

난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한 연구 III. 마우스에서의 방어 효과

신나리 · 김종만* · 유한상

서울대학교 수의과대학 및 농생명 공학부

*국립수의과학검역원 세균과

(2001년 8월 21일 게재승인)

Control of swine respiratory disease using egg yolk antibodies III. Immunoprophylactic effect of IgY in mouse model

Na-Ri Shin, Jong-man Kim*, Han-Sang Yoo

Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

*Division of Bacteriology and Immunology, National Veterinary Research and Quarantine Service,
AnYang 430-824, Korea

(Accepted by August 21, 2001)

Abstract : As an attempt to control respiratory disease in swine, specific immunoglobulin Ys (IgYs) against bacterial pathogens of the diseases were produced and specificity of the IgYs was analysed with Western blot in the previous studies. In this studies, the immunoprotective effects of produced IgY were evaluated in the mice. Mice were challenged with minimal lethal doses of *P multocida* 3A and 4D, *B bronchiseptica* and *A pleuropneumoniae* serotype 2 after intraperitoneal administration of IgY and the protectivity by IgY was dose-dependent at the concentration of 100, 200 and 400 mg/ml. These results suggested that IgY could be a potential immunoprophylactic candidates against those pathogens in swine and apply an effective source of passive immunity for other diseases in animals.

Key words : Immunoprophylaxis, IgY, mouse

서 론

감염성 질병의 예방 및 치료를 위한 대책으로서 오늘날까지 백신접종, 항생제 처치 등이 가장 일반적인 방법으로 사용되었으나 백신접종으로 인한 쇼크 등의 여러 가지 부작용이 나타나고^{1,2} 항생제에 내성을 나타내는 병원체의 출현^{3,4}으로 점차 새로운 예방 및 치료 방법의 모색이 요구되어져 왔다. 이러한 문제점에 대한 새로운 강구방안으로서 최근 항체를 이용한 수동면역에 의한 예방 방법의 사용에 관심이 집중되고 있다⁵. 수동면역은 예방이나 치료 양쪽 측면을 위해 사용가능하고, 즉시 효과를

나타내며 부작용이 거의 없으며 면역억제성 질병을 가진 환자나 환자의 연령 등 백신접종으로 적절한 면역반응을 유도할 수 없는 경우에도 효과적이다. 일반적으로 지금까지 치료의 목적으로 면역된 동물의 혈청을 주로 사용하였으나, foreign antibody의 clearance 증가, 과민반응 등이 주요한 문제점으로 지적되어 왔다. 사람의 경우에는 최근 human blood 유래 항체를 이용한 passive parenteral immunization이 세계적으로 널리 감염성 질병의 예방 및 치료를 위해 사용되고 있으나, 가축의 감염성 질병에서는 같은 species에서 항체를 생산하는 것은 생산 비용 및 생산량 측면에서 매우 비효율적이므로 항

본 연구는 농림기술개발사업(관리번호 198010-3), Brain Korea 21 및 서울대학교 수의과대학 수의과학연구소의 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Address reprints requests to Dr. Han Sang Yoo, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea (E-mail: yoohs@plaza.snu.ac.kr)

체로서 효과적이면서 많은 양을 생산할 수 있는 대체물질이 요구되어 왔다. 난황항체는 현재 매우 효과적인 polyclonal antibody로서 인정받고 있다⁵⁻¹⁴. 이러한 대체물질의 하나로서 난황항체는 백신접종으로 면역된 닭으로부터 오랜 기간 획득할 수 있으며, 한 개의 계란에 70-100 mg 정도의 항체를 포함하고 있고¹⁵ 닭은 매일란을 생산하므로 다량의 항체 생산이 가능하여 동물의 감염성 질병에 대한 예방 및 치료를 위한 좋은 source가 될 수 있다. 난황항체는 특히 동물 감염성 질병 중 소화기 질병에 관련하여 많은 연구가 되어 있으며 그 예로 신생송아지의 enteric colibacillosis에 대한 방어효과¹¹ 및 coronavirus에 대한 방어효과 연구¹³, 자돈의 enterotoxigenic *E coli*¹⁰ 및 porcine epidemic diarrhea virus¹⁶에 대한 방어효과 연구 등이 있다.

돼지의 세균성 호흡기 질병은 전세계적으로 양돈산업에 있어서 많은 경제적인 손실을 야기시켜 왔으나 현재 사용하고 있는 백신이나 항생제 치료만으로 그 근절이 매우 어려운 실정이다. 따라서 이러한 질병들에 대한 새로운 예방법 개발을 위해 이전 보고에서 난황항체를 생산을 위한 닭에서의 면역반응¹⁸ 및 특이성¹⁹을 조사하였다. 그러나 난황항체의 실질적인 field에서의 적용을 위해서는 생체내 효능에 관한 연구가 뒷받침되어야 하므로, 본 연구에서는 난황 항체를 생산 및 이용하기 위한 기초 연구로서 실험실 내 실험동물중 하나인 마우스에서의 방어능을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

난황항체 생산을 위해 사용한 실험동물로는 20주령의 백색 산란계를 사용하였으며, 난황항체의 방어효과를 조사하기 위한 실험동물로는 5주령, 체중 약 18-20 g의 ICR mouse를 사용하였다.

Gum solution을 이용한 난황항체의 대량생산

난황의 대량생산을 위하여 산란계를 면역은 이전의 보고¹⁸와 동일하게 시켰으며, 난황내의 항체가 일정 수준 이상 유지하고 있을 때란을 수집하였으며, 난황항체는 Hatta H 등의 방법¹⁵을 이용하여 추출하였다. 동물접종실험을 위한 난황항체의 대량 생산은 각 그룹마다란을 대량 수거하여 난황만을 분리한 다음, 동량의 멸균증류수를 가하여 30초간 homogenization 시킨 후 다시 0.1% carrageenan lamda solution(Gum solution, Sigma Co.)을 난황무게의 4배 만큼 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 30분간 실온에 방치한 다음 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상청액을 취하여 Whatman No. 1 filter로 여과한

후 여과액을 동결건조하여 냉장보관하면서 사용하였다.

난황항체의 분석

난황항체는 Marandi와 Mittal의 방법²⁰에 따른 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 purification 정도를 분석하였다. 즉, 12% polyacrylamide gel의 각 well 당 20 mg/ml의 sample을 동량의 loading buffer와 boiling 한 후 5 μ l를 loading하여 25 mA에서 150분간 전기영동한 다음 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 분리된 난황항체의 band를 확인하였다.

Mouse에서의 minimum lethal dose(MLD) 설정

돼지 세균성 호흡기 원인체들의 mouse에 대한 MLD를 구하기 위하여 사용한 균주는 국내 양돈장에서 돼지 호흡기 질병의 원인분석을 위하여 서울대학교 수의과대학 전염병학교실에 의뢰된 가검물로부터 분리동정한 야외 분리균주 *B bronchiseptica*, *P multocida* D:4 및 A:3, *A pleuropneumoniae*를 사용하였다.

이들 균주들은 Trytic soy broth (Difco Co, Detroit, MI, USA)에서 37°C 18-24시간 배양한 후 plate count method를 이용하여 균 농도를 측정한 다음 10배 단위로 균을 희석하여 마리 당 0.3 ml 씩 mouse 복강 내로, 각 희석농도마다 마우스 5수씩 접종하였다. 접종 3일 후까지 마우스의 폐사여부를 조사하여 각 원인체의 MLD를 결정하였다.

난황항체의 마우스에서의 방어능 조사

난황항체의 마우스에 대한 예방효과를 알아보기 위하여 gum solution을 이용하여 추출한 난황항체 powder의 protein 농도가 100, 200, 400 mg/ml가 되도록 PBS (pH 7.4)에 용해시킨 다음 5주령 마우스 복강 내에 0.3 ml 씩 24시간 간격으로 2회 접종한 후 24시간 후에 각 원인체를 최소치사농도가 되도록 PBS (pH 7.4)에 용해한 항체가 투여된 마우스 복강내에 0.3 ml 씩 접종하였으며, 대조군은 PBS (pH 7.4)를 접종하였다. 생균 접종 후 3일간 마우스를 관찰하면서 마우스의 폐사여부를 측정함으로써 방어능을 분석하였다.

결 과

난황항체의 대량생산

Gum solution을 이용한 난황항체 추출은 산란계 첫 백신접종 후 10주부터 2주 간격으로 3회 그룹별로 이루어졌으며, 2번, 3번 및 4번 그룹의 경우 각각 43, 56 및 59개, 5번 그룹의 경우 31개, 6번, 7번 및 8번 그룹의 경

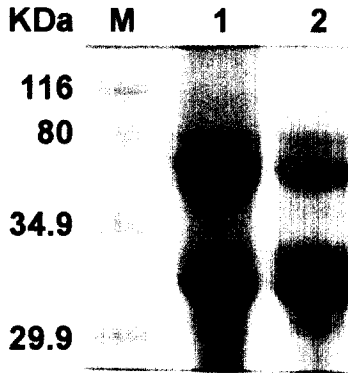


Fig 1. Electrophoretic analysis of immunoglobulin Y(IgY) purified from egg yolk of hens. Lane M : Molecular weight size marker, lane 1 : IgY extracted by using chloroform method, lane 2 : IgY extracted by using gum solution method.

우 각각 79, 120 및 102개의 계란을 수집 처리하여, 총 528개의 계란으로부터 총 23,620 ml의 난황항체를 추출 하였다.

추출한 난황항체의 분석

Chloroform과 gum solution을 이용하여 추출한 난황항체를 분석하기 위해 항체액에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과, 64.4 kDa과 32 kDa의 두 band가 순수하게 분리되는 것을 확인하였다(Fig 1).

돼지 호흡기 질병 세균성 원인체의 마우스에 대한 Minimal lethal dose(MLD) 설정

마우스에서 돼지 세균성 호흡기 질병 각 원인체의 MLD를 구하기 위하여 공격용 균주를 37°C에서 18-24 시간 배양한 후 원심 집중하여 10배 농도 단위로 희석하여 마우스에게 균 접종 실험을 실시한 결과, *P multocida* 4D에 대해서는 1.0×10^3 CFU가, *P multocida* 3A에 대해서는 1.0×10^4 CFU가, *B bronchiseptica*와 *A pleuropneumoniae* serotype 2에 대해서는 1.0×10^8 CFU가 MLD로 나타났다.

난황항체의 마우스에서의 방어효과

B bronchiseptica, *P multocida* 3A와 4D 및 *A pleuropneumoniae* serotype 2에 대하여 난황항체의 마우스 방어효과에 대한 실험을 실시한 결과는 Fig 2, 3, 4, 및 5와 같다. 즉, 모든 돼지 호흡기 질병 원인체에 대하여 PBS를 투여한 마우스는 투여 1-3일 사이에 모두 치사하였으며, 난황항체 투여 후 MLD의 병원체를 투여한 마우스는 난황항체의 농도 100 mg/ml 이상에서 방어효

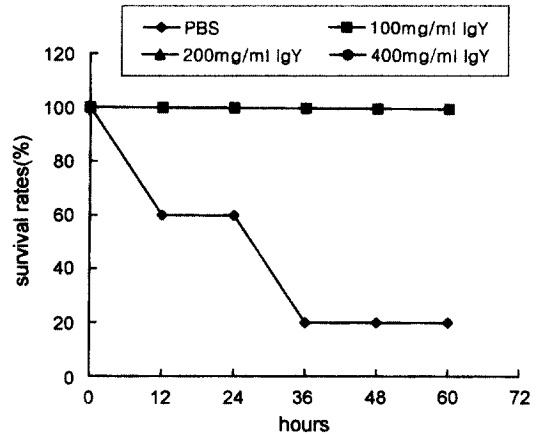


Fig 2. Protective effect of egg yolk antibody against *Bordetella bronchiseptica* in the mice. Mice were injected with 0.3 ml of 100, 200 and 400 mg/ml IgY twice in 24 hour-interval and challenged with 0.3 ml of 1×10^8 CFU/ml of *B bronchiseptica* per animal, intraperitoneally. Mice in control group were injected with 0.3 ml of PBS before challenge with *B bronchiseptica*. Survival was monitored for 3 days or until no further deaths.

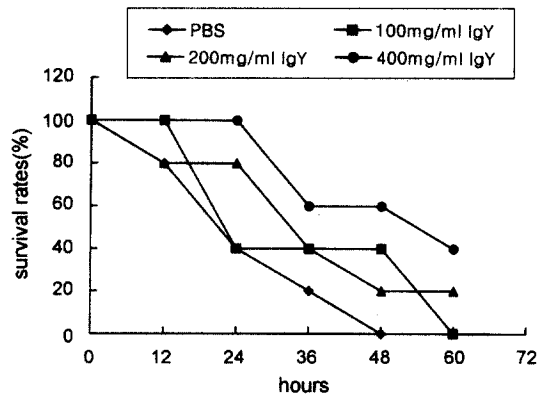


Fig 3. Protective effect of egg yolk antibody against *Pasteurella multocida* 4D in the mice. Mice were injected with 0.3 ml of 100, 200 and 400 mg/ml IgY twice in 24 hour-interval and challenged with 0.3 ml of 1×10^8 CFU/ml of *P multocida* 4D per animal, intraperitoneally. Mice in control group were injected with 0.3 ml PBS before challenge with *P multocida* 4D. Survival was monitored for 3 days or until no further deaths.

과를 나타내기 시작하였고 100, 200 및 400 mg/ml로 농도가 증가함에 따라 농도에 비례하여 방어효과도 증가하였다. *B bronchiseptica*의 경우 투여한 난황항체 추출액의 모든 농도에 대하여 모든 마우스가 생존하여 병원체에 대하여 높은 방어효과를 나타내었으며(Fig 2), 그

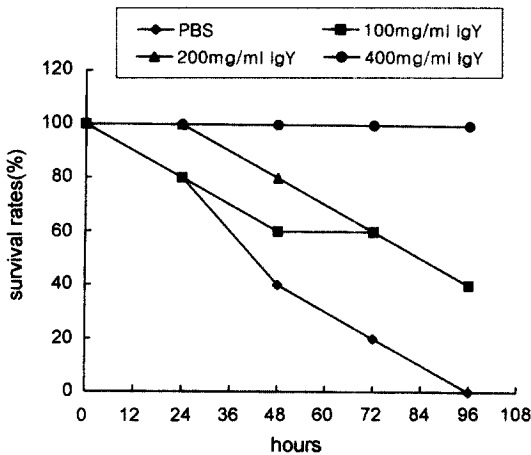


Fig 4. Protective effect of egg yolk antibody against *Pasteurella multocida* 3A in the mice. Mice were injected with 0.3 ml of 100, 200 and 400 mg/ml IgY twice in 24 hour-interval and challenged with 0.3 ml of 1×10^8 CFU/ml of *P. multocida* 3A per animal, intraperitoneally. Mice in control groups were injected with 0.3 ml PBS before challenge with *P. multocida* 3A. Survival was monitored for 3 days or until no further deaths.

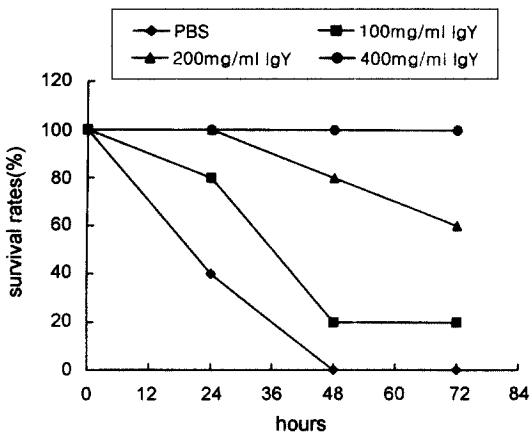


Fig 5. Protective effect of egg yolk antibody against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the mice. Mice were injected with 0.3 ml of 100, 200 and 400 mg/ml IgY twice in 24 hour-interval and infected with 0.3 ml of 1×10^8 CFU/ml of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 per animal, intraperitoneally. Mice in control groups were challenged with 0.3 ml PBS before challenge with *A. pleuropneumoniae* serotype 2. Survival was monitored for 3 days or until no further deaths.

에 비해 *P. multocida* 4D에 대해서는 고농도인 400 mg/ml에서는 공격 접종후 24시간까지는 100%의 높은 방

어 효과를 나타내었으나, 그 이후는 폐사가 시작되어 접종후 60시간 후에는 40%만이 생존하였다(Fig 3). *P. multocida* 3A에 대해서는 공격 접종후 60시간까지는 난황항체 접종군에서는 60% 이상의 생존율을 나타내었으나, 100과 200 mg/ml에서 균접종 96시간 이후 40%의 생존율을 보였고, 고농도인 400 mg/ml에서는 모든 마우스가 생존함으로써 100%의 우수한 방어효과를 나타내었다(Fig 4). *A. pleuropneumoniae* serotype 2의 경우 공격 접종후 24시간 후부터 폐사가 시작되어 공격 접종후 72시간에서는 100, 200 및 400 mg/ml 농도에서 각각 20, 60, 100%의 생존율을 보였다(Fig 5).

고찰

이전의 보고에서 국내외에서 문제시되는 돼지 호흡기 질병 원인체에 대한 난황항체를 생산하였으며¹⁸, 이렇게 생산된 난황항체의 투여한 항원에 대한 특이성을 조사 분석하였다¹⁹. 이를 바탕으로 본 연구에서는 실험동물중 하나인 mouse 접종시험을 통하여 *in vivo*에서의 난황항체의 효능의 조사 및 분석을 실시하였다.

난황항체의 마우스에서의 방어효과를 조사하기 위한 첫 단계로 난황항체를 대량생산하였다. 이전의 난황항체 추출에 사용하였던 chloroform은 독성물질이기 때문에 마우스 접종에 부적합하므로 여러 보고에 의해 제시된 난황항체 추출 방법들^{15,21-25} 중 large scale 생산에 적합하면서 생체에 부작용이 없는 방법^{15,25}을 선발하여 난황항체 대량생산에 적용하였다. Gum solution을 이용한 추출방법은 natural gum이 food ingredient로서 항체의 작용을 저해하는 지질제거에 효과적이며, chromatography나 dialysis 등의 시간적 소비가 많은 단계가 없고 절차가 간단하다는 점에서 다른 방법들에 비해 효과적이라고 사료된다. chloroform과 gum solution을 이용하여 추출한 난황항체를 분석하기 위해 추출항체액에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과, 64.4 kDa과 32 kDa의 두 band를 확인하였다. 두 band 중 64.4 kDa의 band는 IgY의 heavy chain으로, 32 kDa의 band는 IgY의 light chain으로 생각되며, 이는 이전 보고들^{15,24-27}과 일치하는 결과이다. 즉, 이러한 결과는 chloroform-extracted method 및 gum solution을 이용한 IgY 추출 방법이 난황항체를 추출하는 데 있어서 효과적임을 나타낸다.

마우스에서의 난황항체의 방어효과를 시험해 보기 위하여 MLD를 측정해 본 결과, *P. multocida*에 대해서는 낮은 농도에서도 마우스의 치사가 가능하였으며, 그 외 *B. bronchiseptica*와 *A. pleuropneumoniae*에 대해서는 1.0×10^8 - 10^9 CFU/ml로 고농도를 투여하여야 마우스가 모두 치사하는 것으로 나타났다. 이를 바탕으로 마우스

에서의 난황항체의 방어효과를 시험해 본 결과, *B bronchiseptica*에 대하여 난황항체를 적용한 마우스의 경우 접종한 모든 마우스가 생존하였으며, 이는 *B bronchiseptica*에 대한 방어효과가 다른 원인에 대한 방어효과보다 우수함을 의미한다. *B bronchiseptica*를 제외한 모든 마우스 실험군에 있어서는 난황항체의 농도 100 mg/ml 이상에서 방어효과를 나타내기 시작하였으며, 난황항체 접종농도 100, 200 및 400 mg/ml에 있어서 농도에 비례하여 방어효과를 나타내었고, 난황항체의 농도 400 mg/ml에서 접종한 모든 마우스에 대한 방어효과를 나타내었다. 이는 난황 ml 당 약 8-20 mg의 IgY가 포함되어 있으며²¹ 계란 한 개당 난황량이 약 20 ml 인 것을 고려해 볼 때 난황항체가 passive immunization 을 유도할 수는 있으나 고농도로 투여하여야 방어효과가 나타남을 의미한다. 이러한 결과에는 마우스의 접종에 의한 스트레스, 이물질에 대한 clearance 작용 등이 IgY의 균에 대한 방어효과를 저해하는 요인으로 작용할 수 있었을 것으로 생각된다. 또한 여러 실험 결과 닭에서의 항원 접종 후의 시기에 따라서 난황내 항체의 차이가 있기 때문에 난황추출을 위해 계란의 수집시기가 매우 중요하며 또한 지속적으로 높은 항체를 유지할 수 있는 방법의 강구가 요구된다. 그러나, 마우스는 목적동물이 아닐 뿐 아니라 호흡기 원인체를 복강에 접종함으로써 투여 경로 역시 실제 감염 경로와 상이할 수 있으므로, 난황항체의 정확한 돼지 호흡기 질병에 대한 예방 치료 효과를 조사해 보기 위해서는 목적동물인 돼지에서의 실험이 추가로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bhatia B, Mittal KR, Frey J. Factor involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet Microbiol*, 29:147-158, 1991.
2. Weltzin R, Monath TP. Intranasal antibody prophylaxis for protection against viral disease. *Clin Microb Rev*, 12(3):383-393, 1999.
3. Bogaard AEJM, London N, Stobberingh EE. Antimicrobial resistance in pig fecal samples from the Netherlands(five abattoirs)and Sweden. *J Antimicrob Chemother*, 45:663-671, 2000.
4. Wierup M. The control diseases in animals: alternatives to the use of antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*, 14:315-319, 2000.
5. 이남형, 노정해, 한찬규 등. 여러 가지 산란계 사료첨가제가 계란의 IgY 수준과 산란율에 미치는 영향. *한축지*, 41(2):155-166, 1999.
6. 이승배, 최석호, 고태송 등. 계란의 난황에서 IgY 항체 생산 및 특성에 관한 연구. *Korean J Food Sci Ani Resour*, 16(1):85-88, 1999.

7. Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunol*, 54:755-762, 1985.
8. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법개발 I. 대장균 pilus 항원과 LT로 면역시킨 닭의 면역반응. *대한수의학회지*, 38(4):829-836, 1998.
9. 우승룡, 김종만, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법 개발 II. 난황항체의 돼지대장균증에 대한 치료효과. *대한수의학회지*, 38(4):837-842, 1998.
10. Yokoyama H, Paralta RC, Diaz R, et al. Passive protective effect of chicken egg yolk Immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun*, 998-1007, 1992.
11. Ikemori Y, Kuroki M, Peralra RC, et al. Protection of neonatal calves against fatal colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*, 53(11):2005-2008, 1992.
12. Hatta H, Tsuda K, Akachi S, et al. Oral passive immunization effect of anti-human Rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci Biotech Biochem*, 57(7):1077-1081, 1993.
13. Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, et al. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet Microbiol*, 58:105-111, 1997.
14. Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel FB, et al. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet Rec*, 143(21):579-84, 1998.
15. Hatta H, Kim M, Yamamoto T. A novel isolation method for hen yolk antibody, "IgY". *Agric Biol Chem*, 54(10):2531-2535, 1990.
16. Kweon CH, Kwon BJ, Woo SR, et al. Immunoprophylactic of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *J Vet Med Sci*, 62(9):961-964, 2000.
17. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 31(4):268-74, 1997.
18. 신나리, 김종만, 유한상. 난황항체를 이용한 돼지호흡기 질병 방제에 관한연구. I. *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 주요 면역원 분석 및 IgY의 생산. *대한수의학회지*, 40(3):551-561, 2000.
19. 신나리, 김종만, 최인수 등. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한연구 II. 면역된 산란계로부터 생산된 난황항체의 특이성 분석. *대한수의학회지*, 41(2):197-202, 2001.
20. Marandi MV, Mittal KR. Identification and characterization of outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*

- serotype D by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, 33(4):952-957, 1995.
21. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulin from egg yolk: isolation and purification. *J Food Sci*, 57(3):629-634, 1992.
 22. Akita EM, Nakai S. Comparison of four methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods*, 160:207-214, 1993.
 23. Hanson P, Scoble JA, Hanson B, *et al.* Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods*, 215:1-7, 1998.
 24. Hassl A, Aspöck H. Purification of egg yolk immunoglobulins. *J Immunol Methods*, 110:225-228, 1988.
 25. 김종만, 우승룡, 권창희 등. 난황항체를 이용한 돼지 대장균설사증 방제기법 개발 II. 난황항체의 돼지 대장균증에 대한 치료효과. *대한수의학회지*, 38(4):837-842, 1998.
 26. Hsu E, Flajnik MF, Pasquier LD. A third immunoglobulin class in amphibians. *J Immunol*, 135(3):1998-2004, 1985.
 27. Shimizu M, Nagashima H, Sano K, *et al.* Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci Biotech Biochem*, 56(2):270-274, 1992.