

<원 저>

개 파보바이러스성 장염에 대한 난황항체의 예방 및 치료 효과

오경은^{1,†} · 정석영^{2,†} · 김보미³ · 장상호³ · 이남형³ · 조영재¹ · 김 두¹ · 최정훈¹ · 한태욱^{1,*}

¹강원대학교 수의과대학 및 동물의학중합연구소, ²강남동물병원, ³주에드바이오텍

(접수: 2013년 8월 22일, 수정: 2014년 3월 7일, 게재승인: 2014년 3월 17일)

Effect of chicken egg yolk antibody on canine parvoviral enteritis in pups

Kyung-Eun Oh^{1,†}, Seok-Young Jeoung^{2,†}, Bo-Mi Kim³, Sang-Ho Jang³, Nam-Hyung Lee³, Youngjae Cho¹,
Doo Kim¹, Jung Hoon Choi¹, Tae-Wook Hahn^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

²Gangnam Animal Clinics, 765-10, Seoksa-Dong, Chunchon 200-936, Korea

³ADBIOTECH Co., Ltd., Chunchon 200-883, Korea

(Received: August 22, 2013; Revised: March 7, 2014; Accepted: March 17, 2014)

Abstract : Preventive and therapeutic effects of egg yolk antibody, immunoglobulin Y (IgY), against canine parvovirus (CPV) was evaluated in 25 pups orally challenged with CPV-2a. Oral administration of IgY using powder, paste and coated paste delivery systems was compared. Each type of IgY was administered orally for 17 days from 3 days before challenge. The group of pups administered coated IgY showed mild symptoms such as a moderate decrease in total white blood cell count, no depression, vomiting and diarrhea when compared with other groups. The overall clinical score of the group of pups administered coated IgY was significantly lower than that of the challenge control group. However, mortality did not differ among groups because not all pups received symptomatic treatment. These results implied that oral treatment of coated IgY could improve therapeutic effects against CPV challenge if pups received symptomatic treatment.

Keywords : canine parvoviral enteritis, egg yolk antibody, immunotherapy, oral administration

서 론

개 파보바이러스성 장염은 단일 가닥(single strand) DNA 바이러스인 canine parvovirus(CPV)의 감염으로 발병되며 주로 6주에서 6개월령 이하의 면역력이 낮은 자견에게 감수성이 높다. 발병 시 침울, 구토, 출혈성 설사 및 백혈구 감소증을 동반하며 탈수와 다발성장기 손상에 인해 폐사율이 높은 전염병이다 [7, 19]. CPV는 1970년대 후반 개에게서 최초로 분리 보고되었으며 세계적으로 질병을 일으키는 원인체는 CPV-2 유형으로 확인되었다 [1]. 이어 1980년대 초반 CPV-2의 변이형인 CPV-2a와 CPV-2b가 분리되었고 최근에는 CPV-2b의 일부 유전자가 변형된 CPV-2c까지 보고된 바 있다 [3, 18]. CPV-2a는 인도, 독일 그리고 한국에서 유행하는 유전자형이며 CPV-2b는 미국, 태국과 일본에서 주로 분

리되는 유전자형이다. 최근 발견된 CPV-2c는 주로 유럽, 미국, 베트남과 일본에서 분리 보고되고 있다 [18, 25, 26]. 혈청학적 방법으로 교차 반응성을 확인하였을 때 현재 국내 백신주로 사용되고 있는 CPV-2는 CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c에 대하여 교차 반응성이 낮지만, 세 개의 변이형 간에는 충분한 교차 반응성이 나타난다고 보고되어 있다 [3, 8, 19].

CPV 감염은 모체이행항체가 백신접종을 간섭하는 시기에 특히 취약하다. 따라서 개 파보바이러스성 장염 예방을 위해서는 자견이 초유를 통해 모체이행항체를 충분히 전달받거나 백신접종으로 능동면역을 신속히 획득하는 것이 바람직하다. 하지만 모체이행항체를 통한 수동면역은 CPV 감염에 대한 방어 지속시간이 짧으므로 이유 시까지 충분한 질병 예방효과를 가지지 못한다 [5]. 또한 백신접종 시기가 부적절한 경우, 모체이행항체의 간섭효과에 의해 그 효과가 충분히

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8671, Fax: +82-33-244-2367

E-mail: twhahn@kangwon.ac.kr

[†]The first two authors contributed equally to this work.

유도되지 못해 감염에 취약하게 된다. 이 시기에 백신을 보조하는 예방제제를 통해 면역력을 높여 CPV 감염을 예방하는 것이 최선의 방법으로 추천된다.

현재까지는 CPV 감염에 대한 특별한 치료제가 없는 실정이며 대증치료를 하거나 CPV 면역혈청글로블린을 주사하여 수동면역을 유도하거나 인터페론을 이용하는 것이 임상적으로 흔히 사용되는 방법이다 [2, 16]. 하지만 다량의 CPV 면역혈청을 얻기 위해서는 많은 양의 혈액이 필요하며, 이에 따르는 비용과 문제점이 발생한다. 따라서 비용과 생산 효율성이 개선된 다량의 특이항체 생산 방법이 필요하다.

사람이나 동물의 혈액에서 항체를 추출하는 것보다 효율적인 방법은 계란의 난황을 이용하는 것이다. 특정 항원을 산란 중인 모계에 접종 시 모계에서 생성된 항체는 계란의 난황 중에 축적되어 자손에게 전달되며 이를 이용하여 난황으로부터 특이항체를 얻을 수 있게 된다 [11, 21]. 산란계에 항원 주입 시 이에 대항하는 특이항체인 Immunglobulin Y(IgY)가 생성되는데 IgY는 포유동물의 IgG와 매우 유사하여 수동면역을 유도하여 감염을 억제하므로 포유류의 질병예방에 적용 가능한 것으로 연구되었다 [8, 11]. 따라서 IgY는 치료제가 없는 바이러스성 질병예방에 효과적으로 적용할 수 있으며 항생제 남용과 항생제 내성 문제에서 벗어나 항생제의 대용제로 사용할 수 있다 [24]. 또한 IgY는 채란이 쉽고 항체의 분리가 간단하며 생산비용이 저렴하고 섭취 시 안정성이 높은 장점이 있다 [4, 8, 13]. 이미 난황항체를 이용한 질병의 치료나 예방에 관한 연구로 신생자돈 및 송아지의 소화기나 호흡기성 질병에 효과적으로 적용된 것으로 연구되었으며 개 코로나바이러스 및 CPV 감염에 대한 질병방제 및 치료제로도 효과적임이 증명되었다 [6, 10, 12, 17, 22, 23, 27].

본 연구에서는 자견에게 치명적인 CPV에 대한 난황항체를 생산하고 자견에 적용하여 난황항체의 개 파보바이러스 성 장염에 대한 예방효과를 알아보았다. 또한 난황항체 생산에 있어 분말 제제뿐만 아니라 페이스트(paste) 제제로 제형을 달리하고, 장내에 항체가 효과적으로 작용할 수 있도록 장용성 제재인 hydroxypropyl methylcellulose(HPMC)를 혼합, 코팅하여 질병예방에 최적인 제형 방법 또한 연구해 보았다. 특히 기존의 보고와는 달리, 임상증상의 관찰 항목을 상세화하고 혈액검사 및 분변검사를 통해 치료제와 생존을 뿐 아니라 백혈구 수치의 변화, 임상증상의 정도 등 다른 지표들과의 상관관계를 통해 IgY 투여군에 의한 개선효과도 관찰하였다. 결과적으로 IgY 투여군은 대조군과 비교하면 바이러스 배출이 지연되었으며, 특히 코팅제형의 CPV에 대한 임상증상의 완화가 뚜렷함을 확인하였다. 그러나 폐사율 감소로는 이어지지 못했으며 이를 위해 IgY 투여량의 증가와 대증치료를 병행하는 것이 필요한 것으로 나타났다.

재료 및 방법

실험동물

난황항체 생산을 위하여 22주령의 갈색 산란계를 사용하

였다. CPV에 대한 난황항체의 효능을 확인하기 위하여 공시한 실험군은 개시 체중 0.91 ± 0.32 kg의 2개월령 미만의 이 유 잡종 실험군 25두를 대상으로 하였으며, 23두의 수컷과 암컷 2두다. 실험군은 아래에 기술한 대로 CPV에 대한 사전검사 후 실험에 사용되었다. 본 실험은 강원대학교 동물실험윤리 위원회의 심의를 거쳐 적합성을 승인 받았다(승인번호 KW-130411-1).

난황항체 제조를 위한 산란계의 백신접종

CPV에 특이적인 IgY를 산란계에 제조하기 위해서, 우선 산란계에 접종할 CPV-2a를 A72 세포에 접종하여 37°C 5% CO₂에서 4일간 배양하였다. 이 배양액을 20°C에 얼렸다 녹였다 하는 과정을 3회 반복하고 원심분리하여 상층액을 수확하여 이를 바이러스 원액으로 간주하였다 [3]. CPV-2a의 역가는 $10^{4.7}$ TCID₅₀/mL 농도로 조정하였고 일반적인 방법으로, 포르말린(formalin)으로 불활성화 시킨 후 보조제로 ISA70(SEPPIC, France)과 3:7의 비율로 만들고 homogenizer를 이용하여 20분간 혼합하여 산란계 접종용 백신을 제조하였다. 제조된 백신은 22주령의 산란계 3두에 접종하였다. 백신접종은 제조한 백신을 두당 0.8 mL씩 접종하였고 1차 접종 후 2주 간격으로 접종 후 총 5차까지 접종하였다. 혈청과 난황 내 CPV에 대한 항체가를 측정하기 위해 7일 간격으로 채혈하고 난황을 수거하였다.

난황항체의 추출 및 제형

난황항체를 제조하기 위해 기존의 방법에 따라 수행하였다 [13, 14]. 백신을 접종한 산란계에서 낳은 계란을 수거한 후 난백과 알끈을 제거하여 난황을 분리하여 방부제(Sorbic acid, 0.1% 첨가)와 혼합한 다음 분무건조기로 분말화하였다. 생산한 난황분말에서 지질을 제거하기 위하여 생산된 난황분말과 1차 증류수를 1:10(v/v)으로 혼합한 후 1시간 정도 휘저은 후 혼합액을 pH 5.0으로 조정하였다. 지방과 단백질을 분리하기 위해 pH 5.0으로 조정된 혼합액을 4°C 조건에 2시간 정치 후 분리된 상층액을 수거하여 난황에서 순수한 단백질 수용액 층을 얻었다. 얻은 단백질 수용액을 분무건조기로 건조해 탈지 난황분말을 생산하였다. 백신접종 후 12주까지 수거한 난황항체의 CPV-2a에 대한 중화항체가가 80 이상인 난황을 합쳐 아래와 같은 제형으로 구분하여 제조하였다.

난황 단백질만을 정제한 난황분말을 원료로 페이스트(paste) 제형의 일반 경구용 제제와 페이스트 제형에 장 점막 코팅제를 첨가한 제제를 만들었다. 페이스트 제제는 생산된 난황분말과 프럭토올리고당(fructooligosaccharide, 50% 액상), 증류수를 각각 1:2:1 비율로 혼합하였고, 코팅제 첨가 제제는 난황분말에 장용성 제재인 HPMC 1%를 고르게 혼합하고 난황분말, 프럭토올리고당(50% 액상), 증류수를 각각 1:2:1 비율로 혼합하여 코팅 경구용 제제로 사용하였다.

IgY의 예방효과를 위한 자견에서의 실험계획

실험에 사용되는 자견의 CPV 사전 감염 여부와 모체이행

항체 수준을 판단하기 위해 개체 별로 사전검사를 하였다. 일반적인 신체검사에서 특이 임상증상이 없는지 확인한 후, 체중과 체온을 측정하고 분변 내 CPV 유무를 상용화되어 있는 진단 kit SNAP Canine Parvovirus Antigen Test (Idexx Laboratories, USA)로 검사하였고 채혈한 혈액으로 CPV에 대한 중화항체검사와 혈액검사(complete blood count, CBC)를 수행했다. 이와 같은 사전검사를 통해 CPV 음성인 2개월령 미만의 개체를 선별하고 이들 중 중화항체가 다소 높은(28 ± 33) 개체 5두를 정상군(normal)으로 분류하였다. CPV 음성이고, 중화항체가 전혀 없거나 매우 낮은 개체들은 바이러스 공격접종만 시행한 대조군(control) 5두, 난황분말 투여군(powder IgY) 5두, 난황페이스트 투여군(paste IgY) 5두와 장점막 제제가 코팅된 난황코팅 투여군(coated paste) 투여군 5두로 구분하였다. 물과 사료는 하루 두 번 급여하였다.

난황제 투여군은 공격접종 3일 전부터 투여하기 시작하여 공격접종 후 14일까지 각각의 군에 해당하는 제형의 난황항체를 오전과 저녁 2번에 걸쳐 1 g(IgY 함량 23 mg)을 경구로 투여하였다. 매일 자건의 체중, 체온 측정 및 분변과 전 반적인 상태를 관찰하였고, 공격접종일 이후 6일간은 매일 채혈하였다. 이후 14일째까지는 격일로 채혈하여 백혈구 추이를 분석하였다. 같은 일정으로 분변 내 CPV는 SNAP Canine Parvovirus Antigen Test를 사용하였다. 난황항체의 효과만을 살펴보기 위해 시험 중 CPV 등의 임상증상 치료를 위한 수액이나 항생제 등의 증상완화를 위한 대증치료는 실시하지 않았다. 바이러스 공격접종은 4시간 절식 후 CPV-2a 5 × 10⁶ TCID₅₀, 5 mL를 경구 접종하였다 [23]. 임상증상 결과는 Table 1의 점수표 [23]를 기준으로 임상증세의 정도에 따라 이를 점수화하여 기록하였다.

CPV의 중화항체검사

세포배양은 A72 세포주를 사용하였으며, CPV-2a를 A72 세포에 접종하여 증식시킨 후 역가를 측정하여 최소 10⁷ TCID₅₀/mL이 되게 조정한 후 중화항체검사의 바이러스로 사용하였다. 채취한 혈청을 1/10로 희석 후 2진 계단 희석하여 96-well microplate에 100 µL씩 분주하였다. CPV를 동량으로 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 중화 반응시킨 후 중화액 100 µL를 새로운 96-well plate에 옮긴 다음 A72 세포를 1 × 10⁴ 개(cell)/100 µL/well로 조정하여 각 well에 분주하였다. 37°C 5% CO₂에서 5~6일간 배양한 다음 간접형광 항체법으로 중화 항체를 측정하였다. 간접형광항체법은 배양 상층액을 버리고 세포를 cold 80% acetone으로 고정한 후, 1/500로 희석한 CPV monoclonal antibody(Catalog No. 9091, Median diagnostics; Korea)를 100 µL씩 각 well에 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 3~4회 세척한 다음 용액을 완전히 제거하였다. Goat anti-mouse IgG-FITC conjugated 용액(Catalog No. 55493, MP)을 1/200배 희석한 후 well당 50 µL씩 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 3~4회 세척하고 용액을 완전히 제거 후

Table 1. Score assignment scheme for clinical signs

Clinical sign	Score
Rectal temperature	
≤ 37.3°C	1
37.4~39.4°C	0
39.5~39.9°C	1
40.0~40.5°C	2
≥ 40.6°C	3
Stool	
Mucus in stool	1
Watery stool	2
Bloody stool	3
General conditions	
Anorexia	1
Depression	1
Lethargy	1
Vomiting	1
Coughing	1

Referred by Van Nguyen S *et al.* [23].

형광현미경으로 항체 존재 시 나타나는 특이 형광항체를 판독하였다. 백신접종에 의한 항체가는 최소 1:80 이상을 양성으로 간주하였다 [22].

통계분석

각 군간 임상증상의 차이 분석에 활용하였으며, SAS 9.3(SAS Institute, USA)으로 ANOVA test를 실시한 후 Dunnett's test로 다중비교하였다. 유의수준 $p < 0.05$ 를 통계적인 유의성으로 판단하였다.

결 과

임상증상

전체 시험기간 동안 자건에서 관찰된 임상증상을 Table 2에 요약 정리하였다. 정상군을 제외한 거의 모든 군에서 CPV 감염의 주요 임상증상인 설사, 식욕부진, 기력상실, 구토가 관찰되었으며 심한 백혈구 감소증(Table 3)과 저체온증으로 대부분 폐사하였다. 14일간의 시험기간 동안 정상군, IgY를 투여하지 않고 공격접종만 한 대조군 및 IgY 투여군 모두에서 점액이나 혈액이 포함된 액상의 묽은 변이 유사하게 나타났다. 활력에서는 대조군과 난황분말 투여군에서 전 개체에 식욕저하가 나타났지만, 난황페이스트 투여군과 난황코팅 투여군에서는 20%, 60%로 다소 감소하는 경향을 보였으며 특히 난황코팅 투여군에서는 폐사 전일 하루만 식욕감소가 관찰되었다. 또한 난황페이스트 투여군에서는 침울, 난황코팅 투여군에서는 침울 및 기면이 관찰되지 않았다. 반면 대조군과 난황분말 투여군에서는 침울 80% 이상, 기면 40% 정도 관찰되었다. 공격접종 이후부터 최종일까지의 체중변화

Table 2. Comparison of clinical signs after challenge with CPV-2a

		Normal	Control	Powder IgY	Paste IgY	Coated IgY
Stool*	Mucus	2/5(40)	4/5(80)	4/5(80)	2/5(40)	5/5(100)
	Watery	5/5(100)	1/5(20)	3/5(60)	4/5(80)	3/5(60)
	Bloody	5/5(100)	2/5(40)	2/5(40)	4/5(80)	2/5(40)
Condition*	Anorexia	0/5(0)	5/5(100)	5/5(100)	1/5(20)	3/5(60)
	Depression	0/5(0)	4/5(80)	5/5(100)	5/5(100)	0/5(0)
	Lethargy	0/5(0)	2/5(40)	2/5(40)	0/5(0)	0/5(0)
	Vomiting	0/5(0)	3/5(60)	3/5(60)	3/5(60)	2/5(40)
	Coughing	1/5(20)	1/5(20)	2/5(40)	0/5(0)	0/5(0)
	BWG [†] (Kg)	+0.34	-0.06	-0.12	-0.15	+0.01
	Temperature*	≤ 37.3°C	0/5(0)	5/5(100)	3/5(60)	2/5(40)
	≥ 39.5°C	0/5(0)	2/5(40)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)
Clinical Score		5.0	18.2	14.0	12.0	9.4 [§]
Death*		0/5(0)	4/5(80)	4/5(80)	5/5(100)	4/5(80)
Death date after challenge [‡]		-	8.3 ± 1.9	5.0 ± 1.8	7.8 ± 1.8	7.0 ± 3.4
Virus detection date after challenge [‡]		-	2.6 ± 2.0	1.4 ± 0.6	3.8 ± 1.3	3.8 ± 3.8
Duration of virus shedding [‡] (days)		-	4.4 ± 1.9	4.4 ± 2.3	4.0 ± 1.2	2.4 ± 1.8

*Number of pups with clinical signs/total number of pups in group (%). [†]Body weight gain after challenge. [‡]Data are presented as the mean ± SD. [§]Significantly different from the value for the control group at $p < 0.05$. CPV: canine parvovirus.

Table 3. Trend of leukocyte count ($\times 10^3/\mu\text{L}$) following CPV-2a challenge

Group	Pup	Base (d-3 + d0 [*])/2	d1	d3	d5	d8	d12	d14
Normal	A	16.6	21.8	13.6	24.0	18.4	16.5	12.9
	B	14.3	18.8	26.4	24.7	25.5	16.6	14.5
	C	11.6	7.9	10.7	17.3	20.8	17.5	13.4
	D	16.9	10.7	14.7	12.1	15.2	15.1	11.3
	E	17.4	24.9	19.5	22.4	18.0	20.4	31.7
Control	A	13.5	14.0	14.5	10.9	N/A		
	B	20.7	17.8	24.3	15.2	9.4	14.6	20.8
	C	9.0	12.0	15.2	10.7	N/A		
	D	13.9	17.0	11.3	10.4	N/A		
	E	12.9	11.1	13.4	9.5	2.3	N/A	
Powder IgY	A	11.1	10.0	N/A				
	B	9.4	17.1	0.8	N/A			
	C	11.0	11.5	8.8	12.6	3.9	11.2	22.4
	D	15.2	16.2	37.2	23.9	N/A		
	E	16.2	18.8	25.5	25.0	N/A		
Paste IgY	A	8.0	12.3	14.1	2.8	N/A		
	B	14.6	22.9	13.4	N/A			
	C	12.4	12.2	13.2	10.4	5.3	N/A	
	D	9.0	10.2	9.4	11.7	0.7	N/A	
	E	9.7	8.2	10.6	10.2	2.6	N/A	
Coated IgY	A	16.2	12.9	4.5	N/A			
	B	16.8	15.6	13.3	9.5	N/A		
	C	24.3	19.5	29.8	22.2	11.0	N/A	
	D	12.7	27.6	27.4	22.3	24.1	10.8	16.2
	E	20.0	14.2	N/A				

*d0: CPV challenge day. N/A; Not available data due to death.

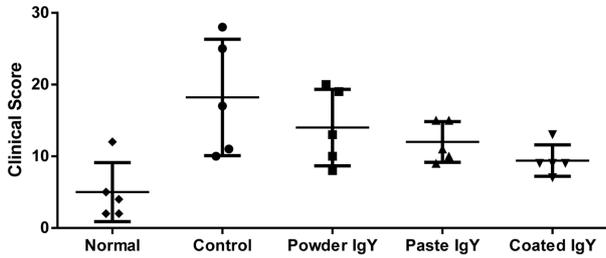


Fig 1. Comparison of groups for clinical response to CPV2a challenge and treatment with IgY.

에서는 난황코팅 투여군만이 감소하지 않고 다소 증가하였다. 체온변화의 경우 37.3°C 이하의 저체온은 대조군에서 전 두수에서 관찰되었으나 난황분말 투여군에서는 3두, 난황코팅 투여군에서는 2두, 난황코팅 투여군에서는 3두가 관찰되었다. 또한 39.5°C 이상의 고체온은 대조군에서만 2두가 관찰되고 나머지 치료군에서는 나타나지 않았다. 위의 임상증상을 기준으로 나타낸 점수총합의 각 구간 평균은 정상군이 3.6 ± 4.1 점, 대조군이 18.2 ± 8.1 점, 난황분말 투여군이 14.0 ± 5.3 점, 난황페이스트 투여군이 12.0 ± 2.8 점, 난황코팅 투여군이 9.4 ± 2.2 점으로 난황코팅 투여군의 임상증상의 심도가 대조군과 비교해 50% 이하로 통계적으로도 유의한 차이를 보였다. 따라서 종합적인 임상증상 점수를 기준으로 볼 때 난황 투여군이 대조군보다 임상증상에서 완화효과를 보이는 것으로 확인되었고 제형별로는 난황코팅 투여군이 임상증상 개선효과가 뛰어났다.

치사율

난황제제 투여군과 대조군 사이에 임상증상의 정도에는 유의성 있는 차이를 보였으나, 치사율은 대조군, 난황분말 투여군, 난황코팅 투여군에서 군당 5두 중 4두가 폐사하여 80%의 치사율을 보였으며 난황페이스트 투여군에서는 5두 모두 폐사하였다. 폐사는 공격접종 이후 5일~8일 사이에 주로 나타났다.

분변 내 바이러스 항원 검사 결과

분변 내 바이러스 검출 시기는 대조군이 2.6일, 난황분말 투여군이 1.4일, 난황페이스트 및 난황코팅 투여군이 3.8일 후로 나타났다. 공격접종 후 바이러스 배출기간은 대조군 및 난황분말 투여군, 난황페이스트 투여군에서 4.2일 정도로 관찰되었고 난황코팅 투여군에서는 2.4일로 이들 정도 짧게 바이러스를 배출하였다.

총 백혈구수의 변화

Table 3에서 나타낸 시험기간 내 자견의 총백혈구수 추이를 보면 공격접종 이후 2~3일 이내에 염증반응이 진행되며 최대 3.7×10^4 개/ μ L까지 증가하는 양상을 보이다가 항체가 가장 높아지는 시점에서 기간 중 최저 백혈구 수치로 떨어진다. 생존 개체는 이 시점에서 다시 증가하였으나 폐사 개체는 이를 극복하지 못하고 떨어진 후 1~2일 이내에 폐사

하였다. 난황코팅 투여군의 경우 대조군이나 난황분말 및 난황페이스트 투여군보다 폐사 직전 총백혈구수의 감소 정도가 완만하게 떨어지는 양상을 보였다.

고 찰

CPV에 대한 난황항체의 효과와 관련하여 발표된 기존 연구에 따르면 경구용 예방제제로서의 CPV 특이 IgY는 CPV 감염은 방어하지 못하지만 임상증상의 발현을 억제 또는 완화했다 [23]. 기존의 연구에서도 대증치료는 병행하지 않았으며 임상증상을 관찰하고 중화항체가 검사를 진행하였다. 그 결과 CPV 공격접종과 대조군에서도 폐사 개체가 없었는데 그 원인으로 공격접종 한 CPV의 병원성이 낮았음을 지적했다. 기존에 발표된 다른 연구보고에서는 초유가 결핍된 신생자견을 대상으로 한 난황항체의 경구투여 실험에서 난황항체를 급여하지 않은 공격접종군은 7마리 중 6마리가 폐사한 데 비해 난황항체 투여군은 폐사가 없었으며 소수의 자견에서 임상증상만을 나타냈다고 보고하였다 [17]. 이 경우에는 자견이 태어난 즉시 모체로부터 격리하여 3일간 우유와 IgY를 경구투여하였다. 신생자견의 장폐쇄(gut closure) 전에 투여한 IgY가 장에서 혈액으로 흡수 항체를 생성하여 CPV를 효과적으로 방어한 경우였다. 또 다른 기존 연구에서는 난황항체의 주사제형과 경구제형으로 비교한 결과를 보고하였는데 CPV 감염증에서 IgY 주사제제의 치료율이 81.6~86.7%인데 반해 경구용 IgY 분말제제는 20.8%로 낮게 나타나는 것으로 발표하였다 [15].

본 실험의 결과 IgY 투여군은 대조군과 비교하면 바이러스 배출이 늦어짐을 확인할 수 있었다. 이는 초기 소장 점막에 머물러 있던 IgY가 CPV를 중화시켰기 때문에 감염이 지연되고, 분변 배출이 늦어진 것으로 생각한다. 그러나 IgY의 투여량은 일정하고 투여한 IgY가 공격접종 한 바이러스를 모두 중화시키지 못했기 때문에 일정 시간 후 바이러스 증식이 일어나 질병을 유발한 것으로 판단된다. 폐사율을 유의적으로 줄이기 위해서는 장폐쇄 이후의 IgY 경구투여가 혈중 항체 생성을 하지 못하는 한계점을 고려하여 IgY의 투여량을 충분히 증량하고, 동반한 설사, 구토에 인한 탈수교정과 백혈구 감소에 따른 2차 감염 예방을 위한 항생제 처치 등의 대증치료를 병행할 필요가 있다. 또한 제형 중에 난황코팅 투여군이 대조군이나 난황분말 및 난황페이스트 투여군보다 임상증상 완화, 총백혈구수의 완만한 하락, 생존기간 연장 등 증상이 개선되었다. 특히 난황코팅 투여군에서는 기력 저하나 식욕저하가 관찰되지 않았고, 체온이 안정적으로 유지되었다는 점이 주목할 만하다.

또한 난황분말 투여군이나 난황페이스트 투여군에서 CPV의 예방 또는 치료 효과가 거의 없는 것으로 본 연구에서는 확인되었는데 이는 동일한 제형의 난황투여군에 대한 기존의 연구 결과와는 정확히 반대된다. 더욱이 난황분말 투여군의 경우 공격접종 후 바이러스 검출일과 폐사 시기가 유의적인 차이는 아니나 대조군보다 빠르게 나타났다. 요인으로

난황항체의 양이나 접종 빈도가 방어효과를 나타낼 수 있을 만큼 충분하지 않았을 가능성과 본 연구에서 사용된 CPV의 병원성이 일반적인 자연감염의 경우보다 강했을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 아울러 난황분말의 경우 위산에 의해 파괴되어 장으로 충분히 이행되지 않았기 때문으로 생각한다. 다만 본 실험에서 CPV 항체가 없는 일반난황분말을 급여한 플라시보대조군을 설정하지 않아 IgY가 들어있지 않은 난황분말 투여군과의 비교가 어려운 점은 보완해야 할 사항이라고 할 수 있다. 또한 위 두 가지 제형의 방어효과가 모두 낮게 나타난 이유는 일반적으로 IgY가 단백질이므로 위에서 위산에 의해 분해가 되어 CPV의 목표부위인 소장까지 충분한 양이 도달되지 못하기 때문이며 [28], 따라서 IgY는 경구 투여 시 위산에 분해되지 않고 통과되도록 제형 및 pH를 고려해야 한다고 판단된다. 본 실험에서도 제형 중 난황코팅 투여군이 대조군보다 50% 이하로 통계적으로도 유의한 차이를 보이며 임상증상의 개선을 보였다. 또한 위산에서 IgY가 무력해지는 것을 방지하기 위해 기존 연구 [17]에서는 pH9.6의 carbonate-bicarbonate buffer 1mL를 IgY 주입 전, 먼저 투여하였다.

CPV 감염을 억제하기 위해서는 공격적접종 된 CPV를 충분히 중화시키기 위한 IgY가 장내에 있어야 한다. 본 연구에서는 1g씩 하루 2회 투여로 하루 총 2g의 IgY를 투여하였다. 대부분의 연구에서 회당 0.6~2g의 IgY를 투여하였고, 한 연구 [23]에서는 분말 IgY를 2g씩 하루 3회, 하루 총 6g을 투여하기도 하였다. 폐사를 줄이지 못한 요인 중 하나로 IgY의 양이 CPV를 중화시키기에 충분치 못했음을 생각해 볼 수 있다. 그 결과 초기에는 난황코팅제 투여군에서 바이러스의 분변 내 검출이 지연되고 임상증상의 경과가 완만히 진행되었으나 폐사한 것으로 생각한다. 본 연구의 결과로는 장용성 제제로 코팅된 IgY가 분말이나 페이스트 제형보다 통계적으로 유의한 차이로 방어효과가 좋은 것으로 나타났다. 본 연구는 CPV 중에서 국내에서 가장 유행하는 CPV의 유전형인 CPV-2a를 사용했다는 점, 3가지 제형 별로 경구용 IgY를 비교 분석했다는 점, 다양한 임상항목을 조사했다는 점이 기존의 연구와 다른 차별성을 가지고 있고, 이를 통해 난황코팅제제가 임상증상을 가장 많이 완화하는 것으로 나타났다. 본 연구를 통해 기존의 연구와는 다르게 IgY를 예방제로 단독 사용하기에는 그 효능이 미비할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 IgY를 자견에게 널리 쓰기 위해서는 위산에 분해되지 않도록 pH를 고려하고, 제형에 변화를 주는 등 효능을 극대화할 방안이 추가로 진행되어야 할 것이며 난황항체의 투여와 대증치료를 병행하여 대조군과 방어효과를 비교 규명할 필요가 있다. 또한 본 연구는 일반적인 난황을 투여한 플라시보군을 설정하지 않은 한계점을 가지고 있다.

아울러 난황항체는 경구용 제제보다 주사제로서 치료효능이 뛰어난 것으로 보고되고 있기 때문에 [15] CPV에 대한 직접적인 치료제가 없는 상황에서 근육이나 피하 주사용 IgY 치료제 연구는 CPV에 대한 피해를 크게 줄일 수 있을 것으

로 판단되며 주사제로서의 효능연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 CPV 이외에 개 코로나바이러스 등과 같은 직접적인 치료제가 없는 자견의 바이러스성 질병에 IgY 특이항체를 통한 적용이 가능할 것으로 판단되며 [6] 이러한 난황항체의 투여와 대증요법의 병행이 자견의 임상증상 완화와 폐사를 많이 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산업통산자원부와 한국산업단지공단의 산업집적지 경쟁력 강화사업 중 생산기술사업화 현장맞춤형 부분 지원사업으로 수행된 연구결과 이고 강원대학교 동물의학종합연구소의 기술적 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Appel MJG, Cooper BJ, Greisen H, Scott F, Carmichael LE. Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritis. *Cornell Vet* 1979, **69**, 123-133.
2. Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. *N Eng J Med* 1991, **325**, 252-264.
3. Cavalli A, Martella V, Desario C, Camero M, Bellacicco AL, De Palo P, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C. Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clin Vaccine Immunol* 2008, **15**, 534-539.
4. Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J* 1990, **4**, 2528-2532.
5. Heddle RJ, Rowley D. Dog immunoglobulins. I. Immunochemical characterization of dog serum, parotid saliva, colostrum, milk and small bowel fluid. *Immunology* 1975, **29**, 185-195.
6. Han S, Zhang X, Zhao J. Production of egg yolk antibody (IgY) against recombinant canine parvovirus VP2 protein. *Acta Sci Vet* 2012, **40**, 1029.
7. Hoskins JD. Canine viral enteritis. In: Greene CE (ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2nd ed. pp. 40-49, WB Saunders, Philadelphia, 1998.
8. Janson AK, Smith CIE, Hammarström L. Biological properties of yolk immunoglobulins. *Adv Exp Med Biol* 1995, **371**, 685-690.
9. Kang BK, Song DS, Lee CS, Jung KI, Park SJ, Kim EM, Park BK. Prevalence and genetic characterization of canine parvoviruses in Korea. *Virus Genes* 2008, **36**, 127-133.
10. Kim J, Woo S, Kweon C, Kim J, Huh W. Development of preventive method for enterotoxigenic colibacillosis using egg yolk antibodies. II. Therapeutic effect of egg yolk antibodies against colibacillosis of piglets. *Korean J Vet Res* 1998, **38**, 837-842.
11. Kovacs-Nolan J, Mine Y. Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian Poult Biol Rev* 2004, **15**, 25-46.
12. Kühlman R, Wiedemann V, Schmidt P, Wanke R, Linckh E, Lösch U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. I. Immunization and antibody determination. *Zentralbl Veterinarmed B* 1998, **35**,

- 610-616.
13. **Larsson A, Bålów R, Lindahl TL, Forsberg PO.** Chicken antibodies: taking advantage of evolution-a review. *Pou Sci* 1998, **72**, 1807-1812.
 14. **Lee H, Kim J, Woo S, Jung B, Cho YS, Tark D, Lim S, Yoo H, Yoon Y, Huh W, Mun Y, Oh J.** Control of canine respiratory and diarrheal disease using egg yolk antibodies. I. Induction of antibody in hens immunized with combined antigens of *Bordetella bronchiseptica*, parvovirus and canine distempervirus. *Korea J Vet Res* 2004, **44**, 65-71.
 15. **Lee H, Kim J, Woo S, Jung B, Cho YS, Yoo H, Yoon Y, Huh W, Mun Y, Oh J.** Control of canine respiratory and diarrheal disease using egg yolk antibodies. II. Immunoprophylactic effect of egg yolk antibodies in mice and dogs. *Korea J Vet Res* 2004, **44**, 415-420.
 16. **Martin V, Najbar W, Gueguen S, Grousseau D, Eun HM, Lebreux B, Aubert A.** Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Vet Microbiol* 2002, **89**, 115-127.
 17. **Oh T, Han H.** Protective effect of chicken egg yolk antibody in colostrums-deprived neonatal puppies. *Korean J Vet Res* 1996, **36**, 903-913.
 18. **Pérez R, Bianchi P, Calleros L, Francia L, Hernández M, Meya L, Panzera Y, Sosa K, Zoller S.** Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet microbiol* 2012, **155**, 214-219.
 19. **Potgieter LN, Jones JB, Patton CS, Webb-Martin TA.** Experimental parvovirus infection in dog. *Can J Comp Med* 1981, **54**, 212-216.
 20. **Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M, Decaro N, Carmichael LE, Buonavoglia C.** Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001, **8**, 612-615.
 21. **Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S.** Anti-*E.coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sci* 1998, **53**, 1360-1368.
 22. **Swango LJ.** Canine viral diseases. In: Ettinger SJ, Felman EC (eds.). *Textbook of Veterinary internal medicine: disease of the dog and cat.* 4th ed. pp. 398-405, WB Saunders, Philadelphia, 1995.
 23. **Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H, Tohya Y, Kodama Y.** Passive protection of dogs against clinical disease due to *Canine parvovirus-2* by specific antibody from chicken egg yolk. *Can J Vet Res* 2006, **70**, 62-64.
 24. **Wierup M.** The control disease in animals: alternatives to the use of antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 2000, **14**, 315-319.
 25. **Yang DK, Kim B, Kim YH, Lee KW, Choi SS, Son SW.** Genetic analysis of canine parvovirus vaccine strains in Korea. *Korean J Vet Res* 2009, **49**, 243-248.
 26. **Yang DK, Yoon SS, Byun JW, Lee KW, Oh YI, Song JY.** Serological survey for Canine parvovirus type 2a(CPV-2a) in the stray dogs in South Korea. *J Bacteriol Virol* 2010, **40**, 77-81.
 27. **Yokoyama H, Paralta RC, Diaz R, Sendo S, Ikemori Y, Kodama Y.** Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun* 1992, **60**, 998-1007.
 28. **Yokoyama H, Paralta RC, Sendo S, Ikemori Y, Kodama Y.** Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am J Vet Res* 1993, **54**, 867-872.