(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0018545
(43) 공개일자 2011년02월24일

(51) Int. Cl.
A61K 33/20 (2006.01) *A61K 36/73* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61K 33/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0076049
(22) 출원일자 2009년08월18일
심사청구일자 2009년08월18일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
이후장
경상남도 진주시 신안동 20번지 현대아파트 101동 702호
이연옥
경상남도 창원시 동읍 봉강리 491
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 7 항

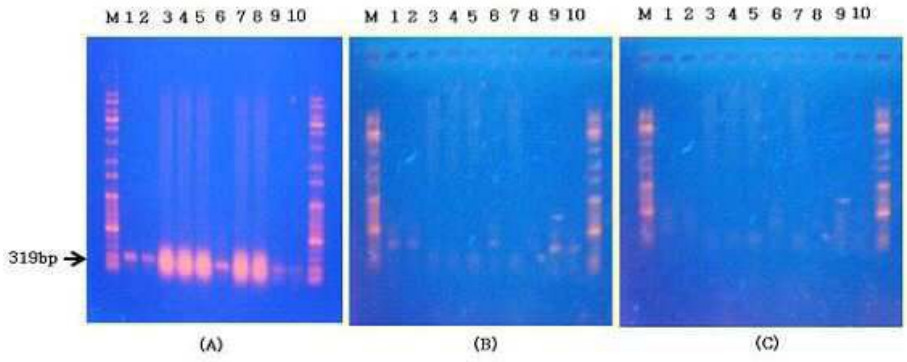
(54) 염소산염을 포함하는 돼지증식성회장염 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 염소산염을 포함하는 돼지증식성회장염 치료용 조성물 및 상기 조성물을 돼지에게 공급함으로써 돼지증식성회장염을 치료하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 생체에 안전하며, 돼지증식성회장염을 효과적으로 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 03-2008-0193
부처명 지식경제부
연구관리전문기관
연구사업명 지역산업기술개발사업(공통기술개발사업)
연구과제명 미네랄과 천연물 합제를 이용한 항생제 대체 돼지증식성 회장염 치료제 개발 및 사업화
기여율
주관기관 경상대학교
연구기간 2008년 05월 01일 ~ 2009년 04월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

염소산염을 포함하는 돼지증식성회장염 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 염소산염은 5 내지 75mM의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

오매 추출물 및 질산나트륨 중 적어도 하나를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 오매 추출물은 오매에 물을 부어 열을 가한 후 상층액을 분리해낸 후 여과하여 수득된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 오매 추출물은 0.05 내지 1.0%의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 3항에 있어서,

상기 질산나트륨은 1 내지 5mM의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

경구 투여용으로 제형화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 염소산염을 포함하는 돼지증식성회장염 치료용 조성물 및 상기 조성물을 돼지에게 공급함으로써 돼지증식성회장염을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 돼지증식성회장염 (Porcine proliferative enteropathy, PPE)은 1994년 영국의 병리학자에 의해 병원체가 확인되어져 1997년 미국에서 *Lawsonia intracellularis*(*L. intracellularis*)로 명명되어진 편성 세포내에 기생하는 그람음성, curved rod 형태의 세균으로, 돼지 외에 말, 개, 여우, 흰족제비(ferrets), 영장류(primates), 사슴, 타조, 랫드, 햄스터 등에서 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있는 질병이다. 돼지에서는 주로 분변을 통한 경구감염으로 전파되며 특히, 자돈의 경우에서는 포유과정에서 오염된 모돈의 유두를 통해 감

염되어, 이유 후 발병하는 것으로 알려져 있다.

[0003] *L. intracellularis*는 감염 후 8~10일경에 장점막부위에서 조직학적 변화를 일으키고, 10~14일경에 임상증상을 관찰할 수 있으며, 21일경 (16-17주령)에 임상증상이 절정에 달하는 긴 잠복기를 특징으로 하고, 분변을 통해 수 주간 균이 체외로 배출되게 된다.

[0004] 돼지증식성회장염은 육성돈 및 도축 출하돈의 회장말단의 비후와 염증을 유발하여 사료섭취량 감소와 증체율 감소 등에 의해 양돈농가에 막대한 경제적 손실을 유발하는 돼지 소모성질환 중의 하나이다. 우리나라의 경우, 2000년에 전국 65개 농장에서 828개의 시료를 채취하여 증식성회장염의 감염 여부를 조사한 결과, 모든 조사대상 농장들이 100% 돼지증식성회장염에 노출되어 있었으며, 개체별로는 828마리 중에 467마리가 양성으로 나와 56.4%의 양성율을 보인 것으로 보고되고 있다.

[0005] 돼지증식성회장염은 유럽, 북미, 호주, 뉴질랜드, 남아프리카공화국, 브라질, 멕시코, 일본, 대만, 태국 등 전 세계적으로 양돈을 하고 있는 나라에서는 대부분 발생되고 있는 질병이다. 미국의 경우에 있어서, 돼지증식성회장염의 농장 및 개체 감염율은 각각 96%와 37%로 알려져 있으며, 돼지증식성회장염에 의해 사료효율성 및 증체율 감소, 폐사 등으로 매년 천만 달러 이상의 막대한 경제적 손실을 입고 있는 것으로 알려져 있다.

[0006] 우리나라의 경우, 돼지증식성회장염에 대한 연구는 부분적으로 진행되고 있으나, 증식성회장염의 원인균인 *L. intracellularis*에 대한 배양 및 특성 분석이 제대로 이루어지지 않아 돼지증식성회장염에 대한 예방 및 치료에 대한 기법이 확립되지 못하고 있다.

[0007] 현재, 주로 사용되고 있는 돼지증식성회장염 치료방법으로는, oxytetracycline(400ppm) 혹은 tylosin(100ppm)을 사료에 첨가해서 2주 정도 투약 후에 3~4주 휴약기를 두고 다시 약제를 투여하는 방법을 수행하고 있는 실정이다. 돼지증식성회장염의 치료에 사용하는 항생제의 농도는 일반적인 권장 치료용량의 두세 배 이상의 고농도로 적용되고 있다. 과량의 항생제를 장기간 사용해야 하는 돼지증식성회장염 치료는, 비육기에 있는 돼지에게는 출하시 식육 내 항생제 잔류가능성으로 인하여 사용할 수 없는 치료방법이다.

[0008] 한편, 가축에 있어서 세계적인 항생제 사용 규제 추세로 인한 일부 사료첨가용 항생제들의 사용금지와 더불어 항생제 대체 치료제 및 질병예방사양 프로그램의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 기존의 항생제(oxytetracycline, tylosin, tiamulin 등)를 대체할 수 있는 치료제의 개발은 전 세계적으로 매우 초기 상태이므로, 이에 대한 연구의 선점을 통해 국내 · 외 돼지증식성회장염 치료제 시장의 확보가 매우 중요한 과제라 할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 이에, 본 발명자는 항생제를 대체할 수 있는 돼지증식성회장염 치료제를 개발하기 위해 예의 노력하던 중, 염소산염이 생체에 안전하면서도 효과적으로 돼지증식성회장염을 치료할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0010] 본 발명의 한 목적은 염소산염을 포함하는 돼지증식성회장염 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 돼지에게 공급함으로써 돼지증식성회장염을 치료하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명의 조성물에서 "염소산염"은 5mM 내지 75mM, 바람직하게는 5mM 내지 45mM, 더욱 바람직하게는 15mM의 농도로 포함되도록 한다. 염소산염이 5mM 이하인 경우에는 돼지증식성회장염 치료 효과가 미흡하고(실시예 3 참조), 염소산염이 75mM 이상인 경우에는 신장과 간에 독성을 유발할 가능성이 높다(실시예 7 참조). 상기 염소산염은 염소산나트륨(sodium chlorate), 염소산칼륨(potassium chlorate), 염소산마그네슘(magnesium chlorate)일 수 있으며, 염소산나트륨이 특히 바람직하다.

[0013] 본 발명의 조성물은 염소산염과 함께 오매 추출물 및 질산나트륨 중 적어도 하나 이상을 추가로 포함할

수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물에서 "오매 추출물"은 바람직하게는 0.05 내지 1.0%, 더욱 바람직하게는 0.1%의 농도로 포함되도록 한다. 오매 추출물의 농도가 0.05% 이하인 경우에는 돼지증식성회장염 치료 효과가 적고, 1.0% 이상인 경우에도 오매의 떫은맛으로 인하여 섭취량이 감소하여 돼지증식성회장염 치료 효과가 떨어진다(실시예 2 참조). 그러나, 본 발명의 조성물에 오매 추출물의 떫은맛을 완화시킬 수 있는 부형제 또는 희석제를 추가한다면, 오매 추출물은 1.0% 이상의 농도로 포함될 수도 있다.

[0015] "오매"는 장미과(Rosaceae)의 갈잎큰키나무 매실나무(Prunus mune Sieb. et Zucc.)의 덜 익은 청매실을 채취하여 40℃ 내외의 저온에서 불에 쬐여 말리거나 연기에 훈증시켜 흑색으로 변한 것으로 맛은 시고 성질은 따듯한 것으로 알려져 있다. 오매의 성분으로는 휘발성 성분, 플라보노이드, 시토스테롤(sitosterol)과 유기산으로 시트르산(citric acid), 말산(malic acid), 숙신산(succinic acid) 그리고 타르타르산(tartaric acid) 등이 다량 함유되어 있다. 보고된 오매의 약리작용으로는 탄저균, 디프테리아균, 포도상 구균, 바실러스균과 폐렴 구균에 대한 항균작용이 있으며, 헥산 엑스는 항돌연변이 활성을 나타내고, 5% 오매환은 회충의 활동성을 현저하게 감소시키는 것으로 알려져 있다.

[0016] 본 발명의 "오매 추출물"은 오매에 물을 부어 열을 가한 후 상층액을 분리해낸 후 여과하여 수득할 수 있다.

[0017] 본 발명의 조성물에서 "질산나트륨(sodium nitrate)"은 특별히 제한되지는 않으나, 1 내지 5mM, 바람직하게는 2.5mM의 농도로 포함될 수 있다.

[0018] 본 발명의 조성물은 음용수 형태로 제형화하여 돼지가 자유롭게 섭취하도록 하는 것이 바람직하다.

[0019] 본 발명의 조성물은 수의학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알코올, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메틸파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다.

[0021] 본 발명의 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 의한 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다. 이렇게 제형화된 본 발명의 수의학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥, 경막 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0022] 본 발명의 조성물은 동물의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100mg/kg의 양을 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한, 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라 증감될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 조성물의 투여 기간 또한 특별히 제한되는 것은 아니지만, 1 내지 30일이 적절하며, 바람직하게는 3 내지 10일이고, 가장 바람직하게는 7일이다.

효 과

[0024] 본 발명의 조성물은 특정 농도 범위에서 생체에 안전하고, 돼지증식성회장염을 효과적으로 치료할 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 조성물은 항생제 대체제로서 사용 가능하고, 미네랄과 천연물의 조합이므로 항생제 이용으로 인한 각종 문제점을 해결할 수 있다.

[0026] 아울러, 본 발명의 조성물은 돼지증식성회장염으로 인하여 사료효율이 저하되고 성장 및 증체가 지연되는 문제점을 예방 및 극복할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0028] **실시예 1: 오매의 열수추출 및 건조**

[0029] 오매의 열수추출은 약탕기에 오매 100g에 물을 부어 1000 mL가 되게 한 다음, 3시간 동안 열을 가한 후, 상층액을 분리해 낸 후, 진공감압 후 여과하였다. 상기 열수추출액의 회수율을 확인하기 위하여 두 가지 방법을 사용하여 비교하였다. 첫째 방법은 여과한 엑스 성분을 회전 진공 증발기(rotary vacuum evaporator)를 이용하여 60℃에서 증발시킨 후, 드라이 오븐(dry oven)에서 수분을 완전히 제거시켜 분말로 만들었다. 두 번째 방법은 여과한 엑스 성분을 회전 진공 증발기를 이용하여 60℃에서 증발시킨 후, 온탕 수조에서 감압 · 농축시킨 다음 동결 건조기로 동결 · 건조시켜 분말로 만들었다. 이렇게 만든 분말들의 회수율은 드라이 오븐에서 건조시킨 경우에는 4.6%이었고, 동결 건조시킨 경우에는 4.5%로 드라이 오븐에서 건조시킨 경우의 회수율이 다소 높게 나타났으나, 두 방법 간에 있어서 커다란 차이를 발견할 수는 없었다. 본 실시예에서는 동결 · 건조 방법으로 오매 열수추출물의 분말을 조제하였으며, 조제된 분말들은 냉동실에 보관하면서 추후 실시예에 사용하였다.

[0030] **실시예 2: 오매의 적용농도 범위 결정**

[0031] **2-1. 실험방법**

[0032] **실험동물:** ICR마우스 수컷 (4주령)을 실험에 사용하였으며, 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명은 12시간 명암주기(점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150-300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 또한, 사료와 물은 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

[0033] ***L. intracellularis*의 감염:** 마우스에 *L. intracellularis*를 감염시키기 위해서, 돼지증식성회장염에 감염된 돼지로부터 채취한 *L. intracellularis*에 감염된 회장부위의 점막을 분리하여 생리식염수에 현탁시킨 후, 카테터를 이용하여 1ml씩 마우스에 경구 투여하여, *L. intracellularis*를 감염시켰다.

[0034] **실험설계:** 마우스의 분변을 채취하여 PCR 검사를 통해 *L. intracellularis*에 감염이 확인된, 25마리의 감염 마우스(평균체중: 29.4±3.3g)를 대상으로 오매 추출물을 농도별(0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 %)로 5마리의 마우스를 한 개 군으로 하여 대조군과 4개의 오매 추출물 투여군을 대상으로 5일간 음용수로 하여 자유섭취 방식으로 투여하면서 경시적으로 분변의 설사 감소 여부를 관찰하여 그 효과를 비교 검토하였다.

[0035] **2-2. 실험 결과**

[0036] *L. intracellularis*를 감염시킨 마우스에 있어서 주된 증상은 증식성회장염에 감염된 돼지에서와 같이 설사 혹은 연변을 보였으며, 심한 경우에는 출혈성 설사를 보이는 경우도 관찰되었다. 따라서 로소니아균에 감염된 마우스들이 오매 추출물을 농도별로 섭취한 이후에 분변 상태의 변화를 관찰하였다. 표 1은 분변 상태에 따라 등급을 정한 것을 나타낸 것이다. 정상 분변을 0으로 하고 수양성 설사를 3으로 하여 관찰된 분변 상태를 분석하였다.

[0037] ***표 1***

분변 상태에 따른 설사 등급

설사 등급	분변의 상태
0	정상

1	약한 설사
2	설사
3	수양성 설사

[0038] 표 2는 오매 추출물을 농도별로 투여한 후, 분변 상태를 등급에 따라 점수화하여 분석한 것이다. 표 2에 따르면, 오매 추출물을 투여한 모든 군에서 시간이 경과함에 따라 점차적으로 다소 개선되는 결과를 나타내었다. 오매 추출물을 투여한 투여군 중에서 오매 추출물 0.1%를 투여한 MF-0.1군의 경우에서 가장 지사 효과가 좋은 것으로 관찰되었다. 오매 추출물을 0.05% 투여한 MF-0.05군은 시간의 경과에 따라 약간의 효과를 보이고 있으나, 대조군과 비교하여 현저한 효과를 나타내고 있지는 않은 것으로 관찰되었다. 또한, 0.5와 1.0%의 높은 농도로 투여한 MF-0.5와 MF-1.0군에서는 시간이 경과함에 따라 지사 효과가 매우 낮은 것으로 나타나고 있으며, 특히, 투여 농도가 가장 높은 MF-1.0군의 경우에 있어서는, 대조군과 비교하여 커다란 차이를 나타내고 있지 않은 것으로 관찰되었다.

[0039] 따라서, 이러한 결과로부터, 돼지증식성회장염의 감염에 따른 설사 및 혈변 증상을 완화시키기 위해 가장 효과적인 오매 열수추출물의 농도를 0.1%로 하여, 다른 약제 성분들과의 상호보완작용을 통해 돼지증식성회장염을 치료하는데 있어서 효과를 보일 수 있도록 적용하였다.

표 2

오매 추출물 투여 기간 동안 각 그룹별 설사 등급 변화

그룹[a]	투여 후 일수					
	0	1	2	3	4	5
대조군	2.6±0.55	2.6±0.55	2.6±0.55	2.6±0.55	2.6±0.55	2.4±0.55
MF-0.05	2.6±0.55[b]	2.6±0.55	2.4±0.55	2.2±0.45	2.2±0.45	2.0±0.71
MF-0.1	2.8±0.45	2.4±0.55	2.0±0.71	1.6±0.55	1.2±0.45	0.8±0.45
MF-0.5	2.8±0.45	2.6±0.55	2.6±0.55	2.2±0.84	2.0±0.71	1.8±0.45
MF-1.0	2.6±0.55	2.6±0.89	2.4±0.55	2.4±0.55	2.2±0.45	2.2±0.45

a: 대조군, MF-0.05: 오매 추출물 0.05% 투여군, MF-0.1: 오매 추출물 0.1% 투여군, MF-0.5: 오매 추출물 0.5% 투여군, MF-1.0: 오매 추출물 1.0% 투여군, b: 5마리 마우스에 대한 평균±SD

[0040]

[0041] **실시예 3: 염소산염(sodium chlorate)의 적용농도 범위 결정시험**

[0042] **3-1. 실험방법**

[0043] **실험동물:** ICR마우스 수컷 4주령을 실험에 사용하였으며, 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명은 12시간 명암주기(점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150-300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 또한, 사료와 물은 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

[0044] ***L. intracellularis*의 감염:** 마우스에 *L. intracellularis*를 감염시키기 위해서, 돼지증식성회장염에 감염된 돼지로부터 채취한 *L. intracellularis*에 감염된 회장부위의 점막을 분리하여 생리식염수에 현탁시킨 후, 카데터를 이용하여 1ml씩 마우스에 경구 투여하여, *L. intracellularis*를 감염시켰다.

[0045] **PCR분석:** PCR 분석을 수행하기에 앞서서, 아가로스 겔을 먼저 만들어야 한다. 1g의 아가로스를 100ml의 TAE 완충용액에 녹여 1% 아가로스 겔을 제조하였다. 50배 TAE 완충용액은, 242g (2M) tris(Trizma base), 57.1ml (1M) 빙초산(100% 아세트산), 100ml 0.5 M Na_2-EDTA(pH8.0) 등을 정량 플라스크에 넣고 증류수를 이용하여 1L로 맞추어 조제하였다. 전자저울(Chemical balance)을 이용하여 아가로스를 정량하여 플라스크에 넣고

완충용액을 채운 뒤 전자레인지에서 살짝 가열하여 녹였다. 아가로스가 굳기 전에 겔을 겔 금형에 부어준 후 약 15분간 그대로 두어 굳게 하였다.

[0046] 전기영동기기에 TAE 완충용액을 알맞게 채우고 앞서 제조한 아가로스 겔을 제자리에 둔 다음, 5㎕ PCR 산물을 겔의 웰에 넣었다. 그리고 마커를 또 다른 웰에 약 3㎕ 넣은 후, 50V로 약 50분 정도 러닝(running)시켰다. 그런 다음, 254 nm의 UV transilluminator (Bio-Rad)를 사용하여 아가로스 겔 상에 형성된 밴드를 확인하였다.

[0047] **실험설계:** 마우스의 분변을 채취하여 PCR 검사를 통해 *L. intracellularis*에 감염이 확인된, 40마리의 감염 마우스(평균체중, 27.6±2.9g)를 대상으로, 각 군을 10마리씩 하여, 대조군(무투약군), 투약군 I(5 mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1% 오매추출물(HFWE)), 투약군 II(15 mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1% HFWE), 그리고 투약군 III(45 mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1% HFWE)로 하여, 음용수를 통하여 자유롭게 섭취하도록 설계하였다. 또한, 실험기간동안 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0048] 경시별로 각 군에 대하여 매일 개체별로 분변을 채취하여 *L. intracellularis*의 존재여부를 검사하여 이를 분석하였다.

[0049] **3-2. 실험 결과**

[0050] 돼지증식성회장염의 원인균인 *L. intracellularis*를 감염시킨 ICR 마우스를 대상으로 음용수를 통해 약제를 투여하면서, 경시적으로 약제의 *L. intracellularis*에 대한 효과를 확인하기 위해 마우스의 분변을 대상으로 PCR분석을 수행하였다. PCR 증폭을 수행하기 위하여 (주)바이오니아에 의뢰하여 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머는 LI-2F, LI2-R (약 319bp)로 명명하였다. 각각의 뉴클레오타이드 서열은 LI-2F; 5'-TATGGCTCTCAAACACTCCG-3'(서열번호: 1), LI-2R; 5'-TGAACCTATTCCTATTCTCC-3'(서열번호: 2)이고 PCR 프로그램은 95℃-30초, 56℃-30초, 72℃-60초, 45회 조건으로 수행하였다. PCR 혼합물의 조건은 5㎕ 주형 DNA와 10㎕의 PCR premixture(Intron, Korea), 1㎕의 각 프라이머 (100 pM), DW 3㎕를 첨가하여 최종 부피가 20㎕로 하여 반응시켰다.

[0051] 표 3은 *L. intracellularis*에 감염된 마우스를 대상으로, 대조군(무투약군)과 투약군(Ⅰ~III)에 있어서 시간에 따른 감염된 마우스의 개체수를 분변에 대한 PCR 검사를 통해 조사한 결과를 나타낸 것이다. 투약군 I의 경우는 시간이 경과에 따라 약간의 치료 효과를 보였으며, 투약 7일째에 20%의 치료율을 보였다. 투약군 II의 경우에는 투여량에 따른 양-반응관계가 비교적 잘 나타나고 있으며, 투약 7일째 모두 완치되는 결과를 나타내었다. 반면에, 투약군 III의 경우에는 투약군 Ⅰ의 경우와 유사한 경향을 나타내었으며, 투약 7일째에 20%의 치료율을 나타내었다.

표 3

본 발명의 조성물 투여 일 수에 따른 *L. intracellularis*에 감염된 마우스

마리 수의 변화

[0052]

그룹	투여 후 일 수							
	0	1	2	3	4	5	6	7
대조군	5	5	5	5	5	5	5	5
그룹 Ⅰ	5	5	5	4	4	4	4	3
그룹 Ⅱ	5	5	4	3	2	2	1	0
그룹 Ⅲ	5	5	4	4	4	3	3	3

[0053] 따라서, 이상의 실험결과로부터 투약군 II (15 mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1% HFWE)의 성분 조성과 투여기간을 이용하여 돼지를 대상으로 한 예비효능실험, 야외적용 시험, 그리고 안전성 시험 등을 통해, 이의 결과를 기초로 해서 최종적으로 안전하고 효과적인 약제의 투여 용량을 결정하였다.

[0054] **실시예 4: 조성된 치료제의 돼지에 대한 스크리닝 검사**

[0055] **4-1. 실험방법**

[0056] **실험동물:** 경상남도 함양군에 위치한 (주) 세농 시험농장에서 설사(연변 포함)를 하고 있는 10주령 전·후의 육성돈을 대상으로 분변을 채취하여 PCR 검사를 통해 돼지증식성회장염에 감염된 것이 확인된 15두(31.4±1.2kg)의 초기 육성돈들을 대상으로 하여 실험을 수행하였다.

[0057] **실험설계 및 투약:** 각 실험군은 5두씩의 초기 육성돈으로 구성하였고, 투약군은 투약군 I(5mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1%MFWE), 투약군 II(15mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1%MFWE), 그리고 대조군(무투약군)으로 설계하여 실험을 수행하였다.

[0058] 조성된 약제는 음용수에 잘 용해시켜 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 사료도 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0059] **시료채취 및 분석:** 음용수를 통해 조성된 약제를 투여하면서 경시별로 실험에 사용되고 있는 모든 돼지들의 분변을 면봉을 이용하여 매일 채취하였다. 채취한 분변으로부터 *L. intracellularis* 균의 DNA를 정제하기 위하여, 얻어진 분변 0.2g을 lysis buffer 950 ㎕ (5 M guanidine thiocyanate, 22 mM EDTA, 0.05 M Tris-Cl; pH6.4, and 0.65% Triton X-100)에 부유한 후 60분 동안 실온에서 반응한 후 14,000 xg에서 20초간 원심분리를 수행하여 상층액을 50 ㎕의 diatomaceous earth suspension (20% diatomaceous earth, 0.17 M HCl)에 섞은 후 실온에서 10분간 반응시킨 다음, 다시 원심분리 (14,000 xg, 20 sec)를 통해 상층액을 제거하여 펠렛을 56℃에서 건조시키고 20 ㎕ TAE 완충용액 (Tris; 10 mM, EDTA; 1 mM, pH 0.8)에 부유시켰다. 부유 후 14,000 xg, 20분간 원심분리를 한 후, 상층액을 시험에 사용하였다.

[0060] PCR 반응이 끝난 시료는 에티듐 브로마이드를 최종농도 0.5 ㎍/㎕로 함유한 아가로스 겔에 전기영동하여 254 nm의 UV transilluminator (Bio-Rad)하에서 확인하였다.

[0061] **4-2. 실험 결과**

[0062] 돼지증식성회장염에 감염된 돼지는 연변 혹은 설사를 나타내며, 심한 경우에는 출혈성 설사를 나타내기도 한다. 따라서 사료효율이 저하되고 성장·증체가 지연되기도 한다. 돼지증식성회장염에 감염된 돼지의 회장은 외관적으로 출혈이 심하고 장벽은 비후 종창되어 있다.

[0063] 표 4는 돼지증식성회장염에 감염된 육성돈에 조성된 약제를 음용수에 혼합하여 투여한 다음 경시별로 분변을 채취하여 PCR기법으로 분석한 결과를 나타낸 것이다. 본 실험 결과로부터 살펴보면, 아무런 처치를 하지 않은 대조군에 있어서는 아무런 변화도 발견할 수 없었던 반면에, 투약군 I에서는 약제 투약에 따른 효과는 투약군 II와 비교하여 서서히 발생하고 있지만, 약제 투약 3일째부터 치료 효과를 나타내기 시작하여 5일째에는 40%의 치료율을 나타내었으며, 투약 7일째에는 60%의 치료율을 나타내었다. 이러한 결과는 앞서 수행한 마우스를 이용한 *L. intracellularis*의 감염시험에서 투약군 I의 경우 투약 7일째에 치료율이 20%이었던 것과 비교하여 다소 높은 치료율을 나타내었다. 한편, 투약군 II의 경우에는 투약 2일째부터 돼지증식성회장염에 대한 치료효과를 나타내기 시작하여 투약 3일째에는 60%의 치료율을 나타내었으며, 투약 5일째에는 80%의 치료율을 나타내었다. 투약 마지막 날인 7일째에는 돼지증식성회장염이 모두 치료되는 결과를 나타내었다. 돼지증식성회장염에 감염된 돼지들의 감수성 정도에 따라서 질병의 중등도가 다르기 때문에 질병에 감염된 정도가 약할수록 빨리 치유되고 감염된 질병의 증상이 중증일수록 천천히 치료된 것으로 사료된다. 또한, 이는 앞서 수행한 마우스를 이용한 *L. intracellularis*의 감염시험에서 투약군 II의 경우, 조성된 약제의 투약 7일째에 모두 완치되는 효과를 나타내었던 결과와 일치하고 있다.

표 4

본 발명의 조성물 투여 일 수에 따른 *L. intracellularis*에 감염된 돼지 마리 수의 변화

그룹	투여 후 일수							
	0	1	2	3	4	5	6	7
대조군	5	5	5	5	5	5	5	5
그룹 I	5	5	5	4	4	3	3	2
그룹 II	5	5	4	2	2	1	1	0

[0064]

[0065] 이상의 결과로부터, 돼지증식성회장염 치료에 있어서, 15mM 염소산염, 2.5mM 질산나트륨 및 0.1% 오매열수추출물(MFWE)로 구성된 약제가 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 음용수를 통해 7일간 투여하는 것이 적절한 것으로 나타났다. 이후, 야외적용시험을 통해 본 약제의 돼지증식성회장염에 대한 치료효과를 확인하였다.

[0066] **실시예 5: 돼지증식성회장염 치료제의 야외적용시험**

[0067] **5-1: 실험방법**

[0068] **공시동물:** 돼지증식성회장염에 대한 치료제의 치료효과를 확인하기 위해 경상남도에 위치한 함양, 진주, 김해의 3개 양돈장의 10주령 전후의 돼지 258두를 대상으로 실시하였다. 감염돈 선정은 각각의 양돈장에서 설사(연변 포함)를 하고 있는 10주령 전 · 후의 돼지를 대상으로 분변을 채취하여 PCR기법을 이용하여 돼지증식성회장염 감염 여부를 확인하였다.

[0069] **실험설계 및 투약:** 각각의 농장별로 감염돈을 선별하여 10-15마리를 한 방에 수용하여 실험을 수행하였다. 약제 투여는 모든 실험돈을 대상으로 음용수를 통해 약제(15mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1%MFWE)를 혼합하여 자유롭게 섭취하도록 하여 7일 동안 투여하도록 설계하였다. 또한, 사료 역시 제한 급식을 하지 않고 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0070] **시료채취 및 분석:** 음용수를 통해 조성된 약제를 투여하면서 경시별로 시험에 사용되고 있는 모든 돼지들의 분변을 면봉을 이용하여 투약 후 1, 3, 5, 그리고 7일로 하여 채취하였으며, 채취한 분변은 PCR기법을 이용하여 *L. intracellularis* 균의 존재여부를 확인하였다.

[0071] **5-2. 실험결과**

[0072] 도 1은 증식성회장염에 감염된 돼지들을 대상으로 약제를 투여한 후 분변을 대상으로 PCR기법으로 검사한 결과를 나타낸 것이다. (A), (B), (C)는 각각 투약 후 1일, 3일, 그리고 7일에 분변시료들에 대한 PCR기법에 의한 *L. intracellularis*의 진단 결과를 나타낸 것으로, 1, 2, 6, 9, 그리고 10 lane의 양성 시료들(증식성회장염에 감염된 돼지)은 투약 7일째에 모두 완치된 결과를 보여주고 있다.

[0073] 증식성회장염에 감염된 돼지에 약제를 투여한 결과, 투약 1일 후 5두(17.4%), 투약 3일 후 115두(44.6%), 투약 5일 후 76두(29.5%), 그리고 마지막 투약 7일 후 16두(6.2%)가 치료되어 전체적으로 258두 중 252두인 97.7%의 치료효율을 나타내었으며, 6두(2.3%)에서는 치료효과를 확인할 수 없었다. 치료효과를 나타내지 않은 6두의 경우, 모두 심한 호흡기 질병으로 인해 음용수 및 사료섭취가 정상적으로 이루어지고 있지 않았던 것으로 인해 치료제의 치료효과를 확인할 수 없었던 것으로 사료된다.

[0074] 표 5는 돼지증식성회장염에 감염된 258두의 돼지를 대상으로 조성된 치료제를 음용수로 7일 동안 투약한 야외시험결과를 나타낸 것이다.

표 5

본 발명의 조성물 투여 일 수에 따른 PPE로부터 회복된 돼지 마리 수

[0075]

돼지 농장	투여한 돼지 마리수	해당 일에 PPE로부터 회복된 돼지 마리수				
		1	3	5	7	총(%)
A	51	10	23	14	3	50(100)
B	53	11	23	15	3	52(98.1)
C	154	24	69	47	10	150(97.4)
총(%)	258	45(17.4)	115(44.6)	76(29.5)	16(6.2)	252(97.7)

[0076] **실시예 6: 돼지증식성회장염 치료제의 안전성 시험(돼지를 이용한 조성 치료제의 경구독성시험)**

[0077] **6-1. 실험방법**

[0078] **실험동물:** 10주령 전후의 건강한 22마리의 3원 교잡종 (Landrace x Yorkshire x Duroc) 수컷 돼지를 7일 동안 단기 독성시험을 위해 경상남도 진주시 인근 농장으로 부터 구입하였다. 1주일간 일반증상을 관찰하여 건강하고, 이상이 없는 돼지돈만을 선택하여 시험에 사용하였으며, 시험개시 시의 체중은 31.3± 0.31kg이었다.

[0079] 사육환경 조건은 시험종료 시까지 온도 20±1.5℃와 상대습도 60±10%를 유지하였으며, 시험기간의 사육기간 중 한 돈방에 5마리씩 넣어 사육하였다. 사료((주)삼양사료, 서울)는 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였고, 조성된 치료제는 성분 중 염소산염(sodium chlorate)의 농도를 달리하여 음용수에 혼합하여 자유롭게 섭취하도록 공급하였다.

[0080] **투여용량의 설정 및 시험물질 투여:** 순화기간 중 건강하다고 판정된 10주령 전후의 돼지들을 대상으로 체중을 측정하고 체중범위에 따라 무작위법으로 군 당 5마리씩 배정하여 시험군을 구성하였다.

[0081] 투여용량은 돼지증식성회장염에 대하여 치료효과를 나타내었던 조성성분 중 염소산염의 농도(15mM)에 대해서 만 3, 5, 그리고 10 배수로 하여 시험군을 설정하였다. 따라서 대조군(무처리군), 투약군 I(3 x 15mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1%MFWE), 투약군 II(5 x 15mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1%MFWE), 그리고 투약군 III(10 x 15mM 염소산염 + 2.5mM 질산나트륨 + 0.1%MFWE)로 설정하였다.

[0082] **시험물질의 조제 및 투여:** 염소산염의 농도를 달리한 조성된 치료제들을 물에 넣고 잘 저어서 용해되도록 한 다음, 각 군별로 음용수에 투여하여 투여농도를 조정하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0083] **관찰 및 검사항목:**

[0084] 임상증상관찰 - 시험기간 중 매일 1회 일반증상과 빈사유무를 관찰하였다.

[0085] 체중측정 - 실험동물의 체중은 시험 개시일과 시험 종료일에 측정하였다.

[0086] 부검소견 - 시험종료 후, 모든 동물은 마취전에 경정맥으로부터 채혈을 한 후에 부검을 실시하여 육안적으로 장기들을 관찰하였다.

[0087] 혈액학적 검사 - 경정맥을 통하여 채혈한 혈액으로부터 RBC, WBC, PCV, 그리고 헤모글로빈(Hb)을 측정하였다. 일부 혈액은 실온에 30분간 방치한 후, 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하여, aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotrasferase(ALT), blood urea nitrogen(BUN), 그리고 creatinine 등의 함량을 autoanalyzer(CL-7200, Shimadzu Co., Japan)로 측정하였다.

[0088] 병리조직학적 검사 - 부검을 통해 채취한 간장과 신장을 10% 포르말린 용액에 고정시킨 후, 파라핀 절편을 만들고 통상방법과 같이 hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 염소산염의 독성에 따른 조직상의 변화와 병변의 진행과정을 광학현미경으로 관찰하였다.

[0089] **통계학적 분석:** 결과의 통계적 처리는 Sigma plot을 이용하여 student's t- test로 실시하였으며, $p < 0.05$일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 분석하였다.

[0090] **7-2. 실험결과**

[0091] **일반증상 관찰:** 돼지에 증식성회장염 치료에 효과를 보였던 치료제의 조성 중 염소산염의 농도(15mM)에 대해서 3, 5, 그리고 10배를 음용수에 혼합하여 7일간 투여한 결과, 전 투여군에서 별다른 일반증상이 관찰되지 않았으며, 폐사한 동물도 없었다.

[0092] **체중 변화:** 표 6은 대조군과 약제 투여군에 있어서 시험 개시체중과 7일 후 시험 종료 시 체중을 관찰하여 나타낸 것이다. 투약군 I의 경우, 시험 종료일의 체중은 대조군과 비교하여 차이를 보이지 않았으며, 투약군 II의 경우에는 대조군에 비해 평균체중이 다소 감소한 것으로 나타났으나, 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 투약군 III의 경우에는, 대조군과 비교하여 다소 큰 차이로 체중이 감소한 것으로 나타났으나, 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 따라서 대조군과 실험군 모두에서 시험종료 시 체중 변화에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

표 6

여러 농도의 염소산이 투여된 돼지에서 체중의 변화

[0093]

그룹	체중의 변화(kg)	투여 후 일수	
		0	7
대조군	6.0	31.5±2.7	37.5±1.0
투약군I	6.3	30.9±3.9	37.2±1.1
투약군II	5.0	31.3±5.0	36.3±1.3
투약군III	3.1	31.6±1.7	34.7±1.2

[0094] **부검소견:** 시험기간 중 사망한 동물이 없었으므로 시험종료 후, 모든 동물에 대하여 부검을 실시하여 육안적 소견을 판정하였다. 투약군 I과 II의 경우에서는 모든 동물에서 별다른 이상 소견을 발견할 수 없었으나, 투약군 III의 경우에는 일부 동물에서 간의 종대를 확인할 수 있었다.

[0095] **혈액학적 검사:** 표 7은 7일 동안 조성된 돼지증식성회장염 치료제의 성분 중 독성이 있는 염소산염의 농도를 각각 3 x 15, 5 x 15, 그리고 10 x 15 mM로 하여 투여한 돼지의 각 실험군에서 채혈하여 혈액 중 혈액학적 그리고 생화학적 지표들에 대한 변화를 분석하여 나타낸 것이다. 표 7로부터 살펴보면, 투약군 I의 경우에는, 대조군과 비교하여 모든 지표의 값들이 다소 변동은 있지만 모두 정상값의 범위 내에 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

[0096] 투약군 II의 경우, RBC, WBC, PCV, 그리고 Hb의 값들이 모두 정상범위를 약간 벗어나고 있는 바, 정상값 범위 내의 값을 나타내는 실험동물과 이의 값을 벗어나는 실험동물들이 혼재하여 나타나는 양상을 보이고 있다. 또한, ALT와 AST 값의 경우, 정상값 범위 내에 있으나, 이 경우 역시, 정상값 범위 내의 값을 나타내는 실험동물과 이의 값을 벗어나는 실험동물들이 혼재하여 나타나는 양상을 보이고 있다. BUN과 creatinine 값은 정상값의 범위 보다 낮은 값을 나타내고 있는 바, 이 또한 정상값 범위 내의 값을 나타내는 실험동물 보다는 정상값을 벗어난 실험동물들이 조금 더 많게 혼재되어 있는 양상을 나타내고 있다.

[0097] 투약군 III의 경우, RBC 값을 제외하고는 모든 지표들이 정상값의 범위를 벗어난 수치를 나타내고 있다. 이러한 결과는, 간과 신장 등 전반적으로 실험동물의 체내에 독성을 유발할 가능성이 매우 높다는 것을 의미하는 것이다. 즉, 간 효소로서 간의 기능에 미치는 영향을 나타내는 지표인 AST와 ALT, 그리고 신장 기능과 관련된 지표들인 BUN과 creatinine 값이 모두 정상범위 값을 크게 벗어나 간장과 신장에 장애를 유발할 가능성이 매우 높다.

표 7

여러 농도의 염소산염이 투여된 돼지에서 혈액학적 검사 결과

[0098]

변수	정상 범위	실험군			
		대조군	투약군 I	투약군 II	투약군 III
RBC(M/㎟)	5.00-8.00	7.19±0.34	7.58±0.27	4.96±0.37	5.43±0.69
WBC(M/㎟)	11.00-22.00	15.63±1.25	14.62±2.04	9.87±3.24	10.35±3.62
PCV(%)	32.0-50.0	39.8±2.31	37.5±3.22	27.7±4.52	25.6±5.41
Hb(g/dl)	10.0-17.0	13.4±1.16	11.7±0.84	9.0±3.46	7.64±2.13
AST(IU/L)	16-65	25±3.46	35.2±5.46	62±8.75	13.5±13.4
ALT(IU/L)	9-43	27±2.37	34±2.37	38±3.25	7.2±1.61
BUN(mg/dl)	6-30	20±5.42	24±4.42	5.9±2.11	5.2±1.07
Creatinine(mg/dl)	0.5-2.1	0.6±0.25	0.6±0.25	0.48±0.23	0.4±0.18

[0099] **병리조직학적 관찰:** 도 2는 조성된 항생제 대체 돼지증식성회장염 치료제의 독성을 확인하기 위해 치료제의 성분 중 염소산염의 농도를 달리하여 7일 동안 음용수로 투여한 후, 그룹 별로 신장 조직에 대해 병리조직학적 관찰을 목적으로 제작한 조직표본을 나타낸 것이다.

[0100] 도 2의 A는 아무 것도 투여하지 않은 대조군 돼지의 신장조직을 나타낸 것이며, B는 3 x 15mM 염소산염, 2.5mM 질산나트륨 및 0.1% MFWE의 합제를 7일 동안 투여한 돼지의 신장조직을 나타낸 것으로서, 정상조직의 구조와 같이 전체적으로 깔끔하고 건강하게 관찰되었다. C는 5 x 15mM 염소산염, 2.5mM 질산나트륨 및 0.1% MFWE의 합제를 7일 동안 음용수로 투여한 돼지의 신장조직을 나타낸 것으로서, 곡세뇨관의 일부 괴사와 세뇨관의 팽대 등이 관찰되었다. 그리고 D는 10 x 15mM 염소산염, 2.5mM 질산나트륨 및 0.1% MFWE의 합제를 투여한 돼지의 신장조직을 나타낸 것으로 C의 경우 보다 심각하게 곡세뇨관에서의 조직 괴사와 공포형성, 그리고 신장 사구체의 초자적 퇴행이 관찰되었다.

[0101] 도 3은 조성된 항생제 대체 돼지증식성회장염 치료제의 독성을 확인하기 위해 치료제의 성분 중 염소산염의 농도를 달리하여 7일 동안 음용수로 투여한 후, 그룹 별로 간장 조직에 대해 병리조직학적 관찰을 목적으로 제작한 조직표본을 나타낸 것이다.

[0102] 도 3의 A는 아무 것도 투여하지 않은 대조군 돼지의 간 조직을 나타낸 것이며, B는 3 x 15mM 염소산염, 2.5mM 질산나트륨 및 0.1% MFWE의 합제를 7일 동안 투여한 돼지의 간 조직을 나타낸 것으로서, 전체적으로 정상조직의 구조와 유사하게 건강한 모습으로 관찰되었다. C는 5 x 15mM 염소산염, 2.5mM 질산나트륨 및 0.1% MFWE의 합제를 7일 동안 음용수를 통해 투여한 돼지의 간 조직을 나타낸 것으로서, 일부 조직의 괴사, 세포핵의 결손 및 붕괴 등이 관찰되었다. 그리고 D는 10 x 15mM 염소산염, 2.5mM 질산나트륨 및 0.1% MFWE의 합제를 7일 동안 음용수를 통해 투여한 돼지의 간 조직을 나타낸 것으로서, C의 경우 보다 심각하게 조직의 괴사, 세포핵의 결손 및 붕괴 등이 관찰되었다.

도면의 간단한 설명

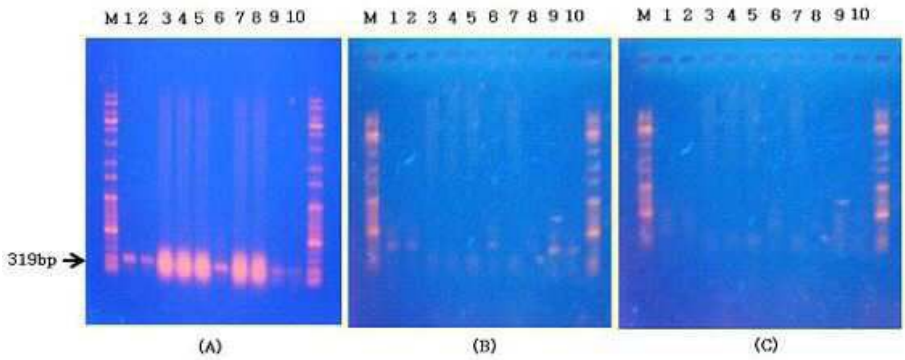
[0103] 도 1은 돼지의 분변에서 PCR을 사용하여 PPE를 진단한 결과를 나타낸 것으로, (A)는 투약 1일째, (B)는 투약 3일째, (C)는 투약 7일째

[0104] 도 2는 여러 농도의 염소산염을 염수를 통해 4주 동안 투여한 돼지의 신장 조직에 대한 조직표본을 나타낸 것이다.

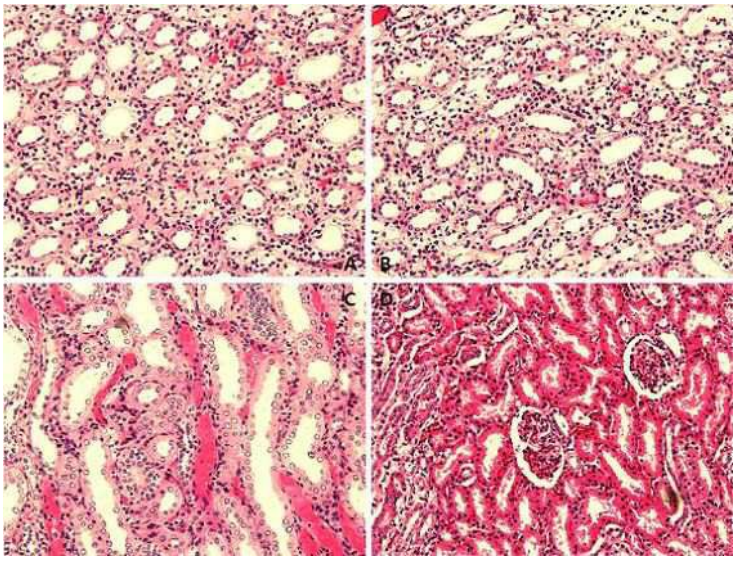
[0105] 도 3은 여러 농도의 염소산염을 염수를 통해 4주 동안 투여한 돼지의 간 조직에 대한 조직표본을 나타낸 것이다.

도면

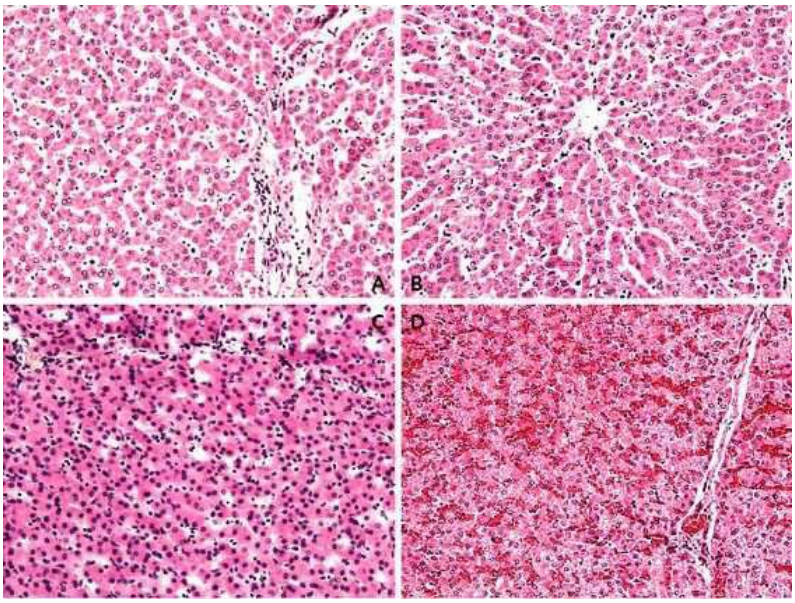
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> Composition for treatment of Porcine proliferative enteropathy comprising chlorate

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 1
tatggctctc aaacactccg 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
tgaacctatt cctattctcc 20