $Al(OH)_3$ 를 혼합한 B1, LaSota, Ulster 2C 백신, 면역증강 물질을 혼합하지 않은 B1, LaSota, Ulster 2C 바이러스 단독 백신을 각 1개 군에게 접종하였다. 6주 동

안 매주 각 군별 5수로부터 채혈 (채혈 후 도태시킴)하여 항체를 조사하였으며, 제 4주째 채혈 직후에 강병원성 교정원주를 1수당 100 μ l (10^6 EID₅₀/ml)씩 점비 접종하여 공격시험을 하고 방어능 및 폐사율을 조사하였다. 제 10군은 대조군으로서 증류수를 접종한 후 항체를 조사하였다. 항체가 측정에는 SPF 발육란의 장노막강에서 증식시킨 B1주를 사용하였으며, 항체는 베타 슬식에 의하여 혈청의 0.5% 닭 적혈구에 대한 hemagglutination-inhibition (HI) 시험으로 측정하였다. 각 혈청에 대하여 3회 반복 시험한 값의 평균을 산정한 후 컴퓨터 프로그램 (Microsoft excel)으로 분석하였다.

그 결과 lectin을 혼합한 B1, LaSota, Ulster 2C 백신을 접종한 후 각각 1주째에 $\log_2 2.2$, $\log_2 2.2$, $\log_2 1.8$ 수준의 항체가 형성되었으며 점차 상승하여 4주째에는 $\log_2 3.9$, $\log_2 4.8$, $\log_2 5.3$ 수준을 보였다. 이때 교정원주로 공격하였던 바 폐사 예는 없었다 (Table 2). 공격시험 후 1주일이 경과된 제 5주째에 항체는 각각 $\log_2 4.9$, $\log_2 4.9$, $\log_2 5.3$ 수준으로서 B1주 접종군에서는 $\log_2 1.0$ 이 상승하였으나 LaSota 및 Ulster 2C 주에서는 4주째와 거의 동일하였으며, 6주째에 각각 $\log_2 8.7$, $\log_2 9.5$, $\log_2 10.3$ 으로 크게 상승하였다. 따라서 lectin 혼합 백신 접종으로 형성된 항체에 의하여, 강병원성 바이러스의 감염이 방어됨은 물론 공격 바이러스에 의한 booster 효과를 나타내어 항체가 상승하는 것을 알 수 있었다. 백신의 종류별로 볼 때 항체는 Ulster 2C, LaSota, B1의 순으로 높았다 (Fig. 13). 또한 전 실험기간 동안 lectin 혼합 백신 접종군의 병아리에서 임상적으로 lectin에 기인하는 이상 증상은 관찰되지 않았다.

Al(OH)₃를 혼합한 B1, LaSota, Ulster 2C 백신에서는 접종한 후 각각 1주째에 $\log_2 2.9$, $\log_2 1.7$, $\log_2 1.5$ 로 lectin 혼합시와 비슷한 수준의 항체가 형성되었으나 점차 상승하여 4주째에는 $\log_2 7.3$, $\log_2 8.3$, $\log_2 9.3$ 으로 lectin 혼합 백신에 비하여 상당히 높은 수준을 보였다. 이때 교정원주로 공격하였던 바 폐사 예는 없었으며 (table 2), 1주일이 경과된 제 5주째에 항체는 $\log_2 5.5$, $\log_2 5.9$, $\log_2 6.9$ 수준으로 4주째보다 다소 감소하였다가 6주째에는 lectin 혼합 백신에서와 거의 같은 수준인 $\log_2 8.2$,

$\log_2 8.5$, $\log_2 9.6$ 으로 상승하였다 (Fig. 14).

한편 바이러스 단독 백신 접종시에 B1, LaSota Ulster 2C에 의한 항체는 교정원 주로 공격하기 전인 4주째에 각각 $\log_2 2.6$, $\log_2 3.7$, $\log_2 2.4$ 수준이었으며 (Fig 13 및 14), 공격시험에서 B1 단독 백신이 접종된 10수중 3수가 발병 증상을 보인 후 폐사하였다. 대조군은 실험기간 동안 항체 음성이었으며 공격접종 후 2일부터 식욕감퇴, 백색 수양성 설사, 침울, 호흡곤란, 졸음 등의 뉴캐슬병 증상을 보인 후 4일째에 10수 모두 폐사하였다 (Table 2).

따라서 lectin (체중 1 g 당 4.4 g)이 병아리에서 뉴캐슬병 예방백신의 면역원성을 증강시키는 효과가 확인되었으며, 임상적으로 lectin에 기인하는 이상증상은 관찰되지 않았다.

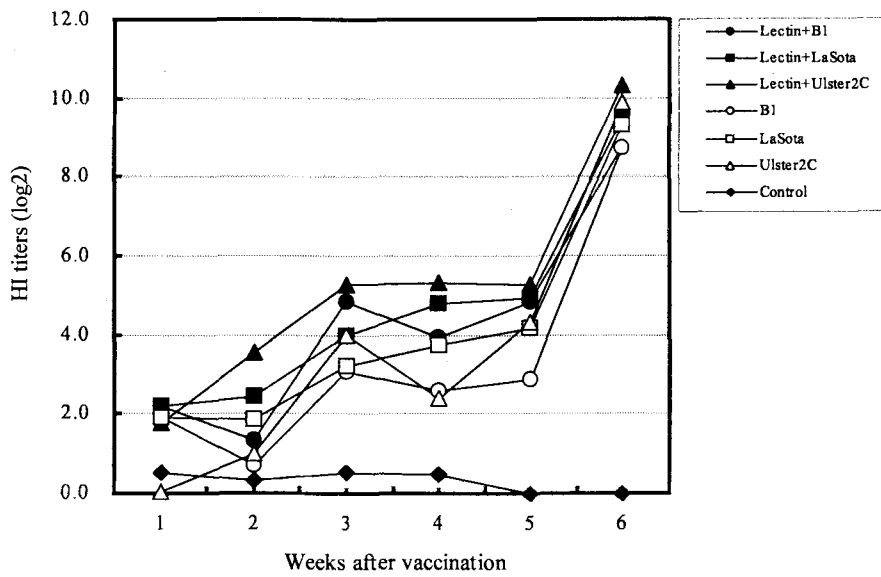


Fig 13. Comparison of HI antibody titers in chicks immunized with lectin-adjuvanted vaccines of Newcastle disease virus.

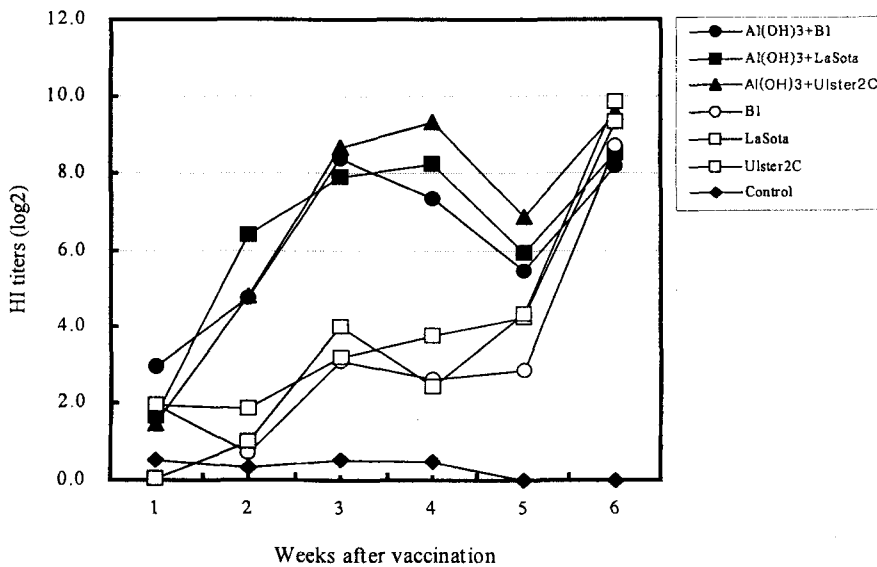


Fig 14. Comparison of HI antibody titers in chicks immunized with Al(OH)₃-adjuvanted vaccines of Newcastle disease virus.

Table 2. Clinical signs and fatality of immunized chicks after challenge by virulent Newcastle disease virus^a

| Vaccines | No. of Chicks Diseased ^b /Tested | No. of Chicks Died/Tested |
|---------------------------------|--|------------------------------|
| Lectin-adjuvanted | | |
| B1 | 0/10 | 0/10 |
| LaSota | 0/10 | 0/10 |
| Al(OH) ₃ -adjuvanted | | |
| B1 | 0/10 | 0/10 |
| LaSota | 0/10 | 0/10 |
| Non-adjuvanted | | |
| B1 | 3/10 | 3/10 |
| LaSota | 0/10 | 0/10 |
| Control | 10/10 | 10/10 |

^aThe 100 μ l (10^6 EID₅₀/ml) of Kyojeongwon strain were infected into chicks via nasal cavity at 4 weeks after vaccination.

^bSigns consisted of inappetence, watery diarrhea, depression, labored respiration and somnolence.

2) Lectin 혼합 백신 및 Al(OH)₃ 혼합 백신의 항체가 비교

동일 백신주에서 lectin과 Al(OH)₃에 의한 면역증강 효과를 비교하였을 때 B1 백신에서의 항체가가 첫 주에는 log₂2.2 및 log₂2.9로서 양자에서 비슷하였으나, 그 이후부터 Al(OH)₃ 혼합 백신에 의한 항체가가 큰 차이로 상승하여 4주째에는 log₂7.3으로서 lectin에 의한 log₂3.9보다 아주 높은 수준이었다. 또한 LaSota 및 Ulster 2C 백신에서도 이와 비슷한 경향으로 항체가 형성되었으며, 4주째에 Al(OH)₃ 혼합 백신에 의한 항체가가 각각 log₂8.3과 log₂9.3으로서 lectin 혼합 백신에서의 각각 log₂4.8과 log₂5.3 보다 상당히 높은 경향이었다. 하지만 공격시험을 한 이후에는 백신주 및 면역증강 물질의 종류에 관계없이 항체가는 거의 비슷하게 5주째에 일시적으로 감소하였다가 급격히 상승하여 6주에는 log₂8.2-log₂10.3의 수준을 나타내었다 (Fig. 15).

이와 같이 면역형성 초기부터 4주까지에서 Al(OH)₃ 혼합 백신에 의한 항체가가 높은 현상은, 면역증강 물질이 단순히 백신주의 분자량을 높여서 면역원성을 증강시킬 뿐 아니라 백신 바이러스가 체내에서 서서히 흡수되도록 하여 면역자극을 오래 유지시킨다는 주지의 사실과 일치되었다. 즉, Al(OH)₃에 비하여 lectin은 병아리 1수 당 백신에 대한 혼합 양이 0.8 μl (240 ng/μl)로서 현저히 적어서 백신의 흡수가 신속하게 되어 면역자극 기간이 짧았기 때문인 것으로 생각되었다.

이와 같은 결과에 따라 뉴캐슬병 백신에 대한 lectin의 면역증강 효과가 있음이 인정되었으며, 백신에 Al(OH)₃ 및 lectin을 동시에 혼합할 때 면역증강 효과가 더욱 상승될 것으로 추정되었다.

한편 백신 바이러스 주별로는 lectin 혼합 백신 및 Al(OH)₃ 혼합 백신에서 모두 Ulster 2C, LaSota, B1의 순으로 항체가가 높게 형성되었다. 이러한 사실로 볼 때 lectin을 면역증강제로 사용할 경우 Ulster 2C 및 LaSota주를 대상으로 하면 면역증강 효과가 우수할 것으로 판단되었다.

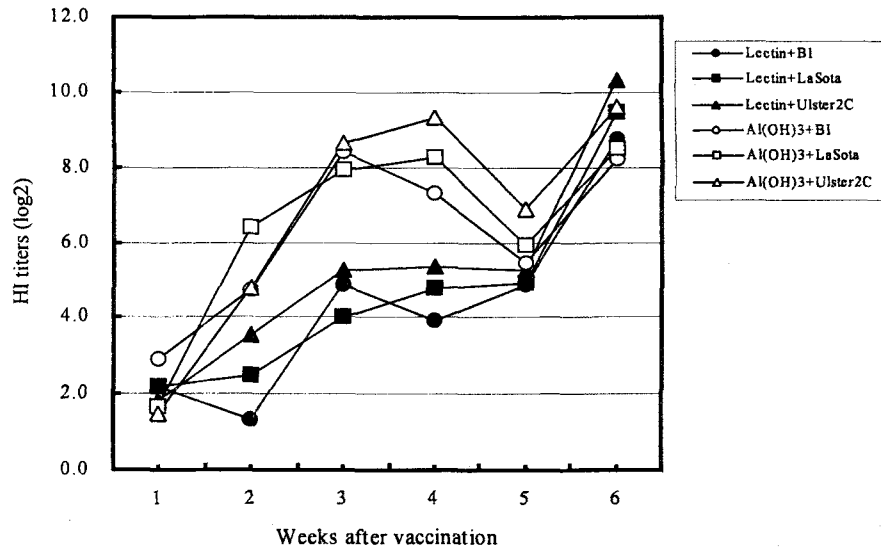


Fig 15. Comparison of HI antibody titers in chicks immunized with lectin- and Al(OH)₃-adjuvanted vaccines of Newcastle disease virus.

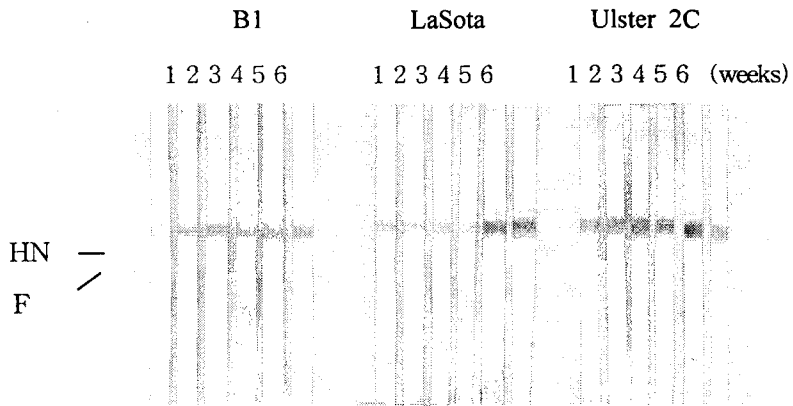
3) Lectin 혼합 백신에 의하여 형성된 항체의 뉴캐슬병 바이러스 항원과의 반응성

Lectin 혼합 백신의 접종에 의하여 형성되는 항체의 뉴캐슬병 바이러스 특정 항원에 대한 반응성을 $Al(OH)_3$ 혼합 백신에서의 성적과 비교 조사하였다. 이를 위하여 SPF 발육란 (미국 Charles River사)의 장노막강에서 증식시켜 얻은 교정원주 액을 40,000 rpm에서 16시간 초원심 분리한 후 바이러스 침전물을 원래 바이러스 액의 1/00 양의 TNE buffer (10 mM tris, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 용해하여 농축하였다. 이 바이러스액의 일정량을 SDS-PAGE용 sample buffer에 1:2 되게 혼합한 후 12% acrylamide gel에서 전기영동하여 바이러스 항원 펩타이드를 전개시켰다. 이어서 nitrocellulose membrane에 western blotting 시켰으며, 백신 접종 후 각 주별로 채취된 혈청과의 enzyme immunoassay를 실시하고 최종적으로 4-chloro-1-naphthol로 발색시켜 관찰하였다.

그 결과 lectin을 혼합한 B1, LaSota, Ulster 2C 백신의 접종 후에 동일한 경향으로 1주부터 뉴캐슬병 바이러스의 HN 및 F 항원에 대한 항체가 확인되었으며, 6주간 경시적으로 볼 때 항체의 반응이 점진적으로 강한 경향임을 알 수 있었다. 또한 $Al(OH)_3$ 혼합 백신 접종시에도 동일한 반응을 나타내었다 (Fig. 16).

뉴캐슬병 바이러스에 대한 항체의 중화반응은 주로 HN, F 항원에 대하여 이루어지는데, 이와 같은 결과로 볼 때 lectin에 의하여 증강된 면역항체의 바이러스에 대한 중화능력이 확인되었다.

Lectin-adsjuvanted vaccines



Al(OH)₃-adsjuvanted vaccines

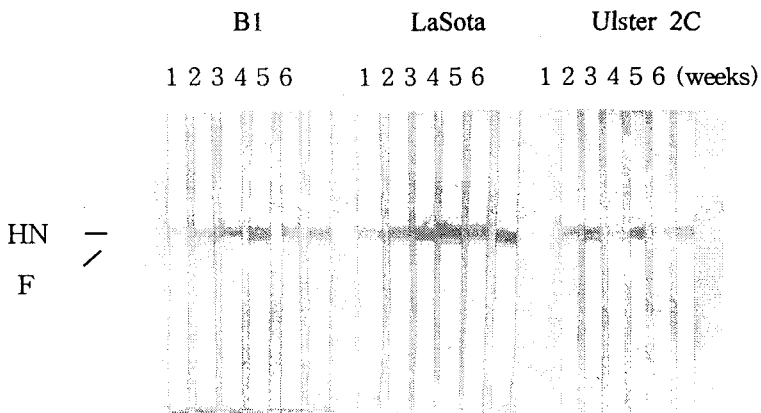


Fig 16. Appearance of antibodies to antigenic substances of Newcastle disease virus after vaccination.

다. 겨우살이 추출물에 의한 전염성기관지염 예방백신의 특이 면역 증강 효과

1) Lectin에 의한 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강 효과

Lectin에 의한 전염성기관지염 예방백신의 의한 특이면역 증강 효과를 조사하고 동시에 기존 면역증강 물질인 $Al(OH)_3$ 의 면역증강 효과와 비교하고자 다음과 같이 백신을 제조하여 예방접종한 후 항체가를 조사하였다. 전염성기관지염 바이러스 M41주 및 KM91주를 부화 9-10일령의 SPF 발육란 (미국 Charles River사)의 장노막강에 접종하고 37℃의 부화기에서 3-5일 동안 증식시킨 후 바이러스가 함유되어 있는 장노막강액을 무균적으로 채취하였다. 이 액을 5000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상층의 바이러스액을 수확한 다음 Reed와 Muench (1938)의 방법에 따라 EID_{50}/ml 를 산정하여 바이러스 역가를 검정하였다. 이 바이러스 액 ($10^7 EID_{50}/ml$)으로 백신제조 회사의 통상적인 백신 생산방법에 따라 뉴캐슬병 예방백신에서와 동일한 방법으로 lectin 및 $Al(OH)_3$ 이 혼합된 불활화 바이러스 백신을 제조하였다. 또한 국내 분리 강병원성 주를 동일한 방법으로 배양 및 검정한 후 공격시험에 사용하였다.

부화후 1주령의 SPF 병아리 (미국 Charles River사)를 경상대학교 무균동물실에서 사육하면서 30수를 1군으로 하고 1수당 0.5 ml의 백신을 대퇴부 근육내에 접종하였다. 즉, 백신 접종군은 6개 군으로서 lectin을 혼합한 M41, KM91 백신, $Al(OH)_3$ 를 혼합한 M41, KM91 백신, 면역증강 물질을 혼합하지 않은 M41, KM91 바이러스 단독 백신을 각 1개 군에게 접종한 후, 6주 동안 매주 각 군별 5수로부터 채혈 (채혈 후 도태시킴)하여 항체가를 조사하였다. 또한 제 4주째 채혈 직후에 강병원성 야외 분리주를 1수당 $150 \mu l$ ($10^6 EID_{50}/ml$)씩 점비 접종하여 공격시험을 하여 방어능 및 폐사율을 조사하였다. 제 7군은 대조군으로서 증류수를 접종한 후 동일한 방법으로 항체가를 조사하였다. 항체가 측정에 사용된 바이러스는 M41주로서 장노막강 배양액을 초원심 분리하여 100로 농축시킨 후 phospholipase C (type 1)으로 처리하였으며,

항체가는 베타 슬식에 의하여 혈청의 0.5% 닭 적혈구에 대한 HI 시험으로 측정하였다. 각 혈청에 대하여 3회 반복 시험한 값의 평균을 산정한 후 컴퓨터 프로그램 (Microsoft excel)으로 분석하였다.

그 결과 lectin을 혼합한 M41 백신 및 Al(OH)₃를 혼합한 M41 백신에 의하여 형성된 항체가를 M41 단독 접종시의 항체가와 비교하면 Fig. 17 및 Table 3에서와 같다.

즉, lectin 혼합 M41 백신을 접종한 후 항체가는 1주에 log₂2.8 이었으나 2주, 3주에 각각 log₂4.0, log₂4.6으로 상승하였으며, 4주에는 log₂3.8로 약간 저하되었다. 이때 강병원성 바이러스로 공격하였던 바 10수 중 2수에서 2-3일 동안 경증의 호흡기 장애 증세를 나타내었으나 폐사 예는 없었다. Al(OH)₃ 혼합 M41 백신의 접종 시에는 1주, 2주, 3주에 항체가가 각각 log₂3.0, log₂3.8, log₂4.8로서 lectin 혼합시와 거의 비슷한 수치를 나타내었고 4주에는 log₂4.4로 lectin 혼합시보다 약간 높았으며, 공격 시험에서 호흡기 증상을 보이거나 폐사한 예는 없었다. 공격시험 후에 lectin 및 Al(OH)₃ 혼합 백신에 의한 항체가는 5주에 각각 log₂6.2, log₂6.4, 6주에 각각 log₂7.0, log₂7.8로 비슷한 수치로 상승하였다. 또한 전 실험기간 동안 임상적으로 lectin에 기인하는 이상 증상은 관찰되지 않았다.

이에 비하여 면역증강 물질을 혼합하지 않은 M41 불활화 백신을 단독 접종하였을 때는 1주, 2주, 3주, 4주에 항체가는 각각 log₂1.2, log₂2.0, log₂3.0, log₂2.4 수준으로 낮았으며, 공격시험에서 10수중 8수가 호흡기 장애와 무기력 증세를 나타내었으며 이들 중 6수가 폐사하였다. 또한 백신 비 접종 대조군에서는 1-4주에 항체가가 log₂0.4-log₂0.6 수준을 보였으며, 공격시험에서 10수 전 예가 폐사하였다.

따라서 M41 불활화 백신에 대한 lectin의 면역증강 효과가 인정되었다. 하지만 공격시험에서 lectin 혼합 M41 백신 접종군의 10수 중 2수에서 호흡기 증세가 관찰되었던 바, Al(OH)₃에 비하여 lectin의 면역원성이 약간 낮은 것으로 생각되었으나 일시적인 증세이었으며 곧 회복하였다.

2) Lectin 혼합 및 Al(OH)₃ 혼합 백신의 항체가 비교

Lectin을 혼합한 KM91 백신 및 Al(OH)₃를 혼합한 KM91 백신에 의하여 형성된 항체를 비교하면 Fig. 18 및 Table 3에서와 같다.

Lectin 혼합 KM91 백신을 접종한 후에 항체의 추이는 lectin 혼합 M41 백신에서와 비슷한 경향으로서, 1주, 2주, 3주에 각각 $\log_2 2.8$, $\log_2 4.2$, $\log_2 4.2$ 로 상승하였으며 4주에는 $\log_2 4.4$ 로 M41주와 거의 동일한 항체를 나타내었다. 이때 강병원성 바이러스로 공격하였던 바 호흡기 이상증상을 보이거나 폐사한 예는 없었으며 1주일 이 경과된 5주에는 항체가 $\log_2 6.6$ 로 상승하였고 7주에는 $\log_2 7.4$ 수준에 도달하였다. Al(OH)₃ 혼합 KM91 백신의 접종 시에는 1주, 2주, 3주, 4주에 각각 $\log_2 3.4$, $\log_2 4.4$, $\log_2 4.8$, $\log_2 4.8$ 로서 lectin 혼합시와 거의 동일한 수치를 나타내었으며, 공격 시험에서도 호흡기 증상을 보이거나 폐사한 예는 없었다. 공격시험후의 5주와 6주에 각각 $\log_2 7.2$, $\log_2 8.6$ 으로서 lectin에 의한 면역증강시보다 약간 높은 수치를 나타내었다. 이에 비하여 면역증강 물질을 혼합하지 않은 KM91 불활화 백신을 단독 접종하였을 때는 1주, 2주, 3주, 4주에 항체가 각각 $\log_2 1.6$, $\log_2 2.4$, $\log_2 3.2$, $\log_2 2.6$ 수준으로 낮았고, 공격시험에서 10수 전 예가 호흡장애와 무기력 증세를 나타내었으며 이들 중 5수가 폐사하였다.

이와 같은 결과로 볼 때 lectin (체중 1 g 당 4.4 g)이 병아리에서 전염성기관지염 예방백신의 면역원성을 증강시키는 효과가 확인되었으며, 임상적으로 lectin에 기인하는 이상증상은 관찰되지 않았다. 한편 면역증강 물질의 종류에 관계없이 M41주에 비하여 KM91주의 면역원성이 높은 것을 알 수 있었다.

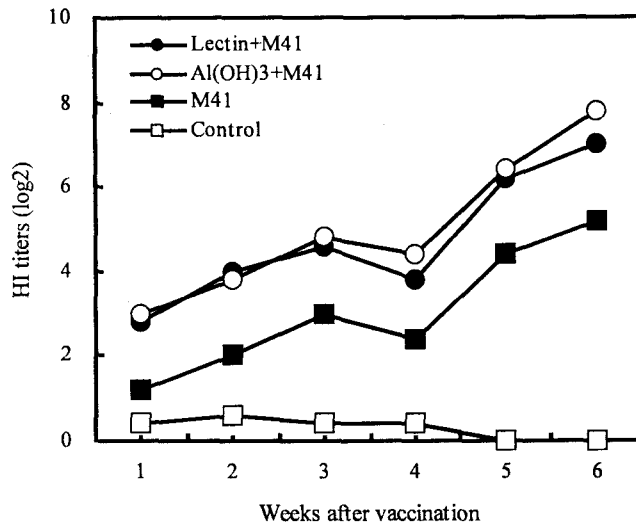


Fig. 17. Comparison of HI antibody titers in chicks immunized with lectin- and Al(OH)3-adjuvanted vaccines of IBV M41 strain.

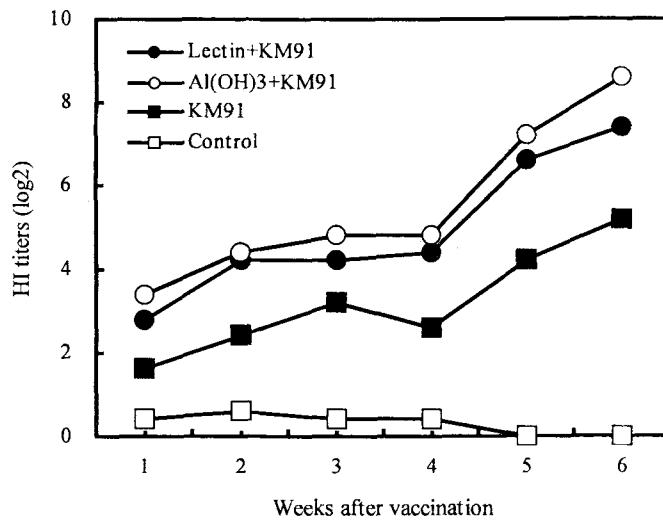


Fig. 18. Comparison of HI antibody titers in chicks immunized with lectin- and Al(OH)3-adjuvanted vaccines of IBV KM91 strain.

Table 3. Clinical signs and fatality of immunized chicks after challenge by virulent infectious bronchitis virus^a

| Vaccines | No. Chicks Diseased ^b /Tested | No. of Chicks Died/Tested |
|---------------------------------|--|---------------------------|
| Lectin-adjuvanted | | |
| M41 | 2/10 | 0/10 |
| KM91 | 0/10 | 0/10 |
| Al(OH) ₃ -adjuvanted | | |
| M41 | 0/10 | 0/10 |
| KM91 | 0/10 | 0/10 |
| Non-adjuvanted | | |
| M41 | 8/10 | 6/10 |
| KM91 | 10/10 | 5/10 |
| Control | 10/10 | 10/10 |

^aThe 150 μ l (10⁶ EID₅₀/ml) of a virulent strain were infected into chicks via nasal cavity at 4 weeks after vaccination.

^bSigns consisted of mild respiratory distress and depression.

라. 결론

겨우살이 추출물로부터 정제된 lectin의 닭에 대한 일반적인 독성 여부를 조사하기 위하여 부화후 1주령의 SPE 병아리에게 lectin을 접종한 후 병리조직학적으로 관찰하였다. 이 lectin의 뉴캐슬병 및 전염성기관지염 불활화 예방백신에 대한 면역증강 효과를 기존의 면역증강 물질과 비교 조사하기 위하여, 부화후 1주령의 SPF 병아리에 lectin 혼합 백신 및 Al(OH)₃ 혼합 백신을 접종한 후 항체의 형성수준 및 지속기간, 강독 바이러스 공격에 대한 방어능력 등을 조사하였던 결론은 다음과 같다.

1) Lectin의 닭에 대한 일반독성

가) Lectin을 병아리에게 근육접종 (체중 1 g 당 1.1 ng, 2.2 ng 및 22.2 ng) 시에 혈액의 정상, 혈액화학치 등 간기능 및 신장기능의 이상 변화를 나타내는 혈액학적 독성이 나타나지 않았으며, 뇌, 간, 심장, 폐, 비장, 신장, 흉선, F낭의 조직소견은 정상이었다.

나) Lectin을 병아리에게 체중 1 g 당 1.1-2.2 ng 접종 시의 근육조직은 정상이었으나, 22.2 ng 접종 시에는 충출혈, 수종, 소수의 염증세포 침윤, 근섬유의 응고괴사, 단핵구성 세포침윤 및 섬유화 등의 염증소견이 관찰되었다.

다) 따라서 병아리에서 독성을 나타내지 않는 lectin의 농도는 체중 1 g 당 2.2 ng 수준으로 확인되었으며, 불활화 예방백신의 면역증강을 위한 lectin의 함량은 병아리 체중 1 g 당 4.4 ng이 적정 수준인 것으로 생각되었다.

2). 겨우살이 추출물에 의한 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강 효과

가) Lectin 혼합 B1, LaSota, Ulster 2C 백신에 의한 항체는 각각 1주째에 $\log_2 2.2$, $\log_2 2.2$, $\log_2 1.8$ 수준으로 형성된 후 점차 상승하여 4주째에는 $\log_2 3.9$, $\log_2 4.8$, $\log_2 5.3$ 수준을 보였으며, 이때 교정원주로 공격 시에 폐사 예는 없었고 공격시험 후인 6주에 각각 $\log_2 8.7$, $\log_2 9.5$, $\log_2 10.3$ 으로 크게 상승하였다.

나) $Al(OH)_3$ 를 혼합한 B1, LaSota, Ulster 2C 백신에 의한 항체는 1주째에 lectin 혼합 시와 비슷한 수준이었고 점차 상승하여 4주째에는 $\log_2 7.3$, $\log_2 8.3$, $\log_2 9.3$ 으로 lectin 혼합 백신에 비하여 상당히 높은 수준을 보였으나, 공격접종 후인 6주에는 lectin 혼합 백신에서와 거의 같은 수준이었다.

다) 바이러스 단독 백신 접종시에 B1, LaSota Ulster 2C에 의한 항체는 4주째에 각각 $\log_2 2.6$, $\log_2 3.7$, $\log_2 2.4$ 수준이었으며, 공격시험에서 B1 백신이 접종된 자돈의 일부에서 발병 증상을 보인 후 폐사하였다.

라) 따라서 lectin 혼합시에 뉴캐슬병 바이러스 불활화 백신의 면역증강 효과가 인정되었으며, 형성된 항체에 의하여 강병원성 바이러스의 감염이 방어됨은 물론 공격 바이러스에 의한 booster 효과를 나타내어 항체가가 상승하였다.

3). 겨우살이 추출물에 의한 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강 효과

가) Lectin 혼합 M41 백신에 의한 항체는 1, 2, 3, 4 주에 각각 $\log_2 2.8$, $\log_2 4.0$, $\log_2 4.6$, $\log_2 3.8$ 로서 Al(OH)₃ 혼합 M41 백신의 접종 시와 거의 비슷한 수치를 나타내었으며, 강병원성 주의 공격에서 일부가 경증의 호흡기 증세를 나타내었으나 폐사 예는 없었다. 공격시험 후인 6주에 $\log_2 7.0$ 로 Al(OH)₃에 의한 항체가와 비슷한 수치로 상승하였다.

나) Lectin 혼합 KM91 백신에 의한 항체는 1, 2, 3, 4 주에 각각 $\log_2 2.8$, $\log_2 4.2$, $\log_2 4.2$, $\log_2 4.4$ 로 M41주 Al(OJ)₃ 혼합 KM91 백신에서와 거의 동일하였고 강병원성 바이러스 공격 시에 이상증상을 보이거나 폐사한 예는 없었으며, 공격시험 후인 6주에 $\log_2 7.4$ 수준에 도달하였다.

다) M41 불활화 백신에 의한 항체가는 1, 2, 3, 4 주에 각각 $\log_2 1.2$, $\log_2 2.0$, $\log_2 3.0$, $\log_2 2.4$ 수준으로 낮았으며, 공격시험에서 10수중 8수가 호흡기 장애와 무기력 증세를 나타내었으며 이들 중 6수가 폐사하였다.

라) KM91 불활화 백신에 의한 항체가는 1, 2, 3, 4 주에 각각 $\log_2 1.6$, $\log_2 2.4$, $\log_2 3.2$, $\log_2 2.6$ 수준으로 낮았고, 공격시험에서 10수 전 예가 호흡장애와 무기력 증세를 나타내었으며 이들 중 일부가 폐사하였다.

마) 따라서 lectin 혼합 시에 전염성기관지염 바이러스 불활화 백신의 면역증강 효과가 인정되었으며, 형성된 항체에 의하여 강병원성 바이러스의 감염이 방어됨은 물론 공격 바이러스에 의한 booster 효과를 나타내어 항체가가 상승하였다.

○2차년도 (2000)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|-------|-------|------------|
| 경상대학교 | 여상건 | 40,000,000 |

가. 겨우살이 추출물의 돼지에 대한 일반독성

이유후 1주령의 자돈을 격리된 양돈장에서 사육하면서, 겨우살이 추출물 (KML-C; lectin)의 돼지에 대한 독성여부 및 이에 따른 불활화 백신에 대한 적정 혼합량을 조사하였다. 12두를 1군으로 하여 제1군의 자돈에는 체중 1 g 당 7 ng, 제2군에는 체중 1 g 당 30 ng의 lectin을 대퇴부 근육 내에 접종하였고 제3군은 비접종 대조군으로서 증류수를 접종한 후 임상 및 실질장기의 10% 중성 포르말린 고정 후 병리학적 소견을 관찰하였다. 동시에 부수적으로 이들 농도의 lectin 접종에 따른 혈액내 세포성 면역 담당 세포의 분포상태를 조사하였던 결과는 다음과 같다.

1) 임상 및 병리학적 소견

임상적으로 7 ng 접종군에서 실험기간 동안 폐사한 예는 없었으나 접종 후 1

일에 전 자돈에서 대퇴부 접종부위 근육에서 부종과 피하출혈 소견이 관찰되었으며 다리를 절고 전반적으로 침울한 증상을 나타내었다. 30 ng 접종군에서는 전 자돈이 접종후 16-20 시간 내에 전신의 발적 및 피하출혈, 호흡곤란, 발열 등의 증상을 나타낸 후 폐사하였다 (Table 1). 폐사 자돈에 대한 부검 및 병리조직 검사에서 독성변화에 기인하는 소견이 간과 신장에서 관찰되었다. 즉, 간 소엽에서 중심성의 울혈 (Photo 1), 지방구 출현 (Photo 2), 지방구의 크기 증가, 간세포의 괴사, 핵붕괴 및 핵소실 (Photo 3) 등 중독성 간염 소견이 있었다. 또한 신장에서 곡세뇨관 세포의 공포화 및 괴사, 사구체의 단백질 소실에 따른 초자적의 출현 소견 (Photo 4)이 관찰되었다. 하지만 이러한 병변이 폐사의 근본 원인이라고 단정하기는 어려웠으며, 폐사의 원인 구명을 위하여는 추후 별도의 정밀 독성병리 조사가 이루어져야 할 것이다. 또한 소견상의 정도는 약하나 7 ng 접종군의 간, 신장에서도 비슷한 소견이 관찰되었다. 한편 대조군은 전 실험기간 동안 임상적 및 병리학적으로 정상이었으며 생존하였다.

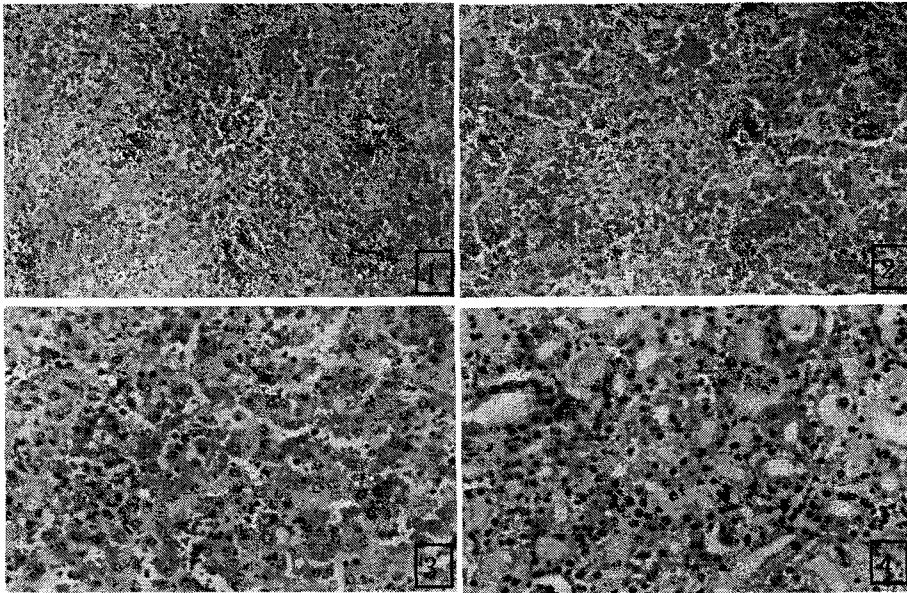
현재까지 국·내외에서 돼지에 대한 lectin의 독성여부에 관하여 선행된 연구결과가 없는 실정인바, 자돈에서의 독성여부 확인을 위한 lectin의 적정 접종량을 결정할 수가 없었다. 따라서 1차년도 연구에서 닭에서 lectin의 면역증강 효과를 조사하고자 부화 후 1주령의 병아리에 체중 1 g당 2.2 ng의 lectin을 투여하였을 때 독성이 전혀 인정되지 않았으며 체중 1 g 당 4.4 ng 수준으로 뉴캐슬병 예방 백신에 혼합하여 투여시에 임상적으로 이상 없이 면역증강 효과가 인정되었던 점을 고려하여, 이 실험에서는 병아리에 대한 접종량의 대략 1.6-6.8배 양을 자돈에게 접종하였다.

하지만 이와 같이 lectin의 자돈에 대한 독성이 현저함을 알 수 있었으며 돼지가 닭 보다 lectin의 독성에 대하여 민감한 것으로 사료되었다. 또한 대퇴부 근육은 7 ng 접종시에도 병변이 나타남으로서 접종에 부적합한 부위인 것으로 생각되었다. 따라서 이들 농도에 의하여 수행된 실험의 결과로는 백신에 대한 lectin의 적정 혼합량을 산정할 수 없었으며, 백신과 혼합 투여시에 독성이 나타나지 않는 lectin의 농도

산정이 요구되었다.

Table 1. Clinical signs and fatality in piglets after inoculation of lectin into thigh muscle

| Experimental Groups | Dose of Lectin (ng/g body weight) | No. of Piglets Tested | No. of Piglets Died/Tested | Clinical Signs |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------|--|
| Lectin (KML-C) | 7 | 12 | 0/12 | edema in leg cutaneous hemorrhages in leg lameness, depression |
| Lectin (KML-C) | 30 | 12 | 12/12 | general cutaneous hemorrhage fever, dyspnea death in 16-20 hours |
| Control | 0 | 12 | 0/12 | normal |
| Total | | 36 | | |



Histopathological findings on thigh muscles of piglets died after inoculation of lectin (30 ng/g body weight).

Photo 1. Centrilobular congestion in liver. H&E, X200.

Photo 2. Appearance of fat granules in liver. H&E, X200.

Photo 3. Necrosis, karyorrhexis and depletion of nuclei in liver. H&E, X400.

Photo 4. Vacuolation and necrosis of cells in convoluted tubules, and hyaline droplets in glomeruli of kidney. H&E. X400.

2) 세포성 면역 담당세포의 분포상태

Lectin의 독성과는 별개로, 7 ng 접종군의 세포성 면역 담당세포의 상태를 조사하기 위하여 MHC class II, CD2+, CD4+, CD8+, B 림프구 (sIgM+), NK 세포, 단핵구, 과립백혈구 등의 면역세포 아집단의 분포비율을 돼지 백혈구 아집단 특이 단클론 항체 및 flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry System, USA)를 이용하여 분석하였다. 그 결과 B 림프구, NK 세포 및 과립백혈구의 비율이 비 접종 대조군에 비하여 유의성 있게 높게 나타났다 (Fig. 1, 2 및 3).

하지만 이 성적은 lectin의 독성이 관찰되었던 자돈에서의 결과이어서 lectin의 세포성 면역 증강 상태에 대한 정확한 판단을 할 수 없었다.

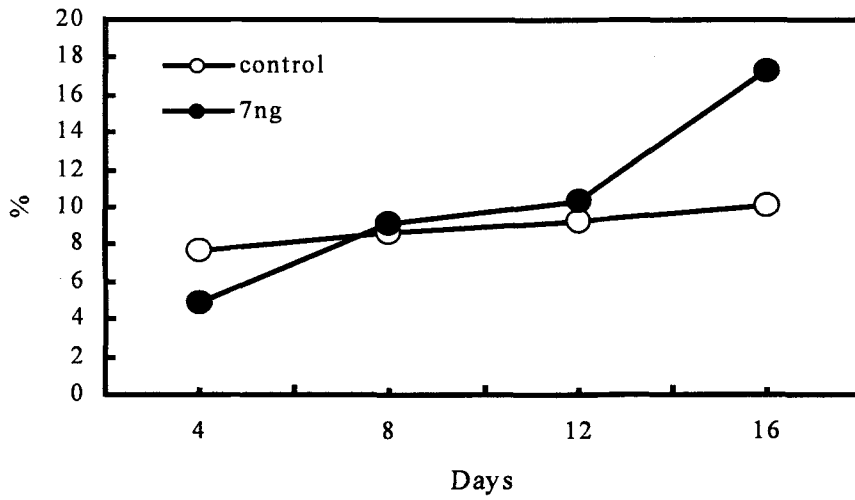


Fig. 1. Increased population of B lymphocytes (sIgM+) in piglets after inoculation of lectin (7 ng/g body weight).

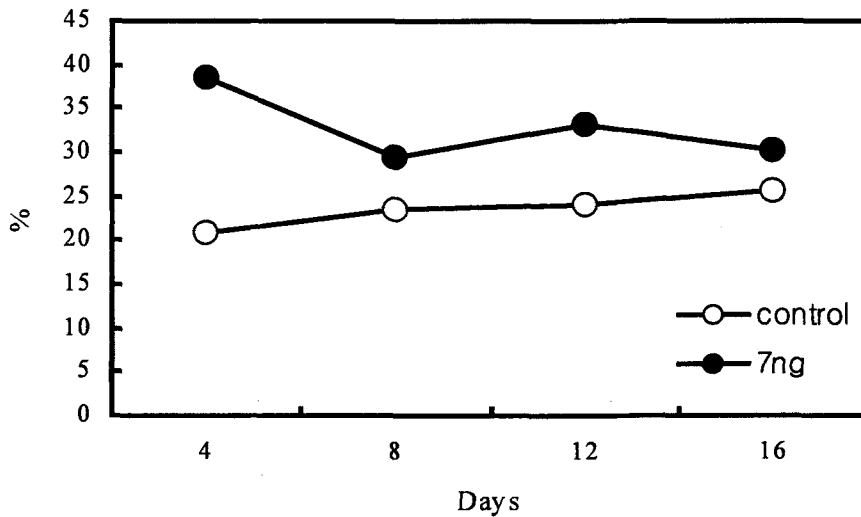


Fig. 2. Increased population of NK cells in piglets after inoculation of lectin (7 ng/g body weight)

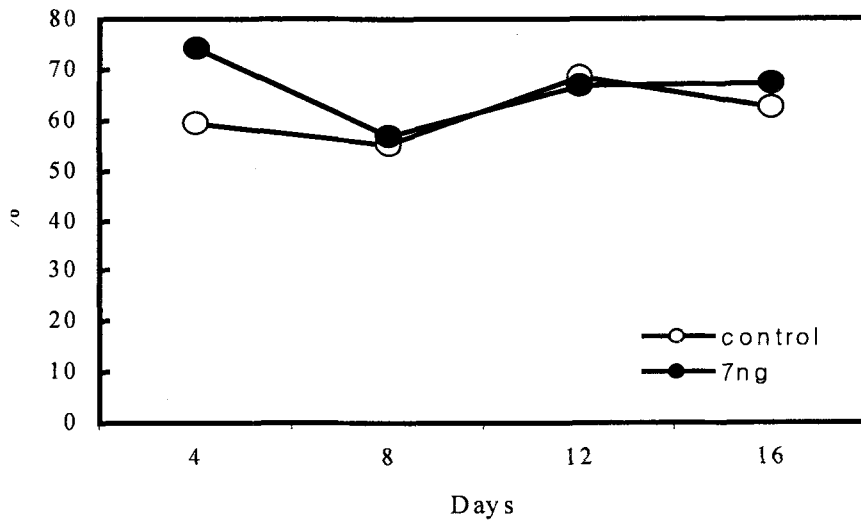


Fig. 3. Increased papulation of granulocytes in piglets after inoculation of lectin (7 ng/g body weight)

3) 불활화 백신의 면역증강을 위한 lectin의 적정 혼합량

돼지에서 독성 없이 불활화 백신의 면역증강 효과를 나타낼 수 있는 lectin의 혼합량을 조사하기 위하여 재 실험을 실시하였다. 1차적으로 자돈 각 1두에 대하여 체중 1 g당 5 ng, 3 ng, 1 ng의 lectin을 각각 경측부 근육내에 접종한 후 5일 동안 관찰하였다. 그 결과 접종 후 1일 째에 전 접종군에서 경증의 침울, 사료섭취 저하 소견이 있었으나 2일째에 회복하였다. 또한 5 ng 접종 자돈에서는 다리의 강직 및 걷기를 기피하는 소견이 있었으나 2일째에 회복하였다. 5일 후에 부검하였던 바 전 예에서 접종부위 근육조직에서 육안적으로 충혈, 경결 및 회황색의 변색 소견이 인정되었다. 병리조직 검사에서는 1 ng 접종 자돈을 제외하고는 간과 신장 등의 독성 변화가 인정되었다 (Photo 미 첨부). 따라서 돼지에서 독성 유발이 최소화 될 수 있는 lectin의 양은 체중 1 g당 1 ng 이하인 것으로 추정하였다.

이와 같은 결과에 따라 2차적으로 이유 자돈을 각 군당 9두씩 공시하여 제 1군은 체중 1 g당 0.7 ng, 제 2군은 0.5 ng의 lectin을 경측부 근육에 접종한 후 4주 동안 관찰하면서 접종 당일, 접종 후 1주, 2주, 4주에 각 군당 3두씩 채혈하여 세포성 면역상태, 혈액학치, 혈액화학치를 조사하였고 부검하여 병리조직소견 (접종 당일 제외)을 조사하였다. 동시에 비 접종 대조군 9두를 공시하였다.

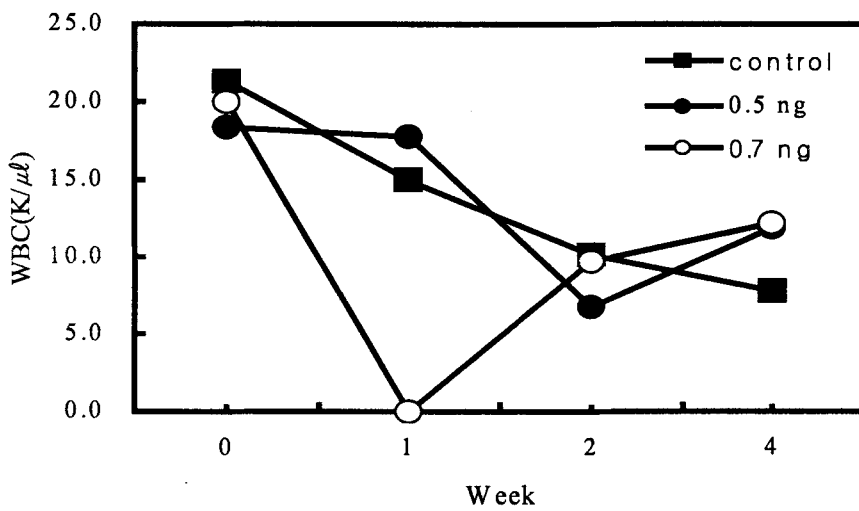
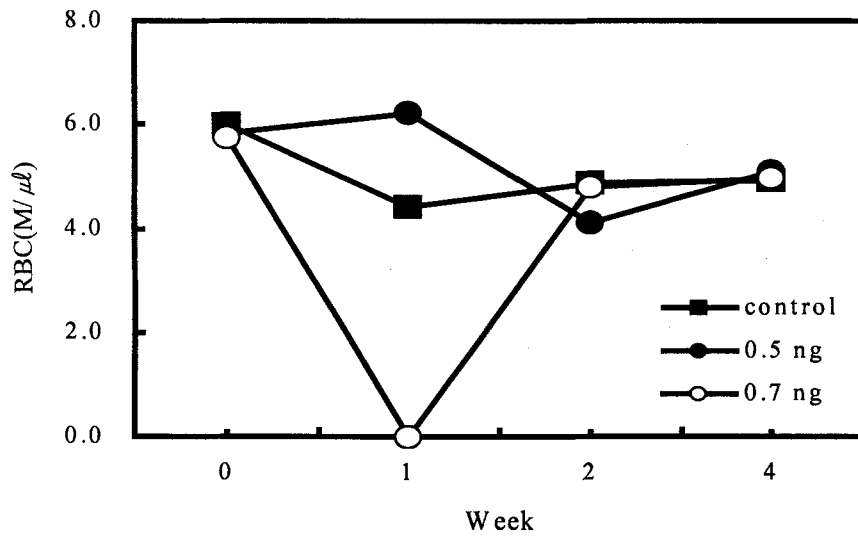
그 결과 전 실험기간 동안 전 군의 자돈들은 임상적으로 정상이었고 폐사하는 예가 없었다. 자동혈액화학분석기 (Hemavet-R Mascot, USA)를 이용한 혈액학치 및 혈액화학치의 검사에서 PCV치, 총 RBC수, Hb치는 접종 후 1주에 감소 ($p < 0.05$) 되었으나 이후 증가하였으며, 총 WBC수는 전 기간 동안 감소되었고 4주째에 약간 증가하는 경향이나 정상 범위내의 변화인 것으로 인정되었다. 또한 BUN치, creatinine 치, AST치 및 ALT치도 정상 범위내의 변화 수준을 나타내어 혈액학적으로 신장과 간에 대한 lectin의 독성은 인정되지 않았다 (Fig. 4).

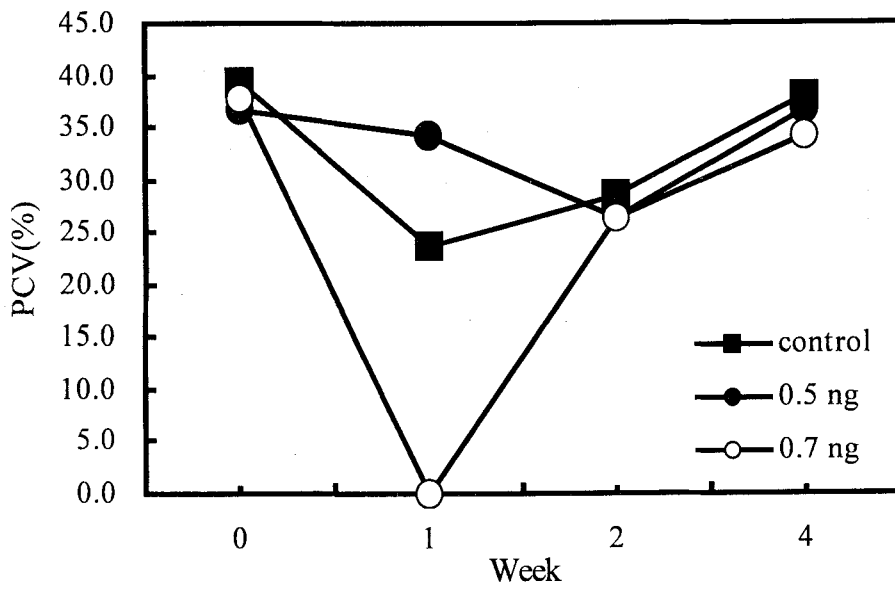
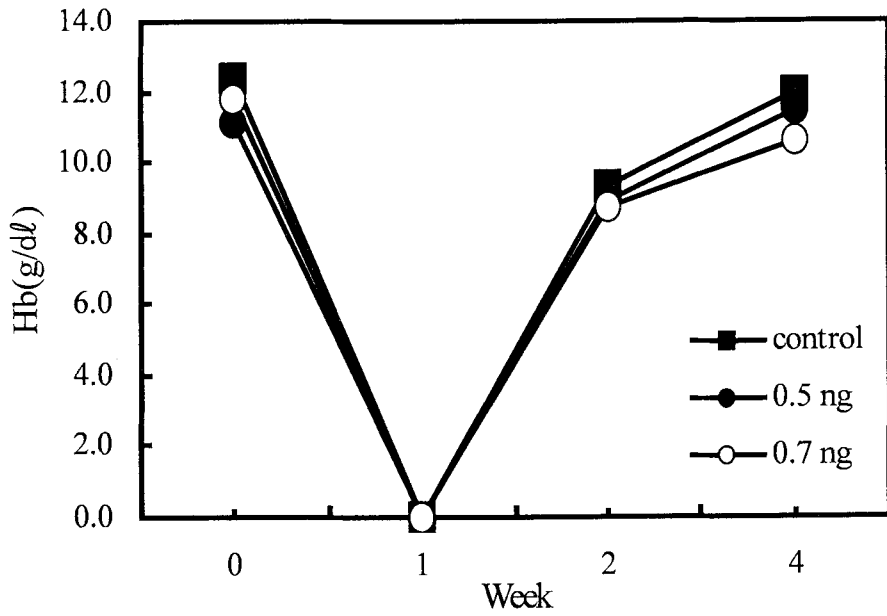
한편 병리조직 소견에서는 0.7 ng 접종군의 경우 대부분 정상이었으나 접종 후 1주에 1 두의 신장에서 세뇨관 상피세포의 중창 및 공포변성이 인정되었다 (Photo

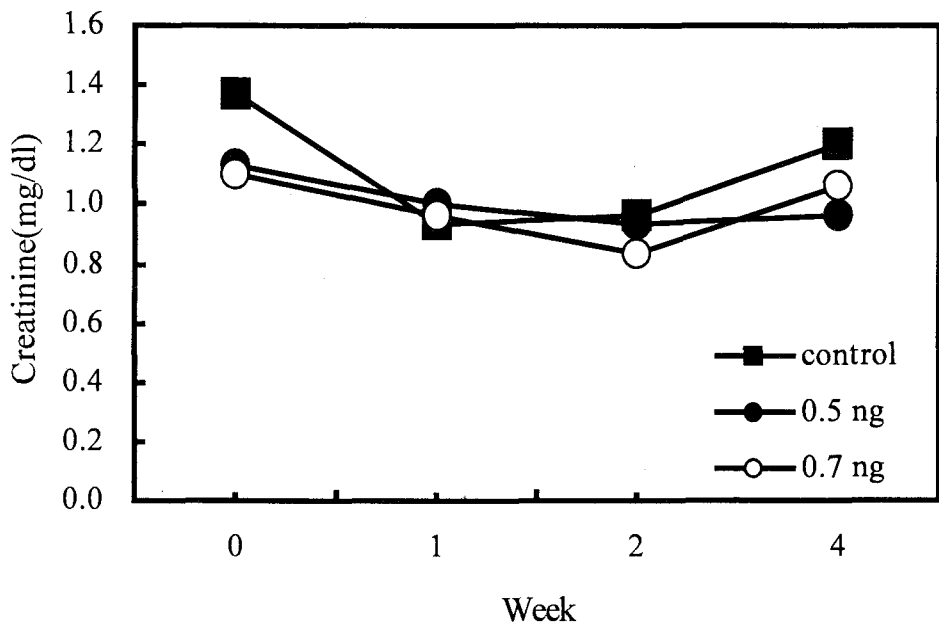
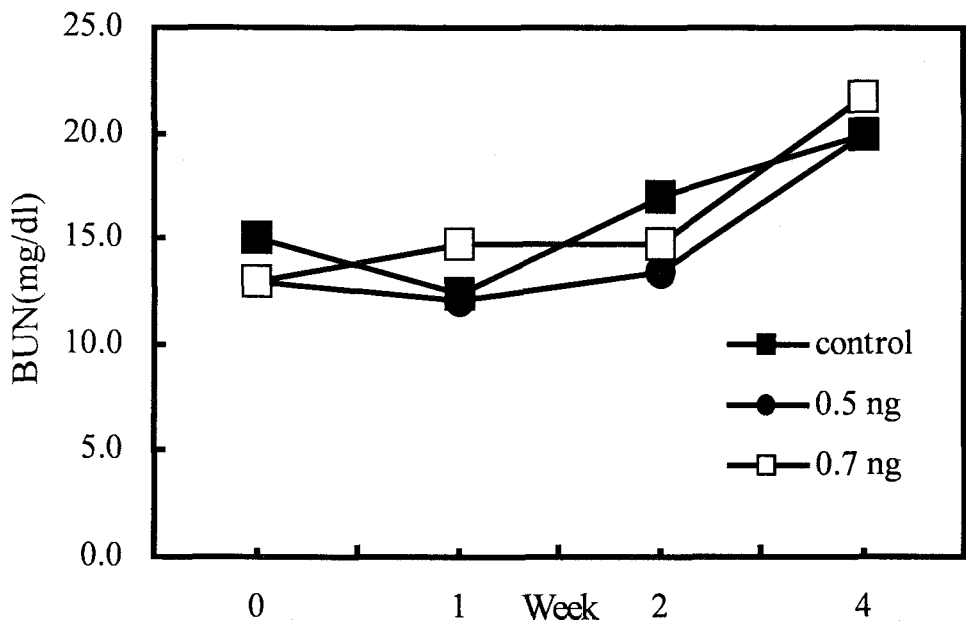
5). 또한 0.5 ng 접종군에서는 간과 신장의 조직소견은 정상이었으나 접종 후 2주까지 1-2두에서 접종부위의 근섬유 괴사 및 섬유소증식 소견이 관찰되었다 (Photo 6). 이와 같은 결과를 병아리에서 체중 1 g당 2.2 ng을 투여하였을 때 독작용 및 부작용이 관찰되지 않았던 1차년도 연구결과와 비교할 때, lectin의 돼지에 대한 독성이 현저히 높은 것으로 사료되었다. 따라서 돼지의 면역증강을 위한 lectin의 사용 및 그 혼합량의 결정에 있어서 신중하여야 될 것으로 판단되었다.

이들 접종군의 세포성 면역상태 조사에서 MHC class II, CD2+, CD4+, CD8+, B 림프구 (sIgM+) 및 단핵구의 비율이 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 이에 비하여 선천성 면역반응에 관여하는 NK 세포 및 과립백혈구의 분포비율은 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타냄으로서 (자료 미첨부) 추후 특정 항원과 혼합하여 투여하면 백혈구 아집단의 분포비율을 확실히 파악할 수 있을 것으로 생각되었다.

이와 같은 성적으로 볼 때 백신과의 혼합 투여시에 lectin의 독성이 배제될 수 있는 농도는 체중 g 당 0.7 ng 이하로 판단되었으나 면역효과를 증강시키기 위한 최소한의 농도를 고려하지 않을 수 없어서, lectin의 백신내 혼합량을 체중 1 g당 0.7 ng으로 결정하였다.







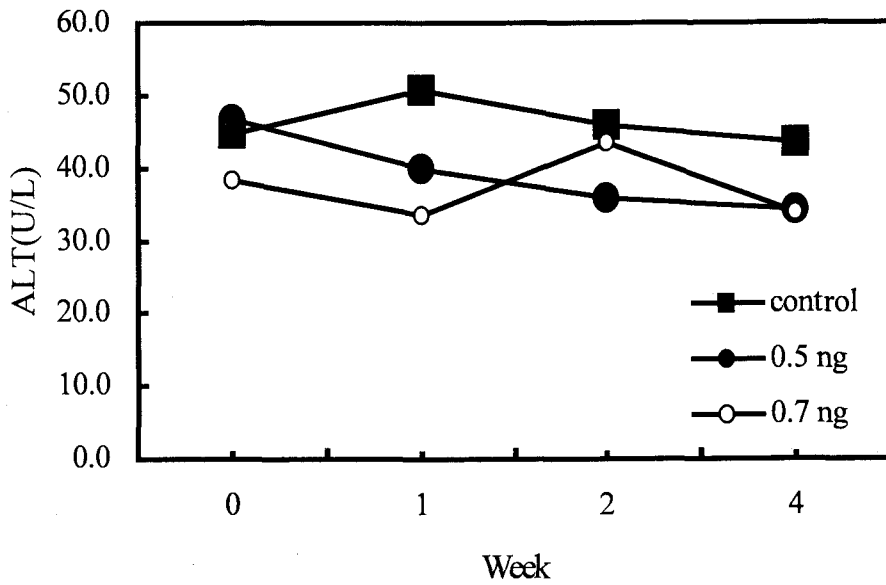
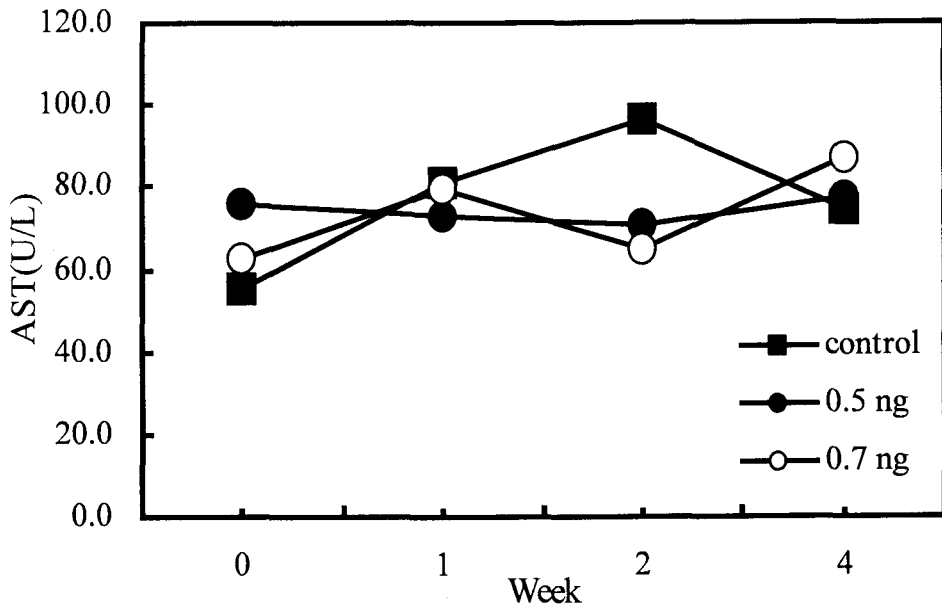


Fig. 4. Changes in cell counts and chemical values of blood in piglets after inoculation of lectin.

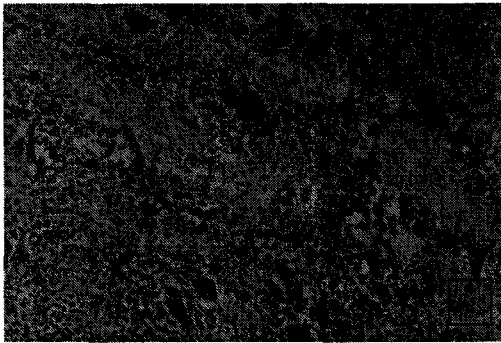
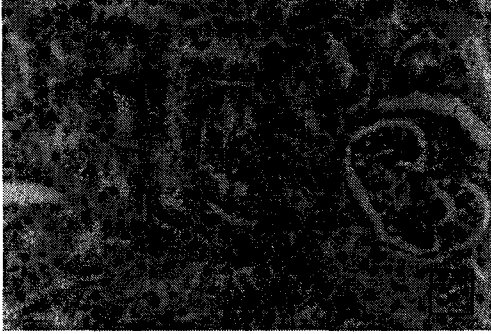


Photo 5. Swelling of tubular epithelia in kidney of piglets at 1 week after inoculation of lectin (0.7 ng/g body weight). H&E, X400.

Photo 6. Necrosis of muscle fibers in piglets at 1 week after inoculation (0.7 ng/g body weight). H&E, X200.

나. 겨우살이 추출물에 의한 오제스키병 예방 백신의 특이 면역 증강 효과

Lectin에 의한 오제스키 바이러스 예방백신의 특이면역 증강효과를 조사하고 동시에 기존 면역 증강물질인 $Al(OH)_3$ 의 면역증강 효과와 비교하고자 다음과 같이 백신을 제조하여 예방접종한 후 세포성 면역상태 및 항체형성 상태를 조사하였다. 오제스키 바이러스 NYJ87-1 주를 PK15 세포에서 증식시킨 후 세포의 동결, 용해후 바이러스를 수확한 다음 역가 ($TCID_{50}/ml$)를 산정하였다. 바이러스 (10^7 $TCID_{50}/ml$) 액에 포르말린을 0.2% 되게 가하고 $37^\circ C$ 에서 24시간 동안 교반하여 바이러스를 불활화 시켰으며, $Al(OH)_3$ 혼합 백신은 백신액의 총량에 대하여 불활화 바이러스를 34%, $Al(OH)_3$ 및 PBS를 각각 32%와 34% 되게 혼합하여 제조하였다. Lectin 혼합 백신은 이와 같은 구성비율 중 32%의 $Al(OH)_3$ 대신에 lectin을 자돈의 체중 g당 0.7 ng이 되도록 혼합하였으며, 부족한 비율만큼은 PBS (pH 7.2)로 충족시켜 제조하였다. 또한 같은 구성비율로 lectin과 $Al(OH)_3$ 을 동시에 혼합시켜 백신을 제조하였다.

기존의 양돈장으로서 2년 이상 돼지를 사육하지 않았고 주위로부터 격리된 한 양돈장에서 이유후 1주령으로서, 혈청중화시험을 통하여 오제스키 바이러스에 대한 항체 음성임이 확인된 자돈을 1군당 12두씩 5군으로 구분하여 사육하면서 공시하였다. 즉, 제 1군에는 lectin 혼합 백신, 제 2군에는 $Al(OH)_3$ 혼합 백신, 제 3군에는 lectin과 $Al(OH)_3$ 의 동시 혼합 백신, 제 4군에는 불활화 바이러스 단독 백신, 제 5군은 백신 비접종 대조군으로서 PBS를 각각 1 ml씩 경측부 근육내에 주사하였다. 접종 후 5주 동안 매주 각 군별 3두로부터 채혈 (채혈후 도태시킴)하여 세포성 면역상태 및 항체가를 조사하였으며, 4주째 채혈 직후에 병원성 NYJ87-1주 (10^6 $TCID_{50}/ml$) 1ml를 비강내에 점적하여 공격시험을 실시하여 방어능 및 폐사율을 조사하였다.

1) 세포성 면역상태

각 백신을 접종한 후 세포성 면역 담당세포 아집단의 분포상태를 분석한 결과는 다음과 같다.

5주 경과시 까지 MHC class II 발현세포, CD2+, CD4+, CD8+, B 림프구 (sIgM+), NK 세포 및 과립백혈구는 lectin과 Al(OH)₃를 동시 혼합한 백신 및 Al(OH)₃ 혼합 백신 접종군에서 백신 비 접종 대조군에 비하여 분포비율이 높아서 비교적 우수한 세포성 면역효과를 나타낸 것으로 사료되었다. 나아가서 이들 백신 접종군에서의 면역상태를 비교하면, Al(OH)₃ 혼합 백신 접종군에서 대부분의 세포성 면역 담당세포 아집단의 분포비율이 높은 것을 알 수 있었다. 또한 Al(OH)₃ 혼합 백신은 항원전달 세포로서의 기능을 확인할 수 있는 MHC class II 세포의 비율이 투여 후 1주부터 상승하기 시작하여 5주까지 높은 분포를 나타내었다. 이에 비하여 lectin 단독 혼합 백신의 경우는 B 림프구 (sIgM+)의 분포비율만 타 백신 접종군 및 백신 비 접종 대조군보다 높은 것으로 확인되었다 (Fig 5-11).

따라서 돼지에서 lectin (체중 1 g 당 0.7 ng)에 의한 세포성 면역은 뚜렷이 활성화 되지 않는 것으로 사료되었으며, 또한 Al(OH)₃와 비교할 때 그 효과는 아주 낮음을 알 수 있었다. 즉, 독성 때문에 lectin의 혼합량을 최소화 하였던 관계로 독성은 출현하지 않았으나, 세포성 면역의 활성화는 대부분 이루어지지 않은 것으로 생각되었다.

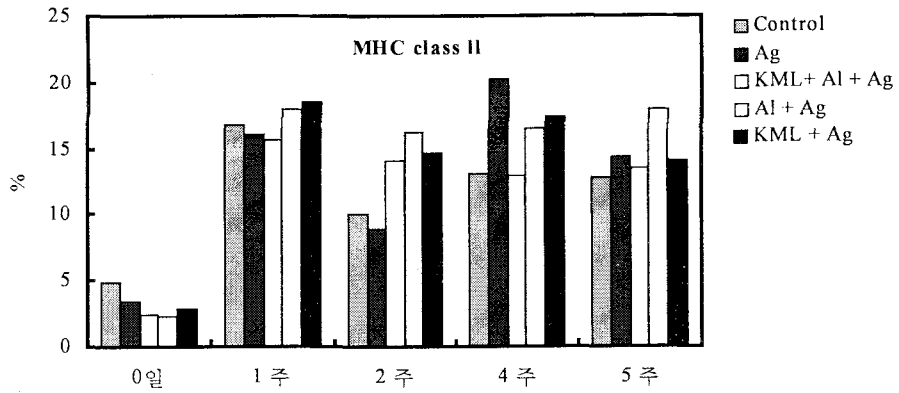


Fig. 5. Distribution rate of cells expressing MHC class II after different vaccinations: Ag, Aujeszky's virus; KML, lectin; Al, Al(OH)₃.

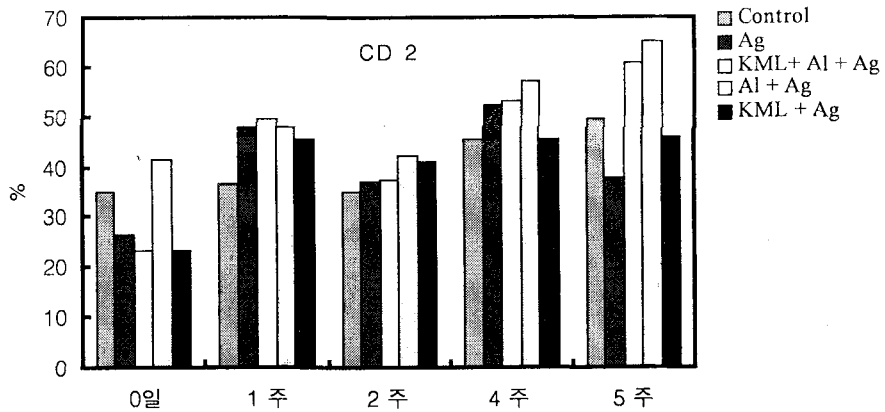


Fig. 6. Distribution rate of CD2+ T lymphocytes after different vaccinations: Ag, Aujeszky's virus; KML, lectin; Al, Al(OH)₃.

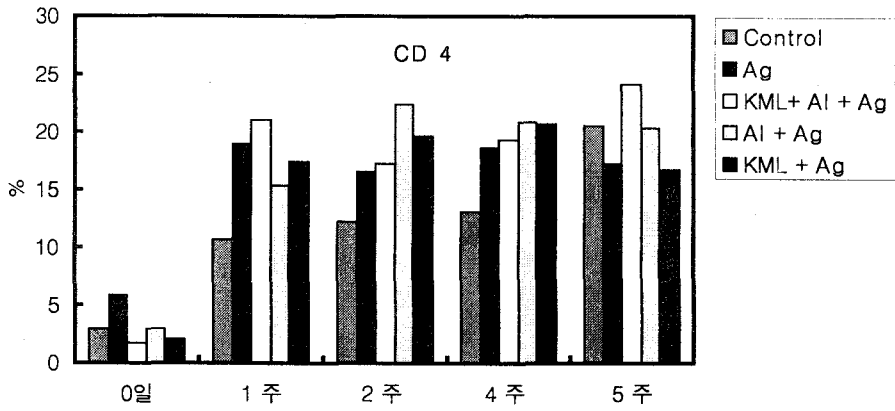


Fig. 7. Distribution rate of CD4+ T lymphocytes after different vaccinations:
 Ag, Aujeszky's virus; KML, lectin; Al, Al(OH)₃.

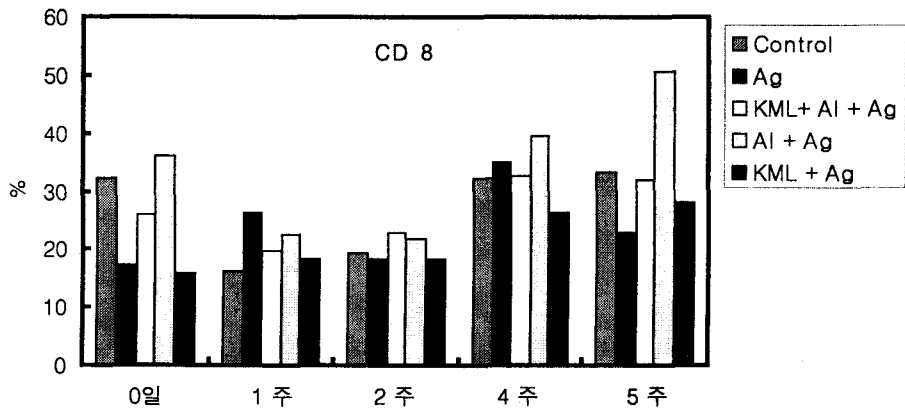


Fig. 8. Distribution rate of CD8+ T lymphocytes after different vaccinations:
 Ag, Aujeszky's virus; KML, lectin; Al, Al(OH)₃.

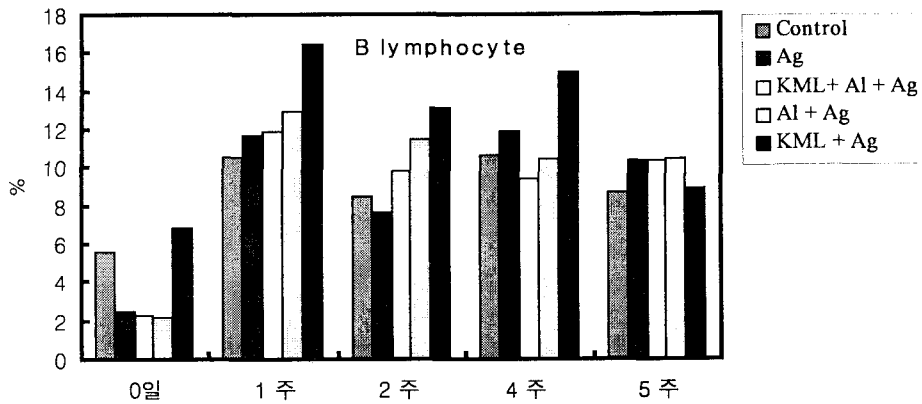


Fig. 9. Distribution rate of B lymphocytes (sIGM+) after different vaccinations:
Ag, Aujeszky's virus; KML, lectin; Al, Al(OH)₃.

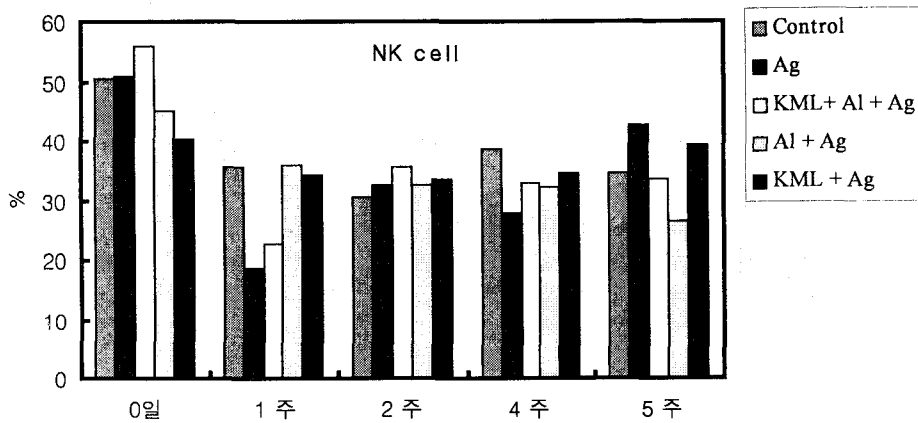


Fig. 10. Distribution rate of NK cells after different vaccinations:
Ag, Aujeszky's virus; KML, lectin; Al, Al(OH)₃.

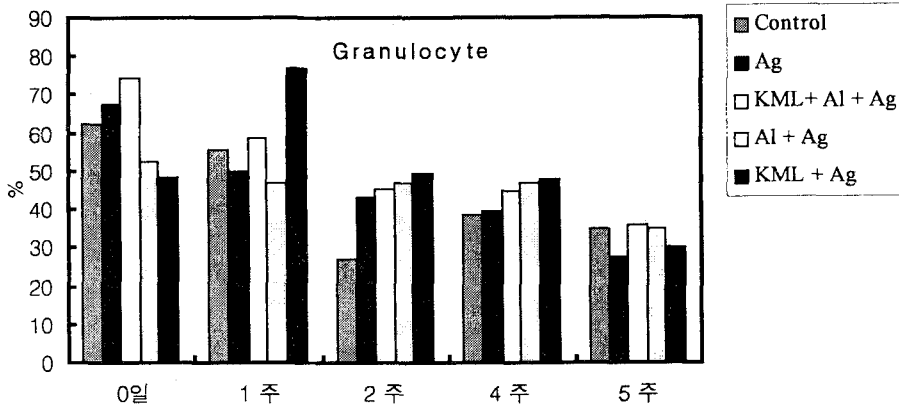


Fig. 11. Distribution rate of granulocytes after different vaccinations:

Ag, Aujeszky's virus; KML, lectin; Al, Al(OH)₃.

2) 항체 형성상태

Lectin 혼합 백신, Al(OH)₃ 혼합 백신, lectin 및 Al(OH)₃ 동시 혼합 백신, 불활화 바이러스 단독 백신 등의 접종군과 백신 비접종 대조군에 대하여 접종전과 접종 후 5주까지 경시적으로 채혈한 후 오제스키 바이러스 NYJ87-1주 (10² TCID₅₀/ml)에 대한 혈청의 중화 항체가를 조사하였던 결과는 다음과 같다.

Lectin 혼합 백신에 의한 항체가는 접종 후 1, 2, 3, 4 주에 각각 log₂1.3, log₂3.0, log₂4.0, log₂3.0으로서 불활화 바이러스 단독 백신에 의한 각 주별 항체가 (log₂1.0, log₂2.3, log₂3.3, log₂3.0)와 큰 차이가 인정되지 않았다. 이에 비하여 Al(OH)₃ 혼합 백신에 의한 항체가는 각각 log₂2.0, log₂4.3, log₂5.7, log₂5.7의 수준을 나타내었으며, lectin과 Al(OH)₃동시 혼합 백신에 의한 항체가는 log₂2.0, log₂4.0, log₂6.0, log₂6.0으로서 Al(OH)₃ 혼합 백신에 의한 항체가와 거의 동일하였다. 따라서 돼지에서 체중 1 g 당 0.7 ng 수준의 lectin에 의한 오제스키병 예방백신의 면역증강 효과는 Al(OH)₃에 의한 것보다 낮은 것을 알 수 있었다 (Fig. 12).

한편 공격시험 후에 lectin 혼합 백신 접종군 3두 중 2두, 불활화 바이러스 단

독 백신 접종군 3두 전 예 및 백신 비접종 대조군 3두 전 예가 1-2일 동안 설사 증세 및 체온 상승소견을 보였으나 폐사한 예는 없었다 (Table 1). 공격시험 후인 5주에 lectin 혼합 백신에 의한 항체가 $\log_2 5.0$ 수준으로서 불활화 바이러스 단독 백신에 의한 $\log_2 4.0$ 와 비슷하였으며, 이 때의 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 혼합 백신, lectin과 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 동시 혼합 백신에 의한 항체가인 $\log_2 7.7$, $\log_2 7.3$ 보다 다소 낮은 경향을 나타내었다. 따라서 공격시험에서 회복함에 따른 booster 효과 역시 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 혼합 백신에 비하여 낮음을 알 수 있었다. 이와는 별개로 전 실험기간 동안 임상적으로 lectin에 기인하는 이상 증상은 관찰되지 않았다.

이와 같은 현상은 lectin의 독성을 피하고자 백신에 대한 혼합량을 최소화하였기 때문인 것으로 추측되며, 그 결과 항체형성에 필요한 항원 자극이 약하게 이루어진 것으로 생각된다. 따라서 여러 가지 성적을 종합하여 볼 때 lectin은 돼지에서 독성을 심하게 나타내며, 독성을 유발하지 않는 수준의 양 (체중 1 g 당 0.7 ng)을 혼합하였을 경우 돼지 전염병 예방 백신의 면역증강 효과를 나타내기 어려운 것으로 판정되었다. 한편 이와 같은 결과로 볼 때 형성된 항체의 오제스키병 바이러스 중화능력 여부는 조사 의미가 없는 것으로 판단하였다.

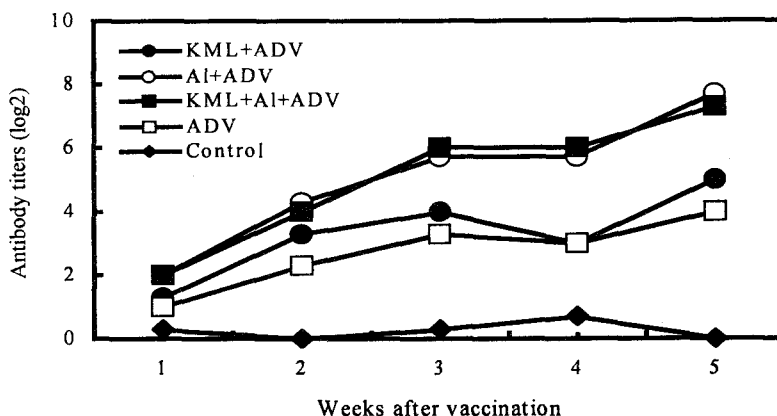


Fig. 12. Comparison of neutralizing antibody titers in pigs immunized with vaccines of Aujeszky's virus in different adjuvants: KML, lectin; Al, Al(OH)₃; ADV, Aujeszky's disease virus.

Table 1. Clinical signs observed in immunized pigs after challenge by virulent Aujeszky's disease virus (ADV)^a

| Vaccines | No. of Pigs | No. of Pigs |
|--|-------------------------------|-------------|
| | Diseased ^b /Tested | Died/Tested |
| Lectin-adjuvanted ADV | 2/3 | 0/3 |
| Al(OH) ₃ -adjuvanted ADV | 0/3 | 0/3 |
| Lectin-Al(OH) ₃ -adjuvanted ADV | 0/3 | 0/3 |
| Non-adjuvanted ADV | 3/3 | 0/3 |
| Control | 3/3 | 0/3 |

^aThe 1 ml of ADV NYJ87-1 strain (10⁶ TCID₅₀/ml) was injected into piglets via nasal cavity at 4 weeks after vaccination.

^bSigns included diarrhea and fever.

다. 결론

겨우살이 추출물로부터 정제된 lectin의 돼지에 대한 혈액학적 및 병리조직학적 일반 독성여부를 조사하고 돼지 오제스키병 예방 백신에 대한 lectin의 면역증강 효과를 기존 면역증강 물질인 Al(OH)₃에 의한 것과 비교 조사하기 위하여, 이들을 혼합시킨 오제스키병 바이러스 불활화 백신을 이유후 1주령의 자돈에게 접종한 후 세포성 면역상태, 항체의 형성상태 및 강병원성 바이러스 공격에 대한 방어능력을 조사하였던 결론은 다음과 같다.

1) 겨우살이 추출물의 돼지에 대한 일반독성

가) Lectin을 체중 1 g 당 30 ng 씩 대퇴부 근육에 접종 시에 전 자돈이 접종 후 16-20 시간 내에 전신의 발적 및 피하출혈, 호흡곤란, 발열 소견 후 폐사하였고, 간 소엽에서 중심성의 울혈, 지방구 출현 및 크기 증가, 간세포의 괴사, 핵붕괴 및 핵소실 등 중독성 간염 소견이 있었으며 신장 곡세뇨관 세포의 공포화 및 괴사, 사구체의 단백질 소실에 따른 초자적의 출현 소견 관찰되었다.

나) Lectin을 체중 1 g 당 7 ng 씩 대퇴부 근육에 접종한 자돈에서 실험기간 동안 폐사한 예는 없었으나 전 자돈에서 대퇴부 접종부위 근육에서 부종과 피하출혈 소견이 관찰되었으며 다리를 절고 전반적으로 침울한 증상을 나타내었다.

다) Lectin을 체중 1 g 당 1-5 ng 씩 대퇴부 근육에 접종한 자돈의 전 예에서 경증의 침울, 사료섭취 저하 소견이 있었고, 5 ng 접종 자돈에서는 다리의 강직 및 걷기를 기피하는 소견이 있었으며, 3-5 ng 접종에서 근육조직의 충혈, 경결 및 회황색의 변색, 간과 신장 독성변화가 인정되었다.

라) Lectin을 체중 1 g당 0.5-0.7 ng 씩 경측부 근육에 접종한 자돈에서는 임상적으로 정상이었고 총 RBC, 총 WBS, PCV, Hb, BUN, creatinine, AST 및 ALT 수치 등이 정상이어서 혈액학적으로 신장과 간에 대한 lectin의 독성은 인정되지 않았으나, 0.7 ng 접종군의 신장에서 세뇨관 상피세포의 종창 및 공포변성이 인정되었으며, 0.5 ng 접종군의 접종부위 근섬유 괴사 및 섬유소증식 소견이 관찰되었다.

마) 따라서 lectin의 돼지에 대한 독성은 상당히 심한 것으로 관찰되었으며, 돼지에서 독성을 최소화 하여 불활화 백신의 면역증강 효과를 나타낼 수 있는 lectin의 혼합량은 체중 1 g당 0.7 ng 이하인 것으로 추정되었다.

2) 겨우살이 추출물에 의한 오제스키병 예방 백신의 특이면역 증강 효과

가) 돼지 체중 1 g 당 0.7 ng의 lectin을 혼합한 백신 접종 시에 MHC class II 발현 세포, CD2+, CD4+, CD8+, B 림프구 (sIgM+), NK 세포 및 과립백혈구 중 B 림프구 (sIgM+)의 분포비율만 높은 것으로 확인되어 세포성 면역이 활성화되지 않았다.

나) Lectin 혼합 (체중 1 g 당 0.7 ng) 백신에 의한 항체가는 접종 후 1, 2, 3, 4 주에 각각 $\log_2 1.3$, $\log_2 3.0$, $\log_2 4.0$, $\log_2 3.0$ 으로서, Al(OH)₃ 혼합 백신에 의한 항체가에 비하여 다소 낮았으며 불활화 바이러스 단독 백신에 의한 각 주별 항체가와도 큰 차이가 인정되지 않았다.

다) 공격시험 후에 lectin 혼합 (체중 1 g 당 0.7 ng) 백신 접종군에서 불활화 바이러스 단독 백신 접종군에서와 같은 설사 및 체온상승 소견을 보였으며, 공격시험 후인 5주에 항체가는 $\log_2 5.0$ 수준으로서 불활화 바이러스 단독 백신에 의한 $\log_2 4.0$ 와 비슷하였다.

이상의 성적으로 볼 때 lectin은 돼지에서 병리조직학적 독성이 심하며, 독성이 유발되지 않는 양 (체중 1 g 당 0.7 ng)을 혼합한 오제스키 바이러스 불활화 백신의 접종 시에 lectin은 백신의 면역효과를 증강시키지 못하는 것으로 판정되었다.

○ 3차년도 (2001)

| 연구기관 | 연구책임자 | 소요예산 |
|-------|-------|------------|
| 경상대학교 | 여상진 | 50,000,000 |

가. 뉴캐슬병 바이러스 HN 유전자 재조합 DNA clone의 작성

실험실에서 작성하여 보유하고 있는 뉴캐슬병 바이러스 B1 주의 HN 유전자 재조합 plasmid DNA로부터 HN 유전자를 취하여 baculovirus expression vector와의 유전자 재조합 DNA clone을 작성하였다.

즉, 이 plasmid DNA는 HN 유전자의 coding 부위에 해당하는 1.7 kb의 DNA와 HN 유전자의 5'측의 noncoding 부위, 그 전방의 F 유전자 일부, HN 유전자의 3'측의 noncoding 부위 및 그 후방의 L 유전자의 일부로 구성된 2.1 kb의 insert DNA와 pTZ19R vector (2.9 kb)로서 총 5.0 kb 이다. 이 plasmid DNA는 제한효소 *Bam*HI으로 절단 시에 pTZ19R과 HN 유전자의 전부에 해당하는 5.0 kb의 1 분절로 나타나며, *Pst*I으로 절단 시에 pTZ19R에 HN 유전자의 일부 (0.5 kb)가 포함된 3.4 kb의 분절 및 1.6 kb의 HN 유전자 분절, *Pst*I과 *Sst*I에 의하여는 2.9 kb의 pTZ19R과 1.6 kb 및 0.5 kb의 2 분절로 나누어지는 HN 유전자로 구성되어 있다 (Fig. 1).

이 plasmid DNA에 대하여 HN 유전자의 ATG codon 전방 부위에 annealing 되는 sense primer (5'caccgacaacagtcctcaatc3')와 HN 유전자의 stop codon을 포함하는 antisense primer (5'actcaactagccagacctggc3')를 사용하여 polymerase chain reation을 실시하였다. 그 결과 HN 유전자의 ATG codon으로부터 TAG stop codon

까지에 해당하는 약 1.7 kb의 DNA를 획득하였다. Bac-to-Bac Baculovirus Expression kit (GibcoBRL, USA)를 이용하여, 이 HN DNA를 expression vector인 pFastBacHTa (4.9 kb)에 cloning하여 1.7 kb의 HN DNA가 재조합된 pFBHN clone을 작성하였다 (Fig. 2).

나. HN 유전자 재조합 pFBHN clone의 배양

HN 유전자 재조합 DNA를 *Sf* 세포 배양계에서 증식시켜 HN 단백질의 발현 여부를 검정하였다. 이를 위하여 pFBHN DNA를 추출한 후 42C, 45초 동안의 열차극을 통하여 DH10Bac 세포내로 형질 전환시켜 pFBHN clone으로부터 HN DNA (1.7 kb)가 전이된 bacmid (baculovirus) DNA를 구축하였다 (Fig. 3).

이 유전자 재조합 bacmid DNA를 추출한 후 lipofectin을 이용하여 *Sf* 세포에 감염시켜 배양하였으며, wild type의 baculovirus를 감염시킨 *Sf* 세포를 대조군으로 하였다. 그 결과 wild baculovirus를 감염시켰던 *Sf* 세포에서는 baculovirus 특유의 occlusion (polyhedrosis)이 관찰되었으며, HN 유전자를 polyhedrosis gene에 재조합하고 있는 bacmid를 감염시켰던 세포에서는 occlusion이 나타나지 않으므로서 polyhedrosis 유전자 부위에 HN 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었다. 또한 이 HN 단백질 발현 *Sf* 세포에 대하여 뉴캐슬병 바이러스 특이 항혈청을 이용하여 형광 항체 시험을 하였을 때, 양성 반응을 보였다.

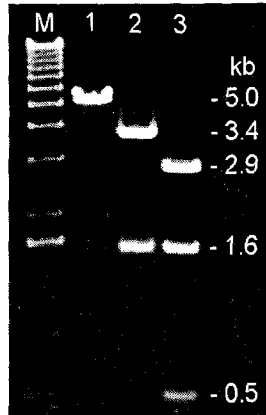


Fig 1. DNA of NDV-HN extracted for gene expression: 1, HN DNA (2.1 kb)-recombinant pTZ19R vector (2.9 kb) digested by *Bam*HI; 2, part (1.6 kb) of HN DNA divided from recombinant pTZ19R in digestion by *Pst*I; 3, HN DNA divided into two fragments of 1.6 and 0.5 kb in digestion of recombinant pTZ19R vector by *Pst*I and *Sst*I; M, 1 kb DNA plus ladder marker (GibcoBRL).

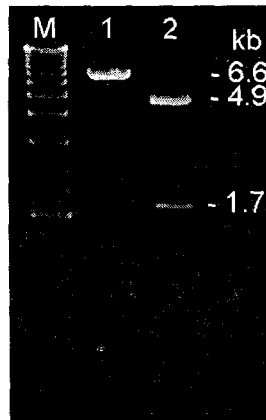


Fig 2. Construction of recombinant clone pFBHN for expression of HN protein: 1, pFBHN clone (6.6 kb) consisted of HN DNA (1.7 kb) and pFastBacHTa vector (4.9 kb); 2, HN DNA from pFBHN digested by *Eco*RI and *Hind*III; M, 1 kb DNA plus ladder marker (GibcoBRL).



Fig. 3. HN DNA identified from HN DNA-recombinant bacmid by PCR: 1, DNA with 3.9 kb consisting of part of bacmid and whole HN DNA amplified from recombinant bacmid by primers for M13/pUC; lane 2, HN DNA with 1.4 kb amplified from recombinant bacmid by specific primers for HN DNA; M, 1 kb DNA plus ladder marker (GibcoBRL).

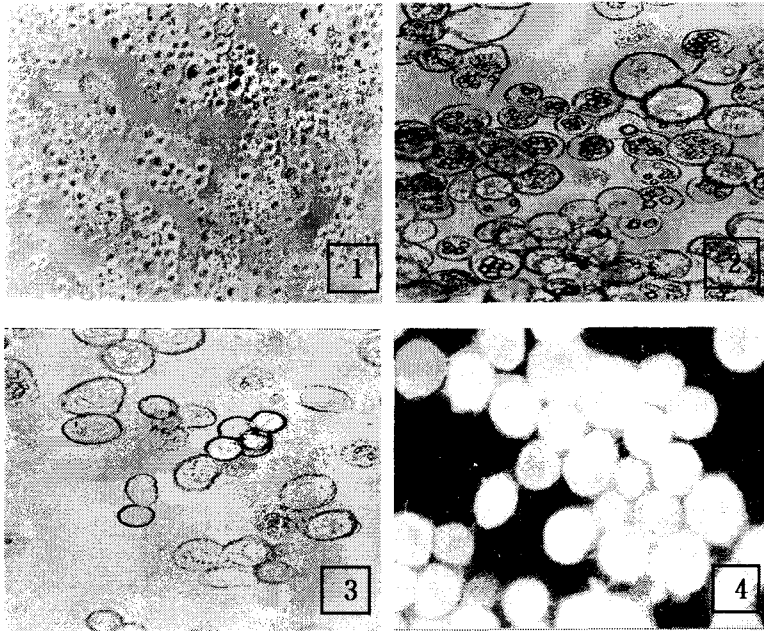


Fig 4. Expression of HN protein in *Sf* cells infected with HN DNA-recombinant bacmid: A, mock-infected cells (X100); B, wild baculovirus-infected cells showing normal occlusion (X200); C, cells infected with HN DNA-recombinant bacmid showing no occlusion (X200); D, fluorescence-positive reaction by HN protein expressed in cells infected with HN DNA-recombinant bacmid (X400).

다. HN 유전자 발현단백질의 추출정제

HN 유전자 재조합 bacmid를 2×10^6 cells/ml 수준의 Sf 세포 (50 ml)에 감염시키고 27°C에서 72 시간 배양한 후에 500 x g에서 5분간 원심 분리하여 세포를 수확하였다. 이 세포 침전물을 5배 양의 lysis buffer (50 mM tris-HCl, pH 8.5, 5 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM KCl, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40)와 혼합시켜 세포를 파괴하였다. 이어서 10,000 x g에서 10분간 원심 분리한 후 상청액을 수확하였다.

이 상청액을 Ni-NTA affinity column (GibcoBRL)에 부하시킨 후 0.5 ml 씩 분획하였으며, 각 분획에 대한 적혈구 응집시험에서 6, 7번 분획의 적혈구 응집역가가 $\log_2 7$ 로서 가장 높았다. 따라서 O.D. 치가 0.167-0.192인 6, 7번 분획을 혼합하여 농축하였다 (Fig 5). 이와 같은 단백질 분획실험을 수회 반복하였으며, 이 분획들을 혼합한 후 분광광도계로 측정하여 단백질의 농도를 산정하여 함량이 500 ng/ml가 되도록 PBS에 농축, 부유시켜 백신의 제조에 사용하였다.

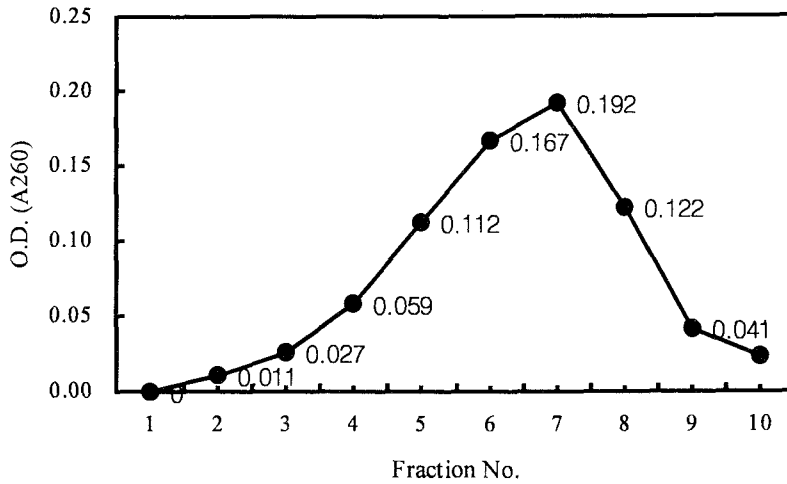


Fig. 5. Fractionation of recombinant HN protein by affinity column of Ni-NTA resin: fraction volume; 0.5 ml.

라. Lectin 혼합 HN 단백질 백신의 특이면역 증강효과

Lectin 혼합 HN 단백질 백신은 2종을 제조하였다 즉, 병아리 1수 당 HN 단백질의 접종량이 200 ng/0.5 ml 및 300 ng/0.5 ml이 되도록 하고 여기에 1수 당 각 200 ng의 lectin을 혼합하여 백신을 생산하였다. 동시에 Al(OH)₃ 혼합 HN 단백질 백신의 면역효과와 비교하고자, 병아리 1수 당 200 ng의 HN 단백질에 대하여 백신 총량의 32%에 해당하는 Al(OH)₃와 34%의 PBS (pH 7.2)를 가하여 Al(OH)₃ 혼합 백신을 제조하였다.

부화후 1주일령의 SPF 병아리를 경상대학교 무균 동물사육실에서 사육하면서 30 수를 1군으로 하고 1수당 0.5 ml의 백신을 대퇴부 근육 내에 접종하였다. 즉, 제 1군에 lectin 혼합 HN 단백질 (200 ng) 백신, 제 2군에는 lectin 혼합 HN 단백질 (300 ng) 백신, 제 3군에는 Al(OH)₃ 혼합 HN 단백질 (200 ng) 백신, 제 4군에는 HN 단백질 (200 ng) 단독 백신을 접종하였고, 제 5군은 대조군으로서 동일량의 증류수를 접종하였다. 백신 접종후 6주 동안 매주 각 군별 5수로부터 채혈 (채혈 후 도태시킴)

하여 항체가를 조사하였으며, 제 4주째 채혈 직후에 강병원성인 교정원주를 1수당 $100 \mu\text{l}$ ($10^6 \text{EID}_{50}/\text{ml}$)씩 점비 접종하여 공격시험을 하여 방어능 및 폐사율을 조사하였다. 항체가는 베타 슬식에 의하여 혈청의 0.5% 닭 적혈구에 대한 hemagglutination-inhibition (HI) 시험으로 측정하였으며, 각 혈청에 대하여 3회 반복 시험한 값의 평균을 산정한 후 컴퓨터 프로그램 (Microsoft excel)으로 분석하였다.

그 결과 Fig 6에서와 같이 lectin 혼합 HN 단백질 (200 ng) 백신을 접종한 후 1, 2, 3, 4 주에 항체는 각각 $\log_2 2.4$, $\log_2 3.4$, $\log_2 3.8$ 및 $\log_2 4.0$ 의 수준으로 형성되었다. 이때 강병원성 바이러스인 교정원주 $100 \mu\text{l}$ ($10^5 \text{EID}_{50}/\text{ml}$)를 비강에 접종하여 공격하였던 바 임상적 이상 증상 및 폐사 예는 없었으며 (Table 1), 1주일이 경과된 제 5주에 항체가는 $\log_2 6.2$ 수준으로 상승하였고 6주에는 $\log_2 7.0$ 에 도달하였다. 따라서 lectin 혼합 HN 단백질 백신 접종으로 형성된 항체에 의하여, 강병원성 바이러스의 감염이 방어됨은 물론 공격 바이러스에 의한 booster 효과를 나타내어 항체가가 상승하는 것을 알 수 있었다.

$\text{Al}(\text{OH})_3$ 혼합 HN 단백질 (200 ng) 백신의 경우에는 접종한 후 1주에 항체가가 $\log_2 2.6$ 으로서 lectin 혼합 HN 단백질 (200 ng) 백신에서와 비슷하였으나 2, 3 주에 $\log_2 4.2$ 와 $\log_2 5.6$ 으로서 lectin 혼합시 보다 조금 높은 수치를 나타내었고 4주에는 3주보다 약간 저하된 $\log_2 5.0$ 수준을 나타내었다. 이 때의 공격시험에서 모두 정상이었고 생존하였으며, 5, 6주에 항체가는 $\log_2 7.4$ 및 $\log_2 7.6$ 을 나타내었다.

한편 HN 단백질 (200 ng) 단독 백신의 접종 후 1, 2, 3, 4 주에 각각 $\log_2 1.6$, $\log_2 2.0$, $\log_2 2.8$, $\log_2 3.0$ 의 수준으로 항체가 형성되었다. 따라서 각 주별로 lectin (200 ng)을 혼합하였을 때 보다 약 $\log_2 1.0$ 정도로 항체가가 낮음을 알 수 있었다. 또한 공격시험에서 10수 중 8수가 2-3일 동안 침울, 경증의 호흡장애 등의 소견을 나타내었으며, 5주, 6주에는 $\log_2 4.2$, $\log_2 5.0$ 로서 lectin 혼합시에 비하여 $\log_2 2.0$ 정도 낮은 수치를 나타내었다. 백신 비접종 대조군에서는 1-4주에 항체가 인정되지 않았고 공격시험에서 침울, 호흡곤란, 설사 등의 소견을 보인 후 전 예가 폐사하였다. 또한 전 실

험기간 동안 임상적으로 lectin에 기인하는 이상 증상은 관찰되지 않았다.

이와 같이 lectin 혼합 HN 단백질 (200 ng) 백신에 의하여 항체의 형성 및 유지, 강병원성 바이러스의 공격에 대한 방어 등의 면역반응이 나타났다. 따라서 Al(OH)₃에 비하여 약간 낮지만 lectin의 유전자 재조합 유래 항원단백질 백신의 면역원성 증강 효과가 인정되었다.

한편 lectin에 혼합한 HN 항원단백질의 양을 병아리 1수 당 300 ng으로 높여서 접종하였을 때, 1, 2, 3, 4 주에 log₂2.6, log₂4.6, log₂5.8, log₂5.2의 수준으로 항체가 형성되었다. 또한 공격시험에서 방어되었으며 5, 6 주에 log₂7.6, log₂8.0의 수준의 항체를 나타내어 Al(OH)₃ 혼합시와 거의 동일한 항체 형성상태를 보였다 (Fig. 7). 따라서 유전자 재조합 유래 항원단백질의 백신내 함량을 일정 수준으로 높일 경우, lectin에 의한 면역증강 효과가 Al(OH)₃에서와 상응하는 수준임을 알 수 있었다.

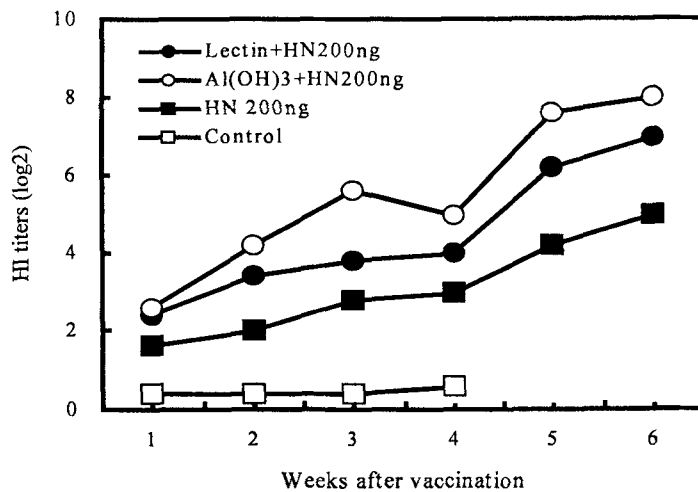


Fig. 6. Comparison of HI antibody titers in chicks immunized with vaccines of HN protein in different adjuvants.

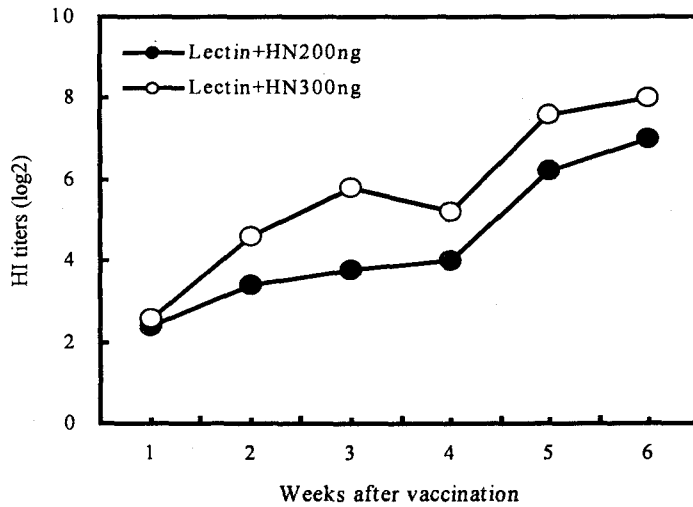


Fig. 7. Comparison of HI antibody titers in chicks immunized with lectin-adjuvanted vaccines of HN protein in different concentration.

Table 1. Resistance of vaccinated chicks to challenge of virulent Newcastle disease virus^a

| Vaccines | No. of Chicks Diseased ^b /Tested | No. of Chicks Died/Tested |
|---|---|---------------------------|
| Lectin-adjuvanted HN (200 ng) | 0/10 | 0/10 |
| Lectin-adjuvanted HN (300 ng) | 0/10 | 0/10 |
| Al(OH) ₃ -adjuvanted HN (200 ng) | 0/10 | 0/10 |
| HN (200 ng) | 8/10 | 0/10 |
| Control | 10 ^c /10 | 10/10 |

^aThe 100 μ l (10^5 EID₅₀/ml) of Kyojeongwon strain were infected into nasal cavity at 4 weeks after vaccination.

^bSigns consisted of depression and labored breathing.

^cSigns consisted of depression, dyspnea and diarrhea.

마. Lectin 혼합 백신에 의하여 형성된 항체의 항원과의 반응성

Lectin을 혼합한 HN 단백질 백신의 접종에 의하여 형성되는 항체의 뉴캐슬병 바이러스 특정 항원에 대한 반응성을 $Al(OH)_3$ 혼합 백신에서의 성적과 비교 조사하였다. 이를 위하여 SPF 발육란의 장노막강에서 증식시켜 얻은 교정원주 액을 40,000 rpm에서 16시간 초원심 분리한 후 바이러스 침전물을 원래 바이러스 액의 1/100 양의 TNE buffer (10 mM tris, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 용해하여 농축하였다. 이 바이러스액의 일정량을 SDS-PAGE용 sample buffer에 1:2 되게 혼합한 후 12% acrylamide gel에서 전기영동하여 바이러스 항원 펩타이드를 전개시켰다. 이어서 nitrocellulose membrane에 western blotting 시켰으며, 백신 접종 후 각 주별로 채취된 혈청과의 enzyme immunoassay를 실시하고 최종적으로 4-chloro-1-naphthol로 발색시켜 관찰하였다.

그 결과 Lectin을 혼합 HN 단백질 백신의 접종 후 2주째부터 혈청에서 뉴캐슬병 바이러스의 HN 항원에 대한 중화 항체가 확인되었으며, 6주간 경시적으로 볼 때 항체의 반응성이 점진적으로 강하게 나타나는 경향이였다. 하지만 $Al(OH)_3$ 혼합 HN 단백질 백신 접종시에 1주째부터 항체가 검출되었고 6주까지 반응성도 다소 강한 것으로 나타났다 (Fig. 8).

이와 같은 결과로 볼 때 lectin 혼합 HN 단백질 백신 접종시에 HN 항원에 대한 항체의 출현 시기가 늦고 반응성이 다소 낮은 편이었지만 형성된 항체의 바이러스에 대한 중화능력이 인정되었다.

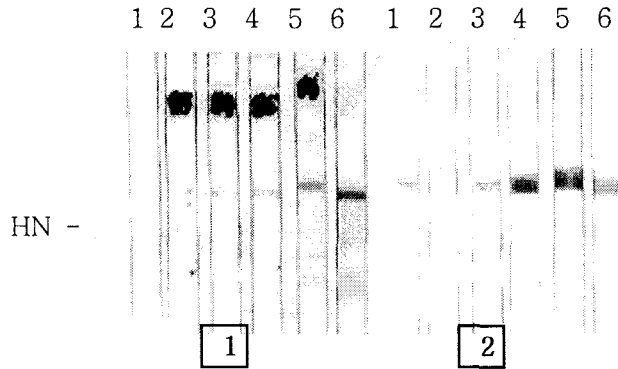


Fig 8. Appearance of antibodies to NDV HN antigen after vaccination with HN protein vaccine: 1-6, weeks after vaccination; A, lectin-adjuvanted vaccine; B, Al(OH)₃-adjuvanted vaccine.

바. 결론

뉴캐슬병 바이러스의 HN 유전자 재조합 DNA clone의 발현단백질을 면역원으로 하여, HN 단백질 백신에 대한 lectin의 면역증강 효과를 Al(OH)₃에 의한 것과 비교 조사하기 위하여 이들 백신을 부화 1주령의 병아리에게 접종한 후 항체의 형성수준 및 지속기간, 강병원성 바이러스 공격에 대한 방어능력 등을 조사하였던 결론은 다음과 같다.

1) Lectin (200 ng/chick) 혼합 HN 단백질 (200 ng/chick) 백신을 접종한 후 1, 2, 3, 4 주에 항체는 각각 $\log_2 2.4$, $\log_2 3.4$, $\log_2 3.8$ 및 $\log_2 4.0$ 의 수준으로 형성되었으며, 교정원주로 공격하였을 때 임상적 이상 증상 및 폐사 예는 없었고 공격 접종 후 1주일이 경과된 제 5주에 항체가 $\log_2 6.2$ 수준으로 상승하였고 6주에는 $\log_2 7.0$ 에 도달하였다.

2) HN 단백질 (200 ng) 단독 백신의 접종 후 1, 2, 3, 4 주에 각각 $\log_2 1.6$, $\log_2 2.0$, $\log_2 2.8$, $\log_2 3.0$ 의 수준으로 항체가 형성되어 각 주별로 lectin (200 ng)을

혼합하였을 때 보다 약 $\log_2 1.0$ 정도로 항체가 낮았으며, 공격시험에 서 2-3일 동안 침울, 경증의 호흡장애 등의 소견을 나타내었다.

3) Al(OH)_3 혼합 HN 단백질 (200 ng/chick) 백신의 접종시에는 1, 2, 3, 4 주에 항체는 각각 $\log_2 2.6$, $\log_2 4.2$, $\log_2 5.6$, $\log_2 5.0$ 로서 lectin에 의한 항체가보다 약 간 높았으며, 공격시험 후 5, 6 주에 각각 $\log_2 7.4$, $\log_2 7.6$ 을 나타내었다.

이와 같이 lectin 혼합 HN 단백질 백신 접종으로 형성된 항체에 의하여, 강병원성 바이러스의 감염이 방어됨은 물론 공격 바이러스에 의한 booster 효과를 나타내어 항체가 상승하였다. 따라서 lectin의 HN 발현단백질 에 대한 면역증강 효과가 인정되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구 목표 및 달성도

1. 1차년도

| 연구목표 | 내용 | 달성도 (%) | |
|----------------------------------|---|--|-----|
| 면역증강제 조성물의 제조와 특성의 조사 | 겨우살이 추출물의 제조 | 100 | |
| | Lectin 분획의 분리 및 대량생산 | 100 | |
| | Toxin 분획의 분리 | 95 | |
| | 기타 활성분획의 분리 | 100 | |
| | 열매 분획의 함량 결정 | 100 | |
| 조성물 표준화 및 정량을 위한 기초연구 | Lectin에 대한 mAb의 생산 | 100 | |
| | Toxin에 대한 poly 항체 생산 | 100 | |
| | 기타 활성 분획에 대한 poly 항체의 생산 | 100 | |
| 추출물 및 구성 신규물질의 면역자극 활성조사 | In vitro에서 면역담당세포에 미치는 활성 (정상세포 및 mitogenic effect) | 100 | |
| | Macrophage 활성화 조사 | 100 | |
| | 항원 비특이적 방어효과조사 | 100 | |
| 겨우살이 추출물에 의한 닭 전염병 예방백신의 특이면역 증강 | 닭에 대한 lectin의 일반독성 분석 | 100 | |
| | 뉴캐슬병 예방백신의 특이면역 증강효과조사 | 뉴캐슬병 바이러스의 배양 및 정제 | 100 |
| | | Lectin혼합 불활화 바이러스 백신 생산 병아리 면역시의 항체 형성수준 및 | 100 |
| | 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강효과조사 | 지속 기간 조사 | 100 |
| | | 항체의 바이러스 중화능력 조사 | 100 |
| | 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강효과조사 | 강독주 공격에 대한 방어능력 | 100 |
| | | 전염성 기관지염 바이러스 배양 및 정제 | 100 |
| | 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강효과조사 | Lectin혼합 불활화 바이러스 백신 생산 | 100 |
| | | 병아리 면역시의 항체 형성 수준 및 지 | 100 |
| | 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강효과조사 | 속기간 조사 | 100 |
| 항체의 바이러스 중화능력조사 | | 100 | |
| 전염성기관지염 예방백신의 특이면역 증강효과조사 | 강독주 공격에 대한 방어능력 | 100 | |

2. 2차년도

| 연구목표 | 내용 | | 달성도 (%) |
|--|------------------------|--------------------------------------|---------|
| 지표물질 분석법 및 표준화 | 지표물질의 정량법개발 | Lectin assay를 위한 sandwich | 100 |
| | | ELISA Toxin assay를 위한 competition | 100 |
| | | ELISA 기타 활성분획을 위한 면역 분석법 | 100 |
| | Adjuvant의 표준화 | Lectin의 함량 결정 | 100 |
| | | 기타 활성분획의 함량 결정 | 100 |
| | | Toxin의 허용량 조사 | 100 |
| 안전성 실험 - 일반약리 - 예비독성 | 급성독성 | | 100 |
| | 일반행동에 대한 영향 | | 100 |
| | 중추신경계에 미치는 영향 | | 100 |
| | 소화기계에 미치는 영향 | | 100 |
| 면역증강 활성의 조사 1) Lectin에 의한 활성조사 2) 표준화된 시료에 의한 활성조사 | 체액성 면역 기능 조사 | 항원의 면역과 혈청의 수집 | 100 |
| | | 항체의 역가 및 subisotype결정 | 100 |
| | 세포성 면역 기능 조사 | Lymphocyte 자극 실험 | 100 |
| | | Cytokine의 유도분비 조사 | 100 |
| | 지연성 과민반응의 측정 | | 100 |
| | 세포독성 T-cell의 활성 측정 | | 100 |
| 항원 특이적인 방어효과 조사 | | 100 | |
| 겨우살이 추출물에 의한 돼지 오제스키병 예방백신의 특이면역 증강 | 돼지에 대한 lectin의 일반독성 분석 | | 100 |
| | 오제스키병 | 오제스키병 바이러스 배양 및 정제 | 100 |
| | 예방백신의 특이면역 | Lectin 혼합 불활화 바이러스 백신 생산 | 100 |
| | | 자돈 면역시의 항체 형성상태 조사 | 100 |
| | 증강효과 조사 | 항체의 바이러스 중화능력 조사 | 100 |
| | | 자돈 면역시의 세포성 면역 상태 조사 | 100 |
| 강병원성주 공격에 대한 방어능력 | | 100 | |

3. 3차년도

| 연구목표 | 내용 | | 달성도 (%) | |
|----------------------------------|--|---|--|-------------------------|
| 혼합면역증강제 개발 및 채취시기, 숙주별 활성물질 함량조사 | 시료의 표준화를 위한 test | 채취시기별 KML-C의 함량조사 숙주별 KML-C의 함량조사 | 100 100 | |
| | KM-110과 KML-C가 함유된 혼합 adjuvant 의 개발 및 활성 | Alum에 혼합한 형태로서의 체액성 면역증강 활성조사 Oil (squalene)에 혼합된 형태로서의 체액성 면역증강 활성조사 | 100 100 | |
| | 임상적의미를 갖는 항원들에 대한 특이적 면역증강능 조사 | Diphtheria toxin에 대한 역가 조사 Influenza hemagglutinin에 대한 항체역가 조사 Hepatitis 항원에 대한 역가 조사 | 100 100 100 | |
| | 시료의 안정성 시험 : 실질장기 조직 검사 | 겨우살이내 toxin분획에 대한 정량조건 확립 : HPLC | 100 85 | |
| | 경구투여용 vaccine adjuvant의 가능성조사 | KM-110과 KML-C의 경구독성조사 | KM-110의 mice에서의 급성 및 아급성 독성 KML-C의 mice에서의 급성 및 아급성 독성 | 100 100 |
| | | KM-110의 경구백신용 adjuvant로서의 가능성조사 | Serum과 장내의 항원특이항체 역가 증강효과 조사 항원 특이항체의 isotype조사 항원 특이항체의 subclass조사 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine 유도능조사 | 100 100 100 80 |
| | | KML-C의 경구백신용 adjuvant로서의 가능성조사 | Serum과 장내의 항원특이항체 역가 증강효과 조사 항원 특이항체의 isotype 조사 항원 특이항체의 subclass조사 경구투여후 비장세포의 증식과 cytokine 유도능조사 | 100 100 100 80 |

| 연구목표 | 내용 | | 달성도 (%) |
|--|-------------------------------|-------------------------|---------|
| 겨우살이추출물에 의한 닭 뉴캐슬병 바이러스 유전자 발현 단백질백신의 특이면역 증강 효과조사 | HN 유전자 발현단백질 백신의 특이면역 증강효과 조사 | HN 유전자 재조합 DNA clone 배양 | 100 |
| | | HN 유전자 발현단백질 획득 | 100 |
| | | Lectin 혼합 발현 단백질 백신 생산 | 100 |
| | | 병아리 면역시의 항체 형성수준 | 100 |
| | | 및 지속기간 조사 | |
| | | 항체의 바이러스 중화능력 조사 | 100 |
| 강독주 공격에 대한 방어능력 조사 | 100 | | |

제 2 절 관련분야 기술 발전에의 기여도

1. 겨우살이에 관한 기초연구 분야

○ 현재 국내에서는 겨우살이에 관한 연구가 극히 제한되어 있다. 서울여자대학교의 박원봉 교수팀과 원광대학교 정헌택 교수팀이 있으나 본 연구팀과는 연구분야가 다르다.

○ 본 연구결과중 계절에 따른 lectin 함량변화와 잎, 줄기 잎사귀등 부위에 따른 함량변화에 관한 조사는 처음으로 이루어져 관련 분야에 많은 참고가 될 것이다.

○ Lectin성분인 KML-C는 한국산 겨우살이에만 함유되어 있는 새로운 물질이며 이들이 단일 성분으로서 체액성 및 세포성 면역을 갖는다는 사실을 처음으로 실험적으로 증명한 것은 매우 의미 있는 일이며 관련분야에 미치는 영향력이 크다.

○ 점막면역을 증진시키는 효과가 있는 소위 mucosal adjuvant활성을 갖는 물질은 극히 제한 되어 있다. 가장 잘 알려진 물질은 cholera toxin이지만 부작용이 심해 널리 사용되지 못하고 있다. 지금까지 겨우살이 lectin이 점막면역을 자극하는 효과가 있음은 외국에서 이미 알려져 있지만 한국산 겨우살이의 주성분인 lectin의 하나 즉 KML-C가 점막면역자극 효과가 있음을 실험적으로 증명한 것은 본 연구가 처음이다 따라서 면역학 분야에서도 새로운 연구분야인 점막면역분야에도 획기적인 전환점이 될 것으로 기대된다.

2. 기술에의 기여도

- 면역적인 활성을 갖는 추출물을 제조할 수 있는 추출과정을 확립함.
- 면역적인 활성을 측정할 수 있는 각종 기술 확립함.
- 한국산 lectin성분에 관한 단일클론 항체생산과 이를 이용한 정량법 ELISA법을 확립하여 관련 회사에 공급할 수 있게 되었음.
- 점막면역 자극 효과 조사를 위한 면역학적인 기법
- 겨우살이 성분을 이용한 가축 백신에의 활용을 위한 적용 : 적정량 및 독성 자료 그리고 일반 약리자료의 활용

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 추가연구의 필요성

본 연구과제의 수행에 있어서 가장 큰 애로 사항은 동물실험을 위한 동물 확보와 관리의 난점이었다. 면역학적인 효과를 증명하는 연구는 어느 정도 확보할 수 있었다고 평가되지만 산업화를 위한 안전상 시험은 전문기관에게 위탁을 해야 하는 애로가 있어서 충분한 연구를 할 수가 없었다. 새로운 물질을 확보한다는 것이 매우 어렵다는 사실은 누구나 아는 사실이다. 한국산 겨우살이에서 신물질을 찾아냈다는 것만으로도 연구의 의의는 크다고 본다. 따라서 계속 지원된다면 기초연구를 보다 심층적으로 수행할 계획이다. 특히 점막면역 자극을 위한 adjuvant로서의 활용에 관한 연구는 세계적으로도 경쟁력이 있는 연구가 될 것으로 믿는 바 추가연구가 지속되기를 간절히 소망한다.

제 2 절. 타 연구에의 응용

1. 겨우살이를 이용한 타 산업분야에의 응용에 관한 분야를 요약하면 :

가. 건강보조 식품분야 2002년 8월에 식약청으로부터 건강보조식품원료로 사용할 수 있다는 식품원료허가를 취득하게 되어 현재 (주)한국야쿠르트, (주)더멋진바이오, (주)엔바이오텍, 건일제약주식회사등에서 겨우살이를 이용한 건강보조식품을 개발 시판을 하고 있고 또한 계획중에 있다. 따라서 겨우살이에 관한 활용이 더욱 확대될 전망이다. 이럴 경우 본 연구의 결과가 여러 분야에 좋은 근거자료로 활용될 것으로 믿는다.

나. 항암제로서의 활용 겨우살이를 이용한 항암제가 현재 독일로부터 수입을 해서 사용되고 있다. 본 연구진은 현재 중국 하르빈 의과대학과 공동으로 겨우살이를 이용한 새로운 항암제를 개발하기 위한 합작회사를 설립코자 금년 중에 계약을 체결할

예정이다.

다. 가축 및 양어 사료용 첨가제로서의 활용 2004년도 중으로 활용할 수 있을 것으로 예상된다.

라. 에이즈 치료용으로서의 활용 겨우살이가 에이즈 환자들에게 사용된 예는 이미 보고된 바가 있다. 그러나 한국산 겨우살이를 이용한 사례는 없을 뿐만 아니라 한국산이 더욱 효과적일 수 있는 근거가 있어 향후 한국산 겨우살이를 이용한 에이즈 환자를 위한 치료제 및 건강보조 식품까지 개발하여 상품화 할 계획이다.

제 3 절. 기업화 추진 방향

겨우살이의 가장 큰 장점은 응용범위가 매우 넓다는 점이다. 본 연구의 결과를 활용할 수 있는 분야는 :

1. 동물백신용 adjuvant 최소한 닭에 사용되는 각종 백신에는 2003년내에 사업화를 할 수 있을 것으로 전망된다.
2. 단순 면역증강제로서 활용
3. 실험실에서 사용되는 항체생산을 위한 adjuvant로서의 활용
4. 경구백신 개발을 위한 활용 - 동물뿐만 아니라 사람에게도 사용할 수 있는 경구백신용 adjuvant로서 활용할 수 있다. 획기적인 사업이 될 수 있을 것으로 전망된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

겨우살이와 관련된 기술과 본 연구과제의 주 활용분야인 면역증강효과 또는 백신용 adjuvant, 그리고 점막면역증강효과를 갖는 물질등에 관한 정보를 중심으로 수집한 정보중 핵심적인 참고로 할 만한 것들을 요약정리하면 ;

제 1 절 겨우살이 주성분 lectin의 대량생산에 관한 정보

○ 독일의 회사 Biosyn의 회사 소개 자료 : 유럽산 겨우살이에 존재하는 lectin성분을 유전자재조합법에 의하여 대량 생산하여 이를 임상에 적용하고자 현재 임상시험중에 있다는 내용임.

○ 평가 : 유럽산은 한국산과는 탄수화물 특이성이 전혀 다르므로 오히려 우리측으로 볼 때는 매우 고무적인 현상임. 현재 본 연구실에서도 한국산 겨우살이로부터 lectin 유전자를 cloning하여 유전자재조합법으로 대량생산에 관한 연구를 수행하고 있는 바, 본 연구의 의의를 더욱 제고 시켜주는 정보라 평가됨.

제 2 절 겨우살이 lectin의 점막면역자극효과에 관한 정보

1. Mucosal immunogenesis of plant lectins in mice, 2000, Lavelle et al, Immunology 99: 30-37

○ 점막을 자극시킬 수 있는 adjuvant의 개발은 기초과학적인 측면은 물론 산업적인 차원에서 매우 중요한 의미를 지니고 있다. 따라서 새로운 물질을 찾을 경우 그 효과는 매우 크다.

○ 겨우살이 lectin을 포함한 많은 식물 lectin들의 점막면역원성(mucosal immunogenicity)을 조사하였다.

○ 항원주입시 경로를 달리하였을 시, 즉 경구와 경비로 각 항원(각종 lectin과 ovalbumin)을주입하여 혈청을 비롯 침, 질세척액, 경비세척물, 장세척물내에서의 항

체의 역가를 비교한 연구임.

○ 콜레라독신(CT)과 겨우살이 lectin(MT)이 다른 것들에 비해 systemic과 점막항체 역가면에서 가장 높은 면역원성을 보였다.

○ 결론 : 겨우살이 lectin이 점막면역을 자극시킬 수 있는 가능성을 제시한 최초의 연구결과임.

2. The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity, 2001, Lavelle et al, Immunology 102: 77-86

○ Ovalbumin을 항원으로 하고 지금까지 가장 강한 mucosal adjuvant로 알려진 cholera toxin(CT)과 유럽산 겨우살이 lectin(MT)을 adjuvant로 사용하여 항체의 역가를 비교하였다.

○ MT와 CT 모두 비슷한 결과를 나타내었다. MT도 CT와 같이 점막면역자극을 위한 adjuvant로 직접 사용할 수 있다는 첫번째 보고서라는 점에서 그 의의가 매우 크다.

○ 그러나 아직 한국산 겨우살이의 lectin에 대한 활성에 대해서는 보고된 사례가 없기 때문에 본 과제의 연구 결과는 상당한 의의가 있다고 판단됨.

3. 기타 : 일반적인 adjuvant로 겨우살이가 사용된 경우는 본 연구실외에는 거의 없다. 대부분 항암효과에 집중되어 있고, 면역증진효과에 대한 응용면에선 국외보고 사례는 거의 전무함.

제 3 절 Adjuvant에 관한 정보

1. Su wang, Xu Liu, Karen Fisher, Jeffrey G. Smith, Fei Chen, Timothy W. Tobery, Jeffrey B.Ulmer, Robert K. Evans, Michael J. Caulfield., Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminum phosphate., Vaccine 18 (2000), 1227~1235.

2. D.T. O'Hagan , M.. Ugozzoli, J. Barackman, M. Singh, J. Kazzaz, K. Higgins, T. C. Vancott, G. Ott., Microparticles in MF59, a potent adjuvant combination for a recombinant protein vaccine against HIV-1., *Vaccine* 18 (2000), 1793~1801.
3. F. Ambrosch, G. Wiedermann, M. Kundi, G. Leroux-Roels, I. Desombere, N. Garcon, C. Thiriart, M. Slaoui, S. Thoelen., A hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system., *Vaccine* 18 (2000), 2095~2101.
4. Margaretha Johansson, Katarina Ranlund, Karin Lovgren-Bengtsson., Impaired immunogenicity of immunostimulating in slow-release formulations., *Microbes and infection* 2(2000), 1003~1010.
5. N. Venkatesan, S.P. Vyas., Polysaccharide coated liposomes for oral immunization development and characterization., *International Journal of Phamaceutics* 203 (2000), 169~177.
6. Ya-Wun Yang, Nadeen A. Dheikh, W.J.W. Morrow., The ultrastructure of tomatine adjuvant., *Biomaterias* 23 (2002), 4677~4686.
7. X.P. Ioannou, S.M. Gomis, B Karvonen, R. Hecker, L.A. Babiuk, S. van Drunen Little-van den Hurk., CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune response to herpesvirus glycoprotein., *Vaccine* 21 (2000), 127~137.
8. Douglas C. Waite, Eric W. Jacobson, Francis A. Ennis, Robert Edelman, Bernadette White, Robert Kammer, Christine Anderson, Charlotte R. Kensil.,

Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21., *Vaccine* 19 (2001), 3957~3967.

9. Peter G. Saferian, Mitzi L. Martinez., Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations., *Vaccine* 19 (2001), 661~668.

10. Palasingam Rajanathanan, George S. Attard, Nadeem A. Sheikh., Novel aggregate structure adjuvants modulate lymphocyte proliferation and Th1 and Th2 cytokine profiles in ovalbumin immunized mice., *Vaccine* 18 (2000), 140~152

제 7 장 참고문헌

- 1) Bocci V.(1993) Mistletoe (*viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. *J Biol Regul Homeost Agents*. 7:1-6.
- 2) Grant G, Puzstai A, Pfuller U, O'Hagan DT. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. *Immunology*. 2000 99(1):30-7.
- 3) Stein GM, Berg PA. Modulation of cellular and humoral immune responses during exposure of healthy individuals to an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res*. 1998 3(6):307-14.
- 4) Stein G, Henn W, von Laue H, Berg P. Modulation of the cellular and humoral immune responses of tumor patients by mistletoe therapy. *Eur J Med Res*. 1998, 3(4):194-202.
- 5) Beuth J. Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I. *Anticancer Drugs*. 1997 Suppl 1:S53-5. Review.
- 6) Stein GM, Berg PA. Characterisation of immunological reactivity of patients with adverse effects during therapy with an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res*. 1999, 4(5):169-77.
- 7) Stein GM, Schietzel M, Bussing A. Mistletoe in immunology and the clinic (short review). *Anticancer Res*. 1998, 18(5A):3247-9.
- 8) Moenning V, Woldensenbet P, Freg HR et al. 1982. Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease in

swine. *Vet Rec* 130:264.

- 9) Schoenbaum NA, Beran GW, Murphy DP. 1990. A study comparing the immunologic response of swine to pseudorabies viral antigens based on the ELISA, serum neutralization and latex agglutination tests. *J Vet Diagn Invest* 2:29-34.
- 10) 유경자. 1987. Immunoassay and blotting. *Korean J. of immunology*. 9(1):121-31
- 11) Sun JB, Rana C., Olsson T et al. 1996. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *PNAS* 93:7196-201
- 12) Krocova Z, Macela A, Kroca M, Herychova L. 2000. The immunomodulatory effects of lead and calcium on the cells of immune system *in vitro*. 14:33-40
- 13) Rautenschlein S, Miller RL, Sharma JM, 1998. Interferon induction in turkeys by oral administration of the imidazoquinolinamine S-28828 and modulation of the pathogenesis of *Escherichia coli*. *Vet. Immune and Immunopathology*. 66:127-41
- 14) Lina JE, Sampaio ALF, Henriques M.O, Christina BF. 1999. Lymphocyte activation and cytokine production by *Pisum sativum agglutinin* (PSA) *in vivo* and *in vitro*. *Immunopharmacology*. 41:147-55
- 15) Sun JB, Holmgren J, Czerkinsky C, 1994. Cholera toxin b subunit: An efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *PNAS*. 91:10795-799
- 16) Bergerot I, Ploix C, Petersen J et al. 1997. A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. *PNAS*. 94:4610-14
- 17) Weiner HL, 1997. Oral tolerance : immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. 18(7):335-343

- 18) Eckmann L, Fierer J, Kagnoff MF, 1996. Genetically resistant (Ity^r) and susceptible (Ity^s) congenic mouse strains show similar cytokine responses following infection with *Salmonella dublin*. 14(8):1315-20
- 19) Bennett B, Irene J et al. 1992 A comparison of commercially available adjuvants for use in research. J. Immunological methods. 31-40
- 20) Revy P, Hivorz C et al. 1999. Activation of the janus kinase 3-STAT5 a pathway after CD40 triggering of human monocytes but not of resting B cells. J. Immunol. 163:787-93
- 21) Bloksma N, Schmiermann P, Reuver M et al. 1992. Stimulation of humoral and cellular immunity by viscum preparations. J. medical plant research. 40(4):21982-8
- 22) WongCK, Leung KN et al. 1992 Mitogenic and tumor necrosis factor producing activities of *Pseudostellaria heterophylla*. 14(8):1315-20
- 23) Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ, 1990. Increased secretion of tumor necrosis factor α , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to b-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. 49:3322-26
- 24) Hajto T. 1986. Immunomodulatory effects of Iscador: A *Viscum album* Preparation. 43: suppl 1. 55-65
- 25) Razvan R. Edward MD, Robert H. 1981. Biologic properties of Iscador: A *Viscum album* Preparation. 44(1):43-7
- 26) Gayon G. Jung ML, Baudino G, Beck JP, 1986. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells. 42:594-9
- 27) Kjaer M, 1989. Mistletoe (IsCADOR) therapy in stage IV renal adenocarcinoma. 28:489-94
- 28) Holtskog R, Sandvig K, Olsens S, 1988. Characterization of a toxic lectin in

Iscador a mistletoe preparation with alleged cancerostatic properites. 35:172-9

29) Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ, 1989. Modulatory potency of the b-Galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vivo* in rabbits and patients. 49:4803-8

30) Bloksma N, Dijk HV, Korst P, Willers JM, 1979. Cellular and humoral adjuvant activity of a mistletoe extract. 156:209-19

31) Catharina BM, Holten-Neelen CV, Balk F, Bak-Glashouwer JH et al. 2000. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. 18:2613-23.

32) Khwaja T, Varven J, Pande H et al. 1980. Isolation of biologically active alkaloids from korean mistletoe *Viscum album, coloratum*. 36:71-2