

최종보고서

양계산업에서 피부병치료약(항체) 개발 및  
신물질 생산에 의한 산업안정화

Industrial stabilization by developmant of dermal  
therapeutic drug (antibodies) and production of  
bioactive substance in poultry industry

연구기관  
전북대학교

과학기술처

# 최종연구보고서

1994년도 특정연구개발 사업에 의하여 완료한 “양계산업에서 피부병치료약 (항체) 개발 및 신물질 생산에 의한 산업안정화”에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 자체 평가

1997년 1월 18일

주 관 연구 기 관      전 북 대 학 교

총괄연구책임자      이 부 응 ①

주 관 연구 기 관    전 북 대 학 교 총 장      장 명 수 직 인

과 학 기 술 처 장 관 귀 하

## 제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “양계산업에서 피부병치료약(항체) 개발 및 신물질 생산에 의한 산업안정화”에 관한 연구의 최종보고서로 제출합니다.

1997년 1월 18일

총괄연구책임자 이 부 응  
연구원 최 순 호  
연구원 장 운 기

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

양계산업에서 피부병치료약(항체) 개발 및 신물질생산에 의한 산업안정화

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

축산업은 국민들에게 양질의 단백질을 급여하여 건강을 유지시키고 기호성을 충족시키는 대단히 중요한 산업이다. 그중에서도 채란 양계는 싼값으로 양질의 단백질을 생산하기 때문에 더욱 중요하다. 그러나 축산물시장 개방에 따라 축산선진국의 계란이 수입되면 국내생산업자들은 생산 원가가 높기 때문에 수입계란과 경쟁력이 없어 심한 타격을 받을 수 있다. 이러한 상황에서 채란양계의 수익성을 증대시키기 위해서는 신기술에 의하여 계란의 부가가치를 증가시키는 방법이 필요하다. 이러한 목적을 위해 산란계를 Candida증 원인균으로 면역시켜 난황에서 항체를 얻어 Candida증 치료약으로 사용하고 난황 부산물과 난백을 다시 이용하면 부가가치가 증가될 수 있기 때문에 가능하다고 볼 수 있다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

임상에서 자주 발견되는 균주를 정제분리하고 동정하였다.

산란계를 *C. albicans*, *C. tropicalis*와 *Statelloidea*로 면역시킨 후 면역 기간 중 혈청과 난황중에 항체가 ELISA로 평가되었다. 항체 IgY가 난황 중에 석 정제되고 amino산 분석 등이 시도되었다.

항체를 전기영동에 의하여 분자량이 평가되었다. 경구치료 약으로 개발 가능성을 판정하기 위하여 단백분해 소화 효소실험을 실시하였다.

IgY가 경구치료 등으로 사용되는 경우 IgY가 IgG에서 유래되기 때문에 allergy가 있을 것으로 예상 되기 때문에 IgY의 allergenicity를 우유와 비교하였다.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

연구개발의 결과는 임상환자에서 *C. albicans*와 *C. tropicalis*가 정제분리 동정되었다.

3종의 균에 대한 항체가 ELISA에 의하여 평가되고 항체가 정제분리되었다. 경구용으로 이용가능성을 위하여 소화율과 allergy성이 평가되었다.

소화는 우유와 비교하여 단백분해 효소저항성이 아주 크고 allergy성은 없는 것으로 나타났다. 그러므로 경구로 사용하여도 allergy는 없을 것으로 사료된다.

전기영동에 의하여 분자량이 평가되었다. 활용을 위하여 다른 질병을 위한 항체생산을 위한 연구와 Kit 개발도 시도되어야 한다.

# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. Subject

Industrial stabilization by development of dermal therapeutic drug (antibodies) and production of bioactive substance in poultry industry

### II. The purpose and importance of research development.

Animal husbandry supply good quality of protein to maintain health and satisfy palatability so which is most important industry. Among these laying hen industry produce good quality of protein with the lowest price so it is more important. But according to opening of animal product market for domestic industry will receive a severe blow because our product can not survive with reason that there are no competence with imported egg price. At these situation it is necessary to introduce a method that elevate the additional value of egg by use of modern technique for increase of gaining in egg production. For these purpose it would be possible that we produce antibody in the egg yolk through immunization with Candida at laying hen and we reuse egg white and a byproduct from yolks.

### III. Contents and scope of development.

Two strain which is more frequently observed in clinic were isolated and identified.

The laying hens were immunized with *C. albicans*, *C. tropicalis* and *stetalloidea* and antibody titer were evaluate in serum and egg yolk by ELISA.

The antibody IgY are separatd from yolk and analyse of ammo acid were followed and evaluate molecular weight of IgY by electrophoresis.

In vitro protein digestibilities by proteases were followed to evaluate the possibility of oral therapeutic use.

Since IgY are originate from IgG and we know that generally this antihody are allergic so we compare the allergenicity with milk in the case when antibody serve as oral therapeutic drug.

#### IV. The results of development and suggestion for application.

*C. albicans* and *C. tropicalis* were separated and identified in clinical subjects.

The antibodies titer against these three strains were evaluate and then separated and purified.

The protein digestibility and allergenicity were testified for oral therapeutic use.

There are no allergenicity and antibody is more resistant to protease with compare to milk proteins which conclude that could be use as oral drug.

Molecular weight are estimated by electrophoresis.

The antibodis of another disease and devecopment of kit in Candiasis should also attempted in future.

# CONTENTS

Summary .....	5
I. Introduction.....	11
II. Materials and Methods .....	25
III. Results and Discussion .....	35
IV. Proposed Direction for Application .....	51
V. Conclusion .....	54
VI. Reference .....	55

여 백

# 목 차

요 약 문	3
I. 서 론	11
II. 재료 및 방법	25
1. Candida의 분리와 동정	25
2. 항체의 제조	29
3. IgY분리	29
4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay	31
5. 항체의 평가(in vitro, in vivo)	32
6. 항체의 화학분석	32
7. 전기영동	33
8. 소화율	33
9. PCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis)	34
III. 결과 및 고찰	35
1. Candida의 분리와 동정	35
2. 혈청과 난황중 ELISA에 의하여 평가되었다.	35
3. 항체의 평가(in vivo)	45
4. 항체의 화학분석	45
5. PCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis)	45
6. 소화율	47
7. 전기영동	47
8. 면역 계란의 이용방법	50
IV. 활용방안	51
V. 결 론	54
VII. 참고문헌	55

여 백

## I. 서 론

### 양계산업의 중요성

양계산업은 해방이후 우리나라의 축산업의 기간을 이룬 산업으로 빈곤했었을 때에 중요한 단백질을 공급한 산업이었다. 그 후 양돈, 비육, 낙농산업의 발전과 함께 꾸준히 성장을 계속하였다. 그러므로 축산업 중에서 가장 발달되고 큰 비중을 차지하는 산업이라고 할 수 있다.

뿐만 아니라 계란은 고기나 우유, 털보다는 값이 아주 싼 단백질 급원이라는 데에서 타 단백질 생산업 보다도 중요하다. 국제 경쟁력이 있는 정도의 기술수준에 도달하기도 전에 즉 '97. 7월 이후 축산물 시장이 완전개방이 되면 양계업자들이 커다란 어려움이 예상된다. 이것을 극복하기 위하여서는 경영조직의 개선, 사양기술개발, 품질개선 등이 있을 수 있다.

그러나 이러한 개선방향은 대규모 업자들에게는 가능 할 수도 있으나 소규모 산란업자들에게는 많은 어려움이 있다. 94년 양계협회 통계에 의하면 전체 양계 농가의 97%인 186,000호가 1,000수 이하의 영세업자들이다. 따라서 소규모 양계업자들의 기술개발을 집중관리가 가능한 소규모 업자들의 형편에 맞는 기술 개발이 필요하다. 이러한 각도에서 본 연구는 산란계를 Candida균으로 면역시켜 난황에서 이 항체를 얻어 이 병을 치료하는 약을 제조하는 원료를 생산하여 결과적 계란의 부존가치를 증가시켜 수입을 증대하여 영세 채란업자들을 축산물시장 개방으로부터 보호하고자 한다.

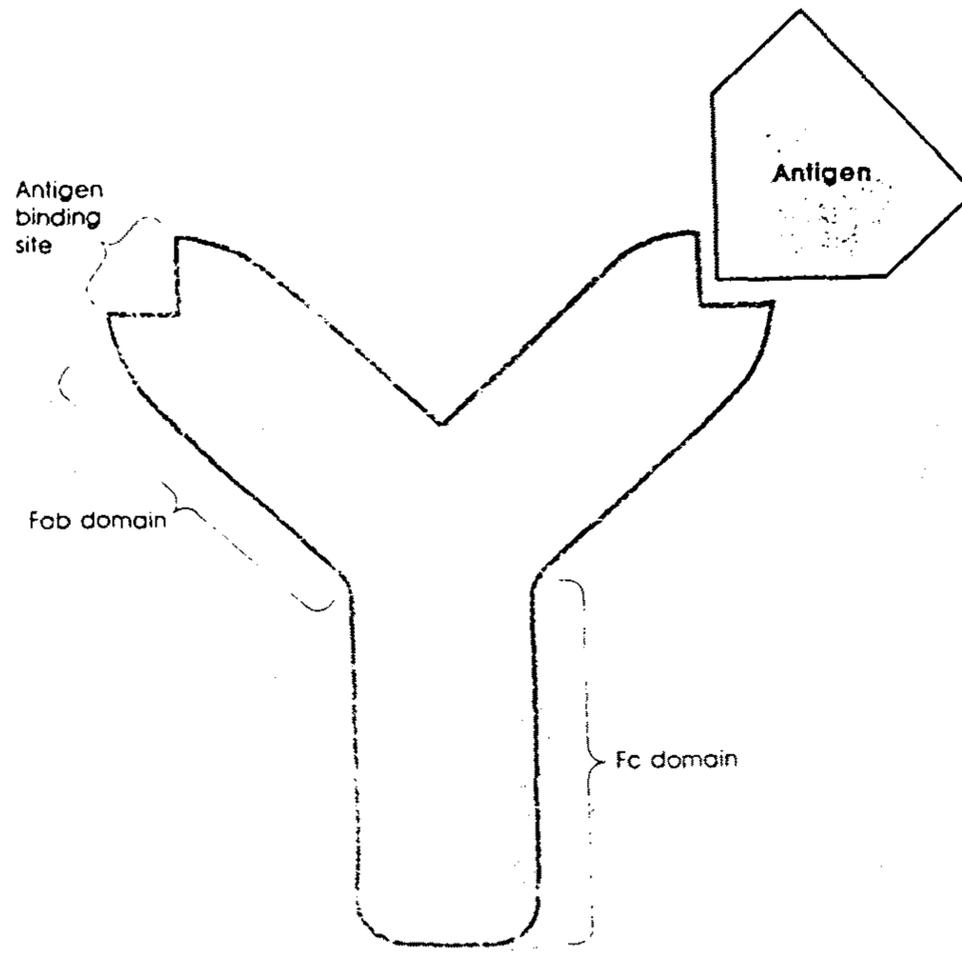
### IgY

동물은 자손에게 태어난 후 일정기간 동안 새로운 환경에 적응할 동안 저항력을 주기 위하여 모체의 항체가 자손에게 수직적으로 이행되는 것이다. 그래

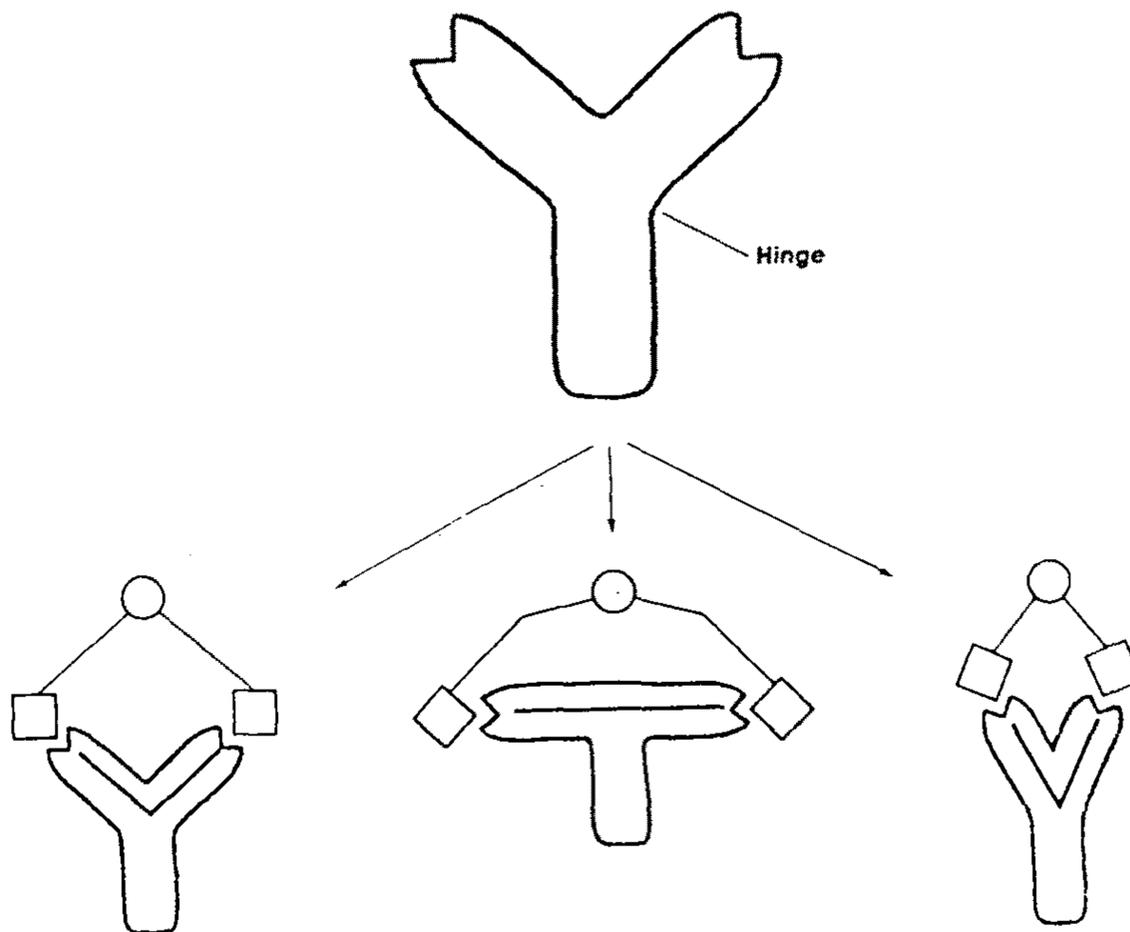
서 포유동물의 경우에는 모체의 혈액으로부터 유방을 통하여 初乳로 移行되어 분만 직 후 상당히 많은 량의 immunoglobulin이 유즙으로 분비된다. 그러나 조류에서는 난황(yolk)에 분비하기 때문에 IgY라고 한다. IgY는 조류, 파충류, 양서류 IgG의 기능을 가지고 있고 최근 연구에 의하면 이 IgY는 포유동물의 항체 IgG나 IgE의 조상이라고 한다.(Gregory et. al. 1995)

그래서 조류의 난황의 immunoglobulin은 Y를 따서 IgY라고 하는데 이것은 IgG에 해당된다. 사실상 IgG와 IgY간에는 약간의 차이가 있다. pH안정성이 라든가 변성은도 및 구조에 약간의 차이가 있다. IgG의 분자는 3개의 단백질 면역으로 되어 있다. (그림 1) 2개의 영역은 같은 것이고 Y형이고 각 두 부분은 같은 것으로 항원과 결합하는 부위이다.

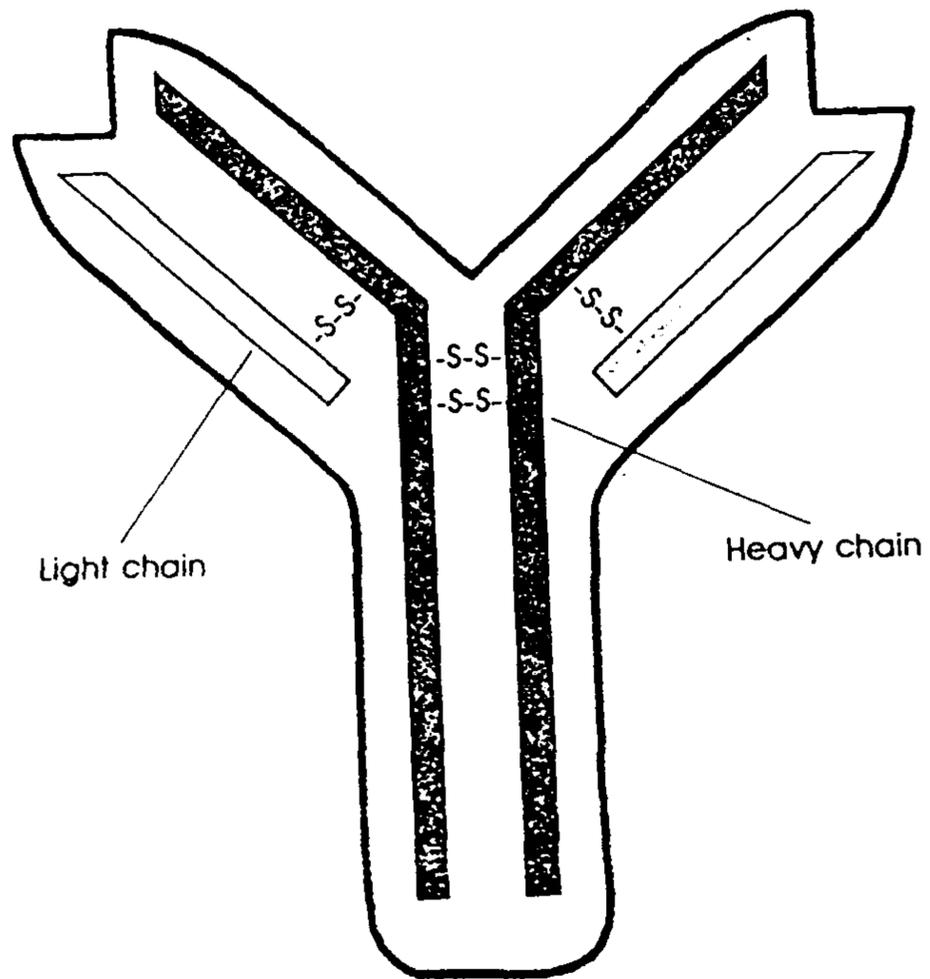
Fab은 antigen binding fragment이고 Fc는 단백분해 후 결정(crystalize)가 된다고하여 붙인 이름이다. Fab와 Fc를 연결하는 부분을 Hinge라고하여 그림 2와 같이 유연성있게 항체와 결합할 수 있다 항체는 2개의 Heavy chain과 Light chain 2개로 구성되었다. 이것은 papain에 의하여 분리될 수 있다.(그림 3)



<그림 1> 항체의 부위  
(Antibody domain)



<그림 2> Hinge와 유연성  
(Hinge and flexibility)



<그림 3> 항체를 형성하기 위한 H사슬과 L사슬  
(Heavy chain and light chain combine to form antibody)

## 산란계에 의한 Vaccine제조의 장점

일반적으로 Vaccine은 포유동물에 면역시킨 후 일정한 기간 후 동물에서 완전 채혈하여 얻은 혈청으로부터 항체를 회수하는 것이 보통이다. 그러나 산란계에서는 항체를 난황에서 얻기 때문에 닭을 죽지 않고 계속적으로 알을 낳기 때문에 여러 장점이 있다. 포유동물과 산란계의 면역의 장점 비교는 다음과 같다.

1. 포유동물의 항원 이용 범위가 넓고 포유동물과 cross reactivity가 없다.
2. 항체가 지속적으로 생산 된다. (년중 산란, 계란 1개=토끼 한 마리)
3. 사육이 용이하다.
4. 염가의 항체를 대량생산 할 수 있다.
5. 혈액에서의 항체 분리 보다 훨씬 염가이다.
6. 분리부산물을 재이용 할 수 있다, 부존가치 증가(난백, 난황침전물)
7. 항체를 위해 동물을 살상하지 않는다.
8. 주변 산업의 촉진(양계, 식품, 약품)
9. 채란업자들을 시장개방으로부터 보호
10. 타질병에서도 응용할 수 있다.
11. 질병 항체이외에 생명공학적 이용도 가능하다.

## IgY의 생산과 이용

### 일반적 장점

난황의 IgY는 감수성이 완벽할 뿐 아니라 포유동물의 전형적 항체보다 많은 장점을 가지고 있다. 포유동물 항체로 포유동물 단백질에 의한 Cross reactivity가 적은 장점들을 가지고 있다.(남경수, 1992)

계란 항체는 포유동물 항체보다 많은 장점들 때문에 면역분석에서 이용에 대해 인기가 높다. 난황으로부터 정제된 IgG의 이용도 murine monoclonal antibody가 Series로 개발되었고 ELISA와 Immunoblotting에 의하여 특정화 되었다. 이것들은 사람, 쥐, 염소, 토끼의 Ig 와 Cross reactivity가 없었다. (Jackowski et. al. 1995)

면역된 산란계의 특이 항체의 양도 토끼의 혈청에서 보다 높다. 산란계 항체 생산 공업은 불필요로한 maltreatment로부터 장점을 가지고 있다. (Schade et. al. 1995)

#### 정제 분리

-20℃로 미리 냉각한 propanol로 난황을 침전시킨 후 지질을 propanol과 acetone으로 계속 제거한다. 이 건조된 추출물을 phosphate 완충용액으로 추출하면 약간의 단백질이 있는 IgG를 얻는다. DEAE Chromatography를 하거나 polyethyleneglycol로 여분의 단백질을 제거 한다. (Heike et. al. 1984)

Livetin protein을 분리함에 있어 carrageenan은 침전제로 난황중 단백질을 제거 하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 상등액 중에 남아 있는 IgY는 염석 후 DEAE Sephacel로 정제하였다. (Hatta et. al. 1990)

IgY의 정제 분리의 완벽한 연구는 Akita와 Nakai(1992)의 연구로 희석법을 이용하여 간단하고 신속하고 효과적인 방법을 개선 하였다.

특이 항체의 원천으로 계란의 중요성은 잘 알려져 있다. 난황 한 개는 80-120mg의 IgY를 함유한다. 그러나 문제는 분리에서 많은 양의 지질제거가 문제이다(Akita et. al. 1993a)

IgY를 대량 얻는 방법으로 난황을 9배의 물에 희석 한 후 상등액 얻은 후 상등액 중 Lipid는 50% alcohol침전으로 완전히 제거된다. (Herikoshi et. al. 1993)

Papain과 Pepsin을 이용하여 IgY로부터 Fab, Fab'를 생산하는 방법을 연구하였다. Pepsin 소화가 Fab'를 대량 생산하는데 적합하다. Fab'의 최적수율은 낮은 농도의 NaCl 농도에서 Pepsin분해 9시간 동안 pH4.2에서 얻었다.(Akita 1993)

식품공업적으로 분리된 난황분말에서 항체를 제정제하는 ion교환 Chromatography, 염 침전법들이 개발되었다.(Fichtalial 1993)

IgY에서 immunoreactive site가 있는 Fab' fragment를 대량 생산하는 연구가 수행되었다. 이는 allergy성이 있는 Fab'나 Fc fragment를 단백분해효소로 절단한 후 UF, chromatography를 실시하여 분리하였다.(Akita 1993)

다양한 가공조건하에서 IgY의 안정성에 있어 설탕의 효과가 연구되었다. 30~50%의 설탕이나 전화당을 첨가하면 70~80℃에서도 IgY의 활성도에 있어 열변성이 현저히 억제되었다. 이성질은 IgY의 가공저장에 이용될 수 있다.(Shimizu et. al. 1994)

### 다양한 이용

Aflatoxin으로 면역시킨 산란계에서 생산된 항체를 ELISA를 이용하여 aflatoxin type에 따라 cross reativity가 있음을 알았다.(Hsu et. al 1992)

사람의 IgA, IgM, IgG 등을 정량하기 위하여 산란계에서 항체를 제조한 후 이 항체를 이용 Turbidimetric immunoassay를 하는데 염소에서 얻은 상법보다 수치나 감도 더 좋다고 하였다.(Inoe et. al. 1933)

고정화된 IgY는 affinity chromatography, 흡착제, biosensor나 효소면역 분석에 사용 될 수 있다. 고정화는 항체의 polysaccharide의 glycerol부분에 산화로 aldehyde기를 형성하거나 소수성 부분의 아미노기들이 aldehyde와 반응하여 이루어 진다.(Inomor et. al. 1993) Thally et. al(1990)은 뱀이나 전갈의 독을 산란계에서 면역시켜 항체를 얻었다.

생리활성 Peptide인 합성  $\beta$ -casokinin 10의 항체(IgY)를 난황으로부터 분리하여 미래의 구조-활성 연구에 사용하고 이 Peptide는 angiotensin 전환 효소의 억제 인자이다.(Meisel, 1994)

저분자 동물성 단백질 Hapten과 anti-analyte항체 생산에서 conjugate사용 방법에 따라 같은 동물 종에서 연구되었다. anti-bilirubin 항체는 bilirubin-ovalbumin conjugate로 산란계를 면역시키어 항체를 얻었다.(Tsuda et. al. 1994)

사람의 DNA-dependent RNA polymerase II가 산란계에서 면역되어 IgY 항체를 얻었다. 이 항체는 RNA polymerase II 조성분의 유전자를 분리하는데 사용하고 HP-RNA polymerase II를 사용하여 in vitro 전사에도 사용된다.(LEE et. al. 1995)

$\beta$ -Lactoglobulin산란계에서 면역시킨 후 항체의 역가를 혈청과 난황에서 비교하고 pH와 열 안정성을 측정하였다.(이 등, 1996)

### 경구용 항체 제조

IgG를 내복약으로 사용할 때 소화 과정 중 면역 반응성을 잃지 않게 하기 위하여 polyethyleneglycerol과 conjugate시키는 방법이 연구되었다.(Cunningham-Rundles 1992)

Polio, 콜레라 tyhoid 대한 새로운 경구 확진의 개발에 관한 연구, 면역 방법 등이 토론되었다.(Okahashi 1993)

난황에서 분리된 항체 IgY를 계란 lecithin /cholesterol liposome와 혼합 dehydration-rehydration법을 이용하여 성공적으로 encapsulation시키었다. Capsul화된 IgY는 Pepsin 가수분해에 대해서 현저한 저항성을 나타내었다.(Shimizu 1993)

IgY항체를 먹었을 때 항체의 안정성을 높이기 위하여 항체를 W/O/W속에

유화 시켰다. 유화물질은 polyglyceryl condensed ricinolate와 dextran-casein conjugate를 사용하였다. 그러나 유화물질에 의하여 역가가 20%감소 하였다. 22%로 각 단백질들의 surface hydrophobicity와 분자안정성이 중요하다고 하였다.(Shimizu et. al. 1995)

### 각종 질병의 예방

사람의 rotavirus의 항체를 산란계에서 생산 한 것을 토끼에서 얻은 항체와 생산성이 비교되었다. 산란계에서 변화없이 계속적으로 알을 낳았고 난황의 항체는 1년 이상 계속되었고 난황의 항체가 더 높은 역가치를 나타낸다고 하였다. 그리고 IgY와는 IgG보다 약간 낮은 온도와 pH에서 열변성 되는데 이것은 구조의 차이 때문이라고 하였다.(Hatta. et. al. 1993)

위암 세포의 immunotoxin이 산란계에서 면역 항체로 얻어 치료효과가 연구되었다. 위암세포를 쥐에 이식 한 후 immunotoxin을 투여 한 바 80%가 치료되었고 성별에 차이가 있다고 하였다.(Liu et. al. 1993)

난황으로부터 rotavirus 표면 특이 항체가 rotavirus의 면역학적 정량을 위하여 제조 되었다. 이 항체는 산란계 IgY로부터 얻어진 것이다.(Miyake et. al. 1994)

Hatta et. al(1994)는 부모새의 항체가 병아리에 이행되고 특이성 항체들이 대량 생산되고 IgY IgG간에는 구조차이가 있고 정제 방법들을 토론하였다. 특히 사람에서 유도된 rotavirus에 의하여 설사, Edwardsiella tarda 감염, Caries 등을 예방할 수 있고 공학적 특성들을 토론 하였다.

송아지의 설사를 방지할 목적으로 bovine rotavirus로 면역 시킨 산란계의 난황 항체 IgY의 효과가 연구되었다. 매 dose당 6,400의 중화역가를 가지는 확실한 예방이 가능했다.(Kuroki et. al. 1994)

IgY가 신생 仔豚에서 흡수되어 혈류로 이행되었고 혈청 중 반감기는 1.85일

이라고 하였다. 설사를 유도시킨 자돈에서 IgY는 많은량을 먹이거나 반복해서 급여했을 때 예방효과가 있고 어떤 부작용도 없다고 보고하였다.(Yokohama et. al. 1993)

Anti-human rotavirus의 중화 역가는 pH 2에서 pepsin에 의하여 완전히 실행되었다. 그러나 어떤 조건에서 trypsin과 chymotrysin은 크게 영향을 끼치지 않았다. 그리고 생후 24시간 이내에 먹는 mice들은 유도된 설사에 대해 IgY의 효과가 있는 것으로 나타났다.(Hatta et. al. 1993)

건강한 쥐에 충치가 잘 일어나는 물질과 충치균, Str. Mutans를 감염시킨 후 충치균을 산란계에서 면역 시킨 후 얻은 난황을 먹인 결과 control과 비교하여 확실히 충치의 증상이 적었다고 하였다.(Otake et. al. 1991)

구강질병균체(Actinobacillus actinomycetemitans Y4와 Porphyroas gingivulis)의 polysaccharide로 면역된 항체가 구강치료에 사용된다. 토끼에서 면역되었고 치약은  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50, glycerin 20, CM Cellulose 1.0 SDS 0.01에 대하여 항혈청 0.1%를 첨가하고 물로 100으로 맞추었다.(Harada et. al. 1992)

Candida의 감염을 검사하기 위하여 D-arabinitol dehydrogenase를 이용하는 데 Candida시료에서 D-arabitol 검출하는 방법을 사용한 kit를 제조 하였는데 anti-D-arabinitol dehydrogenase의 monoclonal antibody를 standard법으로 제조하여 이용하였다.(Miyada et. al. 1993)

Candida albicans는 acid protease를 유리하여 allergy를 일으킨다고 하였다.(Akiyama et. al. 1993)

모발보호제를 함유하는 난황항체가 가금으로부터 얻어졌는데 산란계는 사람의 모발과 keratin 단백질을 grinding constituent tissues로 얻어 면역시키었다.(Norjiri et. al. 1993)

황등(1996) 여드름 균을 예방치료 할 목적으로 Propionbacterium acines를

배양 실패시킨 후 닭에서 면역 시킨 후 난황 항체를 얻었다.(황 등 1996)

#### Animal model

Candida들에 의한 혈액 감염증이 특히 암 환자들에서 빈번하기 때문에 이 감염의 발병을 이해하기 위한 animal model을 개발하였다.(Anaissie et. al. 1993)

치료약 anti fungal drug를 치료목적으로 평가하기 위하여 유용한 Candida 증의 animal model을 개발하였다.(Maebashi et. al. 1994)

### Candida症

Candida증은 Candida속의 균이 피부, 조갑, 점막 및 내장에 감염을 일으키는 질환이다. 주로 *C. albicans*가 원인이며 그 외 *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* 등이 원인이 될 수 있다. 본 균은 건강한 사람의 구강, 질, 장 등에 상재하는 인체상재균이다. 숙주의 면역상태의 변화가 있을 때 생태학적인 변화가 있을 때 감염을 유발하여 내인성감염을 일으킬 수 있다. 대부분 피부나 점막에 국소감염을 일으키지만 특히 면역억제제를 투여하고 있거나 질병 자체로 인해 면역결핍된 상태에서는 전신성 감염을 일으킬 수 있다.

진단 : KOH 진균도말검사서 위성균사와 아포를 증명하는 것이 확진에 도움이 된다. 배양검사는 가검물의 종류에 따라 의의가 다르다. 즉 상재하고 있는 구강 등에서 배양되었을 때는 의의가 적지만 균이 상재하지 않는 혈액이나 뇌척수액에서 배양되었을 때는 한 개의 집락이라도 의의가 있다. 따라서 배지를 여러개 사용하여 배양되는 양적인 판정이 필요하다. 배양검사서 크림 형태의 우유빛 집락이 관찰되고 술이 익는 냄새가 특징적이다.

치료 : 면역상태가 양호한 경우에는 치료가 잘 되며 비교적 짧은 기간에 치료된다. 국소감염에서는 유발인자인 습기를 제거하고 건조하게 유지하며 자극을

피하고 청결하게 해 주어야 한다. 국소치료제는 nystain연고, imidazole계통의 국소제가 효과가 있다. 전신적으로는 ketoconazole, itraconazole을 경구적으로 사용하며 amphotericin B는 전신감염이 있을 때 정맥주사 한다.

### 1) 구강 Candida증

구강 점막에 다양한 크기의 유백색 위막으로 덮힌 백태가 생기며 쉽게 분리되고 그 하부는 붉다. 신생아는 산도를 통하여 감염된다. 성인에서는 당뇨, 노인, 쇠약한 사람, 면역결핍증이 있는 사람에서 발생할 수 있고 특히 후천성면역결핍증 환자에서 많이 나타난다. 병변부에서 KOH 도말검사를 하면 위성균사 및 아포를 관찰할 수 있다.

### 2) Candida외음질염

음부의 심한 소양증이 있으며 홍반 부종이 있다. 분비물은 많지 않으나 우유나 비지와 비슷하다. 당뇨, 임부 또는 항생제를 사용할 때 균이 증식하여 발생한다.

### 3) Candida 간찰진

음고부, 액와, 둔부, 유방하부, 복부하부 등에서 피부가 서로 접하는 부위에 감염을 일으킨다. 유아에서는 기저귀피부염의 형태로 발생하는 경우도 있다. 병변은 홍반, 습윤 성반을 형성하고 주변부에 소수포와 농포가 발생한다. 세균성 간찰진과 감별을 요한다. 때로는 간찰진에 속발하여 파종형으로 이항하여 경부, 후두부 등으로 홍반성구진, 소수포 및 소농포가 다발하는 것을 볼 수 있다. 특히 몸을 자유자재로 움직일 수 없는 신생아나 유아에서 땀띠나 습진이 발생하여 이차적으로 감염을 일으킨 것으로 생각된다.

#### 4) 항문주위 Candida증

항문주위가 붉고, 습윤침적되며 심한 작열감과 소양을 호소한다. 외음 소양증, 위장질환 또는 항생제에 의한 균교대 현상, 정신적 인자 등이 유발요인이 된다. 감별해야할 질환은 건선, 지루피부염, 접촉피부염 등이다.

#### 5) Candida 조갑주위염

주로 손톱이 침범되며 조갑각피가 소실되고 조갑추벽이 붉게 종창되며 이를 압박하면 소량의 고름이 배출되고 동통은 경미하다. 조갑판에 굴곡이 생기고 광택이 없어진다. 조갑백선과는 달리 부스러지는 경우도 드물며 포도상구균의 감염증과는 달리 양측 조갑추벽에 종창이 심하다. 20~40세 여성에서 주로 발생하고 만성적으로 경과한다. 세균과 혼합 감염을 일으킬 수 있다. 당뇨병이나 물일 또는 젖은 물건을 취급하는 사람들에서 잘 발생한다. 그러므로 주부, 요리사, 최사부, 간호사, 세탁부 또는 당분을 취급하는 직종에서 볼 수 있다. 손톱을 다듬을 때 기계적 또는 화학적 자극이 피부에 손상을 주어 감염을 유발하는 인자가 될 수 있다.

#### 6) 만성피부점막 Candida증

유소아기에 피부, 조갑, 점막에서 만성적으로 재발하는 표재성 Candida 감염증을 특징으로하는 증후군이다. 선천적 또는 후천적 면역결핍, 철대사이상과 내분비 이상을 가진 유아에서 잘 동반되어 나타나는 매우 드문 질환이다. 표재성 감염을 일으켜 만성적으로 경과하나 심부 감염은 일으키지 않는다. 6세 이전에 발생하고 성인에서는 흉성종양과 동반되어 나타난다. 증상은 성별에 관계없이 일반 Candida증과 유사하게 피부, 구강점막, 조갑, 간찰부에 감염을 침범하고 손에 침범하는 빈도가 높다. 병변은 다소 융기되고 인설을 동반한 홍반을 나

타내고 각질증식을 보이기도 한다. Candida 육아종은 본증의 각질증식형이라고 생각한다.

### 7) 전신성 Candida증

숙주의 면역이 저하되었을 때 Candida는 전신감염을 일으켜 심한 조직의 파괴를 초래할 수 있다. 백혈병이나 림프종 등 암환자, AIDS, 면역억제제를 투여하고 있는 환자에서 세포면역결핍을 초래하여 본증이 잘 발생한다.

증상 : 불명열, 폐침윤, 위장출혈, 심내막염, 신부전증, 뇌막염, 골수염, 장염 등을 일으키며 피부발진이 나타난다. 피부발진은 홍반으로 시작되어 진행되면 구진, 농포를 형성하고 출혈이 나타나며 괴사, 썩양으로 진행된다.

진단 : 병소에서 균을 증명하거나 배양하는 것이다. Candida가 상주하지 않는 조직이나 조직액, 혈액에서는 한 개의 집락이 배양되더라도 의의가 있다.

치료 : amphotericin B가 주로 사용된다. 그의 5-fluorocytosine도 병용하면 상승작용이 있다. ketoconazole은 진균에 대해 정균작용만 있으므로 전신감염에서는 효과적이지 못하다.(대한화학과학회. 1994)

효모균은 사람에게 candidiasis을 유발하는 *C. albicans*와 드물게 기회감염을 일으키는 *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. zeyanoides* and *T. glabrata* 등과 *Cryptococcus* sp, *Geotrichum* sp, *Trichosporon* sp, *Saccharomyces* sp, *Rhodotorula* sp 등이 사람에게 조갑, 심내막염, 외이도염, 요도염, 골, 폐, 기관지, 구강, 중추신경계에 감염을 일으킨다. 그리하여 내과, 이비인후과, 산부인과, 피부비뇨과 등 모든 영역에서 나타나고 특히 암환자에게서 심각하다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Candida의 분리와 동정

전북대학교 대학병원 피부과에 내원한 환자들의 병변에서 얻은 *Candida* sp를 혈액첨가배지나 Sabouraud glucose agar에 접종하여 30℃에서 48시간 배양하면 cream색 및 백색의 집락을 관찰 할 수 있다. *Candida* sp로 보이는 집락을 다시 사면배양(slant culture)하여 의심이 되는 집락을 취하여 2ml 멸균 증류수에 혼합하여 부유액을 만든다.(서순봉 등 1994)

동정 : 효모들은 대사 실험에 의하여 동정하였다.

대사에 의한 동정은 효모의 in vitro 진단 kit인 ID 32C(bioMerieux Sa, Lyon, 불란서)를 사용하였다. 그 원리와 방법은 다음과 같다.

Kit내 32개의 cupule ID 32 Strip는 각각 건조된 탄수화물 기질들이 들어있다. 화학적으로 정의된 반고체의 최소배지는 실험 될 미생물의 부유액을 접종한다. 24~48시간 배양 후 각 cupule에서 성장여부가 육안으로 관찰하거나 ATB 장치(Merieux 社)로 판독된다.(ID 32C manual)

C Medium

Suspension-medium 2ml	Demineralized Water
C Medium	Ammonium sulfate 5g Monopotassium phosphate 0.31g Dipotassium phosphate 0.45g Disodium phosphate 0.92g Sodium Chloride 0.1g Calciumchlorid 0.05g Magnesium sulfate 0.2g Histidin 0.005g Tryptophan 0.02g Methionine 0.02g Agar 0.5g Vitaminisoln 1ml Traceelement 10ml Demineralized Water ad 1,000ml Final pH : 6.5~6.7

기질의 종류는 다음과 같다.

- |                     |                              |
|---------------------|------------------------------|
| 0.0 SON SORbitol    | 1.0 GAL Galactose            |
| 0.1 XYL D-XYlose    | 1.1 ACT ACTidion             |
| 0.2 RIB Ribose      | 1.2 SAC SACcharose           |
| 0.3 GLY GLYcerol    | 1.3 NAG N-Acetyl-Glucosamine |
| 0.4 RHA RHAmnose    | 1.4 LAT DL-LAcTate           |
| 0.5 PLE PaLatinoseE | 1.5 ARA L-ARAbinose          |
| 0.6 ERY ERYthritol  | 1.6 CEL CELlobiose           |
| 0.7 MEL MELibiose   | 1.7 RAF RAFfinose            |
| 0.8 GRT GlucuRonaTe | 1.8 MAL MALtose              |
| 0.9 MLZ MeLeZitose  | 1.9 TRE TREhalose            |
| 0.A GNT GlucoNaTe   | 1.A 2KG 2Keto-Gluconate      |
| 0.B LVT LeVulinaTe  | 1.B MDG -Metyl-D-glucoside   |
| 0.C GLU GLUcose     | 1.C MAN MANnitol             |
| 0.D SBE SorBosE     | 1.D LAC LACtose              |
| 0.E GLN GLucosamiNe | 1.E INO INOitol              |
| 0.F ESC ESCulin     | 1.F 0 Control                |

조작은 다음과 같다.

집락을 부유액으로 만들어 135 $\mu$ l씩 strip에 접종한다. 30 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한다. ATB reader를 사용하거나 육안으로 관찰한다. control(s)와 비교하여 어떤 cupule이 양성적으로 혼탁한가를 기록한다

## 2. 항체의 제조

### 1) 사용균주

*Candida albicans*, *Candida Stellatoidea*(TIMM 1308)와 *Candida tropicalis*(IFO 0199)를 얻은 帝京 大學真菌研究 Center(192-03 東京都八王子市 大塚)에서 분양 받은 균주를 사용하였다.

#### ① 항원의 제조

균주의 활성화는 사용설명서대로 실시하였다.

효모를 현탁 시킨 후 일부 균주는 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

배지 성분 및 제작은 다음과 같다.

Rehydration fluid(복수액) ; 703

Peptone 0.5% ; 5g

Yeast extract 0.3% ; 3g

Malt extract 0.3% ; 3g

Glucose 1.0% ; 10g

Adjust to pH 6.0

agar 1.5% ; 3g

total volume 200ml 제작

멸균된 일회용 petri dish에 15ml씩 분주하여 사용하기 전까지 냉장 보관하였다.

## ② 배양방법

먼저 108 배지에 균을 활성화시킨다. 실온에서 방치한다.

1일 후 흰색의 colony들이 관찰되었고 직경이 2mm이상이 되었다.

108 agar 배지에서 활성화된 균을 1 loop을 5ml broth tube에 접종하여 정치시켜서 배양하였다. 기온에 따라 상온에서도 배양하였다.

1일 후에 5ml broth tube에 밑바닥에 균이 성장한 것을 관찰하였다.

잘 흔들어서 500ml broth에 접종하였다.

배양은 2일간 배양(48시간), 회전배양을 30℃로 조절하고 200rpm으로 회전시켰다.

## ③ 항원조작

48시간 배양이 끝난 후 포르말린으로 3시간 동안 처리하였다.

broth total volume이 500ml에 37% 포르말린을 6.85ml를 첨가, 그러면 total volume에 0.5% 포르말린을 첨가한 결과가 된다. 3시간 후에 포르말린을 첨가한 것과 정상균주를 108 agar plate에 접종하여 균이 완전히 사멸되었는가를 검사하였다. 실제로 포르말린 첨가된 효모는 agar plate에 성장하지 않는다. 역시 30℃에서 200rpm으로 회전시켰다.

50ml conical tube에 40ml씩 분주하여 300rpm에서 30분간 원심하여 세척을 하였다. 상층액을 버린다. PBS(pH 7.4)로 재부유 시킨 후 다시 3000rpm에서 30분간 원심 하는 방법으로 2회 세척 하였다.

## ④ 측정방법

멸균된 10ml 페니실린 병의 무게를 측정한 다음 rezero버튼을 누른다. 그 상태에서 원심된 항원 펠렛을 페니실린 병에 넣었다. 그 결과 1.4g 이었다. 이병에 멸균된 PBS를 14ml을 첨가했다. 100mg/ml으로 조정하였다. stock solution을 -70℃에서 보관하였다.

## ⑤ 면역에 대한 항원(백신)제조

PBS 6.3ml + antigen(100mg /ml) 0.7ml ; 10mg /ml을 되게 했다.

Freud's Complete Adjuvant 7ml

유리 주사기로 잘 혼합.(Adjuvant에 혼합할 때 소실양이 많으므로 여유있게 만들었다.)

2ml을 백색 레그혼 암닭의 흉근에 접종시켰다.

접종할 때 양쪽 흉근에 나누어서 1ml씩 접종한다.

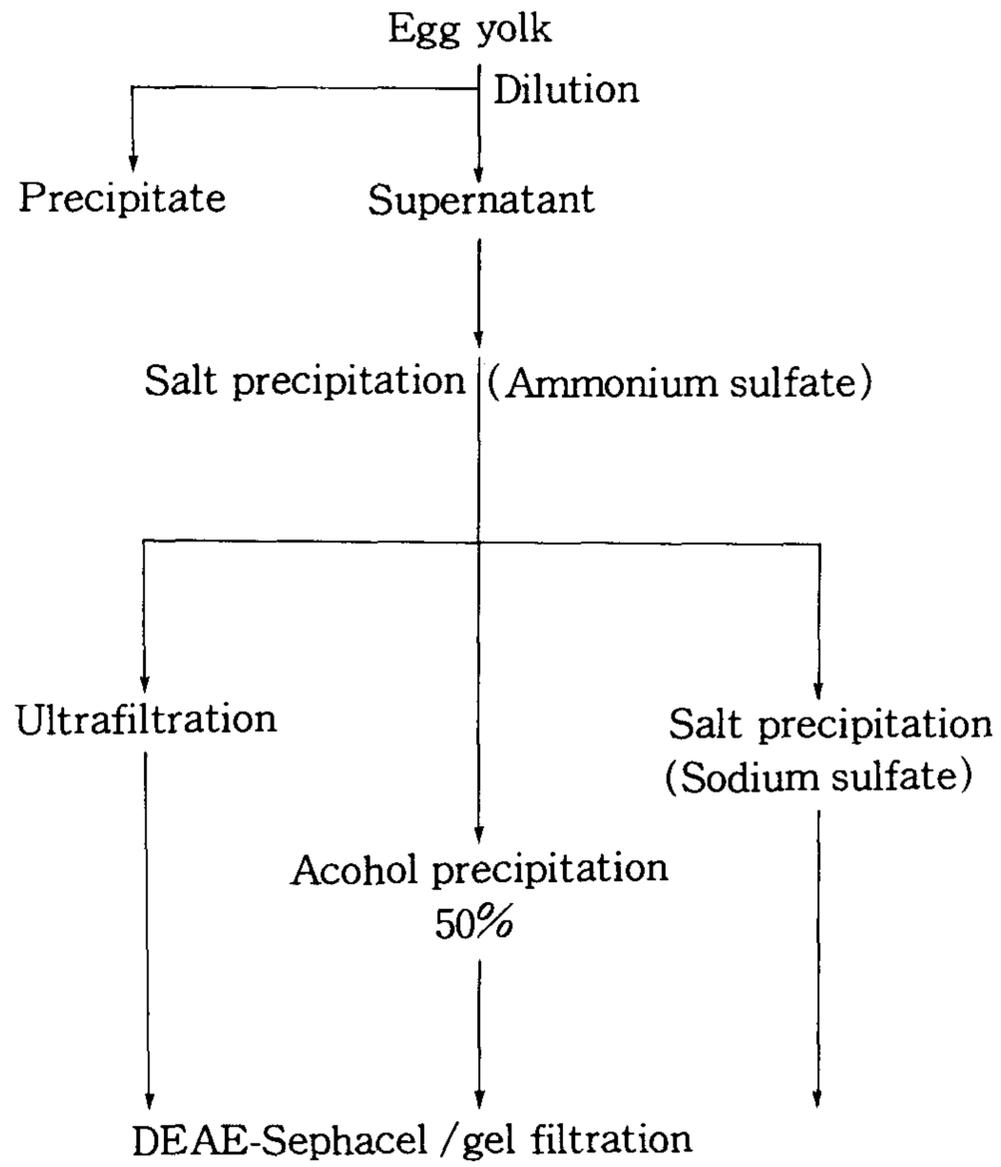
달같은 접종하기 전에 얻은 것을 냉장보관하고 채혈은 접종하기 전에 실시하고 남은 백신은  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다 접종은 일주일간격으로 5회 실시하였다.

### 3. IgY 분리

항체의 분리는 계란의 난황을 난백이 오염되지 않는 최대한 조심스럽게 분리한 후 9배의 pH 5.0의 증류수로 희석하고 6시간 방치한 다음 침전을 제거한 후 33%황산암모늄 염석, 18과 14% 황산 소다염석을 순차적으로 실시한 다음 동결건조 후 사용하거나 alcohol 침전시킨 후 건조하여 ELISA에 사용하였다. (Akita et. al. 1992)

단백질의 농도는 Lowry 法(1951)로 정량하였다. 표준 곡선은 Bovine Serum Albumin을 사용하였다.(Akita et. al. 1992)

Bulk로 대량 정제를 위하여서는 난황을  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 propanol로 침전 세척후 acetone으로 세척(지질제거) 건조하는 방법이 유용하다.(Akita e.t al 1993)



〈그림 4〉 난황으로부터 IgY의 정제분리

(Flow diagram for the isolation and purification of IgY from egg yolk, Akita et. Nakai. 1992)

#### 4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay.

@. 항체가 측정

1) 항체가의 측정은 ELISA를 이용하였다.

각각의 항체가 측정에 요구되는 항원 및 항체와 conjugate의 농도는 Checker board titration방법을 이용하여 최적화 시켰다.

ELISA 조건은 다음과 같이 하였다.

① 실험하기 하루전에 ELISA plate를 coating하였다.

coating의 조건은 다음과 같다.

5 $\mu$ g/ml의 농도의 항원을 well당 50 $\mu$ l씩 coating한다음 이 plate를 lap으로 쌓아 습도가 유지되도록 moisture chamber에 집어 넣은 다음 4 $^{\circ}$ C에서 overnight했다.

② 다음날 이를 꺼내서 washing buffer(PBS w/o Ca and Mg, contained 0.5% Tween 20)으로 이를 3회 washing 한다음 뒤집어서 잘 떨어 well의 물기를 제거하였다.

③ 전 well에 blocking buffer를 50 $\mu$ l씩 집어 넣어 blocking한 다음 이를 moisture chamber에 집어 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 보관하였다.

④ 2번에서와 같이 세척을 하였다.

⑤ 항체가를 알고자 하는 혈청을 1:100으로 희석하여 2well씩 각각 50 $\mu$ l씩 집어넣은 다음 이를 moisture chamber에 집어넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다.

⑥ 2번과 같이 세척을 하였다.

⑦ conjugate를 1:15,000으로 희석하여 serum을 집어넣은 well에 각각 50 $\mu$ l씩 집어넣은 다음 다시 이를 moisture chamber에 집어넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨다.

- ⑧ 2번과 같이 세척을 하였다.
- ⑨ 30ml에 citric /citrate buffer에 o-phenyldiamine powder를 15mg을 녹인 다음 반응시키기 바로전에 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 15 $\mu$ l을 집어넣고 빛을 가린 상태에서 전 well에 50 $\mu$ l씩 집어넣은 다음 이를 cover로 덮은 다음 실온에서 30분간 반응시킨다.
- ⑩ 반응이 끝나는 즉시 Titertek Multiskan MCC /340을 이용하여 492nm의 파장에서 읽는다.

## 5. 항체의 평가(in vitro, in vivo)

in vitro평가는 난황 황체 Positive sera, Negative sera를 이용하여 200배까지 희석하면서 ELISA로 평가하였다.

in vivo는 prednislone을 투여(30mg /kg-1체중)한 Guinea pig의 등의 털을 깎은 후 균액을 10일 도포하여 증상을 일으킨 후 항체약을 1일 2회 환부에 10일간 발랐다. 그 후 환부의 평가는 조직을 균질하여 Sabourard 배지에서 배양 colony유무로 평가하였다.(Maebashi et. al. 1994) 면역과 항체의 평가는 전남대학교 수의과대학 미생물학교실에서 실시하였다.

## 6. 항체의 화학분석

### · 질소의 분석

시료 10mg을 30ml 진한 황산에 의해 분해촉매제를 분해촉매와 함께 3시간 분해 시킨 후 Kjeldhal법으로 질소를 정량하였다.

### · S의 분석

유황은 시료를 Na<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 회화 시킨 후 증량법으로 정량 하였다.(AOAC, 1990)

### · 조성 아미노산의 분석

항체 10mg을 30ml의 6N HCL에 넣고 화염으로 봉입한 후 24시간 110℃에서 분해 후 염산을 증발시킨 후 마미노산 자동 분석기(LKB Sweden)에서 정량하였다.

## 7. 전기영동

정제된 IgY를 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli(1970)의 법으로 12% polyacrylamide gel을 만들어 환원제 존재하 전기영동을하여 분자량을 측정하여 표준 단백질로는 myosin(H Chain, MW : 200K Da), phosphorylase B (97K Da), bovine serum albumin(68K da), ovalbumin(43K Da), carbonic anhydrase(20K Da) 그리고  $\beta$ -Loctoglobulin(18K Da)을 사용하였다.

## 8. 소화율

단백질의 in vitro 소화율을 측정하였다. immunoglobulin은 원래 소화가 잘 안되는 단백질이므로 우유와 비교하여 소화율을 측정하였다. 측정하는 방법으로 소화효소 처리 NPN%로 경시적인 변화를 보았고 최종 24시간에서 유리된 아미노산을 정량하여 평가하였다. 5ml의 1% 단백질 용액에 5ml pepsin용액 (20mg / 100의 0.2 HCL)을 넣고 37℃에서 4시간 소화시킨 후 pH를 8.0으로 조정하기 위하여 5ml의 0.2N NaOH를 넣고 0.04%의 방부제 merthiolate가 들어 있는 5ml의 Pancreatin용액 (55.33mg / 0.05M Phosphate)를 넣은 후 계속해서 37℃에서 27시간 소화시킨다. 경시적으로 4, 6, 9, 12, 20, 25시간의 NPN을 측정하였다. 소화가 끝난 후 100℃에서 3분간 가열 소화를 정지 시킨 후 동량의 TCA를 가하여 침전을 여과할 후 여액의 질소를 정량하고 27시간의 시료는 TCA를 ether로 제거한 후 Amberlite IR 120으로 Peptide로 제거한 후 아미노산 자동분석계에서 아미노산을 정량하고 100g 단백질당 유리된 유리 아미노산을 표시하였다.

소화의 대조군으로 우유를 사용하였다.

## 9. PCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis)

IgY는 일반적으로 allergy성이라고 알려져 있기 때문에 allergenicity를 PCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis) 로 우유와 비교하여 평가하였다. 소화에 의하여 분해도 polypeptide들도 allergenicity가 있는가를 알아보기 위하여 27시간 NPN fraction을 같은 방법으로 PCA를 실시하였다.

### 항혈청 제조

신선한 항원(우유)1ml를 동량의 Complete Freund's Adjuvant(Sigma社)와 혼합·유화시킨 후 약 2.5Kg 체중의 4마리의 토끼 양뒤발 대퇴부 근육에 1ml씩 주사한다. 7일 간격으로 10회 행하고 4주후부터 주사하기전 귀정맥에서 부분 채혈하여 immuno diffision을 실시하여 항체형성을 확인한다. 최종 주사 7일 후 전부 채혈한다. 채혈한 혈액으로 혈청을 제조한다. 또한 다른 항원(IgY)는 동량의 Complete Freund's Adjuvant(Sigma社)와 혼합. 유화시킨 후 mouse에게 4주간 (1회 /1주) 복강에 투여 한 후 심장에서 채혈한다. 그리고 이 혈액으로 혈청을 제조한다.

### Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA)의 실시

항혈청을 PBS로 200배로 희석한 후 약 250~300g체중의 건강한 Guinea pig 등 피부에 주사하고 4시간 후 신선한 항원을 1% Evan's Blue를 혼합한 것을 정맥에 주사한다. 30분 후 희생시켜 Blue spot를 Katayama et. al. 法(1978)으로 색소를 침출시킨 후 control의 흡광도와 비교하여 allergenicity를 평가한다. allergenicity가 있으면 계속하여 상대적 allergenicity역가를 구한다. 3회 반복하여 평균OD로 판정한다. 피부에 여러 항혈청을 주사함으로써 두 sample(우유, IgY)간 cross reactivity도 판정할 수 있다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. Candida의 분리와 동정

전북에 부속병원 피부과에 내원한 Candida 환자들의 병소에서 albicans와 tropicalis가 분리되었다.(Stellatoidea는 발견되지 않았음. 1995. 8~1995. 12) 분리된 균의 집락과 균체(200배)의 모양이 그림 5에 나타나 있다. 집락과 균체의 모양은 전형적 albicans와 tropicalis로 나타났다.

정체분리 되었지만 피부과 균학회의 상례에 따라 항원의 제조는 정제 균주를 일본으로부터 분양받아 사용하였다.

#### 2. 혈청과 난황중 ELISA에 의하여 평가되었다.

그림 5에는 Candida albicans의 경우 3주경부터 혈청과 난황에서 항체가 증가 하기 시작하였다. 난황에서의 역가는 3주까지는 비슷한 양상을 보이다가 4, 5주에서부터 난황의 역가는 혈청보다 약간 낮은 수준을 보였다.(그림 6)

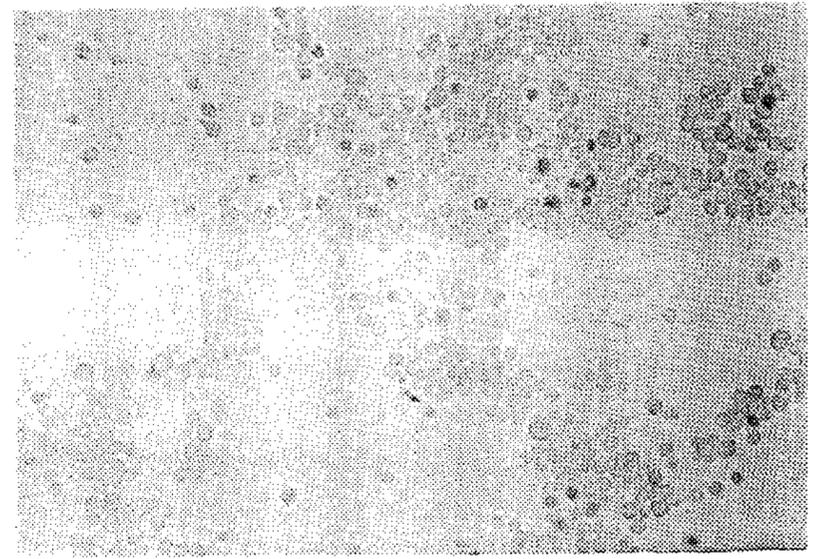
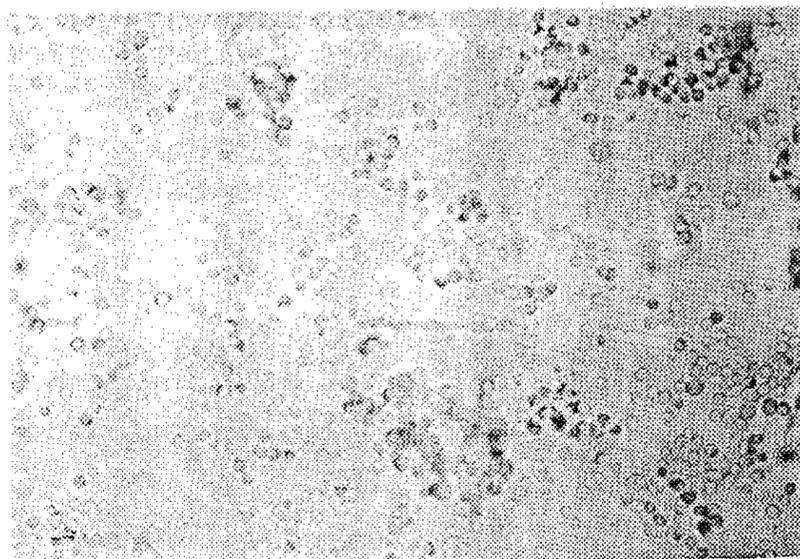
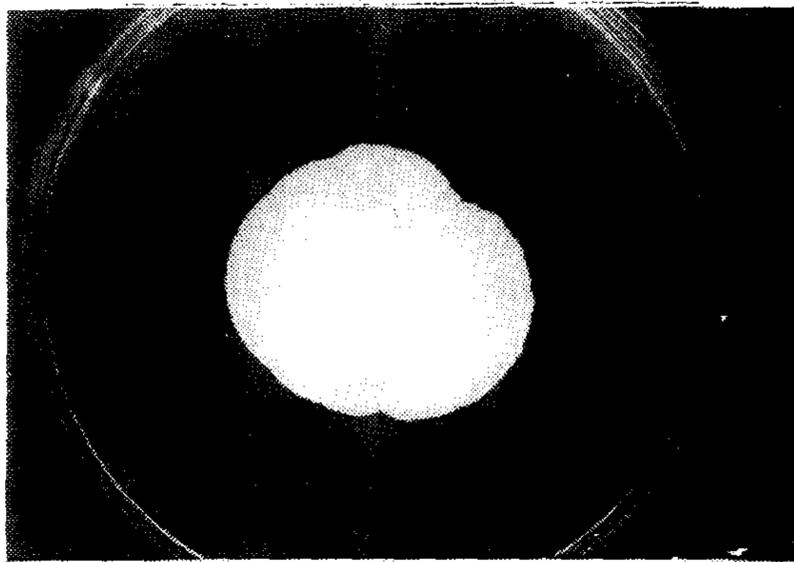
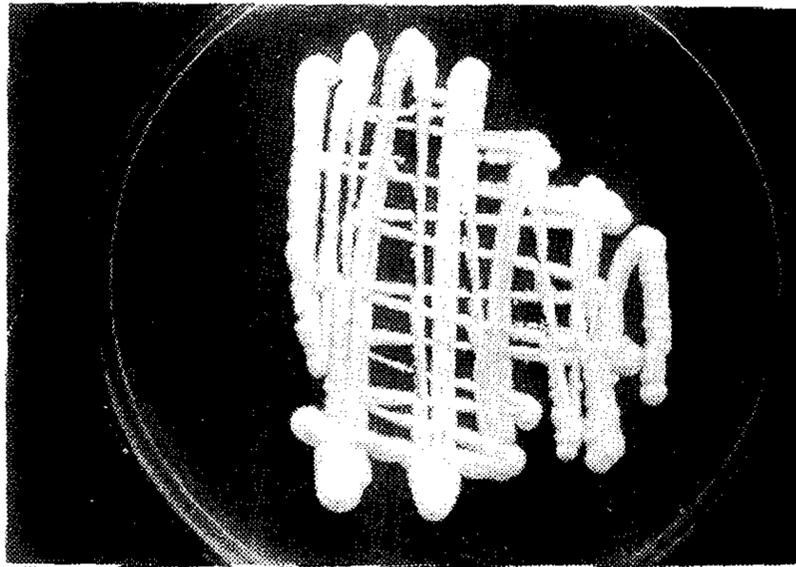
Candida tropicalis의 경우도 전자와 비슷한 양상으로 전개되나 5주에서 난황의 항체가 혈청보다 상대적으로 낮은 것으로 나타났다.(그림 7)

Candida Stellatoidea는 2주경부터 급속히 항체가 생성 되었는데 혈청과 비교하여 항상 낮은 수준으로 나타났다.(그림 8)

Candida에서 각 IgY의 Positive, Negative 혈청들을 각 희석 배수에서 ELISA OD값을 비교하였는데 그 결과가 그림 9-11에 나타나 있다. 이 그림들에서 보는 바와같이 negative serum의 OD가치가 2배 이상이 나타나 항체성이 인정되었다.

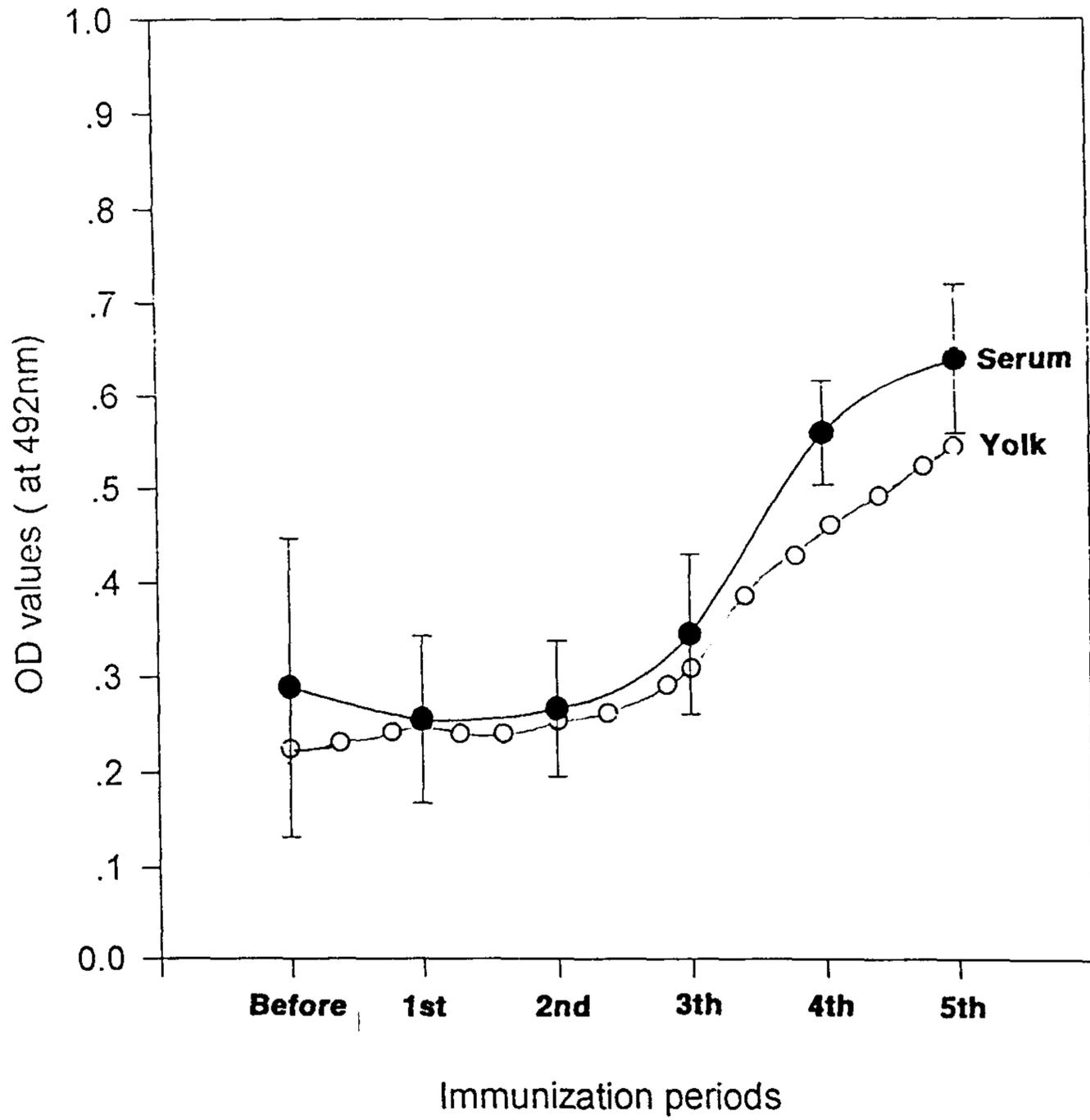
3종의 Candida에서 공히 4배이상 희석에서는 차이가 없었다.(그림 9-11)

또다른 Series 에게 개체별 OD의 변화는 3차원적으로 그림 12에 나타나 있



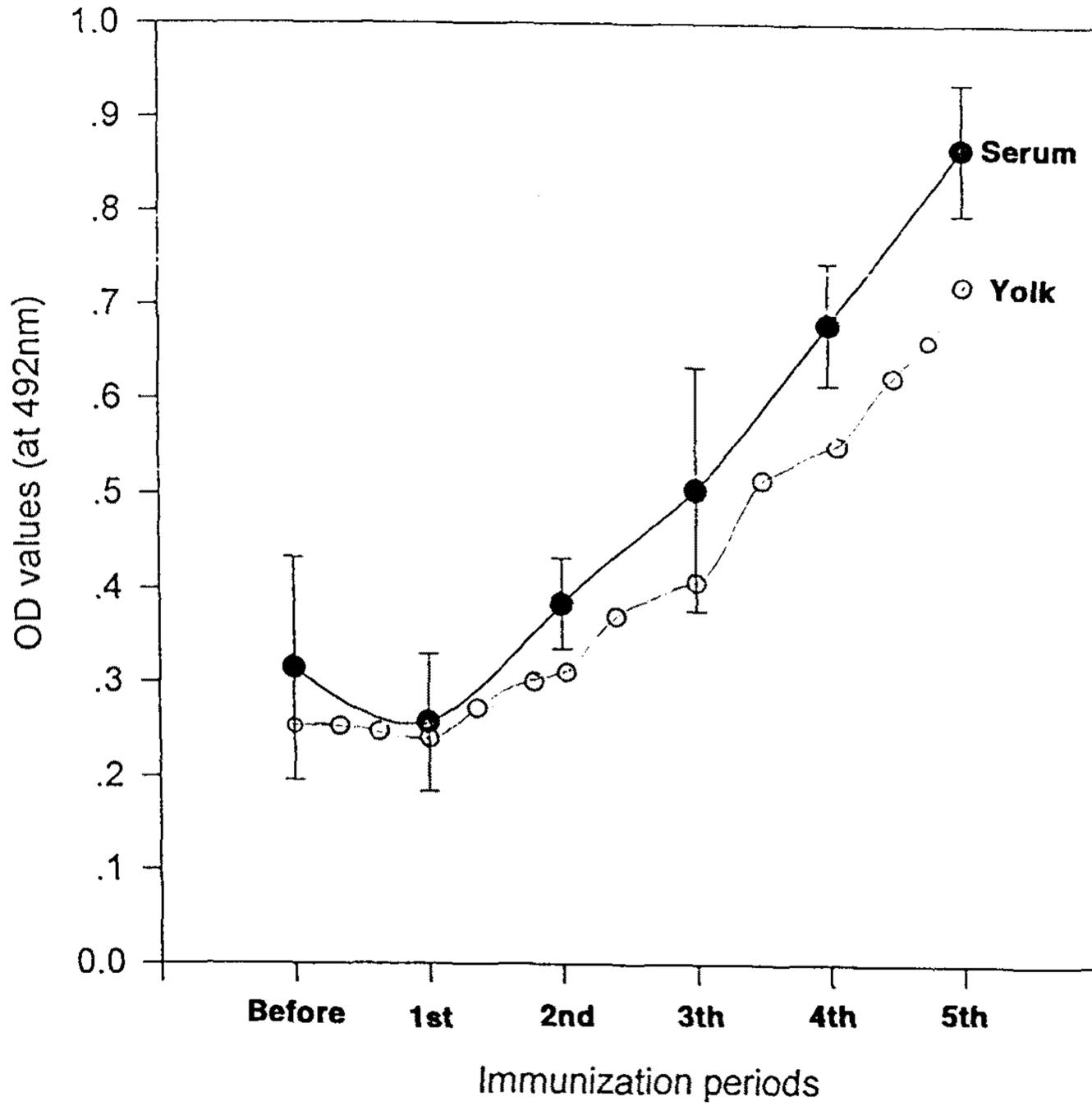
〈그림 5〉 candida 균의분리  
(Identification and separation of Candida)

## ELISA to *Candida albicans*



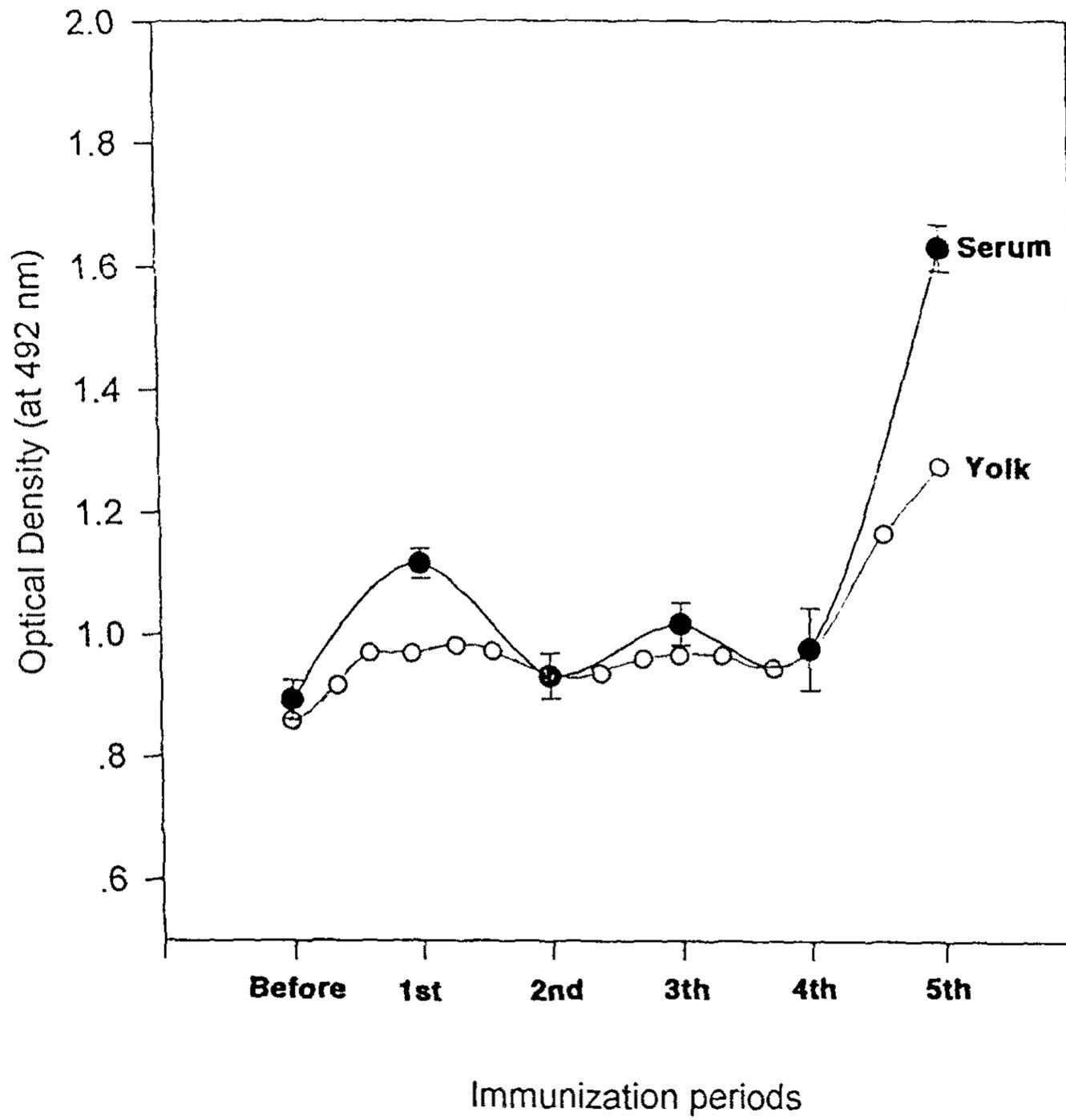
〈그림 6〉 혈청과 난황 중 항체평가(*albicans*)  
 (Evolution of antibody in serum and yolk, *Albicans*)

## ELISA test to *Candida stellatoidea*



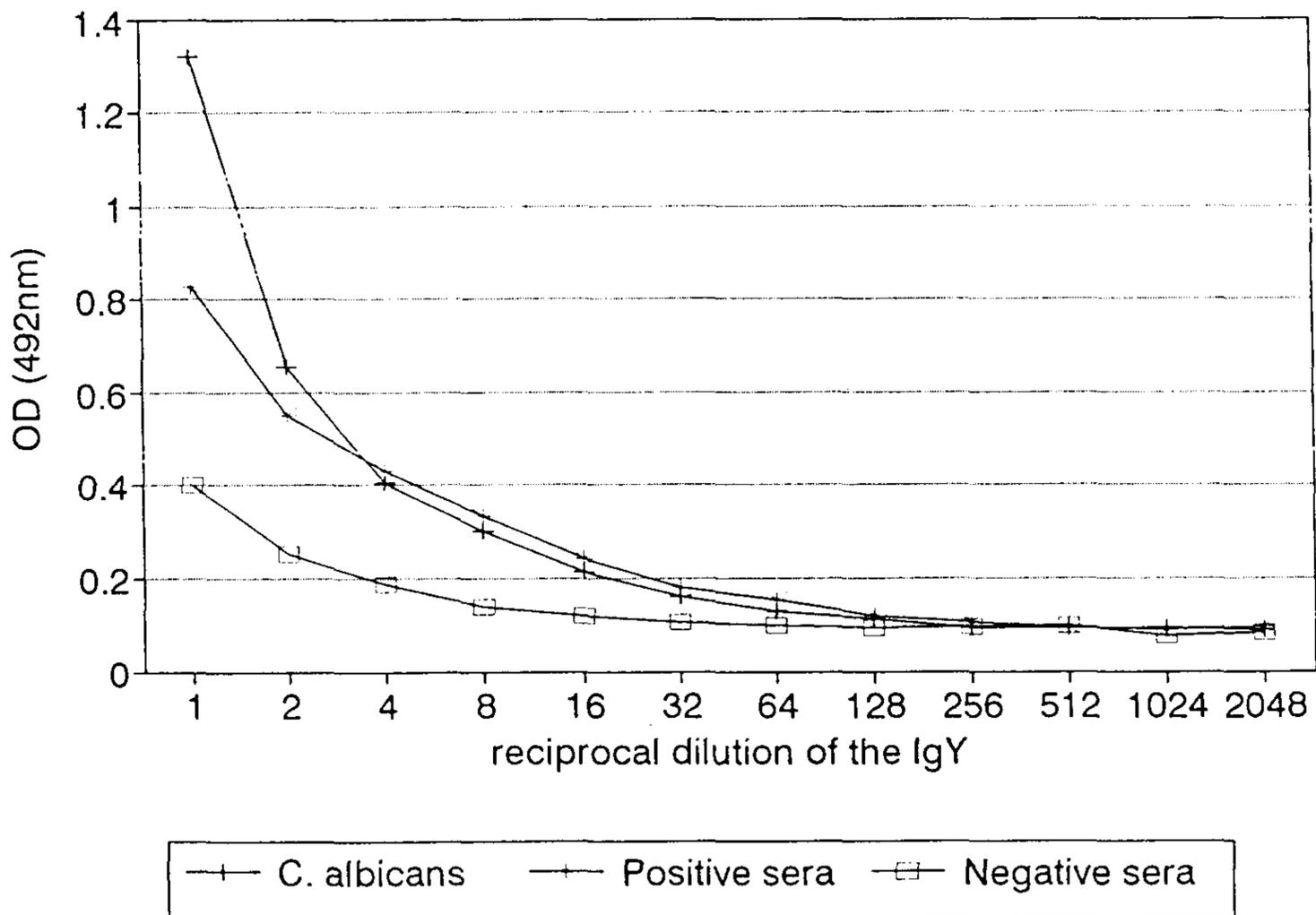
〈그림 7〉 혈청과 난황중 항체평가  
(Evolution of antibody in serum and yolk, tropicalis)

### ELISA test to *Candida tropicalis*



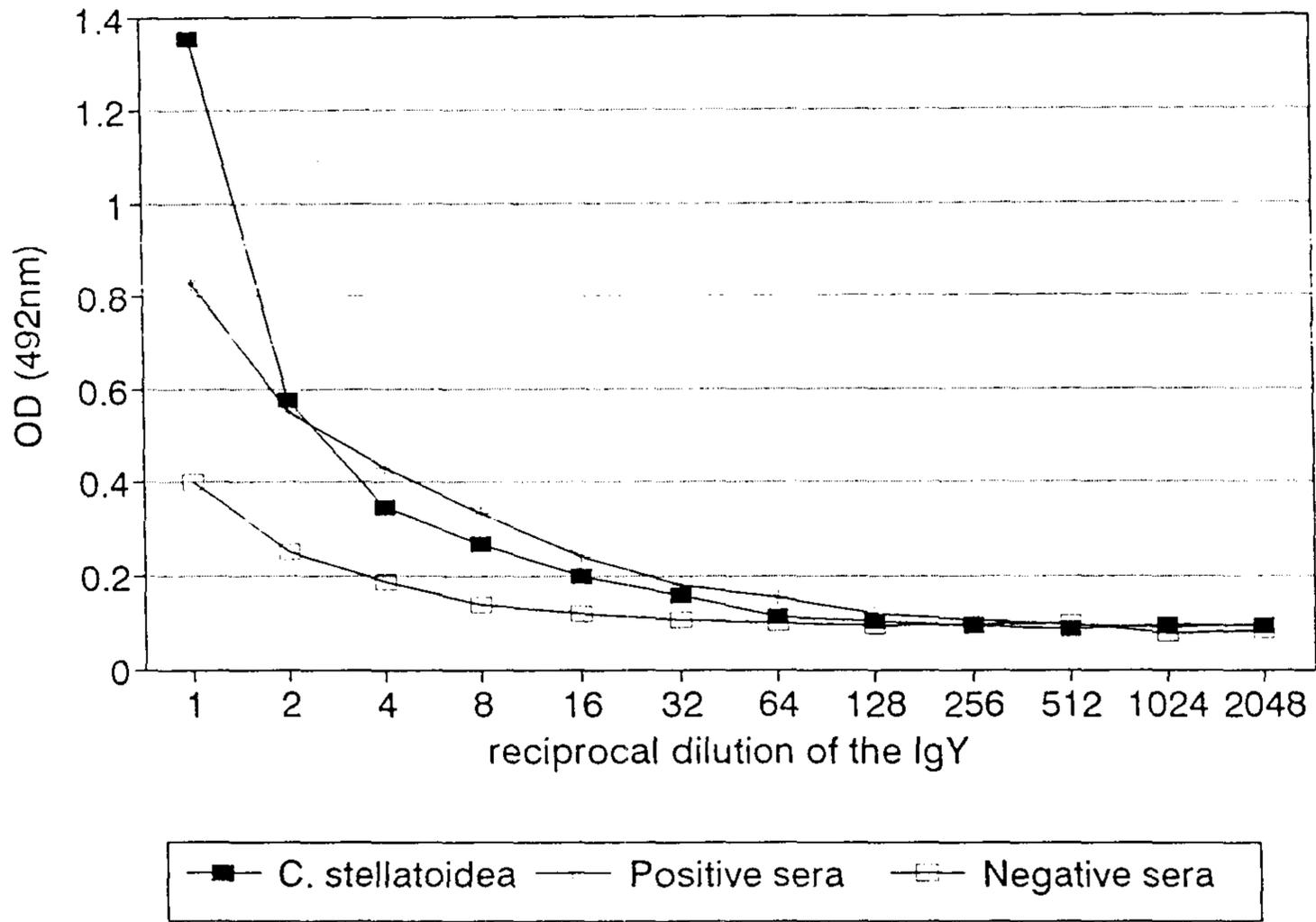
<그림 8> 혈청과 난황중 항체평가 stellatoidea  
(Evolution of antibody in serum and yolk, stellatoidea)

### ELISA test for IgY antibodies response to *Candida albicans*



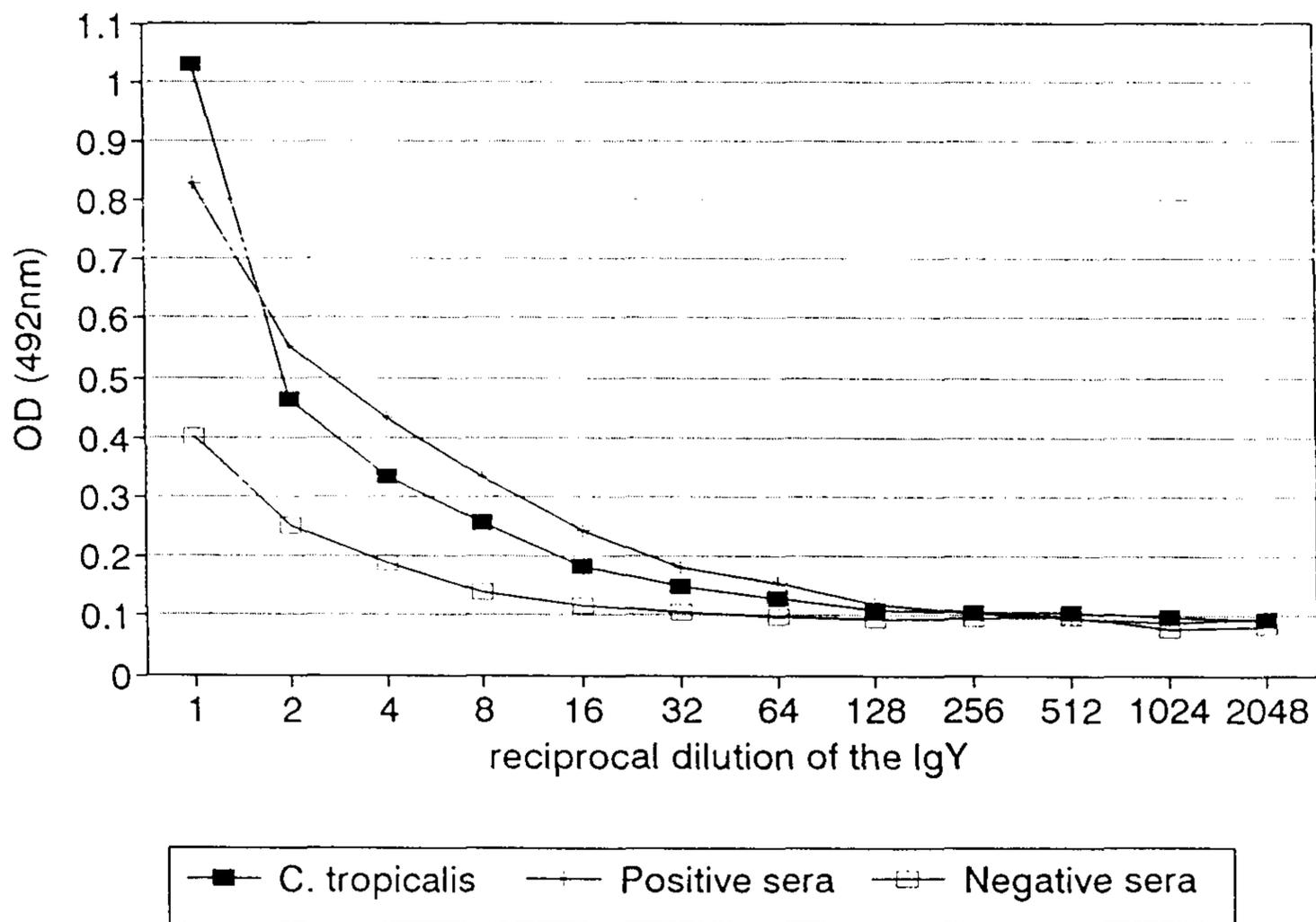
〈그림 9〉 IgY와 혈청과 ELISA 비교  
(Comparison of ELISA value between IgY and Sera)

### ELISA test for IgY antibodies response to *Candida stellatoidea*

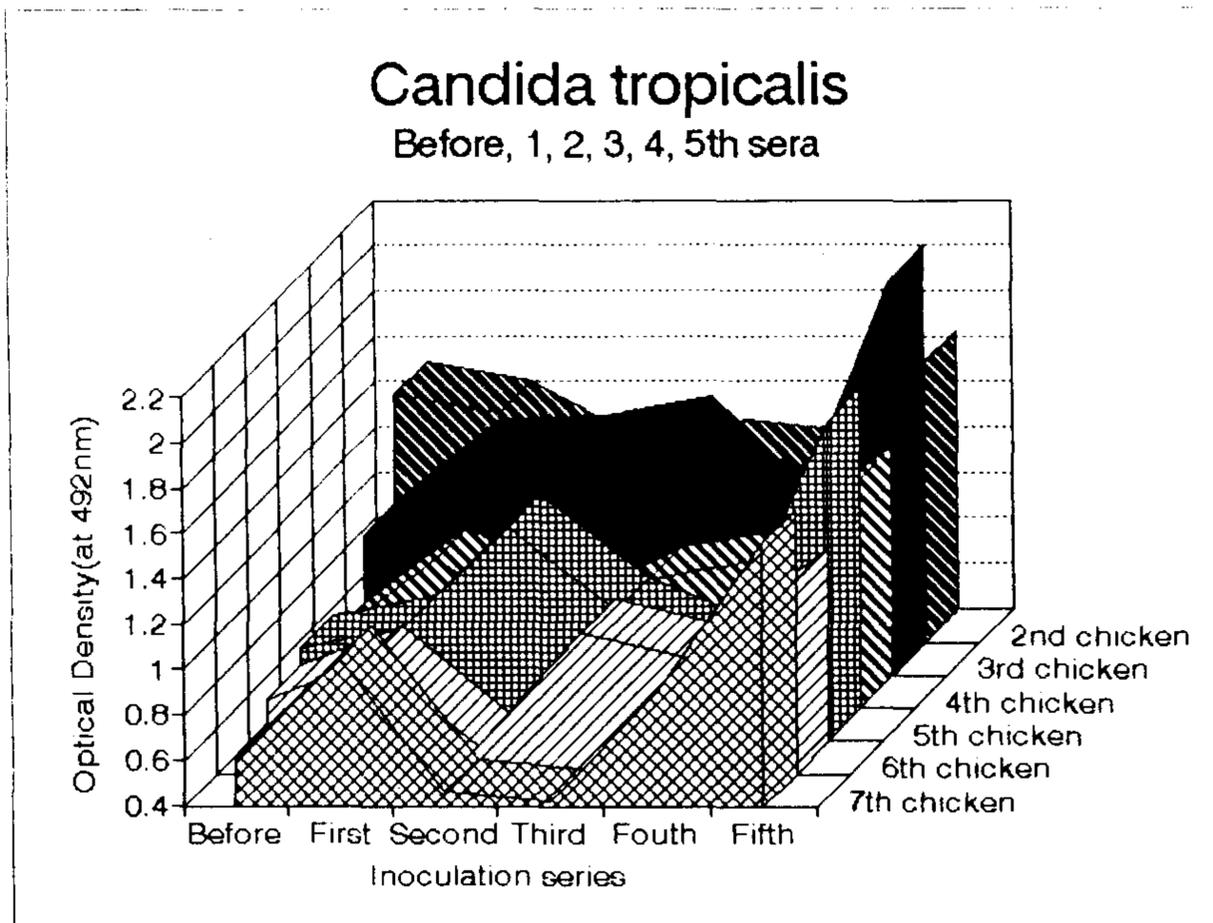


<그림 10> IgY와 혈청과 ELISA 비교  
(Comparison of ELISA value between IgY and Sera)

## ELISA test for IgY antibodies response to *Candida tropicalis*



〈그림 11〉 IgY와 혈청과 ELISA 비교  
(Comparison of ELISA value between IgY and Sera)



〈그림 12〉 개체에 따른 ELISA치 변화  
(Three dimensional graph of ELISA variation according to individuals)

표 1. 100g 단백질 중 각 amino 산의 % 비율  
 (% proportion of each amino acid in 100g protein)

aminoacid	milk	IgY
Asp	8.84	0.27
Thr	4.67	0.39
Ser	5.95	3.18
Glu	23.57	8.16
Gly	2.20	2.96
Ala	3.99	1.85
Val	6.84	4.91
Met	1.72	28.23
Ilen	3.70	8.45
Leu	10.06	9.58
Phe	5.40	4.10
His	10.18	1.84
Lys	9.68	24.28
Alg	3.84	1.37
Total	100	100

다. 7마리의 닭에서 OD가 2.0에서 1.0으로 다양하게 개체별 차이가 나타났다. 보다 강한 항체역가를 위해서는 또다른 면역방법도 시도되어야 한다.

### 3. 항체의 평가(in vivo)

in vivo에서는 prednisolone을 주사한 Guinea pig에 균액을 발라 Candida증을 유발하고 난 후(7일) 약 10일간 항체 용액을 발라주면 증상이 사라진다. 증상이 사라진 후 육안 관찰 한 후 증상이 있었던 조직을 잘라내 균질 한 후 배지에 배양한 후 colony 수를 션는데 거의 정상 colony가 나타나지 않았기 때문에 항체가 Candida증을 치료한 것으로 보인다.

### 4. 항체의 화학분석

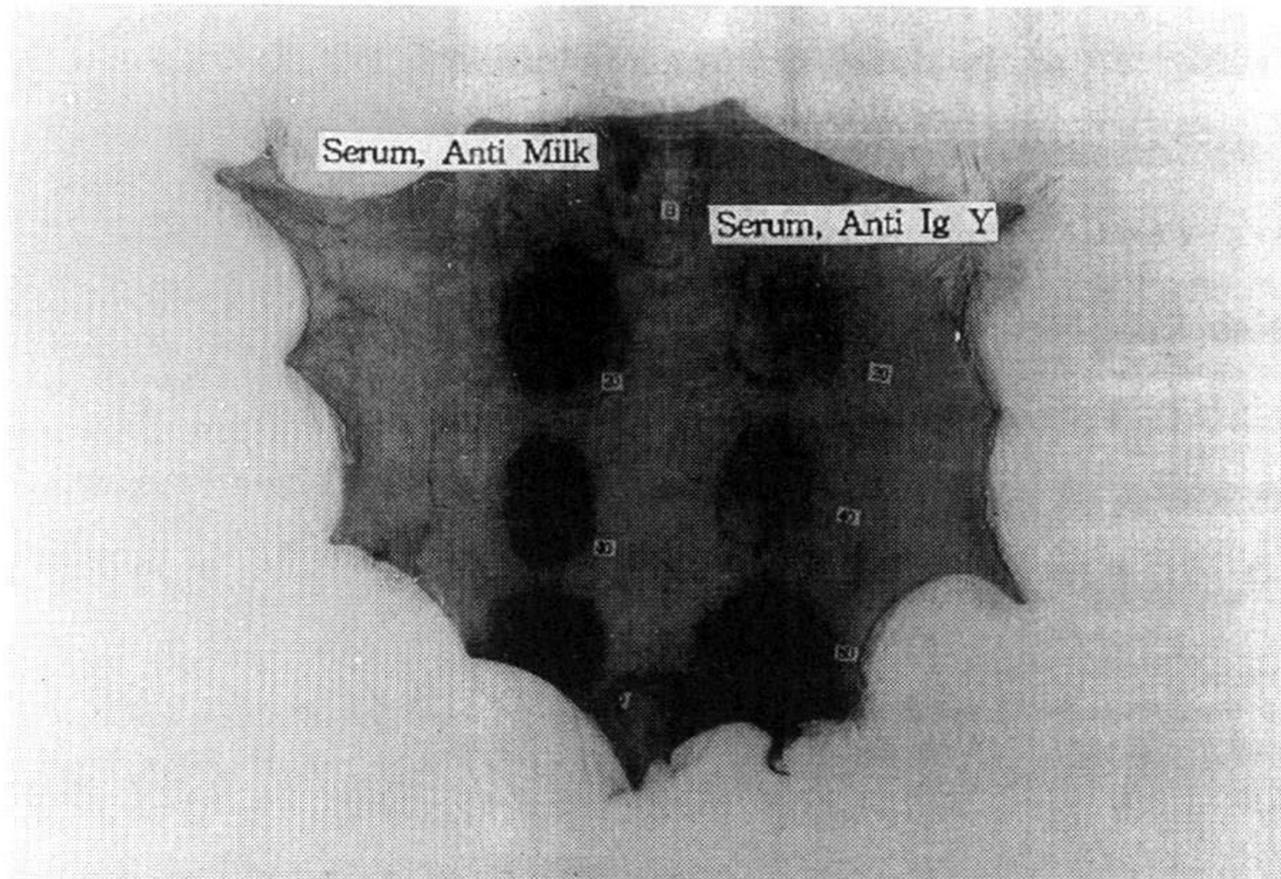
IgY를 6N HCl에서 가수분해시킨 후 조성 amino산을 정량한 후 단백질 100g 각 amino산의 %비율이 표1에 나타나 있다. IgY는 우유와 비교하여 Asp와 Thr His은 아주 적게 함유되고 반대로 Met과 Lys은 IgY가 훨씬 높은 비율을 나타내었다.

### 5. PCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis)

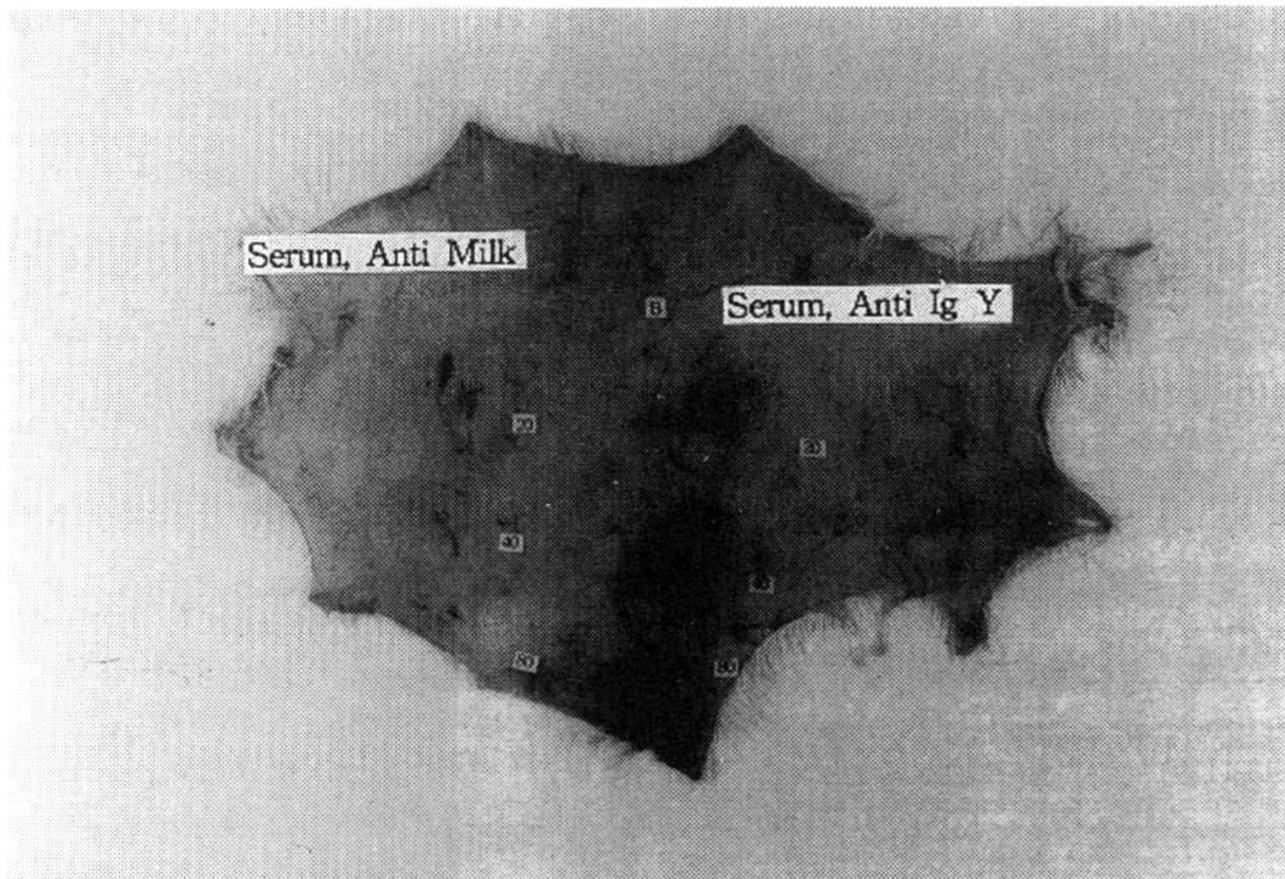
그림 13의 좌측은 우유의 항혈청을 등의 피부주사하고 우측 IgY의 항혈청을 주사한 것이다. 혈관에 항원으로 우유+IgY+Evans blue를 주사하고 희생시킨 후에 Skin의 착색을 나타낸다. 주사부위의 수자는 각 항혈청이 희석 배수를 나타낸다. 이 그림에서 우유의 allergenicity는 인정되나 IgY의 allergenicity는 인정되지 않았다.

그림 14는 항혈청의 등 피부주사는 그림 13과 동일하고 혈관에 주사는 IgY와 Evan's blue만 항원으로 주사한 것이다.

양쪽 모두에서 blue spot가 나타나지 않으므로 IgY의 allergy성은 물론 없고 IgY가 유 allergy의 보체로도 작용하지 않는다는 것을 나타낸다.



〈그림 13〉 우유와 IgY 혼합항원과 비교한 anti-IgY의 PCA skin  
 (PCA skin for anti-IgY with compare to milk antigen mixed with milk and IgY)



〈그림 14〉 IgY 항원에 대한 우유와 anti IgY의 PCA skin  
 (PCA skin for anti-milk and anti-IgY against antigen IgY)

## 6. 소화율

표 2는 IgY를 우유와 비교한 NPN비율이다. 우유는 이미 12시에서 전체 단백질 중 56%가 유리된 반면 IgY는 25%만 분해되고 24시간에서도 우유는 98%인 반면 IgY는 57%로 나타났다. 100g중 유리된 amino산의 량도 우유에 비해 IgY는 훨씬 적게 나타났다. 이 결과로부터 우유는 IgY는 우유에 비해 소화율이 낮다는 것을 시사한다. 우유와 IgY의 소화중 유리된 amino산의 pattern에서도 상당한 차이가 나타났다. 우유와 비교하여 Asp와 Ser은 비슷한 수준이다.

Val, His Arg의 비율은 Ig가 현저히 높고 반대로 Thr, Glu, Gly, Ala은 우유가 약 2배 이상 높게 나타났다. 이러한 비율들은 조성 각 단백질들과의 어떤 규칙적인 변화는 없는 것으로 보인다.(표 3)

표 2. 우유와 비교한 IgY의 소화율

(Digestibilities of IgY with compare to milk(NPN /NT;%))

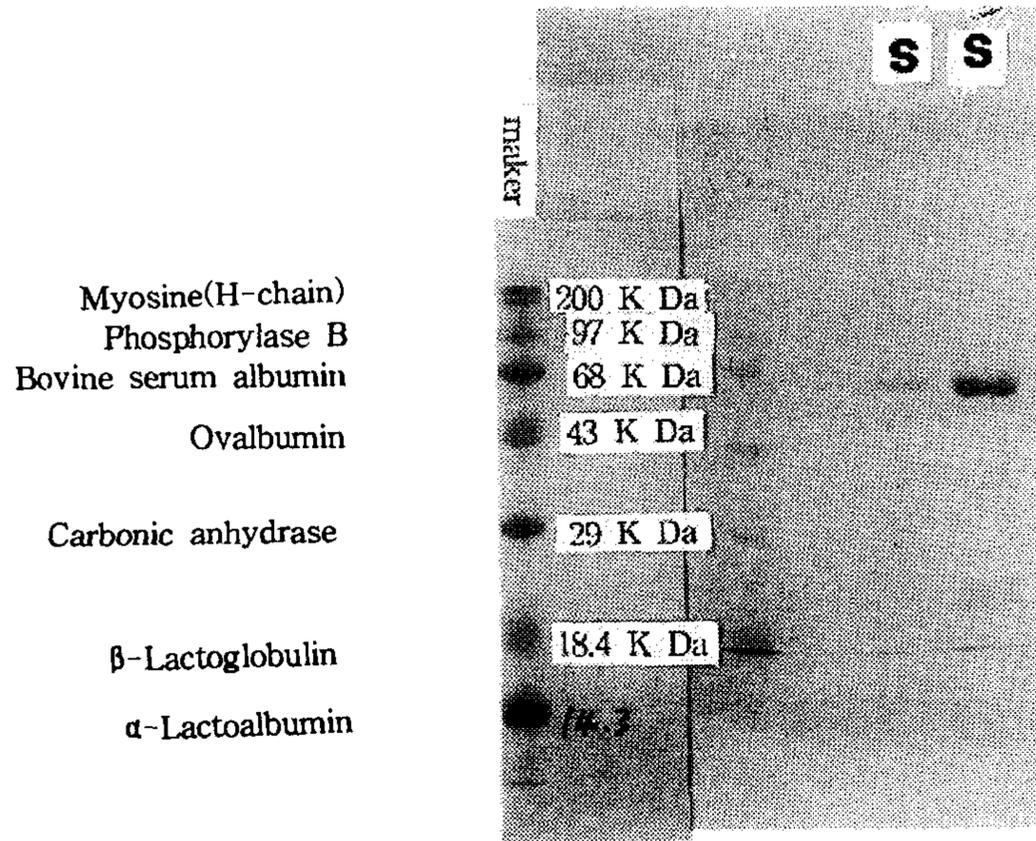
protein	hrs	12	24
milk		56	98
IgY		25	57

## 7. 전기영동

그림 15는 전기영동에 대한 IgY의 분자량 측정이다. 분자량 67KDa과 28KDa에서 Band가 나타나 것은 IgY의 Heavy chain과 Light chain으로 사료된다.(Akita et. Nakai 1993)

표 3. 소화중에 단백질 100g에서 유리된 각 amino산의%비율  
 (% proportion of each amino acid liberated during digestion from 100g protein)

aminoacid	milk	IgY
Asp	3.20	3.27
Thr	4.25	1.58
Ser	3.37	2.62
Glu	10.32	4.72
Gly	4.71	1.51
Ala	6.37	2.03
Val	2.61	10.77
Met	2.25	0.50
Ileu	0.12	1.02
Leu	24.32	2.78
Phe	19.54	1.21
His	6.97	42.02
Lys	11.24	2.03
Arg	0.54	23.93
Total	100	100



S = Sample

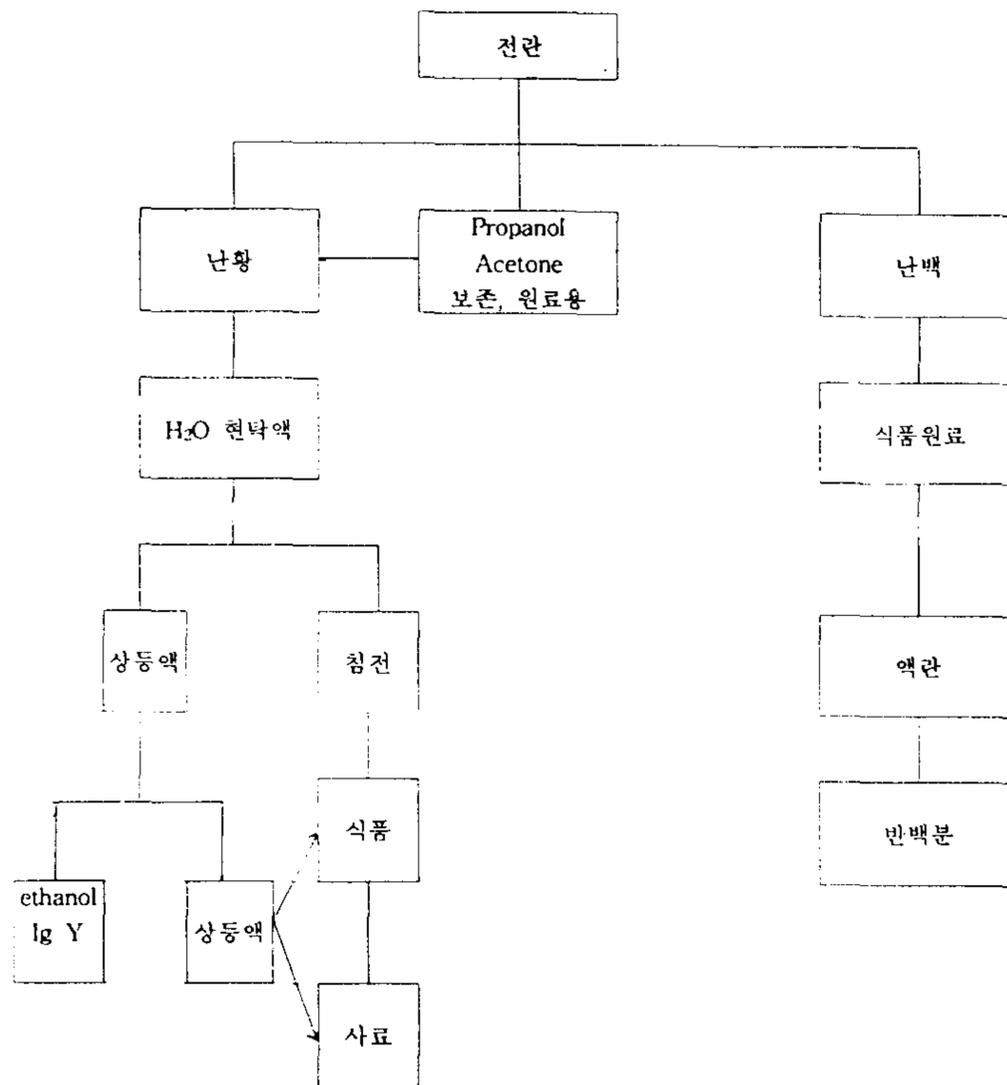
<그림 15> 전기영동에 대한 IgY의 분자량 측정  
(Molecular determination of for IgY by electrophoresis)

## 8. 면역 계란의 이용방법

문헌상에 나타난 정제방법을 본 연구에서 결과와 종합하여 본면 그림 16과 같다. 계란이 생산되면 우선 난황을 보존이나 원료등으로 사용하고자 할 때 propanal acetone 처리를 하여 보관하고 직접 분리할 경우에는 물 현탁액에서 침전 식품이나 사료로 사용하거나 여기에서 또 인지질을 분리할 수 있다.

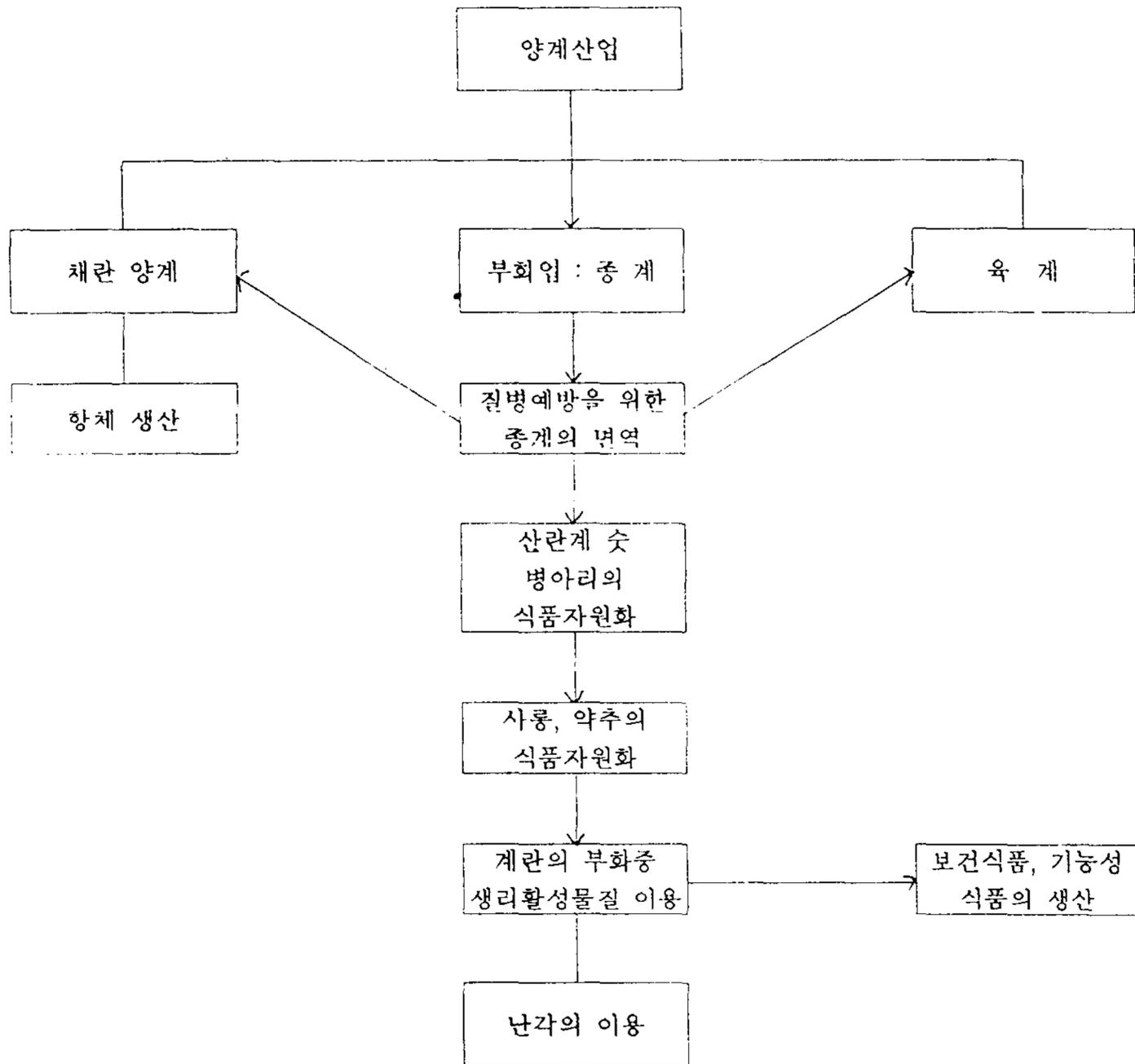
상등액은 난황 단백질을 함유하기 때문에 또 식품사료로 사용한다. 50% ethanol을 회수하면 가장 염가로 98% active IgY를 회수할 수 있다.

물론 우측의 난백은 정상적으로 식품에 사용한다. 즉 난황에서 부존가치가 높은 항체가 생산되는 이점이 있다.



〈그림 16〉 면역계란의 이용  
(Utilization of immunized egg)

## 양계 산업 안정화 방안 (생산비 절감, 부존가치 증가)



〈그림 17〉 양계 산업 안정화 방안

(A proposed direction for stabilization of poultry industry)

## IV. 활용방안

1. 병아리 질병 예방비 절감을 위한 종래 면역체계 확립
2. 기타 인간, 가축, 가금의 질병 예방을 위한 항체 생산기술 연구시도
3. 채란업자와 제약회사에 홍보·기술이전
4. 항원 제조와 공급체계 확립
5. 종래의 Candida증 진단 시약보다 염가의 진단 kit 개발
6. 난황 부산물 부존가치 증가를 위한 생리활성물질을 분리 연구
7. 시판 난황분말을 면역학적 분석을 수행하여 유용한 항체를 발굴이용(Salmonella, Clostridium, 설사균 등)
8. 식용 계란으로 또 다른 항체(생리활성물질, 고영양가)를 포함하는 계란을 생산하여 고 부가가치 계란을 생산해 계란의 차별화와 고급화 증진과 계란의 상품 가치를 더욱 증진시킨다.

양계산업을 안정화시키기 위하여서는 다양한 각도가 있을 수 있지만 계란의 부존가치를 증가시킨다는 관점에서는 다음과 같이 제안될 수 있다.

우선 이미 밝힌 바와 같이 채란양계에서 항체 생산을 하고 양계에서 빈번히 발생하는 중요한 질병을 종계의 종란(부화장)에서부터 면역체계를 확립하는 것이 긴요하다고 시급하다. 이것은 한개 질병에 대해 방역비를 및 백분지 일로 감소시킬 수 있다고 한다. 그리고 산란계의 숫병아리가 그냥 폐기되어 환경오염 등이 문제인데 이것을 식품자원화하여 산란계 생산가격을 절감시켜야 한다.

물론 부화중 약추 사육도 같은 이유에서 자원화 되어야 한다. 왜냐하면 전국 부화장에서 생산되는 이 부산물은 약 25%가 되기 때문에 숫병아리와 합하면 막대한 단백질 자원이 영양으로 이용되지도 못하고 환경만 오염시키기 때문이다. 난각도 비료나 사료가 아닌 고부가가치 물질개발이 이루어져야 한다. 또 하나의 부존가치 증가방법이 부화계란 중 생리활성물질의 이용이라고 할 수 있다.(이 부분은 초기에 계획했으나 2차년도에서 축소조정되었음.)

지금까지 열거한 방법들이 실행된다면 국내양계산업은 어떤 경우에도 분명히 안정화 될 수 있다고 본다.

## V. 결 론

1. 산란계에서 항체가 생산 되므로 염가로 대량의 특이 항체를 제조 할 수 있고 소화 효소에 저항성이 있기 때문에 Candida증 항체가 예방치료 되는 약제화(경구, 외용) 가능하다.
2. 치료제 뿐만아니라 진단을 위한 Kit 시약의 개발도 가능하다. 종래의 Kit는 각종 Candida 에 대한 생화학적 특성에 따라 균을 동정했기 때문에 시약이 많이 들고 균의 균의 배양시간이 길었으나 항원(환자의 검사물) 특이항체(Kit 내)가 반응하는것과 ELISA 원리로 이용하면 완만하게 제조할 수 있다.
3. IgY의 아미노산 조성과 소화율은 비교한 우유보다 소화율이 낮고 소화속도도 느린 것으로 나타났다.
4. 전기 영동에서는 분자량이 68 KDa와 26 KDa와 해리되었다.
5. 우유와 비교한 allergenicity에서 IgY의 소화액은 물론 정제 IgY로 allergenicity를 나타내지 않았다. 뿐만 아니라 우유와 Ig Y의 cross reactivity도 인정되지 않았다.
6. 이 기술은 선행연구의 결과로 보아 다양한 생명공학적 기술에 응용할 수 있다.
7. 결과적으로 양계업자가 이 기술로 항체를 생산하면 수익 증대되어 외국계란이 들어와도 경쟁력을 가지기 때문에 UR 대응효과가 있다.
8. 이 기술병아리의 질병예방을 위해 종계에서부터 면역하면 육축나 방역비용을 현저히 감소 될 수 있다.
9. 이 연구는 양계산업의 전반적 발전방향을 제시한다.
10. 이 기술은 대규모 사육농가도 가능하지만 영세채란업자에게 사양관리 등의 특성 때문에 유리하다.

## VI. 참고문헌

- Akita E. M. , Nakai S(1993a)  
Comparison of four purification method for the production of immunoglobulin from egg laid hen immunized an enterotoxigenic E. Coli. Strain  
J. Immunol. Methods. 160(2) 207-214.
- Akita. E M. , Nakai S(1993)  
Production and purification of Fab'fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y(Ig Y)  
J. immunol. Method. 162(2). 154-164.
- Akita E. M. , Nakai S(1992)  
Immunoglobulins from egg yolk : isolation and purification. J. Food Sci. 57 3 629-634.
- Akiyama K., Yasueda H. , Mita H., Yanagihara Y., Kaneko F., Mcda Y., Hayakarawa T., Hasegnwa H., Shida T. et. al (1993) Arerug : 42(10). 1628-1632.  
The allergergic reaction to acid protease released by Candida albicans.
- Anaissie E., Hachem R., K-Tin-U C., Stephens C., Bodey PB. (1993)  
Experimental hcmatogenous candidiasis caused by Candida krusei and Candida albicans : Species differences hen pathogenity.  
Infect Immunol. 61. 4 1268-1271.
- Bade H., Stegeman H. (1984)  
Rapid method of Extraction of antibodies from hen egg yolk.  
J. Immunol Method. 72 421-426.
- Cunningham-Rundles. C (1992)  
Oral pharmaceutical composition cantaining a polyethylene-immunoglobulin G conjugate for reconstitution of secretary immunity. US. US 5, 169627(CI 424-85. 91 : A61K39 /395), 08  
Dec. 1992 Appl. 753,360 28 Oct 1991.

Lane D(1988)

Antibodies, cold spring, Harbor Lab.

Fichtali J., Charter E. A., Lo K. V., Nakai. S(1993)

Purification of antibodies from industrially separated egg yolk.  
J. Food Sci 58(6) 1282-1285, 1290.

Gregory W. W., Katharine E., Magor E., David A. H(1995)

Ig Y : Clues to the origin of modern antibodies.  
Immunology Today 16,8 392-398.

Harada Y. (1994)

Oral antibody foundation for treatment of peridintal diseases.  
Ger. Offen. DE. 4. 324. 859(Cl A16K7 /26), 27 JAn 1994.  
JP Appl. 92 /2,17,153 23 Jul 1992.

Hatta H., Akachi S., Kim M. (1994)

Production of egg yolk antibody(Ig Y) and it use. (Japanea)  
일본 농예 화학회지 68(10) 1457-1462.

Hatta H., Tsuda K., Akachi S., Kim M. j., Yamamota(1993)

Productivity and some properties of egg yolk antibody (Ig Y) against hu-  
man rotavirus  
compared with rabbit Ig G.  
Biosci. Biotechnol. Biochem. 57(3) 450-454.

Hatta H., Tsuda k., Akachi S., Kim M., Yamamoto T., Ebina T. (1993)

Oral passive immunization effect of antihuman rotavirus Ig Y and it  
behavior against enzyme  
Biosci. Biotechnol. Biochem. 57(7) 1077-1081.

Hatta H. ,Kim M. ,Yamamoto T(1990)

A novel isolation method for hen egg antibody "Ig Y"  
Agric. Biol. Chem. 54(10) 2531-2535.

Heike B., Stegemann(1994)

Rapide method of extraction of antibody from hen egg yolk  
J. Immunol. Method. 72 421-426.

Horikoshi T., Hiraoka J., Saito M., Hamada S(1993)

Ig Y antibody from hen egg yolks : Purification by ethanol fractionation.  
J. Food Sci.  
58(4) 739-742, 779.

Hsu K. H., Chu, F. S., (1992)  
Production and Characterization of antibodies against aflatoxin in laying  
hens.  
Food Agric. Immunol. 4(2) 83-91.

Inomori K., Yokota H., Seko M., Tanaka M., Kin B., Fujiki M., Hatsuta  
H (1993)  
Method for immobilizing chicken egg antibody.  
Jpn. Kokai Tokky. Koho. JP 05, 340, 948 [93. 340,948] (Cl G01N33 /547)  
24 Dec. 1993 Appl. 92 /175,115 09 Jul 1992

Inoue H., Ogasawara Y., Hatsuta H., Toda Y. (1993)  
Turbidimetric immunoassay using antibody derived from chicken egg.  
Jpn. Kokai Tokky Koho JP 05, 107, 247(93, 107, 247)  
(Cl. G01N33 /531) 27 Apr. 1993 Appl. 91 /296,428 15 Oct. 1991

Jockowski G. , Takahashi M. (1995)  
Monoclonal antibodies to egg yolk immunoglobulin(Ig Y)  
PCT Inti Appl. WO 9502,612(Cl, C07K54 /28) 26 Jan 1995 US Appl. 26.  
4531, 03 Mar 1993.

Kuroki M., Ohta M., Ikemori Y., Derlata R. C., Yokoyama H., Kodama  
Y (1994)  
Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific  
immunoglobulin from chicken egg yolk.  
Arch. Virol 138(1-2) 143-148.

Lammli V. K (1970)  
Cleavage of structural protein during assembly of head of bacteriophage  
227:680-685.

Lowry Rosebraugh N. Farr A and Randal R. (1951)  
Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193  
256-261.

- Lee Y. K., Surzycki S. S., Lee Y. I. (1995)  
 Production of egg yolk antibody(Ig Y) against placental DNA-dependent  
 RNA polymerase II.  
 J. Biochem. Mol. Biol. 28(1) 27-32.
- Liu LR., Wang H. P., Yong Tr., Feng S(1993)  
 Studis on antibody-Ig Y against stomach cancer.  
 Recent. Adv. chem. Mol. Biol. Cancer. Res. Int. Symp. 195-200.
- Maebashi. K., Itoyama T., Uchida K., Suegara N., Yamaguchi H(1994)  
 A novel model of cutaneous Candidiasis produced in prednislone-treated  
 guinea pig.  
 J. Med. Vet. Mycology 32. 349-359.
- Meisel. H(1994)  
 Antibodyes from egg yolk of immunized hen against a bioactive  
 caseinopeptide( $\beta$ -casokinin-10)  
 Biol. Chem. Hoppe. Seyler 375(6). 401-405.
- Miyada C. G., Switchenko A. C., Quong M. W., Wong M. Y. L(1993)  
 Method fir detecting Candida infection using D-arabinitol dehydrognase  
 assay.  
 Eur. Pat. App. EP 522,875(Cl. C12N9 /04), 13 Jan 1993.
- Myake S., Momose T., Kita H., Hatsuta H., Tsuda K., Fujiki M., Kin B  
 (1994)  
 Avian egg derived antibody for rotavirus detection.  
 Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 06, 308 128 [94. 308,128] (Cl G01N33 /569),  
 09 Nov 1994 Appl.  
 93 /117,835 21 Apr. 1993
- Nojiri H., Naito S., Takahashi H., Fujik M. Kim M. (1993)  
 Hais care product containirg fowl egg yolk antibody.  
 Eur. Pat. Appl. Ep 542309(Cl A61K 7 /06) 19 May 1993  
 JP Appl. g1 /325,057 14 Nov 1991 16 pp
- Okahashi N(1993)  
 Oral immunization  
 Med. Immunol. 26(6) 597-601.

Otake S., Nisihar Y., Makimura M., Hatta H., Kim M., Yamamoto T., Hirasawa M(1991)

Protection of rat against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody(Ig Y)

J. Dental Res. 70(3) march 162-166

Protocol from scope 1982. ACAC(1990)

Official Method of Analysis, Association of official Analytical Chemists. USA. 1990.

No 924. 06 page 917.

Schade R., Hlina K A., Bucger W., Knoli A(1995)

Yolk-antibodies-a practicable alternative to traditional polyclonal antibodies. (Ger)

Bioferum 18(1-2) 22-24.

Schimizu M., Miwa Y., Hashimoto K., Goto, A(1993)

Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G(Ig Y) by liposomes.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 57(9) 1445-1449.

Shimizu M., Nagashima H., Hashimoto K., Suzuki T(1994)

Egg yolk antibody(Ig Y) stability in aqueous solution with high sugar concentration.

J. Food. Sci. 59(4) 763-765, 772.

Shimizu M., Nakane Y(1995)

Encapsulation of biologically active protein in a multiple emulsion. Biosci. Biotechnol. Biochem.

59(3) 492-496

Thalley B. S Carroll SB(1990)

Rattlesnake and scorpion antivenom from egg yolk of immunized hen.

Biotechnology 8 October 210-214.

Tsuda Ken., Hatsuda M., Fujiki M(1994)

Coujugate of low molecular weight hapten and animal protein for antibody production.

Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 06 16. 167[94. 16. 697] (Cl C07K15/14) 25 Jan 1994 Appl.

92/200. 450. 03 Jul 1992.

Yokoyama H., Peralta R. C., Sendo S., Ikemori Y., Kedama Y(1993)  
Detectction of passage and absorpction of chicken egg yolk immunoglobulin  
in the gastrointestinal tract of pig by use of enzyme-linked immunosorbent  
assay and flurescent antibody testing.  
Am. J. Vet. Res. 54(6) 867-872.

남경수(1992)  
면역글로브린 Y(Ig Y), 생화학뉴스레타 9-10

대한양계협회(1990)  
UR농산물 협상과 양계산업대책방안  
대한양계협회 출판

대한 양계협회(1994)  
협회 현황  
대한양계협회 출판

대한 피부과학회(1994)  
피부과학  
여문각 출판

서순봉, 김기홍, 방용준(1994)  
의진균학  
도서출판 대학서점

이승배, 최석호, 고태승, 장문주, 한석현(1996)  
계란의 난황에서 Ig Y의 항체생산 및 특성에 관한 연구  
한국축산식품학회지 (6) 85-88

황규광, 양광현(1990)  
계란들을 통하여 propionbacterum acnes에 대한 가가 항체물질의 제조에 관한  
연구  
대한 피부과학회지 34, 부록 2 S19