

한국산 겨우살이 (*Viscum album coloratum*)로부터 추출된 lectin의 닭에 대한 독성 및 뉴캐슬병 백신의 특이면역 증강 효과

여 상 건*

경북대학교 수의과대학
(게재승인: 2006년 9월 8일)

Toxicity of lectin extracted from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) in chicks and its immunoadjuvant activity on Newcastle disease virus vaccines

Sang-Geon Yeo*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
(Accepted: Sep 8, 2006)

Abstract : In order to search the availability of the lectin extracted from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) as an adjuvant for the avian vaccines, attempts were made to determine toxicity of the lectin in chicks and its immunostimulating activity on the inactivated vaccines against Newcastle disease virus (NDV). For the determination of toxicity, the lectin was injected into the thigh muscle of SPF chicks (Charles River) of 1-week-old and observed hematologically and pathologically. For the determination of immunostimulating effects, lectin-adjuvanted, inactivated NDV vaccines were injected into the thigh muscle of SPF chicks in the same age group. Sera of the chicks were examined for the hemagglutination-inhibition (HI) antibodies induced, their HI titers and reaction to the NDV antigens. The data were further compared with those from aluminum hydroxide [Al(OH)₃]-adjuvanted vaccines and vaccines without adjuvant, and the results are as follows. There were no significant changes observed in the values of RBC, WBC, Hb, PCV, MCV, MCH, MCHC, AST, ALT, BUN, creatinine and total proteins in the chicks administered with lectin of 1.1, 2.2 and 22.2 µg/kg body weight, which means the lectin has no effects on blood values and functions of liver and kidney. In histopathologic observation, no lesions were observed in the brain, heart, liver, lung, spleen, kidney, thymus and bursa of Fabricius of the chicks administered with lectin of 1.1, 2.2 and 22.2 µg/kg body weight. There were inflammatory lesions, such as congestion, hemorrhage, edema, infiltration of macrophages and coagulation necrosis observed in the thigh muscle of chicks administered with lectin of 22.2 µg/kg body weight, whereas no changes were observed in 1.1 and 2.2 µg/kg lectin administered chicks. In chicks immunized with lectin (4.4 µg/kg of body weight)-adjuvanted B1, LaSota and Ulster 2C vaccines, HI titers in reciprocal values for log₂ were 1.8-2.2 at 1 week after vaccination, which was similar with those of 1.5-2.9 by Al(OH)₃-adjuvanted vaccines. The HI titers by the lectin-adjuvanted vaccines reached to 3.9-5.3 at 4 weeks, whereas those by the Al(OH)₃-adjuvanted vaccines were more high as 7.3-9.3. Meanwhile, the immunostimulating effects of the lectin were recognized while compared to the HI titers with 2.4-3.7 in chicks immunized with vaccines without adjuvants at 4 weeks after vaccination. The chicks immunized with lectin-adjuvanted vaccines were enough to resist challenges by Kyojeongwon strain, a very virulent NDV at 4 weeks after vaccination as well as chicks immunized

이 논문은 농림기술관리센터의 연구비(No. 299088-3) 지원에 의하여 수행되었음.

*Corresponding author: Sang-Geon Yeo

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea.
[Tel: +82-53-950-5968, Fax: +82-53-950-5955, E-mail: sgyeo@knu.ac.kr]

with Al(OH)₃-adjuvanted vaccines. The HI titers by the lectin-adjuvanted vaccines reached to high level as 8.7-10.3 as those with 8.2-9.6 by the Al(OH)₃-adjuvanted vaccines at 6 weeks after vaccination, which may be the booster effects by the challenge virus. Antibodies specific to the HN and F antigens of NDV were observed in the sera of both chicks immunized with lectin-adjuvanted vaccines and Al(OH)₃-adjuvanted vaccines.

Key words : lectin, NDV, HI titer, immunostimulation, adjuvant

서 론

동물 전염병의 예방을 위하여 다양한 백신이 사용되고 있으며 특히 집단사육 되고 있는 산업동물에서는 방역상 백신 접종이 중요함은 주지의 사실이다. 뿐만 아니라 피해가 심한 주요 세균성, 바이러스성 감염증에 대하여는 높은 면역수준을 유지하기 위하여 수회의 추가 예방접종이 필요하다. 일반적으로 동물용 백신은 생백신과 불활화백신의 형태로 사용되고 있으며, 불활화백신의 경우에 안전성은 인정되지만 흔히 면역원성이 낮기 때문에 이를 개선하고자 수종의 면역증강 물질이 이용되고 있다 [23]. 이들 중 동물에 널리 이용되고 있는 aluminum hydroxide [Al(OH)₃], aluminum phosphate, aluminum potassium sulfate 등은 항원자극을 장기간 유지시키는 장점이 있으나 때로 접종부위에서의 염증, 손상 등의 부작용이 있다 [23].

한편 국내에서는 다양한 백신이 개발되어 양축산업에 이용되고 있으나 면역효과 증강 물질에 대한 연구는 미흡한 실정으로서, 백신의 개발과 병행하여 백신의 특이 면역을 증강시킬 수 있는 물질에 대한 연구가 요구되고 있다.

겨우살이(mistletoe, *Viscum album*)는 세계 전역에 분포하며 참나무, 소나무, 벚나무 등 여러 종류의 나무를 숙주로 하여 성장하는 기생 식물로서, 우리나라 겨우살이(*Viscum album coloratum*)는 요통, 고혈압, 유산방지 등에 대한 민간요법제로 사용되어 왔다 [2]. 유럽에서도 겨우살이(*Viscum album loranthaceae*)는 암 및 고혈압 등의 질병에 대한 전통 약제로 사용되었으며 [6], 근래에는 체액성 및 세포성 면역계를 자극하는 효과가 있는 것으로 알려졌다 [3, 7-9, 24]. 또한 동물과 사람에게 대한 임상실험 결과 대식세포 및 NK 세포의 활성을 증가시킴으로서 종양세포의 성장을 억제하는 것으로 보고 되어 있으며 [12, 21], 이러한 작용은 주로 겨우살이 성분 중의 lectin에 의한 것으로 알려져 있다 [10, 22].

이 연구는 동물용 면역증강 물질에 관한 연구의 일환으로 수행하였으며, 한국산 겨우살이 추출물(lectin)의 닭에 대한 독성 여부를 확인하고 뉴캐슬병 백신의 특이 면역 증강 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

공시 동물

인공부화기를 이용하여 SPF 종란(Charles River사, 미국)을 부화시켰으며, 부화 후 병아리를 격리된 무균동물 사육실에서 멸균 처리된 물과 사료를 급여하면서 사육하였다.

Lectin 접종

한동대학교 김종배 교수로부터 윤 등 [3]과 Yoon *et al.* [24]의 방법에 준하여 한국산 겨우살이로부터 추출, 정제된 lectin을 분양받아 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

닭에 대한 lectin의 독성 여부를 조사하기 위하여, 부화 후 1주령의 SPF 병아리(평균체중: 45 g)를 1개 실험군당 15수로 구획하여 체중 kg 당 제1군에 1.1 µg, 제2군에 2.2 µg, 제3군에 22.2 µg의 lectin을 대퇴부 근육에 접종하였으며, 제4군은 대조군으로서 멸균된 증류수를 접종하였다. 접종당일과 접종 후 16일 동안 4일 간격으로 각 군당 3수로부터 혈액을 채취하여 EDTA로 항응고 처리 한 후 혈액화학적으로 관찰하였으며, 채혈후의 병아리는 부검하여 병리학적으로 관찰하였다.

혈액학적 관찰

적혈구 및 백혈구 총수는 Neubauer 계산판을 이용한 통상의 방법에 의하여 산출하였으며, 혈구용적(packed cell volume, PCV)은 microhematocrit 법으로서, 혈색소(hemoglobin, Hb)는 혈색소 측정기(Hemocue, β-hemoglobin, Sweden)를 사용하여 측정하였다. 또한 상법에 따라 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구 혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH) 및 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)를 산출하였다. 혈액화학치는 혈액화학분석기(Auto dry chemistry analyzer, spot chem SP-4410, 일본)를 이용하여 혈청 aspartate aminotransferase(AST), 혈청 alanine aminotransferase(ALT), 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN), creatinine 및 총단백함량을 측정하였다. 각 분석치의 유의성은 student t-test로 검정하였다.

병리학적 관찰

Lectin 접종당일과 접종 후 4일 간격으로 실험 군별로 채혈되었던 3수의 병아리를 부검하여 각 실질장기 및 lectin 접종부위 근육조직을 채취하여, 통상적인 방법에 따라 10% 중성 포르말린으로 고정된 후 파라핀 포매 조직절편 재료를 제작하여 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 한 후 병리조건을 관찰하였다.

공시 백신

뉴캐슬병 백신에 대한 lectin의 면역증강 효과를 조사하기 위하여 B1주, LaSota주 및 Ulster 2C주 불활화백신을 공시하였으며, 이들은 (주)한국미생물연구소 [현 (주)코미팜, 경기도 시흥]에서 통상적인 백신생산 공정 및 불활화 처리과정에 따라 제조된 것을 분양받은 것으로서 그 생산 공정은 다음과 같다. 즉, 부화 9-10일령 SPF 발육란(Charles River)의 장요막강에서 3일간 증식시킨 바이러스를 수확하여 EID₅₀ [20]를 산정한 후, 10⁷ EID₅₀/m^l 수준의 각 바이러스 액에 포르말린을 0.2% 되게 가하여 37°C에서 48시간 동안 교반하여 바이러스를 불활화 시킨 것이다.

이 회사의 Al(OH)₃ 혼합백신 생산 공정에 준하여, 백신액 총량을 기준으로 각 불활화 바이러스액 34%에 병아리 1수에 0.5 ml를 접종할 때 체중 kg 당 4.4 µg이 접종되는 양의 lectin을 가하고 PBS(pH 7.2)로 100% 되게 증축시켜 lectin 혼합백신을 제조하였다. 동시에 각 불활화 바이러스액 34%에 PBS 34% 및 Al(OH)₃ 32%를 가하여 Al(OH)₃ 혼합백신을 제조하였으며, 각 불활화 바이러스액 34%에 PBS를 100%되게 증축시켜 불활화 바이러스 단독백신을 제조하여 대조 백신으로 사용하였다. 이들 백신은 4°C에 보관하면서 공시하였다.

병아리 면역 및 항체 형성능 조사

부화 후 1주령의 SPF 병아리 30수를 1개 군으로 하여 1수당 0.5 ml의 백신을 대퇴부 근육에 접종하였다. 즉, 백신 접종군은 9개 군으로서 lectin 혼합 B1, LaSota, Ulster 2C 백신, Al(OH)₃ 혼합 B1, LaSota, Ulster 2C 백신, 면역증강 물질을 혼합하지 않은 B1, LaSota, Ulster 2C 바이러스 단독백신을 각 1개 군에 접종하였다. 제 10 군에는 멸균 PBS 0.5 ml를 접종하여 대조군으로 하였다. 백신 접종 후 6주 동안 매일 임상적으로 관찰하였고 매주 각 군별 5수로부터 채혈(채혈 후 도대시킵)하여 항체가를 측정하여 경시적인 항체의 형성수준 및 지속상태를 조사하였으며, 제 4주째 채혈 후에 Kelleher *et al.* [13]의 방법에 준하여 교정원주를 1수당 100 µl (10⁶ EID₅₀/m^l)씩 접비 접종한 후 방어능 및 폐사율을 조사하였다.

항체가 측정

병아리 혈청을 56°C, 30분간 비동화 시켰으며, 항체가 는 SPF 발육란의 장요막강에서 증식시킨 B1주를 사용하여 배타 술식 [5]에 의한 hemagglutination-inhibition(HI) 시험으로 96-well plate에서 측정하였으며 HI 항체가는 혈구응집을 완전히 억제시키는 최고혈청희석농도의 log₂ 값을 역수로 표시하였다. 각 혈청에 대하여 3회 반복 시험한 값의 평균을 산정한 후 컴퓨터 프로그램(Microsoft excel)으로 분석하였다.

바이러스 항원에 대한 항체의 반응성

Lectin 혼합백신에 의하여 형성된 항체의 뉴캐슬병 바이러스 특정 항원에 대한 반응성을 Al(OH)₃ 혼합백신에서의 성적과 비교 조사하였다. 이를 위하여 SPF 발육란의 장요막강에서 증식시킨 교정원 바이러스액을 40,000 rpm에서 16시간 초원심 분리한 후 바이러스 침전물을 원래 바이러스액의 1/100 양의 TNE buffer(10 mM tris, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 용해하였다. Laemmli [14]의 방법에 따라 이 바이러스액의 일정량을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 용 sample buffer에 1:2로 혼합한 후 12% acrylamide gel에서 전기영동하여 바이러스 항원 펩타이드를 전개시켰다. 이어서 nitrocellulose membrane에 blotting 시켰으며, 백신 접종 후 각 주별로 채취된 혈청과의 enzyme immunoassay를 실시하여 4-chloro-1-naphthol로 발색시켜 관찰하였다 [11].

결 과

닭에 대한 lectin의 독성 여부

부화 후 1주령의 SPF 병아리에 대하여 각각 체중 kg 당 1.1 µg, 2.2 µg 및 22.2 µg의 lectin을 대퇴부 근육에 접종한 후 16일 동안 관찰하였을 때, 전 실험기간 동안 각 농도별 lectin 접종군과 대조군에서 총 적혈구, 총 백혈구 및 Hb 수치의 유의적인 변화가 나타나지 않았다. PCV치는 유의한 감소가 인정되었으나 이러한 변화는 정상범위 내에서의 변화이었다. MCV, MCH 및 MCHC 수치 역시 실험기간 동안 정상범위 내에서의 변화를 나타내었다. 또한 AST와 ALT 함량에서 실험기간 동안 유의한 변화가 인정되지 않았으며 BUN, creatinine 및 총단백 함량 역시 실험기간 동안 유의한 변화가 인정되지 않았다(Fig. 1).

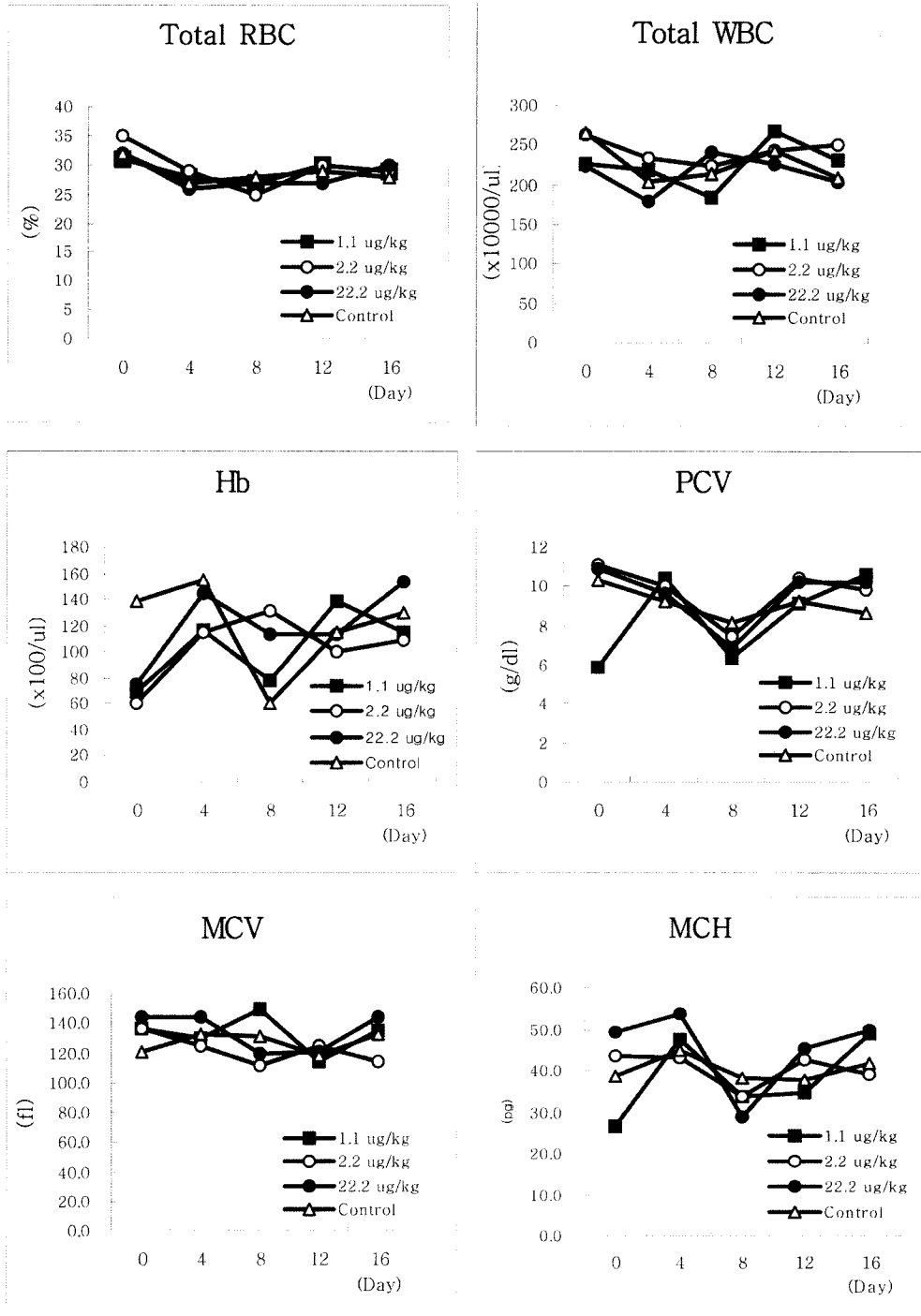
Lectin 접종 후 병리학적 소견

부화 후 1주령의 SPF 병아리에 대하여 각각 체중 kg 당 1.1 µg, 2.2 µg 및 22.2 µg의 lectin이 접종된 전 실험

군 및 대조군에서 실험기간 동안 뇌, 간, 심장, 폐, 비장, 신장, 흉선, F낭의 조직소견은 정상이었다.

또한 lectin이 접종되었던 대퇴부 근육조직에서의 소견은 1.1 μg 접종군 및 2.2 μg 접종군과 대조군에서 전

실험기간 동안 정상이었다(Fig. 2). 이에 비하여 22.2 μg 접종군에서 4일째에는 정상이었으나 8일째에는 조사된 3수 전부에서 충혈, 수종, 소수의 염증세포 침윤 등의 염증소견이 관찰되었다(Fig. 3). 12일째에는 3수 전부에서



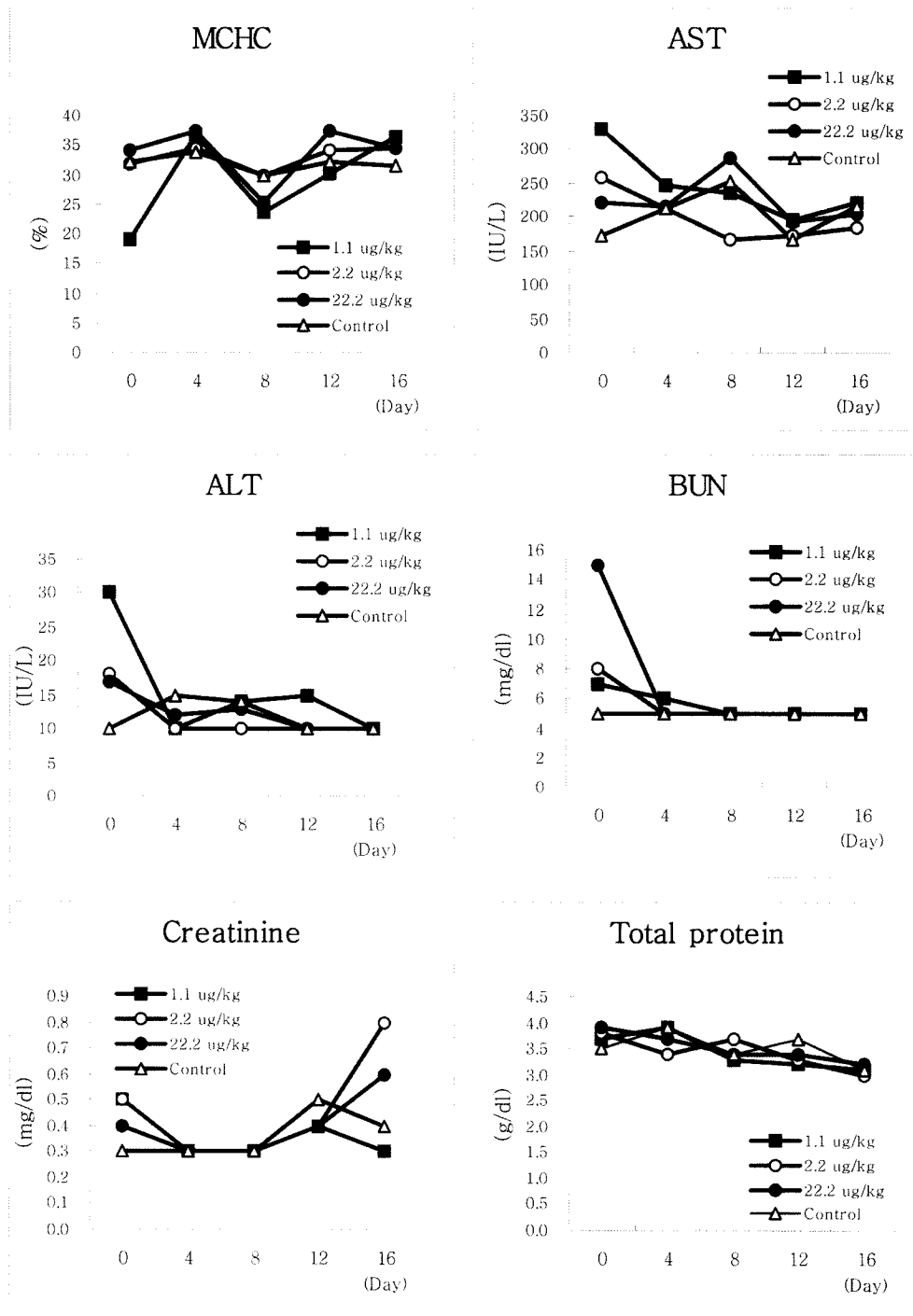


Fig. 1. Blood cell counts and chemistry values in chicks after administration of lectin with 1.1, 2.2 and 22.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight.

출혈, 수종, 대식세포 침윤, 근섬유의 응고괴사 소견이 현저하였고(Fig. 4), 16일째에는 염증이 회복되는 과정으로서 단핵구성 세포의 침윤 및 섬유화 소견이 관찰되었

다(Fig. 5 및 6).

따라서 백신에 혼합하여 투여할 때 독성을 나타내지 않을 lectin의 양은 체중 kg 당 2.2 μg 수준이 적합한 것

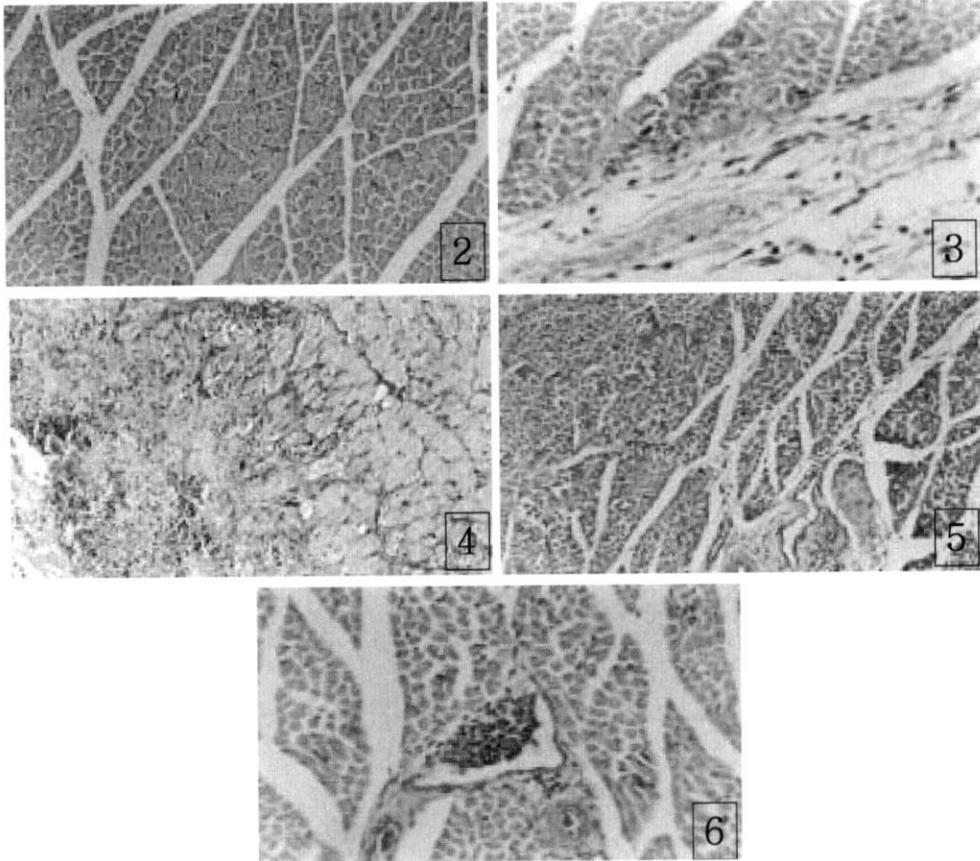


Fig. 2. No pathological findings in thigh muscle of chicks by lectin with 1.1 and 2.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weigh during experimental period of 16 days. H&E, $\times 200$.

Fig. 3. Congestion, edema and infiltration of inflammatory cells observed in thigh muscle of chicks by lectin with 22.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight at 8 days post injection. H&E, $\times 200$.

Fig. 4. Hemorrhage, edema, infiltration of macrophages and coagulation necrosis of muscle fibers observed in thigh muscle of chicks by lectin with 22.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight at 12 days post injection. H&E, $\times 200$.

Fig. 5. Infiltration of mononuclear cells and fibrosis observed in thigh muscle of chicks by lectin with 22.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight at 16 days post injection. H&E, $\times 200$.

Fig. 6. Infiltration of mononuclear cells observed in thigh muscle of chicks by lectin with 22.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight at 16 days post injection. H&E, $\times 400$

으로 확인되었던 바, lectin의 닭에 대한 면역 활성화력이 불확실한 점을 감안하여 추후 뉴캐슬병 예방백신에 대한 lectin 혼합 양을 체중 kg 당 4.4 μg 으로 결정하였다.

Lectin에 의한 뉴캐슬병 백신의 특이면역 증강 효과

Lectin(4.4 $\mu\text{g}/\text{체중 kg}$) 혼합백신을 접종한 후 매일 관찰하였을 때 임상적으로 이상 증상은 없었으며, lectin에 의한 뉴캐슬병 백신의 특이면역 증강 효과를 조사하여 기존 면역증강 물질인 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 에 의한 면역증강 효과와 비교하였던 결과는 다음과 같다.

Lectin 혼합 B1, LaSota, Ulster 2C 백신을 접종한 후

각각 1주째에 2.2, 2.2, 1.8 수준의 HI 항체가 형성되었으며 점차 상승하여 4주째에는 3.9, 4.8, 5.3 수준을 보였다. 이때 교정원주로 공격하였던바 감염증상을 보이거나 폐사한 예는 없었으며, 공격접종 후 1주일이 경과된 제 5주째에 항체가는 각각 4.9, 4.9, 5.3 수준으로서 B1 백신 접종군에서는 1.0이 상승하였으나 LaSota 및 Ulster 2C 백신에서는 4주째와 거의 동일하였으며, 6주째에 각각 8.7, 9.5, 10.3으로 크게 상승하였다. 백신의 종류별로 볼 때 항체가는 Ulster 2C, LaSota, B1의 순으로 높았다(Fig. 7).

또한 전 실험기간 동안 lectin 혼합백신 접종군의 병

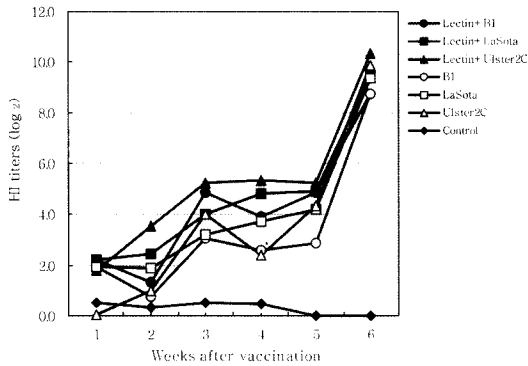


Fig. 7. Comparison of HI titers in chicks immunized with lectin-adjuvanted vaccines against Newcastle disease virus.

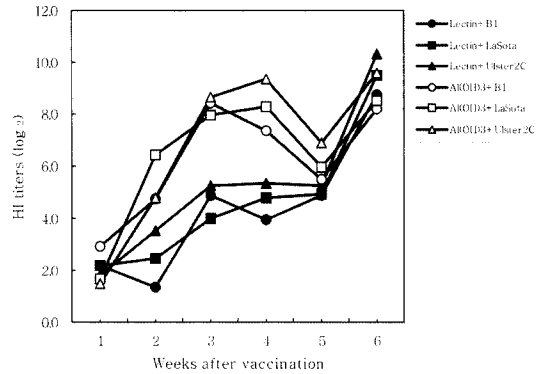


Fig. 9. Comparison of HI titers in chicks immunized with lectin- and Al(OH)₃-adjuvanted vaccines against Newcastle disease virus.

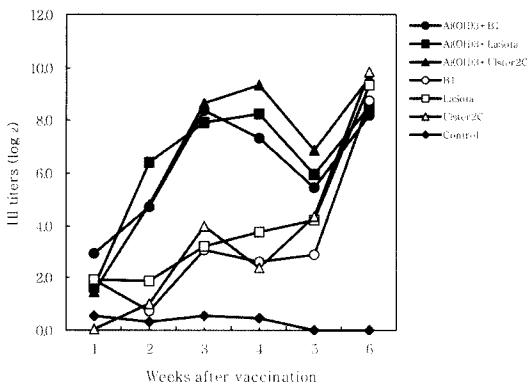


Fig. 8. Comparison of HI titers in chicks immunized with Al(OH)₃-adjuvanted vaccines against Newcastle disease virus.

아리에서 임상적으로 lectin에 기인하는 이상 증상은 관찰되지 않았다.

Al(OH)₃ 혼합 B1, LaSota, Ulster 2C 백신을 접종한 군에서는 접종 후 각각 1주째에 2.9, 1.7, 1.5로 lectin 혼합 시와 비슷한 수준의 HI 항체가 형성되었으나 점차 상승하여 4주째에는 7.3, 8.3, 9.3으로 lectin 혼합 시보다 높은 수준을 보였다. 이때 교정원주로 공격하였던바 역시 감염증상을 나타내거나 폐사한 예는 없었으며, 공격 접종 후 1주일이 경과된 제 5주째에 항체가는 각각 5.5, 5.9, 6.9 수준으로 4주째보다 다소 감소하였다가 6주째에는 lectin 혼합 백신에서와 거의 같은 수준인 8.2, 8.5, 9.6으로 상승하였다(Fig. 8).

한편 바이러스 단독백신 접종 시에 B1, LaSota Ulster 2C에 의한 HI 항체는 교정원주로 공격하기 전인 4주째에 각각 2.6, 3.7, 2.4 수준이었으며(Fig. 7 및 8), 공격접종 후 B1 백신이 접종된 10수 중 3수(30%)가 발병 증상을 보인 후 폐사하였다. 백신 비 접종 대조군은 전 실험기간 동안 항체 음성이었으며 공격접종 후 2일부터

식욕감퇴, 백색 수양성 설사, 침울, 호흡곤란, 졸음 등의 뉴캐슬병 증상을 보인 후 4일째에 10수 모두 폐사하였다. 따라서 lectin이 병아리에서 뉴캐슬병 백신의 면역원성을 증강시키는 효과가 확인되었으며, 임상적으로 lectin에 기인하는 이상증상은 관찰되지 않았다.

동일 백신 주에서 lectin 혼합 및 Al(OH)₃ 혼합 시의 항체가의 비교

동일 백신 주에서 lectin과 Al(OH)₃에 의한 면역증강 효과를 비교하였을 때 B1 백신에 의한 HI 항체가는 첫 주에는 2.2 및 2.9로서 양자에서 비슷하였으나, 4주째에 Al(OH)₃ 혼합백신에 의한 HI 항체가는 7.3으로서 lectin 혼합 백신에 의한 3.9보다 아주 높은 수준이었다. 또한 LaSota 및 Ulster 2C 백신에서도 이와 비슷한 경향으로 HI 항체가 형성되었으며, 4주째에 Al(OH)₃ 혼합백신에 의한 항체가가 8.3 및 9.3으로서 lectin 혼합 백신에서의 4.8 및 5.3 보다 상당히 높은 경향이었다. 하지만 공격접종을 한 후에는 백신주 및 면역증강 물질의 종류에 관계없이 항체가는 거의 비슷하게 5주에 일시적으로 감소한 후 급격히 상승하여 6주에는 8.2-10.3의 수준을 나타내었다. 한편 백신 바이러스별로는 lectin 혼합백신 및 Al(OH)₃ 혼합백신에서 모두 Ulster 2C, LaSota, B1의 순으로 항체가가 높게 형성되었다(Fig. 9).

항체의 뉴캐슬병 바이러스 항원에 대한 반응성

Lectin 혼합 B1, LaSota, Ulster 2C 백신을 접종한 후 1주부터 동일한 경향으로 뉴캐슬병 바이러스의 hemagglutinin-neuraminidase(HN) 항원 및 fusion(F) 항원에 대한 항체가 확인되었으며, 6주간 경시적으로 볼 때 항체의 반응이 점진적으로 강한 경향이었다. 또한 Al(OH)₃ 혼합백신 접종시에도 동일한 반응을 나타내었다(Fig. 10).

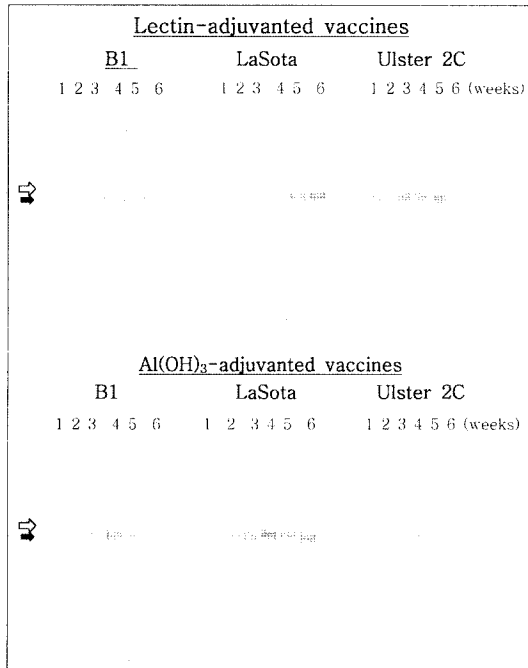


Fig. 10. Appearance of specific antibodies to HN(⇔) and F(➡) antigens of Newcastle disease virus by lectin- and Al(OH)₃-adjuvanted vaccines.

고 찰

강 등 [1]은 한국산 거우살이의 lectin(KML-IIU)을 ICR 생쥐 미정맥에 투여한 후 치사율을 조사하였을 때, 체중 kg 당 125 µg 및 250 µg 투여 군에서 2일 째에 치사율 100%이었고, 62.5 µg 투여 군에서는 5일 째에 치사율 60%이었으며 31 µg 및 15.5 µg 투여 군에의 치사율은 0% 이라고 하였다. 또한 이들은 SD 흰쥐에 투여시의 치사율로 100 µg 투여 군에서 1일째에 치사율 100%, 50 µg 투여 군에서는 2일째에 치사율 40%이었고 12.5 µg 투여 군에서는 치사율이 없음을 보고하였으며, ICR 생쥐와 SD 흰쥐에서의 lectin의 LD₅₀는 각각 체중 kg 당 31 µg 과 62.5 µg 사이 및 50-100 µg으로 추정하였다. 따라서 일정농도 이상의 lectin은 실험동물에 대한 치사독성이 있음이 시사되고 있으나, lectin에 의한 구체적인 혈액학적 변화, 병리소견 등은 알려져 있지 않다.

이 연구에서 lectin에 의한 닭 전염병 백신의 면역증강 효과에 관한 조사에 선행하여 lectin의 닭에 대한 독성여부를 확인하였다. 이 때 병아리에 대한 lectin 투여량을 결정함에 있어 근거 자료가 미비하였으며, 병아리가 부화 후 1주일으로서 미숙하였고 조류는 생리학적으로 포유류와 상이한 점 등을 고려하여 병아리에 대한 lectin의 최대 투여 양을 강 등 [1]이 추정하였던 ICR 생쥐에서의 LD₅₀ 하한선(31 µg/체중 kg) 보다 낮은 체중 kg

당 22.2 µg 수준으로 결정하였다.

따라서 체중 kg 당 1.1 µg, 2.2 µg 및 22.2 µg의 lectin을 불활화 백신의 일반적 접종경로인 근육에 투여하였을 때, 전 접종군의 총 적혈구수, 총백혈구수, Hb, PCV, MCV, MCH, MCHC 등 혈액학치의 변화가 없었다. 또한 AST와 ALT 함량도 유의적인 변화가 인정되지 않아 간 기능의 이상이 없음을 알 수 있었고, BUN, creatinine 및 총 단백 함량 역시 유의적인 변화가 인정되지 않아 신장 기능에도 이상이 없음을 관찰할 수 있었다.

한편 병리학적으로 이들 접종군의 병아리 전 예에서 뇌, 간, 심장, 폐, 비장, 신장, 흉선, F낭 등 실질장기의 조직소견은 정상이었다. 따라서 이 농도 수준의 lectin은 병아리의 실질장기에 대한 병리학적 독성을 나타내지 않는 것으로 판명되었다. 이에 비하여 lectin 접종 부위인 대퇴부 근육조직의 경우 22.2 µg 접종군의 병아리 전 예에서 접종 후 조기에 염증소견이 관찰되었으며, 시간이 경과함에 따라 출혈, 수종, 대식세포 침윤, 근섬유의 괴사 등으로 병변이 더 심하게 진행되었으며 16일째에도 섬유화 소견 등이 관찰됨으로서 근육부위에서의 독성이 구명되었다.

현재까지 국·내외적으로 닭을 비롯한 가축에서 lectin의 독성여부가 알려져 있지 않아서 독성 유발 최저농도를 산정하기 어려우나, 이 연구 결과만으로 볼 때 백신에 혼합할 때 독성을 나타내지 않는 lectin의 양은 병아리 체중 kg 당 2.2 µg 수준이 적합할 것으로 생각되었다. 하지만 lectin의 닭에 대한 면역 활성능력을 알지 못하므로 이점을 고려하여 추후 뉴캐슬병 예방백신의 면역증강 효과 조사를 위한 백신내 lectin의 함량을 체중 kg 당 4.4 µg으로 결정하였다.

Lectin(4.4 µg/체중 kg)을 뉴캐슬병 바이러스 B1주, LaSota주, Ulster 2C주 불활화 백신에 혼합하여 병아리에 근육접종한 후 경시적으로 항체형성 상태를 조사하고 Al(OH)₃ 혼합백신 및 면역증강 불질을 혼합하지 않은 불활화 바이러스 단독백신에 의한 성적과 비교하였을 때, 전 기간동안 lectin에 의한 이상은 관찰되지 않았으며 1주째에 lectin 혼합백신 접종군의 HI 항체가가 1.8-2.2 수준으로서 Al(OH)₃ 혼합백신 접종군의 HI 항체가(1.5-2.9)와 비슷한 수준으로 항체 형성이 이루어지는 것을 알 수 있었다. 4주째에는 lectin 혼합백신 접종군의 항체가가 3.9-5.3로서 Al(OH)₃ 혼합백신 접종군의 항체가(7.3-9.3)보다 다소 낮은 수준이었다. 이때 교정원주로 공격하였던바 lectin 혼합백신 접종군 및 Al(OH)₃ 혼합백신 접종군의 전 예에서 폐사한 예는 없었다. 이에 비하여 B1, LaSota 및 Ulster 2C 불활화 바이러스 단독백신 접종군의 HI 항체가는 4주째에 2.4-2.6으로 아주 낮은 수준이었으며, 공격접종 후에 B1 백신 접종군의 30%가 발병

증상을 보인 후 폐사하였다. 백신 비 접종 대조군은 전 실험기간 동안 항체 음성이었으며 공격접종 후 2일부터 뉴캐슬병 증상을 보인 후 전 예가 폐사하였다.

따라서 lectin에 의하여 뉴캐슬병 바이러스 백신의 면역효과가 증강됨이 확인되었으며, lectin 혼합백신으로 형성된 항체에 의하여 강병원성 바이러스가 방어되며 그 수준은 Al(OH)₃ 혼합백신에 의한 것과 비슷함을 알 수 있었다. Lavelle *et al.* [15] 및 Lavelle *et al.* [16]에 의하면 lectin은 마우스에서 혈청 IgG, IgA 및 분비성 IgA 형성을 유도하며, 특히 점막면역 능력이 우수한 것으로 알려져 있다. 또한 윤 등 [4] 및 Yoon *et al.* [24]은 lectin의 작용기전을 대식세포를 활성화시켜서 TNF- α , IL-1, IL-6, INF- γ 등을 유도하는 비 특이적인 면역이라고 하였다.

한편 공격시험 후 2주 경과한 6주째에는 lectin 혼합백신 접종군의 항체가가 8.7-10.3 수준으로 크게 상승하여 Al(OH)₃ 혼합백신 접종군의 항체가(8.2-9.6)와 차이가 없었으며, 이와 같이 양자에서 항체가가 상승한 것은 공격 바이러스의 항원자극에 의한 booster 효과로 추측되었다.

또한 lectin 혼합 백신주의 종류에 관계없이 Al(OH)₃ 혼합백신에서와 마찬가지로 접종 후 1주부터 병아리 혈청에서 뉴캐슬병 바이러스의 HN 및 F 항원에 대한 항체가 확인되었으며, 경시적인 항체가의 상승에 비례하여 항원에 대한 반응정도가 강한 경향이였다. 뉴캐슬병 바이러스에 대한 항체의 중화반응은 주로 HN, F 항원에 대하여 이루어지는데 [17-19], 이와 같은 결과로 볼 때 lectin 혼합백신에 의하여 형성된 항체의 바이러스에 대한 중화 반응성이 인정되었다.

동일한 백신주에서 lectin 혼합시와 Al(OH)₃ 혼합시의 면역증강 효과를 보면 B1, LaSota 및 Ulster 2C 모두에서 lectin 혼합시보다 Al(OH)₃ 혼합시에 면역형성 초기부터 교정원주로 공격하기 전인 4주째까지의 기간 동안 항체가가 높은 경향이였으며, 공격시험에 의한 booster 효과 이후에는 양자에서의 항체가가 거의 비슷한 수준을 나타내었다. 이와 같이 면역형성 초기부터 4주까지에서 Al(OH)₃ 혼합백신에 의한 항체가가 높은 현상은 Al(OH)₃는 백신 바이러스의 체내 분해를 지연시켜 면역 자극을 오래 지속시킨다는 사실과 일치되었다 [23].

이상에서와 같이 lectin 혼합백신 접종군에서 lectin에 기인하는 이상 증상과 독성이 관찰되지 않았으며, 뉴캐슬병 백신의 면역효과를 증강시키는 것이 인정되었다.

결 론

한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)로부터 추출된 lectin을 닭 전염병 백신의 특이면역 증강 물질로 사용하기 위한 연구의 일환으로서, lectin의 닭에 대한 독

성여부를 조사하고자 정제된 lectin을 부화 후 1주령 SPF 병아리(Charles River)의 대퇴부 근육에 접종한 후 혈액학적 및 병리학적으로 관찰하였다. Lectin에 의한 뉴캐슬병 바이러스 불활화백신의 특이면역 증강 효과를 조사하기 위하여, 부화 후 1주령 SPF 병아리의 대퇴부 근육에 lectin 혼합백신을 접종한 후 적혈구응집억제(hemagglutination-inhibition, HI) 항체의 형성능, 형성수준, 항원과의 반응성 및 강독 바이러스에 대한 방어능력 등을 확인하였으며 aluminum hydroxide [Al(OH)₃] 혼합백신 및 불활화 바이러스 단독백신에 의한 성적과 비교하였던 결론은 다음과 같다.

1. 체중 kg 당 1.1 μ g, 2.2 μ g 및 22.2 μ g의 lectin을 접종한 병아리에서 총 적혈구수, 총 백혈구수, Hb, PCV, MCV, MCH 및 MCHC 수치에서 유의한 변화가 인정되지 않았으며, AST, ALT, BUN, creatinine 및 총 단백 수치에서도 유의한 변화가 없으므로 간 및 신장 기능의 이상이 인정되지 않았다.

2. 체중 kg 당 1.1 μ g, 2.2 μ g 및 22.2 μ g의 lectin을 접종한 병아리에서 뇌, 간, 심장, 폐, 비장, 신장, 흉선, F낭의 조직소견은 정상이었다.

3. 체중 kg 당 1.1 μ g 및 2.2 μ g의 lectin을 접종한 병아리의 근육에서 조직소견은 정상이었으나, 22.2 μ g의 lectin 접종시에는 총출혈, 수종, 소수의 염증세포 침윤, 근섬유의 응고괴사, 단핵구성 세포침윤 및 섬유화 등의 염증소견이 관찰되었다.

4. Lectin(4.4 μ g/체중 kg) 혼합 B1, LaSota, Ulster 2C 백신에 의한 HI 항체가는 1주째에 1.8-2.2로서 Al(OH)₃ 혼합백신 접종군의 HI 항체가 1.5-2.9와 비슷한 수준이었고, 4주째에는 3.9-5.3로서 Al(OH)₃ 혼합백신 접종군의 7.3-9.3보다 다소 낮았다. 이에 비하여 불활화 바이러스 단독백신에 의한 HI 항체가는 4주째에 2.4-2.6이어서 lectin에 의한 면역증강 효과가 인정되었다.

5. 백신 접종 후 1주인 4주째에 교정원주로 공격하였을 때 lectin 혼합백신 접종군 및 Al(OH)₃ 혼합백신 접종군의 전 예에서 폐사한 예가 없었다.

6. 공격접종 2주후인 6주째에 lectin 혼합백신 접종군의 HI 항체가는 8.7-10.3으로 booster 효과를 나타내었으며 Al(OH)₃ 혼합백신 접종군의 HI 항체가 8.2-9.6과 차이가 없었다.

7. Lectin 혼합백신 접종 병아리 혈청에서 Al(OH)₃ 혼합백신에서와 같이 뉴캐슬병 바이러스의 HN 및 F 항원에 대한 특이 항체가 확인되었다.

감사의 글

이 연구에서의 혈액학적 검사에 많은 도움을 주신 경

북대학교 수의내과학교실의 이근우 교수님과 병리조직 소견을 판독하여 주신 경상대학교 수의병리학교실의 김순복 교수님께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

1. 강태봉, 윤택준, 김종배, 송성규, 이관희, 박진환. 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)로부터 정제된 렉틴 성분 KML-IIU의 예비 독성 및 일반 약리 시험. 약학회지, 2001, **45**, 251-257.
2. 신민교. 원색임상본초학. pp. 237-238, 영림출판사, 서울, 1988.
3. 윤택준, 유영춘, 강태봉, 도명술, 서병선, Azuma I, 김종배. 한국산 겨우살이 추출물(*Viscum album coloratum*; KM-110)의 면역학적 활성. 대한면역학회지, 1997, **19**, 571-581.
4. 윤택준, 유영춘, 홍은경, 조영호, 이석원, Auma I, 유보림, 김종배. 마우스 macrophage의 IL-1 및 TNF- α 의 분비유도에 있어서 한국산 겨우살이 추출물이 미치는 영향. 생약학회지, 1994, **25**, 132-139.
5. Beard CW. Serologic procedures. In: Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE. (eds). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3rd ed. pp. 192-194, Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, 1990.
6. Becker H. Botany of European mistletoe(*Viscum album L.*). Oncology, 1986, **43**, 2-7.
7. Bloksma N, Dijk HV, Korst P, Willer JM. Cellular and humoral adjuvant activity of Mistletoe extract. Immunobiol, 1979, **156**, 309-319.
8. Bloksma N, Schmiermann P, de Reuver M, Dijk HV, Willer JM. Stimulation of humoral and cellular immunity by *Viscum* preparations. J Med Plant Res, 1982, **46**, 2-8.
9. Fisher S, Scheffler A, Kabelitz D. Stimulation of the specific immune system by mistletoe extracts. Anticancer Drugs, 1997, **8**, 33-37.
10. Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. Modulatory potency of the b-galactoside-specific lectin from mistletoe extract(Iscador) on the host defence system in vitro in rabbits and patients. Cancer Res, 1989, **49**, 4803-4808.
11. Harlow H, Lane D. Antibodies: A laboratory manual. pp. 471-510, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988.
12. Holtskog R, Sand K, Olsnes S. Characterization of a toxin lectin in Iscador, a mistletoe preparation with alleged cancerostatic properties. Oncology, 1988, **45**, 172-179.
13. Kelleher CJ, Halvorson DA, Newman JA. An evaluation of Newcastle disease virus spray vaccination programs of market turkeys. Avian Dis, 1987, **31**, 431-437, 1987.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, **227**, 680-685.
15. Lavelle EC, Grant G, Pusztai A, Pfuller U, O'Hagan DT. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. Immunol, 2000, **99**, 30-37.
16. Lavelle EC, Grant G, Pusztai A, Pfuller U, O'Hagan DT. The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. Immunol, 2001, **102**, 77-86.
17. Meulemans G, Gonze M, Carlier MC, Petit P, Burny A, Long L. Protective effects of HN and F glucoprotein-specific monoclonal antibodies on experimental Newcastle disease. Avian Pathol, 1986, **15**, 761-786.
18. Morrison T, Hinshaw V, Sheerar M, Cooley AJ, Brown D, McQuain C, McGines L. Retrovirus expressed hemagglutinin-neuraminidase protein protects chickens from Newcastle disease virus induced disease. Microbial Pathogen, 1990, **9**, 387-396.
19. Nishino Y, Niikura M, Suwa T, Onuma M, Gotoh B, Nagai Y, Mikami T. Analysis of the protective effect of the hemagglutinin-neuraminidase protein in Newcastle disease virus infection. J Gen Virol, 1991, **72**, 1187-1190.
20. Payment P, Trudel M. Methods and Techniques in Virology. pp. 33, Marcel Dekker, New York, 1983.
21. Rentea R, Lyon E, Hunter R. Biologic properties of Iscador: A *Viscum album* preparation. I. Hyperplasia of the thymic cortex and accelerated regeneration of hematopoietic cells following X-irradiation. Lab Invest, 1981, **44**, 43-48.
22. Ribereau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Poindron P, Anton R. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. Cancer Letters, 1996, **109**, 33-38.
23. Tizard IR. Veterinary Immunology: An introduction. 7th ed. pp. 256-258, Saunders, China, 2004.
24. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. Prophylactic effect of Korean mistletoe(*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. Inter J Immunopharm, 1998, **20**, 163-172.