大韓獸醫學會誌(2006) 第46卷 第3號
Korean J Vet Res(2006) 46(3) : 225~234

한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)로부터 추출된 lectin의 돼지에 대한 독성 및 오제스키병 백신의 면역원성에 미치는 영향

여 상 건*

경북대학교 수의과대학

(게재승인: 2006년 9월 11일)

Toxicity of lectin extracted from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) in piglets and its effects on the immunogenicity of Aujeszky's disease virus vaccines

Sang-Geon Yeo*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Accepted: Sep 11, 2006)

Abstract : In the present study toxicity and immunostimulating activity of the lectin (KML-C), which was extracted from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) were investigated in swine. To determine the toxicity, lectin was injected into thigh or cervical muscles of 4-week-old piglets (Landrace) and observed clinically and pathologically. For determination of the immunostimulating activity, lectin (0.7 μg/kg of body weight)-adjuvanted vaccine of Aujeszky's disease virus (ADV) (NYJ1-87) which was inactivated by 0.2% formalin was injected into the cervical muscle of antibody-negative piglets in the same age group. Subpopulation of the immune cells and serum neutralizing (SN) antibodies in the piglets were examined after vaccination, and resistance of the piglets against challenge by virulent NYJ1-87 was further examined. The results were also compared with those from piglets injected with aluminum hydroxide [$Al(OH)_3$]-adjuvanted vaccine of inactivated NYJ1-87 and NYJ1-87 vaccine without adjuvant, and the results are as follows. By injection of lectin with 30 μg/kg of body weight to the thigh muscle, all of 12 piglets died after signs such as dyspnea, fever, systemic erythema and subcutaneous hemorrhages, and lesions pertaining to poisonous hepatitis and dysfunction of kidney were observed. By injection of lectin with 7 μg/kg of body weight to the thigh muscle, all of 12 piglets showed signs such as edema and cutaneous hemorrhage in the injected area, lameness and depression, and lesions pertaining to poisonous hepatitis and dysfunction of kidney were observed. By injection of lectin with 1, 3 and 5 μg/kg of body weight to the thigh muscle of each one piglet, signs such as congestion, induration and grayish coloration in the injected area, depression and inappetence were observed in all piglets. Toxic changes were also observed in the liver and kidney of piglets by lectin of 3 and 5 μg. By injection of lectin with 0.5 and 0.7 μg/kg of body weight to the cervical muscle of each 9 piglets, all piglets were clinically normal and there were no significant changes in blood counts and chemistry values. Whereas, epithelial swelling and vacuolation of convoluted tubules were observed from one piglet injected with lectin of 0.7 μg, and necrosis and fibrosis of muscular fiber were observed in the muscle of one piglet injected with lectin of 0.5 μg. Only population of sIgM+ B lymphocytes increased among immune cells in all of 15 piglets immunized with lectin(0.7 μg/kg of body weight)-adjuvanted vaccine, while compared to those in $Al(OH)_3$-adjuvanted vaccine and vaccine without

이 논문은 농림기술관리센타의 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]

adjuvant. No additional stimulation to the immune cells was recognized when lectin was added to $Al(OH)_3$-adjuvanted vaccine. In piglets immunized with lectin-adjuvanted vaccine, SN titers in reciprocal values for log_2 were 1.3-4.0 at 1-4 weeks after vaccination, which was similar to those with 1.0-3.3 by vaccine without adjuvant but lower than those with 2.0-5.7 by $Al(OH)_3$-adjuvanted vaccine. Also, no additional increase in the SN titers was recognized when lectin was added to $Al(OH)_3$-adjuvanted vaccine. Piglets immunized with lectin-adjuvanted vaccine were resistant to challenge by the virulent NYJ1-87 at 4 weeks after vaccination, and the SN titers reached to 5.0 one week after challenge, which was higher than those with 4.0 by vaccine without adjuvant but somewhat lower than those with 7.7 by $Al(OH)_3$-adjuvanted vaccine.

Key words : lectin, ADV, SN titer, immunostimulation, adjuvant

서 론

동물 전염병의 예방에 있어서 백신접종이 무엇보다도 중요하며, 특히 대규모로 다두사육 되고 있는 양돈장에서는 주요 세균성, 바이러스성 전염병의 집단발생으로 겪는 피해를 줄이기 위하여 수회의 추가 접종이 요구되고 있다. 동물용 백신은 생백신과 불활화백신이 주로 사용되고 있으며, 이중에서 불활화백신은 안전성이 인정되지만 면역원성이 낮기 때문에 수종의 adjuvant가 이용되고 있다 [16]. 이들 중 널리 이용되고 있는 aluminum hydroxide[$Al(OH)_3$], aluminum phosphate, aluminum potassium sulfate 등은 항원자극을 장기간 유지시키는 장점이 있으나, 때로 접종부위에서의 염증, 손상 등을 유발 한다 [16]. 따라서 aluminum계 adjuvant의 이러한 단점을 보완하고 동물에 사용할 수 있는 면역증강 물질에 대한 연구가 필요한 실정이다.

겨우살이(mistletoe, *Viscum album*)는 세계 전역에 분포하며 참나무, 소나무, 벚나무 등 여러 종류의 나무에 기생하는 식물로서, 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)는 오래전부터 사람에서 요통, 고혈압, 유산방지 등을 위하여 민간요법제로 사용되어 왔다 [2]. 유럽에서도 겨우살이(*Viscum album loranthaceae*)는 암, 고혈압 등에 대한 전통약제로 사용되고 있으며, 특히 체액성 및 세포성 면역반응의 증강, 대식세포 및 NK 세포의 활성증가 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 [3-8, 14, 18]. 이러한 겨우살이의 면역계 활성작용은 주로 lectin 성분에 의한 것으로 알려져 있다 [12, 13].

이 연구에서는 동물용 백신의 면역효과 증강에 사용할 수 있는 물질을 탐색하고자, 한국산 겨우살이 추출물(lectin)의 돼지에 대한 독성 여부를 확인하고 오제스키병 백신의 특이면역 증강효과 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

공시 동물

출생 시에 초유를 급여하지 않았으며 오제스키병 백신 등 특정 백신을 접종하지 않은 생후 4주령 이유자돈(랜드레이스, 평균 체중 7.2 kg)을 기존의 양돈장으로서 2년 이상 돼지를 사육하지 않았고 주위로부터 격리된 한 양돈장에서 사육하면서 실험에 공시하였다.

Lectin 접종

한동대학교 김종배 교수로부터 윤 등 [3]과 Yoon *et al.* [18]의 방법에 따라 한국산 겨우살이로부터 추출, 정제된 lectin(KML-C)을 분양하여 4°C에 보관하면서 공시하였다.

Lectin의 독성 여부를 조사하고자 1차 실험으로 자돈 12두를 1개 군으로 하여, 제1군에는 강 등 [1]이 추정하였던 생쥐에서 lectin의 LD_{50} 하한선(31 kg/체중 kg)을 고려하여 체중 kg 당 30 μg의 lectin을, 제2군에는 이 농도의 약 1/4에 해당하는 체중 kg 당 7 μg의 lectin을 대퇴부 근육에 접종하였다. 또한 제3군은 대조군으로서 멸균 증류수를 접종하였으며, 전 실험군과 대조군을 임상적으로 관찰하였고 폐사한 자돈과 생존한 자돈을 살처분하여 병리학적으로 관찰하였다. 제2차 실험으로 자돈 각 1두에 대하여 체중 kg 당 1, 3 및 5 μg의 lectin을 각각 대퇴부 근육에 접종하고 5일 동안 임상 관찰한 후 살처분하여 병리학적 소견을 관찰하였다. 제3차 실험으로 각 군당 9두의 자돈을 공시하여 제 1군의 자돈에게 체중 kg 당 0.5 μg, 제 2군은 0.7 μg의 lectin을 경측부 근육에 접종한 후 4주 동안 임상 관찰하였고, 접종 당일, 접종 후 1주, 2주, 4주에 각 군당 3두씩 채혈하여 EDTA로 항응고 저리한 후 혈액학적 변화를 관찰하였으며 살처분하여 병리학적 소견(접종 당일 제외)을 관찰하였다. 동시에 멸균 증류수를 접종한 9두를 대조군으로 공시하였다.

혈액학적 관찰

자동혈액화학분석기(Hemavet-R Mascot, USA)를 이용하여 총 적혈구수, 총 백혈구수, 혈구용적(packed cell volume, PCV), 혈색소(hemoglobin, Hb), 혈청 asparate aminotransferase(AST), 혈청 alanine aminotransferase(ALT),

혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN) 및 creatinine 함량 등 혈액학치 및 혈액화학치를 조사하였으며, 각 분석치의 유의성은 student t-test로 검정하였다.

병리학적 관찰

Lectin 접종 후 폐사한 자돈과 살처분된 자돈을 부검하여 각 실질장기 및 lectin 접종부위 근육조직을 채취하여, 통상적인 방법에 따라 10% 중성 포르말린으로 고정한 후 파라핀 포매 조직절편 재료를 제작하여 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 한 후 병리소견을 관찰하였다.

공시 백신

Lectin에 의한 오제스키 바이러스 백신의 특이면역 증강효과를 조사하고 동시에 기존 면역증강 물질인 $Al(OH)_3$의 면역증강 효과와 비교하고자 실험실에 보유하고 있는 오제스키 바이러스 NYJ1-87주를 공시하여 불활화백신을 제조하였다. 즉, NYJ1-87주를 Moenning [12]의 방법에 준하여 minimal essential medium으로 계대배양 되고 있는 porcine kidney 15(PK15) 세포에 감염시켜 37°C, 5% CO_2 배양기에서 3일 동안 증식시킨 후 세포를 몇 차례 동결, 융해시켜 바이러스를 수확한 다음 50% tissue culture infective dose($TCID_{50}$/m*l*) [13]를 산정하였다. 이어서 10^7 $TCID_{50}$/m*l* 수준의 바이러스액에 포르말린을 0.2% 되게 가하고 37°C에서 24시간 동안 교반하여 바이러스를 불활화 시켰다.

백신액 총량을 기준으로 불활화 바이러스액 34%에 자돈 1두에 1 m*l*를 접종할 때 체중 kg 당 0.7 μg이 접종되는 양의 lectin을 가하고 PBS(pH 7.2)로 100% 되게 충족시켜 lectin 혼합백신을 제조하였으며, 불활화 바이러스액 34%에 같은 농도의 lectin, $Al(OH)_3$ 32% 및 PBS 34%를 혼합시켜 lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신을 제조하였다. 동시에 불활화 바이러스액 34%에 $Al(OH)_3$ 32% 및 PBS 34%를 가하여 $Al(OH)_3$ 혼합백신을 제조하였으며, 불활화 바이러스 34%에 PBS로 100%되게 충족시켜 불활화 바이러스 단독백신을 제조하여 대조 백신으로 사용하였다. 이들 백신은 4°C에 보관하면서 공시하였다.

자돈 면역 및 항체 형성능 조사

혈청중화시험 [13]을 통하여 오제스키 바이러스에 대한 항체 음성임이 확인된 자돈 15두를 1개 군으로 하여 5개 군으로 구획하였다. 제1군에는 lectin 혼합백신, 제2군에는 $Al(OH)_3$ 혼합백신, 제3군에는 lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신, 제4군에는 불활화 바이러스 단독백신 각 1 m*l*를 경측부 근육에 주사하였다. 제5군은 멸균 PBS 1 m*l*를 접종하여 대조군으로 하였다. 접종 후 5주 동안 임상적으로 관찰하면서 접종 전, 접종 후 1주일 간격으로 각 군별 3두로부터 채혈(채혈 후 도태시킴)하여 중화 항체가 및 세포성 면역상태를 관찰하였으며, 4주째 채혈 직후에 Jestin *et al.* [9]의 방법에 따라 병원성 NYJ1-87주(10^6 $TCID_{50}$/m*l*) 1 m*l*를 비강내에 점적하여 공격시험을 실시한 후 감염 또는 생존 여부, 항체 보유수준 등을 조사하였다.

항체가 측정

백신 접종 후 자돈 혈청내 오제스키병 바이러스에 대한 중화 항체 소장여부 및 항체가를 조사하기 위하여, 혈청을 56°C, 30분간 비동화 시킨 후 2배 계단 희석하였으며, 96-well plate의 각 well에 배양시킨 PK15 세포에서 NYJ1-87주(100 $TCID_{50}$/m*l*)에 대한 혈청중화시험 [12, 13, 15]을 실시하였다. 항체가는 바이러스를 중화시키는 최고혈청희석농도의 $\log_2$ 값을 역수로 표시하였으며 각 혈청에 대하여 3회 반복 시험한 값의 평균을 산정한 후 컴퓨터 프로그램(Microsoft excel)으로 분석하였다.

세포성 면역상태 관찰

Yoo *et al.* [17]의 방법에 따라 백신 접종 후 자돈의 혈액을 채취하여 ACD 용액으로 항응고 처리한 후 혈액내 MHC class II 발현세포, CD2+, CD4+, CD8+, B 림프구(sIgM+), NK 세포 및 과립백혈구 등 면역세포 아집단의 분포비율을 돼지 백혈구 아집단 특이 단크론 항체 및 flow cytometry(FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry System, USA)를 이용하여 분석하였다.

결 과

돼지에 대한 lectin의 독성

자돈 각 12두에 대하여 체중 kg 당 7 및 30 μg의 lectin을 대퇴부 근육에 접종한 후 관찰하였을 때, 7 μg 접종군에서 폐사 예는 없었으나 접종 후 1일에 전 자돈에서 다리를 절고 전반적인 침울 증상을 나타내었으며 접종부위 근육의 부종과 피하출혈 소견이 관찰되었다. 30 μg 접종군에서는 전 자돈이 접종 후 16~20 시간 내에 호흡곤란, 발열, 전신 발적 및 피하출혈 소견을 나타낸 후 폐사하였다.

폐사 자돈의 병리학적 관찰에서 간 소엽의 중심성 울혈(Fig. 1), 지방구 출현(Fig. 2), 지방구의 크기 증가, 간세포의 괴사, 핵붕괴 및 핵소실(Fig. 3) 등 중독성 간염 소견이 있었다. 또한 신장에서 곡세뇨관 세포의 공포화 및 괴사, 사구체의 단백질 소실에 따른 초자적의 출현 소견(Fig. 4)이 관찰되었다. 또한 7 μg 접종군의 간과 신

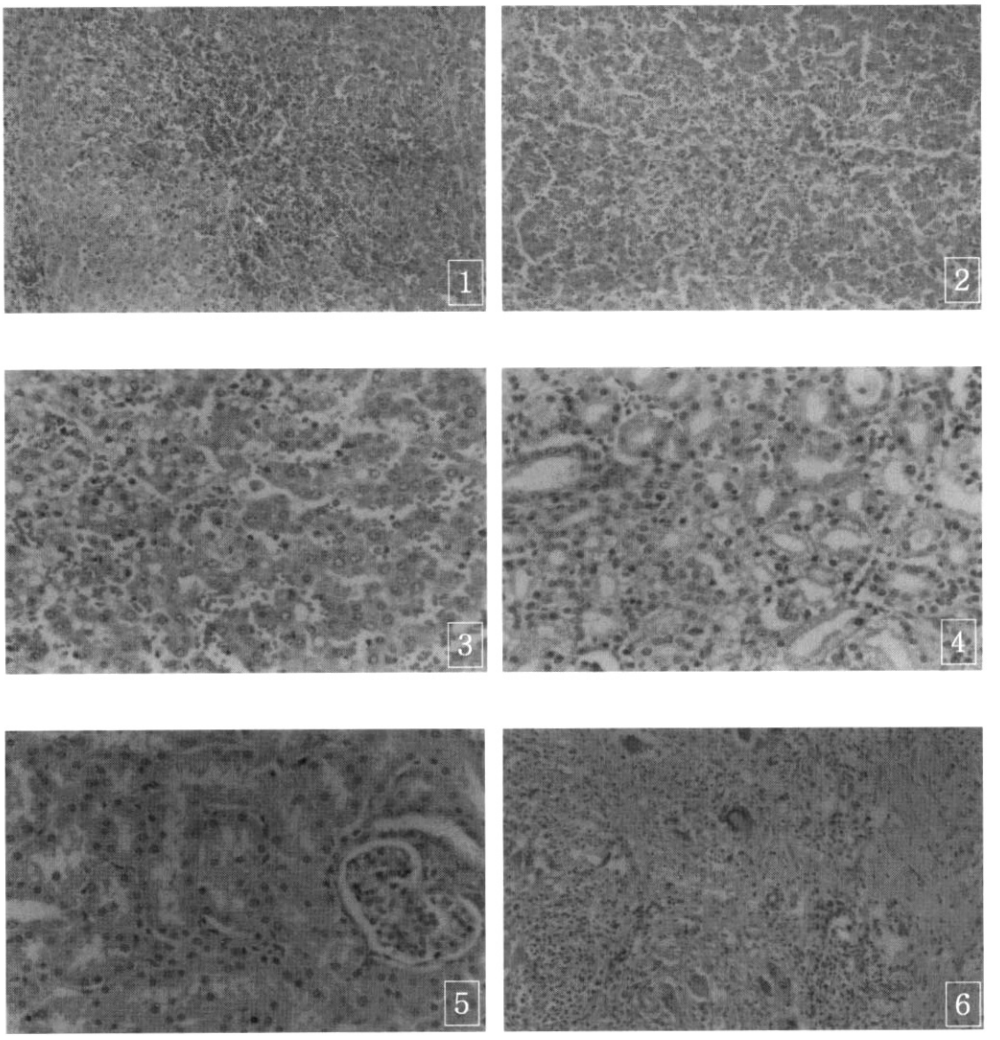

Fig. 1. Centrilobular congestion in liver of piglets died in 16-20 h by lectin with 30 μg/kg body weight. H&E, ×200.
Fig. 2. Fat granules in liver of piglets died in 16-20 h by lectin with 30 μg/kg body weight. H&E, ×200.
Fig. 3. Necrosis, karyorrhesis and depletion of nuclei in liver of piglets died in 16-20 h by lectin with 30 μg/kg body weight. H&E, ×400.
Fig. 4. Vacuolation and necrosis of cells in convoluted tubules and hyaline droplets in glomeruli of kidney of piglets died in 16-20 h by lectin with 30 μg/kg body weight. H&E. ×400.
Fig. 5. Swelling of tubular epithelia in kidney of piglets by lectin with 0.7 μg/kg body weight at 1 week. H&E, ×400.
Fig. 6. Necrosis of muscle fibers in piglets by lectin with 0.5 μg/kg body weight at 1 week. H&E, ×200.

장에서도 정도는 약하나 비슷한 소견이 관찰되었다. 한편 대조군은 전 실험기간 동안 임상적 및 병리학적으로 정상이었으며 생존하였다. 이와 같은 결과에서 체중 kg 당 7 및 30 μg 농도의 lectin은 돼지에 심한 독성을 나타내는 것으로 확인되었다.

따라서 lectin의 농도를 체중 kg 당 1, 3 및 5 μg으로 줄여서 각 1두의 자돈의 대퇴부 근육에 접종한 후 5일 동안 임상적 및 병리학적으로 관찰하였을 때, 접종 후 1일 째에 전 접종군에서 경증의 침울, 사료섭취 저하 소견이 있었으나 2일째에 회복하였다. 또한 5 μg이 접종된 자돈에서 다리의 강직과 걷기를 기피하는 소견이 있었으나 2일째에 회복하였다. 5일 후에 살처분하여 병리학적으로 관찰하였던바 전 접종군의 자돈의 접종부위 근육조직에서 육안적으로 충혈, 경결 및 회황색의 변색 소견이 인정되었다. 또한 병리조직 관찰에서 1 μg을 접종한 자돈을 제외하고는 정도는 약하지만 30 μg 접종시와

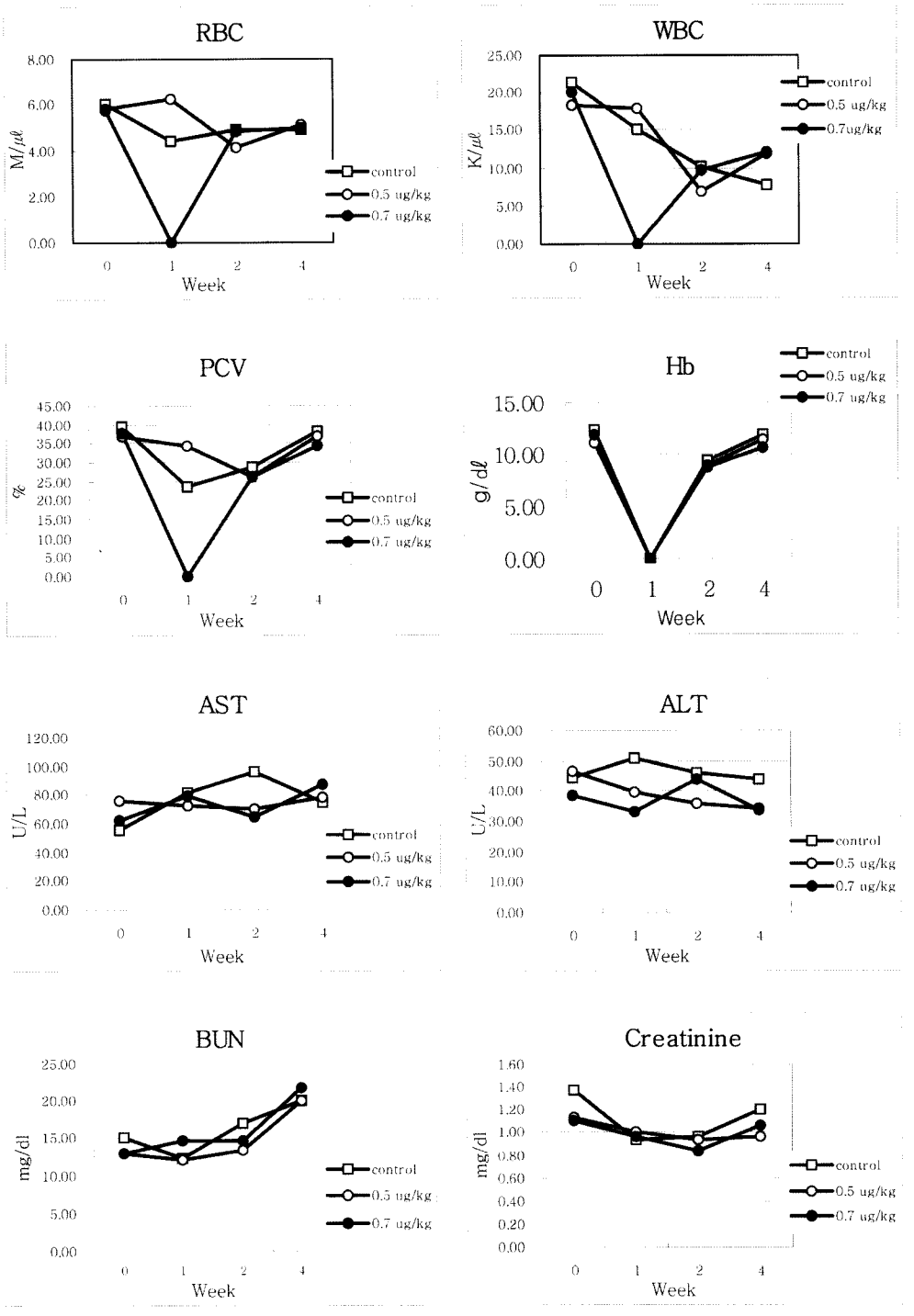

Fig. 7. Blood cell counts and chemistry values in piglets after administration of lectin with 0.5 and 0.7 μg/kg body weight.

비슷한 간과 신장의 독성 변화가 인정되었다. 한편 대조군은 전 실험기간 동안 임상적 및 병리학적으로 정상이었다. 그러므로 돼지에서 독성 유발이 최소화 될 수 있는 lectin의 양은 체중 kg 당 1 μg 이하인 것으로 추정되었다.

이와 같은 결과에 근거하여, 불활화 백신에 혼합하여

사용 할 때 돼지에서 독성을 나타내지 않을 lectin의 농도를 알기 위하여, 자돈 각 9두에 대하여 체중 kg 당 0.5 및 0.7 μg의 lectin을 경측부 근육에 접종한 후 4주 동안 임상 관찰하면서 1, 2 및 4주에 각 군당 3두에 대하여 혈핵학적 관찰 및 살처분하여 병리학적 소견을 관찰하였던 결과는 다음과 같다.

실험기간 동안 전 군의 자돈들은 임상적으로 정상이었고 폐사하는 예가 없었으며, 병리조직 소견에서는 0.7 μg 접종군의 경우 대부분 정상이었으나 접종 후 1주에 1 두의 신장에서 세뇨관 상피세포의 종창 및 공포변성이 인정되었다(Fig. 5). 또한 0.5 μg 접종군에서는 간과 신장의 조직소견은 정상이었으나 접종 후 2주까지 1두에서 접종부위의 근섬유 괴사 및 섬유소증식 소견이 관찰되었다(Fig. 6).

한편 혈액학적 관찰에서는 총 적혈구수, PCV, Hb 수

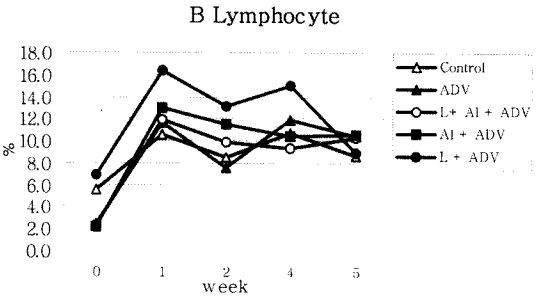

Fig. 8. Distribution rate of B lymphocytes(sIgM+) after different vaccinations: ADV, Aujeszky's virus; L, lectin; Al, $Al(OH)_3$.

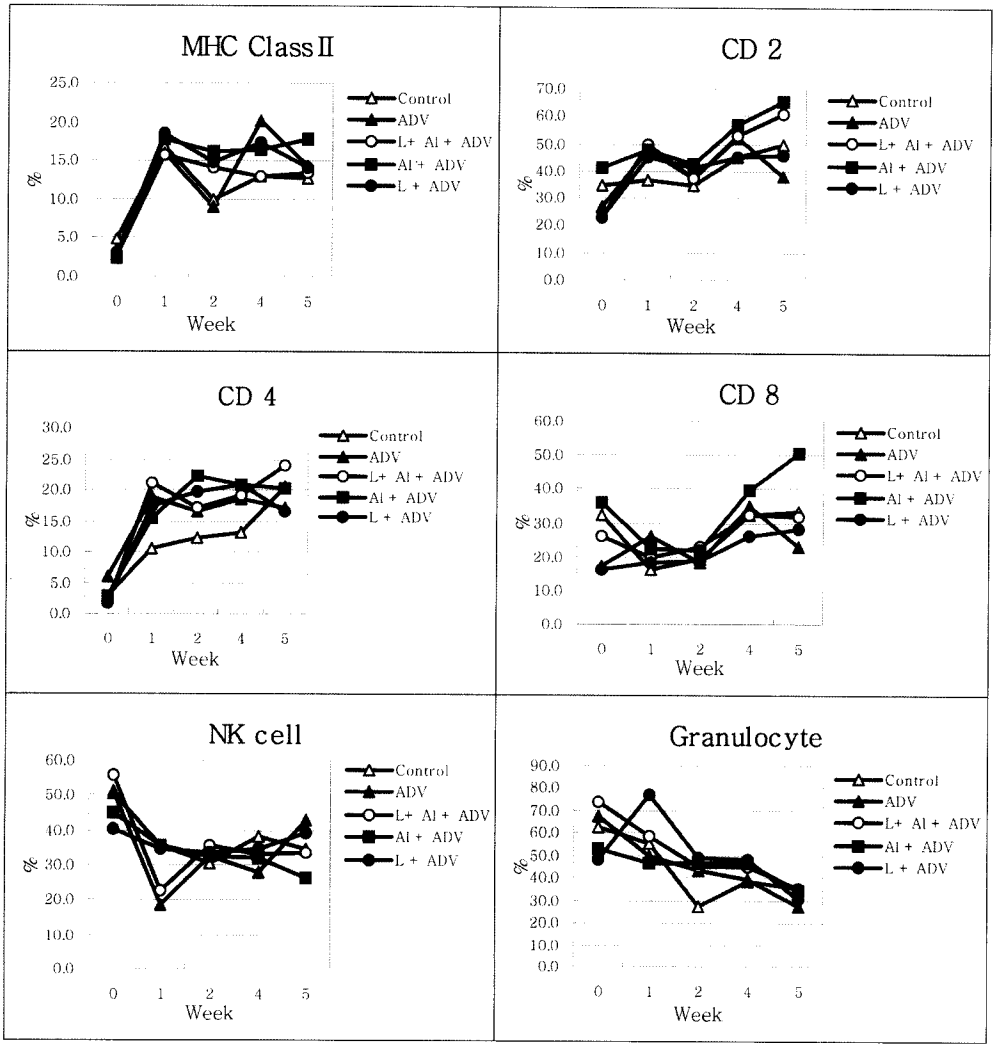

Fig. 9. Distribution rate of various immune cells after different vaccinations: ADV, Aujeszky's virus; L, lectin; Al, $Al(OH)_3$.

치는 접종 후 1주에 감소($p < 0.05$) 되었으나 이후 증가하였으며, 총 백혈구수는 전 기간 동안 감소되었고 4주째에 약간 증가하는 경향이나 정상 범위내의 변화인 것으로 인정되었다. BUN, creatinine, AST 및 ALT 수치도 정상 범위내의 변화 수준을 나타내어 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 7).

이상의 성적으로 볼 때 백신과의 혼합 투여시에 lectin의 독성이 배제될 수 있는 농도는 체중 kg 당 0.7 μg 이하로 판단되었으나, 면역효과 증강을 위한 최소한의 농도를 고려하여 추후 lectin의 백신내 혼합 양을 체중 kg 당 0.7 μg으로 결정하였다.

Lectin에 의한 오제스키병 예방 백신의 특이 면역 증강 여부

오제스키 바이러스 항체 음성 자돈 각 15두에 대하여 lectin(0.7 μg/체중 kg) 혼합백신, $Al(OH)_3$ 혼합백신, lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신, 불활화 바이러스 단독백신 1 m를 접종한 후 5주 동안 임상적으로 관찰하면서, 접종 전 및 접종 후 매주 각 군별 3두로부터 채혈하여 항체가 및 면역세포 아집단의 분포비율을 조사하였던 결과는 다음과 같다.

전 실험기간 동안 lectin 혼합백신 접종시에 B 림프구(sIgM+)의 분포비율만 타 백신 접종군보다 높았다(Fig. 8). 또한 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군과 비교할 때 MHC class II 발현세포의 분포비율은 4주까지 비슷하다가 5주에는 낮아지는 경향이었으나, 그 외의 면역세포 아집단은 $Al(OH)_3$ 혼합백신에서보다 낮았다(Fig. 9).

한편 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군과 lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군을 비교하면, $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군에서 MHC class II 발현세포, CD2+, CD4+, CD8+, B 림프구(sIgM+), NK 세포 및 과립백혈구의 분포비율 높았으며 특히 MHC class II 세포의 비율이 1주부터 상승하기 시작하여 5주까지 높은 분포를 나타내었다(Fig. 9).

Lectin 혼합백신에 의한 중화 항체가는 접종 후 1, 2, 3, 4 주에 각각 1.3, 3.0, 4.0, 3.0으로서 불활화 바이러스 단독백신에 의한 각 주별 항체가 1.0, 2.3, 3.3, 3.0과 차이가 인정되지 않았다. 이에 비하여 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 중화 항체가는 각각 2.0, 4.3, 5.7, 5.7의 수준을 나타내었으며, lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 중화 항체가는 2.0, 4.0, 6.0, 6.0으로서 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 항체가와 거의 동일하였다. 따라서 돼지에서 0.7 μg/체중 kg 수준의 lectin에 의한 오제스키병 백신의 면역증강 효과는 $Al(OH)_3$에 의한 것보다 낮았다. 공격시험 후 1주 경과한 5주째에 lectin 혼합백신에 의한 항체가는 5.0 수준으로서 불활화 바이러스 단독백신에 의한 4.0보다 약간 높았으며, $Al(OH)_3$ 혼합백신, lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 항체가인 7.7, 7.3보다 다소 낮은 경향을 나타내었다(Fig. 10). 전 실험기간 동안 임상적으로 lectin에 기인하는 이상 증상은 관찰되지 않았다.

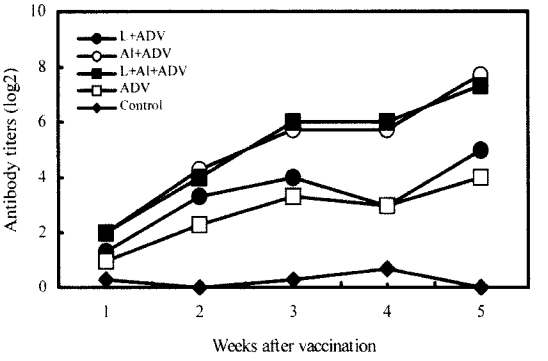

Fig 10. Comparison of neutralizing antibody titers in piglets immunized with vaccines of inactivated Aujeszky's disease virus in different adjuvants: ADV, Aujeszky's disease virus; L, lectin; Al, $Al(OH)_3$.

한편 백신접종 후 4주째에 공격시험을 한 후에 lectin 혼합백신 접종군의 3두 중 2두(66.7%), 불활화 바이러스 단독백신 접종군의 3두 전 예(100%) 및 백신 비접종 대조군의 3두 전 예(100%)가 1~2일 동안 설사 및 발열 소견을 보였으나 폐사한 예는 없었다.

고 찰

이 연구에서는 돼지 전염병 백신의 면역원성 증강 물질을 탐색하기 위하여, 한국산 겨우살이로부터 추출된 lectin의 오제스키병 백신에 대한 면역원성 증강 여부를 조사하였다. Lectin은 사람, 마우스 등에서 비 특이적인 면역 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 [3, 5-7, 10, 11, 18], 가축에서의 효과는 잘 밝혀져 있지 않으며 면역증강 효과에 전제되는 독성 여부도 불확실하다.

이 연구에서 lectin의 자돈에 대한 독성을 조사하였던 바, 돼지에 대한 lectin의 독성에 관한 선행 연구가 미비함으로 자돈에 대한 lectin의 최대 투여 양을 결정할 수 있는 근거 자료가 부족하여, 강 등 [1]이 추정하였던 생쥐에서의 LD_{50} 하한선(31 μg/체중 kg)에 상응하는 체중 kg 당 30 μg 수준으로 정하였다. 하지만 30 μg을 대퇴부 근육에 접종하였을 때 12두 모두에서 16~20 시간 내에 급성 호흡곤란, 발열, 전신 발적, 피하출혈과 함께 폐사하였으며, 병리조직학적으로 중독성 간염과 신장기능 이상 소견이 관찰되었다. 따라서 이 농도의 lectin은 자돈에 대하여 독성이 강한 것으로 판명되었다. 또한 접종양을 1/4 수준인 체중 kg 당 7 μg으로 하여 접종하였을 경우에도 폐사 예는 없었지만 접종부위 근육부종, 피하출혈 소견과 함께 절름발이 증상을 나타내었으며 정도

는 약하지만 중독성 간염 및 신장기능 이상 소견이 관찰됨으로서 상당한 수준의 독성이 인정되었다.

Lectin의 독성을 최소화 할 수 있는 농도를 조사하기 위하여 자돈 각 1두에게 체중 kg 당 1, 3 및 5 μg의 lectin을 대퇴부 근육에 접종하였을 때, 전 자돈에서 일시적인 침울 증상, 식욕저하 소견이 있었으며 5 μg 접종 자돈에서는 일시적으로 다리의 기능장애가 있었다. 또한 접종 양에 관계없이 접종부위 근육에서 육안적인 충혈, 경결, 변색 소견이 있었으며, 1 μg 접종 자돈을 제외하고는 간 및 신장에서 독성 변화가 인정되었다. 그러므로 돼지에서 독성 유발이 최소화 될 수 있는 lectin의 양은 체중 kg 당 1 μg 이하인 것으로 추정되었으며, 대퇴부 근육은 lectin 접종에 부적합한 부위인 것으로 생각되었다.

한편 본 실험실에서 각종 동물에 대한 lectin의 면역증강효과를 조사하기 위한 일련의 연구를 수행중인데, 본 연구에 앞서서 닭에서의 lectin에 의한 독성여부 및 면역증강효과를 조사한바 있다. 즉, 뉴캐슬병 바이러스 불활화백신에 lectin을 혼합하여 부화 후 1주령의 병아리에 접종 하였을 때, 체중 kg 당 4.4 μg 수준의 lectin이 독성 없이 면역증강 효과를 나타내었던 점(미발표)을 고려하면, 돼지가 닭보다 lectin의 독성에 아주 민감한 것으로 사료되었다.

따라서 추후 lectin을 백신에 혼합하여 돼지에서의 면역증강 효과를 조사할 때 독성 없이 효과를 나타낼 수 있는 lectin의 양을 조사하기 위하여 재 실험을 하였다. 자돈 각 9두에게 체중 kg 당 0.5 및 0.7 μg의 lectin을 경측부 근육에 접종하였을 때 전 자돈은 임상적으로 정상이었으며 혈액학치와 혈액화학치에서 이상변화가 인정되지 않았다. 이에 비하여 0.7 μg 접종군의 1 두에서 신장의 염증소견 및 0.5 μg 접종군의 1두에서 접종부위 근육의 염증소견이 관찰되었다.

현재까지 lectin이 돼지에 미치는 독성에 관한 선행 연구가 미진하여 비교, 평가할 수 없었지만, 이 연구에서 밝혀진 독성으로 볼 때 백신과의 혼합 투여 시에 lectin의 독성이 나타나지 않을 농도는 자돈 체중 kg 당 0.7 μg 이하인 것으로 판단되었다. 하지만 면역증강 효과를 위한 최소한의 농도를 고려하지 않을 수 없어서 추후 사용되었던 백신에 체중 kg 당 0.7 μg의 lectin을 혼합하게 되었다.

백신접종 후 면역세포 아집단의 분포비율을 보면 Lectin(0.7 μg/체중 kg) 혼합백신 접종시에 B 림프구(sIgM+)의 분포비율만 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종시보다 높았다. 또한 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군과 lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군을 비교할 때, $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군에서 대부분의 면역세포 아집단의 분포비율이 높음으로서 $Al(OH)_3$에 lectin을 추가하여도 lectin에 의한 부수적인 면역세포의 분화 자극효과가 나타나지 않음을 알 수 있었다.

한편 항원전달 세포로서의 기능을 나타내는 MHC class II 세포의 비율을 보면, $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종시에 1주부터 5주까지 높은 분포를 나타내었으며 lectin 혼합백신에 의하여도 4주까지는 비슷한 경향이었다. 이에 비하여 lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군에서는 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군보다 다소 낮은 경향을 나타내었던바, lectin에 의하여 $Al(OH)_3$의 MHC class II 세포 분화 자극작용이 저해되는 것으로 추측되었다. 하지만 이들 물질간의 상호작용에 대하여는 추후 체계적인 조사가 이루어져 할 것이다.

이러한 사실로 볼 때 체중 kg 당 0.7 μg 수준으로 낮은 농도의 lectin은 면역세포 중의 B 림프구(sIgM+) 분화에는 상당한 자극효과를 주지만 다른 세포의 분화에 대하여는 $Al(OH)_3$에 비하여 효과가 낮은 것을 알 수 있었다.

백신 접종 후 1~4주에 형성된 중화 항체의 수준을 보면 lectin 혼합백신에 의한 항체가는 1.3~4.0으로서 불활화 바이러스 단독백신에 의한 항체가(1.0~3.3)에 비하여 큰 차이가 없었으며, $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 항체가(2.0~5.7)보다 낮은 수준을 나타내었다. 또한 lectin 및 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 항체가(2.0~6.0)도 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 항체가와 거의 동일하여, 체중 kg 당 0.7 μg의 lectin으로서는 항체형성 자극능력이 $Al(OH)_3$보다 저조함은 물론 면역증강 효과가 나타나지 않았다.

한편 공격시험에서 lectin 혼합백신 접종군의 66.7%, 불활화 바이러스 단독백신 접종군의 100%에서 일시적인 설사, 발열소견을 보였으나 폐사한 예는 없었으므로 lectin 혼합백신에 의한 면역 후에 방어능을 인정할 수 있었다. 공격시험 후 1주에 lectin 혼합백신에 의한 항체가는 5.0으로서 불활화 바이러스 단독백신에 의한 4.0보다 약간 높았으며 공격 바이러스의 항원자극에 따른 booster 효과가 인정되었으나, $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 항체가(7.7)보다 다소 낮은 경향이었는데 이러한 현상은 기초면역에서 형성된 항체가가 반영된 것으로 추측되었다.

이상에서와 같이 lectin은 돼지에서 독성을 심하게 나타내며, 독성을 유발하지 않는 수준의 농도로서는 돼지 전염병 백신의 세포성 면역 및 항체성 면역의 증강 효과를 나타내기 어려운 것으로 사료되었다.

결 론

한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)로부터 추출된 lectin(KML-C)의 자돈에 대한 독성여부를 조사하고

백신에 대한 lectin의 면역증강 효과를 조사하여 기존 면역증강 물질인 $Al(OH)_3$에 의한 성적과 비교하기 위하여, 이들을 혼합시킨 돼지 오제스키병 바이러스(NYJ1-87) 불활화백신을 오제스키병 바이러스 항체 음성인 생후 4주령의 이유 자돈에 접종한 후 면역세포 분아집단의 분포상태, 중화 항체 형성능, 형성수준, 강병원성 바이러스에 대한 방어능력 등을 조사하였던 결론은 다음과 같다.

1. 체중 kg 당 30 μg의 lectin을 자돈 12두의 대퇴부 근육에 접종시에 전 자돈이 16~20 시간 내에 호흡곤란, 발열, 전신 발적, 피하출혈 소견 후 폐사하였고, 중독성 간염 및 신장기능 이상 소견이 관찰되었다.

2. 체중 kg 당 7 μg의 lectin을 자돈 12두의 대퇴부 근육에 접종시에 전 자돈의 접종부위 근육에서 부종과 피하출혈 소견, 침울, 절름발이 증상을 나타내었으며, 중독성 간염 및 신장기능 이상 소견이 관찰되었다.

3. 체중 kg 당 1, 3 및 5 μg의 lectin을 자돈 각 1두의 대퇴부 근육에 접종시에 전 자돈에서 침울, 사료섭취 저하 소견이 관찰되었으며, 5 μg 접종 자돈에서 다리강직 및 보행기피 소견이 관찰되었다. 또한 전 접종군의 접종부위 근육에서 충혈, 경결 및 회황색의 변색 소견이 관찰되었고, 1 μg을 접종한 자돈을 제외하고는 간과 신장의 독성 변화가 인정되었다.

4. 체중 kg 당 0.5 및 0.7 μg의 lectin을 자돈 각 9두의 경측부 근육에 접종시에 전 접종군의 자돈은 임상적으로 정상이었고 혈액학적 변화가 관찰되지 않았으나, 0.7 μg 접종군 1두의 신장에서 세뇨관 상피세포의 종창 및 공포변성과 0.5 μg 접종군 1두의 접종부위에서 근섬유 괴사 및 섬유소증식 소견이 관찰되었다.

5. Lectin(0.7 μg/체중 kg) 혼합백신 접종시에 B 림프구(sIgM+)의 분포비율이 $Al(OH)_3$ 혼합백신 접종군 및 대조군에 비하여 높았으나, $Al(OH)_3$에 lectin의 추가시에도 lectin에 의한 부수적인 면역세포의 분화 자극효과가 나타나지 않았다.

6. Lectin(0.7 μg/체중 kg) 혼합백신 접종시에 중화 항체가는 접종 후 1~4 주에 1.3~4.0으로서 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 항체가 2.0~5.7보다 낮은 수준이었고 불활화 바이러스 단독백신에 의한 항체가 1.0~3.3에 비하여 큰 차이가 없었다. 또한 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 lectin의 추가하여도 lectin에 의한 부수적인 항체 형성능의 상승이 인정되지 않았다.

7. 강병원성 바이러스에 의한 공격시험에서 lectin 혼합백신 접종군의 방어능은 인정되었으나 1주후의 항체가는 5.0으로서 불활화 바이러스 단독백신에 의한 항체가 4.0보다 약간 높았으며 $Al(OH)_3$ 혼합백신에 의한 항체가 7.7보다 다소 낮은 경향이었다.

감사의 글

이 연구를 위하여 혈액학적 검사를 수행하여 주신 경북대학교 수의내과학교실의 이근우 교수님, flow cytometer로 면역세포 아집단 분포상태 검사를 수행하여 주신 서울대학교 수의미생물학교실의 박용호 교수님과 병리조직 소견을 판독하여 주신 경상대학교 수의병리학교실의 김순복 교수님에게 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

1. **강태봉, 윤택준, 김종배, 송성규, 이관희, 곽진환**. 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)로부터 정제된 렉틴 성분 KML-IIU의 예비 독성 및 일반 약리시험. 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. **Becker H**. Botany of European mistletoe(*Viscum album L.*). Oncology, 1986, **43**, 2-7.
5. **Bloksma N, Dijk HV, Korst P, Willer JM**. Cellular and humoral adjuvant activity of Mistletoe extract. Immunobiol, 1979, **156**, 309-319.
6. **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.
7. **Fisher S, Scheffler A, Kabelitz D**. Stimulation of the specific immune system by mistletoe extracts. Anticancer Drugs, 1997, **8**, 33-37.
8. **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.
9. **Jestin A, Foulon T, Pertuiset B, Blanchard P, Labourdet M**. Rapid detection of pseudorabies virus genome sequences in biological samples from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification. Vet Microbiol, 1990, **23**, 317-328.
10. **Lavelle EC, Grant G, Pusztai A, Pfuller U, O'Hagan DT**. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. Immunol, 2000, **99**, 30-37.
11. **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.

12. **Moenning V, Woldensenbet P, Freg HR**. Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease in swine. Vet Rec, 1982, **30**, 264.
13. **Payment P, Trudel M**. Methods and techniques in virology. 1st ed. pp. 33, Marcel Dekker, New York, 1983.
14. **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.
15. **Schoenbaum NA, Beran GW, Murphy DP**. 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, 1990, **2**, 29-34.
16. **Tizard IR**. Veterinary Immunology: An introduction. 7th ed. pp. 256-258, Saunders, China, 2004.
17. **Yoo BW, Choi SI, Kim SH, Yang SJ, Koo HC, Seo SH, Park BK, Yoo HS, Park YH**. Immunostimulatory effects of anionic alkali mineral complex solution Barodon in porcine lymphocytes. J Vet Sci, 2001, **2**, 15-24.
18. **Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB**. Prophylactic effects 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.