

봉독의 항독소(IgY)생산을 위한 실험적 연구 An Experimental Study on Production of Egg Yolk Antibody(IgY) against Bee Venom

황 태 준 · 이 승 배 · 권 기 록

상지대학교 한의과대학 침구학 교실
상지대학교 생명자원과학대학 생명공학 교실

ABSTRACT

This study was carried out for production of neutral antibody to bee venom(anti-phospholipase A₂ IgY). Hen layings were injected repeatedly with bee venom and phospholipase A₂ with Freund's adjuvant.

Specific antibody in egg yolk from immunized hen laying was separated, and purified, also immunological characteristics of anti-phospholipase A₂ IgY was investigated. The results were summarized as follows :

1. Phospholipase A₂ was showed single band at molecular weight 17,000 in SDS-PAGE and bee venom was showed two band at molecular weight 17,000 and under molecular weight 6,500 in SDS-PAGE.
2. During 70 days after hen immunized with bee venom and phospholipase A₂, antibodies(anti-bee venom IgY) to bee venom were showed poor ELISA value in egg yolk, but antibodies(anti-Phospholipase A₂ IgY) to phospholipase A₂ in egg yolk were increased ELISA value from 8 days or 15 days and found maximum ELISA value at 42 days. Also after booster at 49 days, ELISA value of anti-Phospholipase A₂ IgY in egg yolk was supported at optical density(O.D) 1.0 level, continuously.
3. Titer of phospholipase A₂ IgY was showed 1: 32,000.
4. In double immunodiffusion test to phospholipase A₂ after double dilution of anti-phospholipase A₂ IgY, only precipitation line was made in 1:1 dilution well of anti-Phospholipase A₂IgY. But In immunodiffusion test to anti-phospholipase A₂ IgY after double dilution of phospholipase A₂, Precipitation line to 250ul/ml well of phospholipase A₂ was showed.
In double immunodiffusion test to bee venom(1mg/ml) after double dilution anti-phospholipase A₂ IgY, all well without 1:32 dilution well were showed strong precipitation line.
5. In dot blotting test to anti-phospholipase A₂ IgY after diluting bee venom(0.5mg/ml), dot blotting color was showed clearly to 1/100(5 µg/ml) in bee venom.

Key words : Egg Yolk Antibody(IgY) against Bee Venom, Ig Y, Anti body of Bee venom, Korean Bee Venom Therapy

1. 緒 論

봉약침요법이란 살아있는 꿀벌(*Apis mellifera*)의 독낭에 들어있는 독을 인위적으로 추출·가공하여 질병과 관련한 부위 및 경혈에 주입함으로써 자침의 효과와 벌의 독이 지니고 있는 생화학적 약리 작용을 질병의 치료에 이용하는 신침요법이다.¹⁾ 봉약침요법은 약침요법과 더불어 인체의 경혈에 물리적인 자극뿐만 아니라

화학적 자극을 가한 치료법으로 통증, 염증성 질환이나 류마티스 관절염과 같은 자가면역계 질환에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.^{2,3,4)} 또한 자연계에 존재하는 동물성 독을 경혈에 주입하여 질병을 치료하는 한의학적인 방법으로, 독을 이용한 치료세계의 가능성을 보여주고 있다고 할 수 있다.

하지만 치료의 과정에서 발생하는 다양한 형태의 Allergy 반응은 시술자나 환자에게 있어서 부담으로 작

용하며 특히 봉독에 대한 과민성을 지닌 경우에 발생 하는 전신즉시형 반응인 anaphylactic shock은 봉약침 시 술에서 가장 큰 장애가 되고 있다.⁶⁾

이러한 Allergy 반응에 가장 중요한 Allergen은 봉독의 대표적인 효소인 phospholipase A₂이다.

Phospholipase A₂는 효소성분의 대부분을 차지하는 물질로, 봉독에 민감한 사람들의 90% 정도에서 이에 대한 IgE 항체가 발견된다.

따라서 phospholipase A₂의 중화항체를 생산하여 임상 적인 치료과정에서 발생할 수 있는 anaphylactic shock과 다른 allergy 반응을 원천적으로 예방할 수 있는 항체요 법의 개발은 봉약침요법의 대중화와 발전을 위해 매우 필요한 과제라 할 수 있다.

일반적으로 특이성 항체를 생산하기 위해서는 쥐, 염 소, 토끼, 양, 말 등과 같은 포유동물에 과면역 시켜서 얻은 혈청에서 주로 분리하여 사용하지만 Polson과 Wechmar(1980)가 처음 산란계를 이용하여 계란에서 항 체를 생산 분리 하는 방법을 사용한 이 후⁷⁾ 최근 산란 계를 이용하여 계란의 난황으로부터 Immunoglobulin Y(IgY)를 사용하는 연구가 많이 사용되고 있다.⁸⁾

산란계의 경우 면역된 혈액으로부터 난황으로 많은 양의 항체가 활발히 이행되는 것으로 알려져 있다.

산란계에 항원을 과면역시키면 계란의 난황에서 항 원의 특이 항체인 ImmunoglobulinY(IgY)를 얻을 수 있 고, 계란 1개에 들어 있는 IgY의 양은 약 90-100mg 정 도로, 난황에 존재하는 항체는 매우 우수한 polyclonal 항체로 알려져 있다.⁹⁾

산란계에 항원을 면역 주사하여 계란의 난황에서 IgY 항체를 생산하는 연구를 살펴보면 세균항원으로는 Escherichia coli,⁹⁾ Edwardsiella tarda,¹⁰⁾ 바이러스 항원으 로는 rotavirus,¹¹⁾ 호르몬 항원으로는 Prostaglandin,¹²⁾ 효 소항원으로 RNA polymerase,¹³⁾ 단백질 항원으로 lactoferrin,¹⁴⁾과 β-lactoglobulin 등¹⁵⁾이 있으나 봉독 항원을 이용한 연구는 없는 실정이다

따라서 본 연구에서는 순수 봉독 분말과 봉독에 존재 하는 allergen인 phospholipase A₂를 산란계에 주사하고 계란으로부터 특이 항체인 anti-bee venom IgY 및 anti-phospholipase A₂ IgY를 생산한 후, IgY 항체를 분리 및 정제하여 이 항체의 면역학적 특성을 조사해 본 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 시료

면역원으로 이용한 phospholipase A₂(이하 PLA₂)는 Sigma, chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였고, bee venom은 꿀벌(Apis mellifera)의 독낭에 들어있는 독을 봉독채취기(Bee Venom Collector, Odicine, Korea)로 추출 한 후 무균실에서 0.2μm membrane filt로 여과하고 동결 건조하여 얻어진 순수 봉독 분말을 적정 비율로 생리 식염수에 희석하여 사용하였다.

2. 산란계의 면역

25주령된 Hy-Line Brown 산란계를 이용하여 PLA₂ 200 μg을 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 녹인 후 complete Freund's adjuvant와 섞어 닭의 가슴 근육에 면 역 주사하였다. 추가면역은 incomplete Freund's adjuvant 와 섞은 후 Fig. 2와 같이 14일, 28일 및 49일에 주사하 고, 계란은 매일 수집하여 4°C에 보관하여 사용하였다.

3. IgY 항체의 분리방법

계란으로부터 anti-PLA₂ IgY는 Akita와 Nakai¹⁶⁾(1992) 의 방법에 따라 lipoprotein을 침전시킨 후 수용성 분획 으로부터 분리하였다.

4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

난황항체의 활성은 Mine(1997)¹⁷⁾가 사용한 ELISA 방 법을 약간 변형하여 측정하였다.

1μg/ml의 농도로 희석한 후 96 well polystyrene plate(Nunc, Denmark)에 well당 100μl씩 coating하여 4°C 에서 하룻밤 흡착시켰다. PBS-T(0.05% Tween 20 in PBS) 로 세 번 세척한 다음 항원이 흡착되지 않은 부위를 차 단하기 위해서 2% bovine serum albumin(BSA: Sigma, USA)이 포함된 PBS-T를 150μl씩 넣고 37°C에서 2시간 반응하면서 blocking시키고 상기와 같은 방법으로 세 척하였다. 적절히 희석한 난황항체를 100μl씩 넣고 37 °C에서 1시간 반응시킨 후 다시 PBS-T로 5회 세척하 였다.

Alkaline phosphatase(AP: Sigma, USA)가 결합된 이차

항체인 rabbit anti-chicken IgG(Sigma, USA)용액을 넣고 37°C에서 1시간 반응시키고 다시 5회 세척하였다.

AP효소의 기질인 p-nitrophenyl phosphate 용액을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 3N NaOH를 50 μ 씩 사용하여 반응을 정지시킨 다음 405nm의 파장에서 ELISA reader(BIO-RAD, Model 550, USA)로 각 well의 흡광도를 측정하여 ELISA value로 나타내었다.

5. Immunodiffusion 방법

Double immunodiffusion은 Ouchterlony 와 Nilsson¹⁸⁾ (1973)의 방법을 약간 변형하여 PBS에 1% Agar(Difco, USA)와 2% polyethylene glycol(PEG: Sigma, USA) 6000을 첨가하여 gel을 형성시키고 직경 1.5~3mm의 구멍을 뚫어 각각 중심원에 PLA₂, anti-PLA₂ IgY 항체 및 bee venom을 넣고 주위 원에 다시 상기 단백질을 채운 후, 37°C에서 overnight하여 형성된 침강선을 coomassie brilliant blue R-250(BIO-RAD, USA)용액으로 염색하였다.

6. 전기영동

Polyacrylamide gel electrophoresis 실험은 Laemmli¹⁹⁾ (1970)의 방법에 따라 실시하였다.

PLA₂와 bee venom을 sample buffer(100mM Tris HCl, pH 6.8, 1% SDS, 4% 2-mercaptoethanol, 0.02% brilliant blue G and 24% glycerol)와 1:1로 (v/v)로 섞은 후 16.5% separating gel, 4% stacking gel을 사용하여 분리하였다.

각 well에 넣은 단백질의 양은 5 μ g이었고 전기영동은 100V로 1시간 동안 진행하였다. Low molecule marker는 Sigma M3546을 사용하였고, 염색은 coomassie brilliant blue R-250을 이용하였다.

7. Dot blot 방법

Nitrocellulose막을 넣은 Bio-Dot(Bio-Rad, USA) kit에 bee venom 100 μ l(100 μ g/ml ~ 0.312 μ g/ml)씩 첨가한 후 전공 펌프를 이용하여 농축하였다.

이 후 TBS-T(0.05% Tween 20 in tris buffered saline, pH 7.5)로 세척한 다음, 2% BSA를 이용하여 실온에서 1시간 blocking 하였다.

Anti-PLA₂ IgY(1:10,000)항체를 100 μ l를 첨가한 후 37

°C에서 1시간동안 반응 시켰다. TBS-T로 세척한 후 AP가 결합된 이차 항체인 rabbit anti-chicken IgG 용액을 넣고 37°C에서 반응시켰다.

다시 TBS-T로 세척한 후 기질인 BCIP/NBT(Bio-Rad, USA)을 첨가하여 발색시켰다.

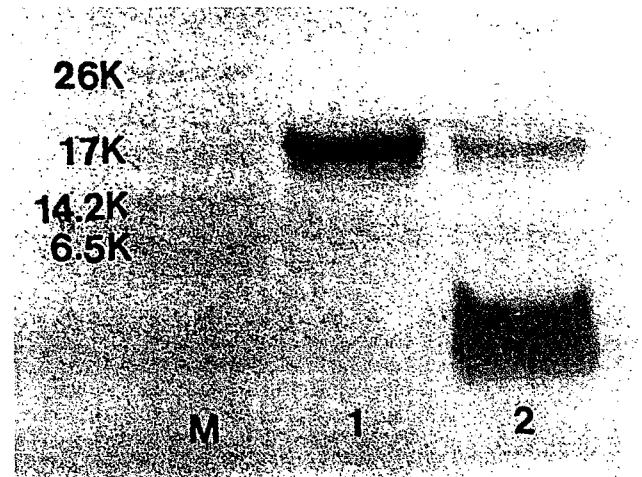


Fig1. Polyacrylamide gel electrophoresis in Sodium Dodecyle Sulfate (SDS-PAGE) patterns of phospholipase A₂ and Bee venom. Preparations were submitted to electrophoresis in 16.5% gel under Tris-tricine.

M : Molecular weight marker,
Lane 1 : Phospholipase A₂
Lane 2 : Bee venom.

III. 結 果

1. PLA₂와 봉독의 SDS-PAGE

본 실험의 항원으로 사용되는 PLA₂와 봉독의 특성을 조사하기 위해 SDS-PAGE를 시행하였다.

(Fig.1) 그림에서 보면 PLA₂는 lane 1에서 17K에서 단일 band를 형성하고, Lane 2의 봉독에서는 두 개의 band로 나누어지는 것을 볼 수 있다.

이런 결과는 봉독에서 분자량 17,000에서 형성되는 것이 PLA₂와 일치하는 것이며, 6,000이하에서 형성되는 두꺼운 band는 polypeptide component으로 건조 봉독에 가장 많은 성분인 melittin으로 보여진다.

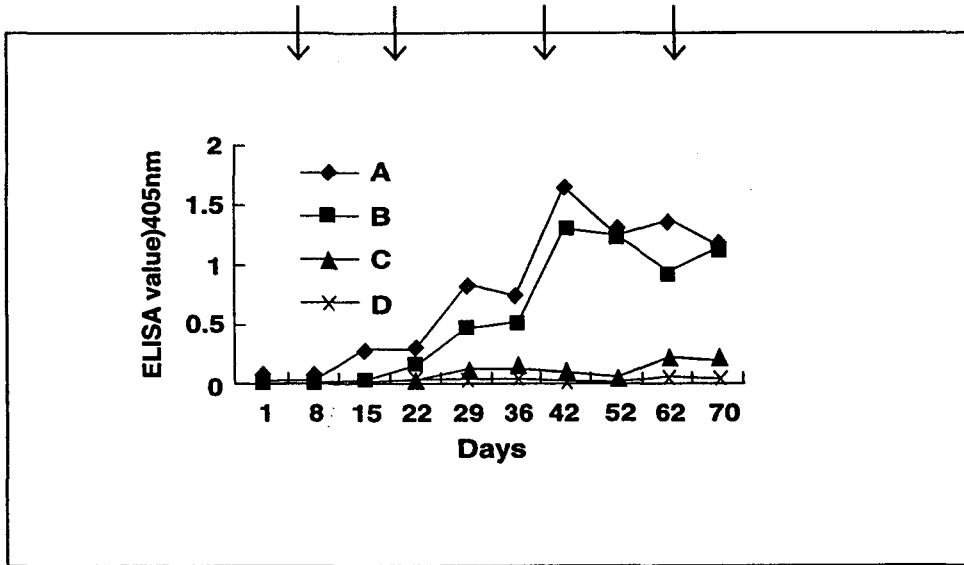


Fig 2. Change of antibody level in hen egg yolk during the immunization period.

A&B are the level of phospholipase A₂ antibody in yolk is expressed as ELISA value at 1:1,000 dilution using the phospholipase A₂ as antigen.
 C&D are the level of phospholipase A₂ antibody in yolk is expressed as ELISA value at 1:1,000 dilution using the Bee venom as antigen.
 The arrows indicate 0, 14, 28 and 49 days when hen is injected with phospholipase A₂.

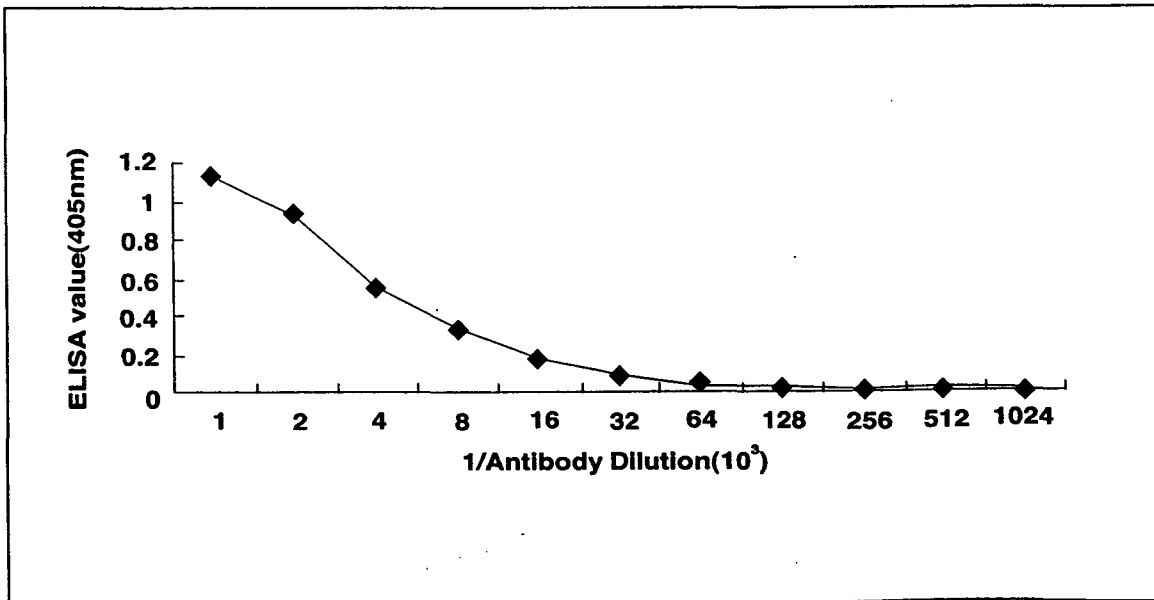


Fig 3. Titration curve of anti-phospholipase A₂ IgY.
 The anti-phospholipase A₂ IgY activity is expressed as ELISA value (405nm).

2. PLA₂와 봉독으로 면역된 IgY 항체의 역가

PLA₂와 봉독을 산란계에 면역시킨 후 계란에 생성된 anti- bee venom IgY와 anti-PLA₂ IgY 항체의 역가를 ELISA로 조사하였다.(Fig. 2) 그림에서 보면 PLA₂를 산란계에 주사한 A와 B의 경우에서, 산란계 A는 PLA₂를 면역 후 8일부터, 산란계 B는 15일 이후부터 anti-PLA₂IgY항체가 형성되기 시작해서 42일에는 O.D값이 각각 1.6과 1.3으로 가장 높은 항체의 역가를 나타낸 것을 볼 수 있었다. 또한 49일째 추가 접종 이후에 항체의 ELISA 값이 O.D 1.0 정도의 높은 수준에서 유지되는 것을 알 수 있었다.

그러나 봉독을 주사한 산란계 C의 경우 ELISA 값이 0.23정도로 증가하여 약간의 항체가 형성되었으나 산란계 D는 0.06으로 거의 항체가 형성되지 않았다.

3. 분리된 Anti-PLA₂ IgY의 titer 조사

계란으로부터 lipoprotein을 침전시킨 수용액으로부터 분리한 Anti- PLA₂ IgY항체를 희석하여 항원인 PLA₂와 어느 정도까지 반응하는가를 ELISA로 조사하였

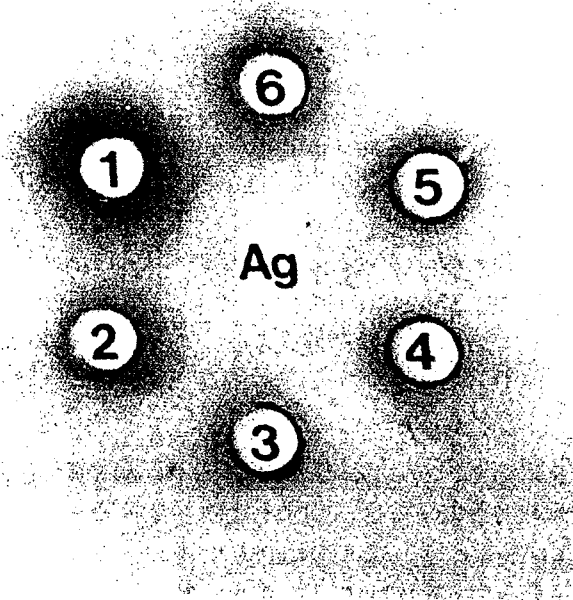


Fig 4. Double immunodiffusion pattern of phospholipase A₂ against antiphospholipase A₂ dilution.
Ag : Phospholipase A₂
1~6 : Anti-phospholipase A₂ double dilution (1:1~1:32).

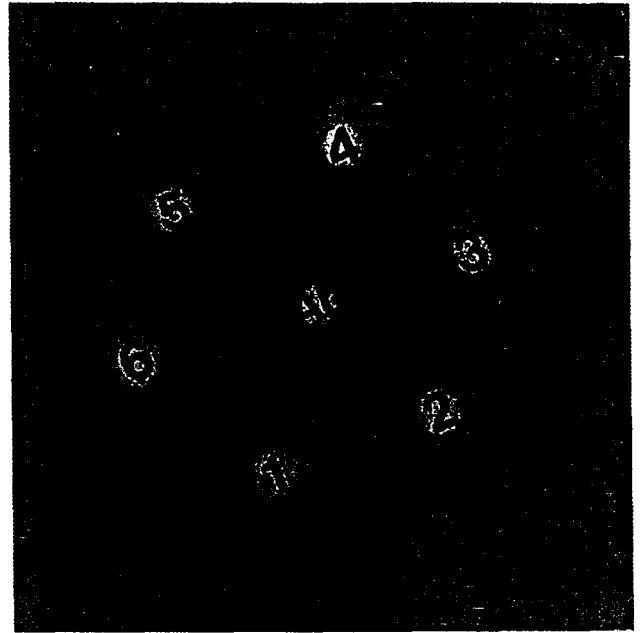


Fig 5. Double immunodiffusion pattern of anti-phospholipase A₂ against phospholipase A₂ dilution.
Ag : Phospholipase A₂
1 : 1mg/ml, 2 : 500µg/ml, 3 : 250µg/ml,
4 : 125µg/ml, 5 : 62.5µg/ml, 6 : 31.25µg/ml.

다.(Fig.3) 그림에서 보면 Anti-PLA₂ IgY 항체를 32,000배까지 희석하여도 항원과 반응하는 것을 볼 수 있었다.

4. Anti-PLA₂ IgY의 특이성 조사

계란에서 분리된 Anti-PLA₂ IgY 항체와 항원인 PLA₂와의 특이성을 조사하기 위하여 Double immunodiffusion에 의한 침강반응을 조사하였다.

PLA₂(1mg/ml)에 대해 Anti-PLA₂ IgY를 1:1에서 1:32까지 2배씩 희석하여 반응시킨 결과, 침강선은 anti-PLA₂ IgY항체를 1:1로 희석한 1번 well에서만 관찰되었다.(Fig.4)

이와는 반대로 Anti-PLA₂ IgY 항체에 대해 항원인 PLA₂를 1mg/ml에서부터 시작하여 31.25µg/ml까지 double dilution하여 PLA₂가 어느 농도까지 침강 반응을 나타내는지 관찰한 결과 PLA₂ 농도가 250µg/ml까지 침강선을 만드는 것을 볼 수 있었다.(Fig.5)

5. Anti-PLA₂ IgY와 봉독의 교차반응 특이성 조사

Double immunodiffusion과 Dot blotting을 이용하여

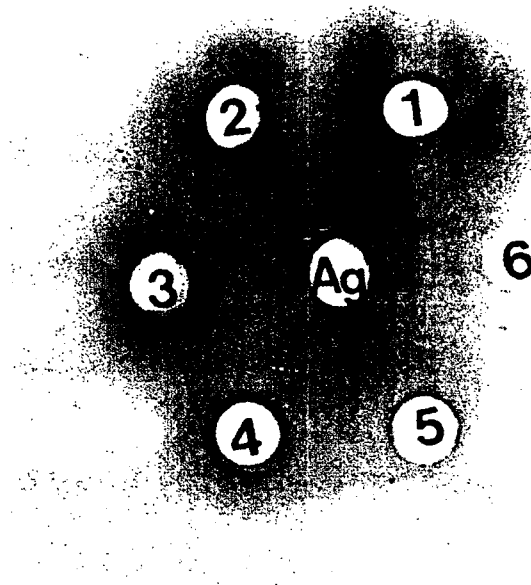


Fig 6. Double immunodiffusion pattern of bee venom against anti-phospholipase A₂ IgY dilution. Ag : Bee venom
1~6 : Anti-phospholipase A₂ double dilution(1:1 ~ 1:32).

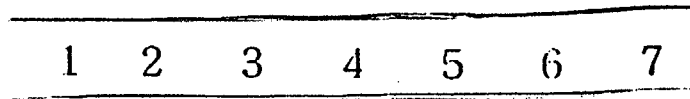


Fig 7. Dot blotting patten of bee venom against anti-phospholipase A₂ IgY (1:10,000). Nitrocellulose membranes are blocked with 1% BSA
Lane 1 : Raw Bee venom sample(0.5mg/ml)
2~6 : Bee venom sample dilution(1:10 ~ 1:100,000)
7 : Non Specific Binding(NSB).

Anti-PLA₂ IgY와 봉독의 면역반응을 관찰하였다.

봉독(1mg/ml)에 대해 Anti-PLA₂ IgY를 1:1에서 1:32 까지 2배씩 희석하여 반응시킨 결과, Anti-PLA₂ IgY 항체를 1:16으로 희석한 5번 well까지 침강선이 강하게 나타난 것을 볼 수 있었다.(Fig. 6)

또한 현재 임상에서 많이 사용되는 1:2,000(0.5mg/ml) 봉약침액을 10배 희석법으로 희석하여 Nitrocellulose membrane에 흡착시킨 후, Anti-PLA₂ IgY 항체와의 반응

을 Dot blotting하였다.

(Fig. 7) 그림에서 보면 3번의 1/100(5 μ g/ml)까지는 선명하게 반응하는 것을 볼 수 있으나 1/1,000(0.5 μ g/ml)이상(4-7) 희석한 것은 대조구로 사용한 None Specipic Binding과 비슷한 반응을 보이는 것으로 나타났다.

IV. 考 察

봉약침요법은 살아있는 꿀벌에게 전기나²⁾ 전자파로³⁾ 흥분시켜 봉독을 추출·건조한 후, 정제·가공하여 경락이론을 바탕으로 경혈을 선택하여 질병을 치료하는 신침요법의 일종이다.”

봉약침의 재료인 꿀벌로는 서양벌(*Apis mellifera*)중 일벌^{20,21)} 만이 사용되며, 독의 채취가 어려울 때에는 벌의 침을 뽑아서 취혈하는 발침법과 벌을 혈위에 놓아 자극하는 직침법이 활용되었으나, 최근에는 전기추출법 등으로 봉독을 추출 가공하여 건조한 봉독을 주사용 Ample, 연고 등으로 만들어 임상 및 연구용으로 이용하고 있다.

역사적으로 볼 때 B.C. 2,000년 전 이집트 파피루스에 서도 벌의 침을 아픈 곳에 쏘이거나 문질러 치료했다는 내용을 확인 할 수 있고,²²⁾ B.C 4-5C에 히포크라테스도 봉침을 신비한 치료제라고 하였으며, 前漢時代 이전의 의학 저서로 추정되는 馬王堆 醫書에서도 봉독을 질병의 치료에 이용²³⁾하였음을 알 수 있다.

봉독은 무색 투명하며 점성이 있는 액체로 강한 쓴맛이 나는 방향성 물질이며, 건조 상태에서는 희백색 또는 황백색의 덩어리 모양이나 분말상을 나타낸다. 봉독액의 비중은 1.13이며 산도(pH)는 5.2-5.5범위이다.²⁴⁾

봉독의 性味는 大熱有毒 辛甘鹹하며 補益精氣 除中益氣하고, 通經活絡 消腫排膿 清熱涼血의 효능이 있다.²⁵⁾

봉약침요법은 약침요법과 더불어 인체의 경혈에 물리적인 자극뿐만 아니라 화학적인 자극을 가한 치료법으로 통증, 염증성 질환이나 류마티스 관절염과 같은 자가면역계 질환에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.²⁶⁾ 하지만 치료의 과정에서 발생하는 다양한 형태의 Allergy 반응은 시술자나 환자에게 있어서 부담으로 작용하며 특히 봉독에 대한 과민성을 지닌 경우에 발생하는 전신즉시형 반응인 anaphylactic shock은 봉약침 시술에서 가장 큰 장애가 되고 있다.^{6,26)}

蜂毒에 대한 과민반응은 2-3명/10만 명 정도의 역학적 분포를 나타낸다. 벌에 처음 쏘였을 때나 봉약침 시술시에 anaphylactic shock이 일어나면 혈압이 떨어지고 전신 무력감, 피부 발진, 안면 창백, 오심 구토, 복통, 빈맥, 오한 등이 나타날 수 있고 더 진행되면 빈 호흡이나 실신, 사망에도 이를 수도 있다. 이러한 제 1형 또

는 전신즉시형 과민 반응은 동종양세포항체(homocytotropic antibody)인 IgE에 의해 매개된다고 알려져 있다.^{25,26)} Allergy반응에 가장 중요한 Allergen은 봉독의 대표적인 효소인 PLA₂이다. PLA₂는 효소성분의 대부분을 차지하는 물질로, 봉독에 민감한 사람들의 90% 정도에서 이에 대한 IgE 항체가 발견된다.

PLA₂가 봉독 내에 존재한다는 것은 1952년에 Neumann 등에 의해 보고되었다.^{27,28)} PLA₂의 주요 작용으로는 강력한 항원성을 들 수 있으며⁶⁾ 봉독의 주요 Allergen으로 작용하기 때문에 특히 많은 관심을 받아 왔다. 봉약침과 같이 근육이나 피하로 주입되는 Allergen은 혈액을 따라 체내를 순환하다가 비반세포와 접촉하게 되며, 만일 주입된 Allergen에 감작되어 있는 경우라면 순환계의 허탈과 호흡부전 등 그 반응이 훨씬 격렬하고 치명적일 수 있다. 그래서 IgE가 붙은 비반세포에 접촉하여 위험한 전신반응을 일으키기 전에 Allergen을 중화시킬 수 있는 IgG를 생성시키기 위해 소량의 Allergen에 잠재적 환자를 접촉시키는 탈감작요법이 많이 시도되어 왔고, 공기전파성 Allergen에 대한 치료성적보다 나은 치료성적을 거두는 것으로 알려져 있다. 1956년에 Habermann과 El Karemi가 봉독으로 면역시킨 토끼에서 고분자 단백질 성분인 PLA₂와 Hyaluronidase를 중화하는 항체의 존재를 발견한 이래²⁹⁾ 이 두 효소는 봉독의 주요 Allergen으로서 많은 관심을 받아 왔다.

봉약침 시술에서 발생하는 Allergy반응은 크게 4가지로 나눌 수 있다.³⁰⁾ 즉 국소·즉시형 반응, 국소·지연형 반응, 전신·즉시형 반응 그리고 전신·지연형 반응이다. 봉독에 의한 Shock의 양상은 <표. 1>과 같다.

이러한 Allergy반응, 특히 전신즉시형 반응인 anaphylactic shock을 원천적으로 예방할 필요성을 봉약침 시술자들은 느끼고 있다.

일반적으로 생물학적연구에서 사용하는 특이성 항체는 쥐, 염소, 토끼, 양, 말 등과 같은 포유동물에 과면역시켜서 얻은 혈청에서 주로 분리하여 사용하지만 본 연구에서는 산란계를 이용하여 항체를 생산하는 방법이 시도되었다.

산란계의 경우 면역된 혈액으로부터 난황으로 많은 양의 항체가 활발히 이행되는 것으로 알려져 있다.^{31,32)} 산란계에 항원을 과면역시키면 계란의 난황에서 항원의 특이 항체인 ImmunoglobulinY(IgY)를 얻을 수 있고, 계란 1개에 들어 있는 IgY의 양은 약 90-100mg 정도로

<표1. 벌의 독에 의한 shock>

전신증상	권태감 불안감 무력감 식은땀 두통 오한
순환기증상	혈압강하 맥박미약 맥박빈삭 심계항진 흉협고만 cyanosis
소화기증상	복통 복명 뇨실금 분변실금 오심 구토 설사 구태이물질 구내 불쾌감
호흡기증상	호흡곤란 천명 후두협착감 흉내교압감 재채기
신경증상	사지말단부 구순부의 마비감 소양감 의식상실 현훈 이명 경련 혼수 눈앞이 캄캄해짐
피부점막증상	피부 창백 혈관부종 자반 결막출혈 결막부종 구강점막부종 피부발진 피부홍조

난황에 존재하는 항체는 매우 우수한 polyclonal 항체로 알려져 있다.

또한 난황항체의 수동면역의 경우 생쥐에서 난황항체를 경구 투여한 후 rotavirus에 의한 감염을 막을 수 있는 것으로 알려져 있다. 산란계가 생산하는 계란 난황으로부터 분리되는 IgY 항체의 장점은 다음과 같다.

첫째, 항체 생산 시 불편한 채혈조작이 필요 없다.

둘째, 일반적으로 산란계는 질병 예방을 목적으로 하는 백신 주사 방법이 확립되어 있으므로 면역 조작을 비교적 간단히 할 수 있다.

셋째, 계란 1개로부터 약 100mg의 IgY 항체를 생산할 수 있고, 산란계의 대량 사육이 용이하므로 다량의 IgY 항체를 얻을 수 있다.

따라서 본 연구에서는 순수봉독분말과 봉독에 존재하는 Allergen인 PLA₂를 25주령 된 Hy-Line Brown 산란계에 주사하여 anti-bee venom IgY 및 anti-PLA₂ IgY를 생산, 분리 및 정제한 후 그 특성을 조사하였다.

본 실험에 항원으로 사용된 봉독은 독낭에 들어있는 독을 봉독채취기로 추출한 후 무균실에서 정제과정과 동결건조를 통해 얻어진 순수 봉독 분말로, 그 성분을 알아보기 위해 전기영동을 하였다. 그 결과 Fig. 1을 보면 분자량이 17,000부근에서 형성되는 PLA₂ 밴드와 분자량이 6,000이하에서 형성되는 두꺼운 Peptide component 밴드로 나누어지는 것을 확인할 수 있었다. 이런 결과는 이²⁰⁾ 등의 결과와 일치함을 알 수 있었다. 봉독의 주요 성분은 약 40가지 정도로, peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino

acids 등으로 나누어 볼 수 있다. 그 중 건조 봉독의 대표적인 성분은 melittin으로 전체 봉독의 40-50%의 차지하며 분자량이 2,840이고, 26개의 아미노산으로 구성된 peptide이다.

따라서 분자량 6,000이하에서 형성된 두꺼운 band의 대부분은 melittin으로 추정된다.

그 다음으로 많은 성분이 PLA₂로 건조 봉독의 10-12%를 차지하며 분자량이 17,000인 효소이다. 본 실험에서 IgY 항체를 생산하기 위해 사용된 항원인 PLA₂의 성분을 알아보기 위해 전기영동을 실시하였다. 그 결과 Fig.1을 보면 분자량 17,000의 단일 band를 형성하고 있음을 알 수 있었다. 이는 실험에 사용된 PLA₂가 순수함을 알 수 있었고, 이런 결과는 1952년에 봉독 내에는 PLA₂가 존재하며 이들 분자량은 17,500이라고 보고한 Neumann 등²⁰⁾의 결과와 거의 일치하였다.

봉독으로 면역된 산란계에서 얻은 계란의 IgY 항체의 역할을 조사해 본 결과, 산란계의 역할은 크게 증가하지 않음을 알 수 있었다.(Fig.2) 또한 PLA₂로 면역된 산란계에서 얻은 계란의 IgY 항체의 역할을 조사해 본 결과 PLA₂를 면역 주사한 산란계는 면역 후 8일 또는 15일 이후부터 IgY 항체가 형성되기 시작해서 42일에는 가장 높은 항체의 역할을 나타내었다. 또한 49일째 추가 접종 이후에 항체의 역할이 O.D 1.0 수준에서 유지되는 것을 알 수 있었다. 이런 결과를 볼 때 봉독은 항체 형성이 잘 안되는데 비해 PLA₂는 항체가 잘 형성되는 것을 알 수 있었다. 이것은 순수한 PLA₂가 강력하게 Allergen으로 작용할 수 있다는 것을 의미한다고 사려

되며, 봉독 자체에도 PLA₂가 존재하지만 그 양이 10-12%가량이므로 항체 형성을 위해서는 더욱 많은 봉독을 주입해야 됨을 알 수 있었다. PLA₂ 이외의 물질은 대부분이 분자량이 작은 물질로 이들은 hapten으로 작용하여 항체가 형성되지 않는 것으로 보인다.

계란에서 IgY 항체를 분리하기 위하여 Akita와 Nakai의 방법¹⁹에 따라 lipoprotein을 침전시킨 후 수용성 분획으로부터 anti-PLA₂ IgY를 분리한 후 IgY 항체의 역가를 ELISA를 이용하여 조사한 결과 Anti-phospholipase A₂ IgY 항체의 titer는 1:32,000 정도로 나타났다(Fig. 3). 이런 결과는 이 등²⁰이 저온세균인 *Pseudomonas fluorescens*을 이용하여 산란계에서 생산한 anti-Ps. fluorescens IgY 항체의 titer가 1:128,000으로 나온 결과에 비해서는 titer가 약간 낮게 나타났으나 Pal 등²¹이 장내세균인 *Escherichia coli*를 토끼에 주사해서 얻은 항체 titer 1:10,240과 비교해보면 비교적 높은 역가를 나타내는 것을 알 수 있었다.

계란에서 분리된 Anti-PLA₂ IgY 항체와 항원인 PLA₂의 특이성을 조사하기 위하여 Double immunodiffusion에 의한 침강반응을 조사하였다. Fig. 4는 PLA₂(1mg/ml)에 대해 Anti-PLA₂ IgY를 1:1에서 1:32까지 2배씩 희석하여 반응한 결과 침강선은 anti-PLA₂ IgY 항체를 1:1로 희석한 1번 well에서만 관찰되었다. Fig. 5는 Fig. 4와는 반대로 Anti-PLA₂ IgY 항체에 대해 항원인 PLA₂를 1mg/ml에서부터 시작하여 31.25 μ g/ml까지 double dilution하여 PLA₂가 어느 농도까지 침강 반응을 나타내는지 알아보기 위한 실험으로 PLA₂ 농도가 250 μ g/ml까지 침강선을 만드는 것을 볼 수 있었다. 따라서 Anti-PLA₂ IgY 항체를 이용하면 Double immunodiffusion 방법으로 봉독에 들어 있는 PLA₂의 농도를 250 μ g/ml까지 검출할 수 있는 것으로 사려된다.

Double immunodiffusion과 Dot blotting을 이용하여 Anti-PLA₂ IgY와 봉독의 교차반응을 관찰하였다. Fig. 6에서는 봉독(1mg/ml)에 대해 Anti-PLA₂ IgY를 1:1에서 1:32까지 2배수로 희석하여 반응시킨 결과 Anti-PLA₂ IgY 항체를 1:16으로 희석한 5번 well까지 침강선이 강하게 나타난 것을 볼 수 있었다.

Fig. 7은 현재 임상에서 많이 사용되는 1:2,000(0.5mg/ml) 봉약침액을 10배 희석법으로 희석하여 Nitrocellulose membrane에 흡착시킨 후 Anti-PLA₂ IgY 항체 반응한 Dot blotting한 결과이다. 그림에서 보면 1/100(5 μ g/ml)까지는 선명하게 반응하는 것을 볼 수 있으나 1/1,000(0.5

μ g/ml)이상 희석한 것은 대조구로 사용한 NSB와 비슷한 반응을 보이는 것으로 나타났다. 이는 기존에 사용되고 있는 봉약침보다 매우 낮은 농도에서도 반응을 나타내기 때문에 봉독과 봉독이 아닌 유사제품을 감별하는데 유용한 방법으로 사용될 수 있을 것으로 사려된다.

산란계에서 봉약침의 중화항체(Anti-PLA₂ IgY)를 생산하기 위해 시도된 본 실험과정에서 IgY를 생산, 분리 및 정제하여 그 특성을 조사해 본 결과, 봉독보다는 정제된 PLA₂에서 IgY 항체 형성이 용이하고 항원 항체반응이 비교적 잘 나타나, 앞으로 봉약침의 항체요법이 가능하리라는 기대가 되며 이를 위해 Anti-PLA₂IgY의 독성, 안정성 실험과 임상 실험 등 지속적인 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

봉약침의 중화항체(Anti-PLA₂ IgY)를 생산하기 위해 산란계에 봉약침과 PLA₂를 면역 주사한 후, 계란에서 특이항체인 Immunoglobulin Y(IgY)를 생산, 분리하여 그 특성을 조사해 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SDS-PAGE를 시행한 결과 PLA₂는 17,000의 단일 band를, 봉독은 17,000과 6,000이하에서의 두 개의 band로 나누어짐을 확인할 수 있었다.
2. PLA₂에 대한 anti-PLA₂ IgY 항체의 역가는 면역 후 8일 또는 15일 이후부터 IgY 항체가 형성되기 시작해서 42일에는 가장 높은 ELISA value를 나타내었다. 또한 49일에 추가 접종한 이후에도 항체의 ELISA value가 O.D 1.0 수준에서 유지되는 것을 알 수 있었다.
그러나 봉독에 의한 Anti-bee venom IgY 항체의 ELISA value는 매우 낮았다.
3. PLA₂에 대한 Anti-PLA₂ IgY의 titer는 1:32,000 정도의 역가를 나타내었다.
4. Double immunodiffusion test에 있어서 PLA₂는 Anti-PLA₂ IgY가 1:1로 희석된 농도에서 침강선이 형성되었으며, PLA₂를 희석하여 Anti-PLA₂ IgY와 반응

시켰을 때 PLA₂의 농도가 250 μ g/ml까지 침강선이 형성되었다. 또한 봉약침(1mg/ml)에 대하여 Anti-PLA₂ IgY를 1:1에서 1:16까지 2배수로 희석하여 반응시킨결과 모두 침강선이 강하게 나타났다.

5. 봉약침(0.5mg/ml)을 10배 희석법으로 희석한 후 Anti-PLA₂ IgY에 대해 Dot blotting 시험을 한 결과 봉약침액을 1/100(5 μ g/ml)까지 희석한 농도에서 뚜렷한 반응을 보였다.

參考文獻

1. 權奇祿 : 蜂針에 대한 考察, 대한 침구학회지, Vol 11. No1, 160, 1994
2. 金文昊 : 봉독요법과 봉침요법, 서울, 한국교육기획, 20-37, 41-42, 57, 70, 72, 133-149, 171-176. 1996.
3. 권기록 : 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회지, 130-131, 1998.
4. 권기록, 고흥균, 김창환 : 태충 및 족삼리의 방풍수침과 봉독요법이 소염 및 활혈자극에 미치는 영향, 경희한의대논문집 16: 297-323, 1993.
5. 권기록, 고흥균 : 봉독약침요법이 항염, 진통작용에 미치는 효능에 관한 실험적 연구, 대한침구학회지 15(2): 97-103, 1998.
6. Schmidt J.O, Allergy to hymenoptera venoms: in Piek T. ed, Venoms of the hymenoptera, London, Academic press, 510, 1986.
7. Polson A. and von Wechmar M. B. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolk of immunized hens. Immunol. Commun., 9:475-493.
8. Yokoyama H.,Peralta R.C.,Diaz R.,Sendo S.,Ikemori Y. and Kodama Y. : Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Escherichia coli infection in neonatal piglets. Infect. Immun. 60:998-1007, 1992.
9. Matsuda, T., Kawauchi, M. and Nakamura, R. : Growth of ovarian follicle and yolk protein accumulation. japanese J. Dairy & Food Sci., 41(6), 223, 1992.
10. Gutierrez M. A.,Miyazaki T., hatta, H. and Kim, M. : Protective properties of egg yolk IgY containing anti-Edwardsiella tarda antibody against paracolo disease in the Japanese eel, Anguilla japonica Temminck & Schlegel. J. Fish Dis., 16, 113-122. 1993.
11. Hatta, H.,Tsuda K.,Akachi S., Kim M.,Yamamoto T. and Ebina T. : Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzyme, Biosci, Biotech. Biochem., 57, 1077-1081, 1993.
12. Fertel R. Yetiv J. Z. Coleman M.A., Schwarz R.D. Greenwald J.E. and Bianchine J.R.. : Formation of antibodies to prostaglandins in the yolk of chicken eggs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 135:1028-1033, 1981.
13. Carroll S. B. and Stollar B. D. : Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. J. Biol. Chem. 258:24-26, 1983.
14. 이승배, 최석호, 백두연 : anti-lactoferrin IgY 항체의 면역학적 특성과 우유의 락토페린 측정, 한국축산식품학회, 21(4), 299-304, 1999.
15. 이승배, 최석호, 고태승, 장문주, 한석현 : 계란의 난황에서 IgY 항체 생산 및 특성에 관한 연구, 한국축산식품학회, 16(1), 85-88, 1996.
16. Akita, E. M. and Nakai, S. : Immunoglobulin from egg yolk; isolation and purification. J. Food Sci. 57, 629. 1992.
17. Mine, Y. : Separation of Salmonella enteritidis from experimentally contaminated liquid eggs using a hen IgY immobilized immunomagnetic separation system. J. Agric. Food Chem, 45, 3723. 1997.
18. Ouchterlony, O. and Nilsson, I. A. : 19.1 in handbook of experimental immunology. Vol. 1. Weir, D. M. 2nd, ed. blackwell Sci. Publ 1., Oxford, Engl. 1973.
19. 崔大鳳 : 養蜂協會報, 한국양봉협회, 서울, 12월호, 1986.
20. 崔承允 : 양봉, 꿀벌과 벌통, 五星出版社, 서울, 117-118, 1987.
21. 崔承允 : 新制養蜂學, 서울, 집현사, 47-56, 328-330, 1987.
22. Tom piek: Venom of the Hymenoptera, Academic Press, London, 107-120, 1986.
23. 인창식, 고흥균 : 봉독요법에 대한 한의학 최초의 문헌기록: 마왕퇴의서의 봉독요법 2례, 대한 침구

- 학회지, Vol 15, No1, 143, 1998
24. Barbara & Rudolf, *Chemistry and Pharmacology of Honey Bee venom*, Academic Press, 329-402, 1986.
 25. 권기록, 고희균 : 염좌후유증에 대한 봉약침요법의 임상응용, 대한 약침학회지, Vol 2, No.1, 1-12, 1999.
 26. 權奇祿 : 봉독요법의 면역반응에 관한 임상적 연구, 대한 침구학회지, Vol 17, No.1, 169-174, 1999.
 27. Habermann E., & Karemi M.M.A.(1956), Antibody formation by protein components of bee venom, *Nature* 178:1349.
 28. Neumann W., Habermann E., Amend G.: Zur papier-elektrophoretischen fraktionierung tierischer gifte, *Naturwissenschaften* 39: 286-287, 1952.
 29. Habermann E.: Bee and wasp venoms, *Science* 177: 314-322, 1972.
 30. 이진선 : 전기영동법(Electrophoresis)과 HPLC를 이용한 봉약침의 주요 성분에 관한 연구, 상지대학교 대학원 석사학위 논문, 2000.
 31. 이승배, 최석호, 백두연 : 난황 IgY 항체의 inhibition Enzyme-Linked Immunosorbant Assay(ELISA)법을 이용한 원유내 *Pseudomonas fluorescence* 의 신속 검출 방법 개발, *한국축산식품학회* 20(3), 231, 2000.
 32. Pal, T., Pacsa A. S., Emody L., Voros, S. and Selley E.: Modified Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Enteroinvasive *Escherichia coli* and virulent *Shigella* strains, *J. Clin. microbiol.*, 21, 415, 1985.
 33. Laemmli. U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680, 1970.