Kor. J. Food Hygiene 6(3, 4), 179-183(1991)

기니픽과 토끼에서 소성장 홀몬(BST)의 항원성에 관한 시험

강경선 · 이영순

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Antigenicity Test of Bovine Somatorophin(BST) in Guinea Pigs and Rabbits

Kyung-Sun Kang and Yong-Soon Lee

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT－**Antigenicity tests-ASA(Active Systemic Anaphylaxis), PSA(Passive Systemic Anaphylaxis), PCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis)- of Bovine Somatotrophine(BST, Lucky Ltd.) were performed according to the established regulations of National Institude of Safety Research.**

The results were as follows:

1. No specific clinical signs related anaphylaxis were observed. Therefore, it was considered that BST has no antigenicity in guinea pigs and rabbits.

2. No blue spots were observed on the back of guinea pig in the PCA test; BST-related IgE was not produced.

Keywords□**Bovine Somatotrophine(BST), Antigenicity, Guinea Pig, Rabbit**

1931년 Evans와 Simpson은 소의 뇌하수체 추출물이 성장기에 있는 동물에게 주사했을 때 동물의 성장을 증가시킨다고 보고한 이래 성장홀몬이 특히 반추수에서 비육 및 비유에 필수적임에 증명이 되었다(Cowie et al., 1964). 그리고 1986년 Baumruker 등이 행한 연구에서 소 성장홀몬(Bovine Somatotrophine)이 소에 있어서 유선조직의 대사효율과 유선의 발달을 촉진함으로써 유량의 증가와 관련이 있음이 밝혀지게 되어 국내는 물론 국외의 축산분야에서 지대한 관심과 논의의 대상이 되어 왔다. 그래서 소 성장홀몬을 대량 생산할 수 있는 방안들이 개발되었는데, 최근 유전공학의 발달에 힘입어 유전자 재조합기법(Recombinant-DNA Technology)을 이용해 국내는 물론 국외에서 대량생산할 수 있게 되었다. 이렇게 생산된 BST는 사료효율을 5～15% 개선시키고 우유생산을 10～28%까지 증가시키는 효과를 가진 생합성 홀몬이라 할 수 있다(1990, Robert Reotutar). 그러나 BST는 생체에서 추출정제한 것이 아니고 합성해낸 단백질이기 때문에 실제 임상적용시에 소에서 항원성이 있어 쇼크를 유발할 수도 있다.

따라서 본 연구는 BST의 항원성 유무중 특히 Anaphylatic shock가 있는지를 밝혀 BST가 실제 임상에 적용할 수 있는지의 여부를 밝히는데 있다.

재료 및 방법

시험물질－주식회사 럭키에서 공급받은 BST(Bovine Somatotrophine)을 4℃로 보관하면서 사용하였다.

Received for publication 21 Jan., 1992
Reprint request: Dr. Y. S. Lee at the above address

실험동물－순계 배양된 New Zealand White계 백색 토끼 암수 각각 6마리(4개월령, 체중 2.0～2.5 kg)와 England Hartley계 백색 기니픽 암수 각각 21마리(4개월령, 체중 500～600g)를 가축위생 연구소 동물실 및 실험동물 연구소에서 분양받아 1주간 실험실 환경에 순화시킨 다음 실험에 사용하였다. 토끼용 스테인레스 케이지(명진기계 제작)에 기니픽은 3마리씩 토끼는 1마리씩 넣어 환경조건(온도, 23±3℃; 상대습도 60±10%; 명암주기, 12시간)을 조절한 다음 음수와 사료(퓨리나사료, 양배추)를 자유급식 시켰다.

용량결정－BST의 용량은 의약품 독성시험기준(국립보건 안전원 예규 제10호)에 준하여 저용량은 임상용량인 20 mg/600 kg으로 사용하였고, 고용량은 저용량의 10배의 양을 사용하였다.

Active Systemic Anaphylaxis(ASA)－ASA실험을 위하여 60마리의 Guinea pig(암수 각각 30마리)를 무작위로 5개군으로 나누고 제1군은 동결건조시에 사용한 완충용액을, 제2군은 실험의 양성 대조군으로 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)을, 제3군은 저용량의 BST(0.033 mg/kg)를, 제4군은 고용량의 BST(0.33 mg/kg)를, 제5군은 대조물질인 Reference(0.033 mg/kg)을 투여하였다. 실험방법은 제1일과 제4일에 피하주사로 감작 투여하고, 제14일과 제24일에 정맥주사로 유발투여하여 anaphylaxis 유무를 활동성(restless), 전신떨림(trembling), rubbing nose, 재채기(sneezing), 기침(cough), 배뇨(urination), 호흡곤란(respiratory depress), 숨막힘(gasping), 비틀기(writhing), 경련(convulsion), 사망(death) 등으로 관찰하고 종합적으로 Shock정도에 따라 등급을 음성, 경증, 보통, 중증, 사망 등으로 판정하였다.

Passive Systemic Anaphylaxis(PSA)

항혈청 생산－기니픽 및 토끼를 사용하여 BST에 대한 항체를 생산하였다. 토끼에는 0.33 mg/kg의 용량의 BST 및 Reference를 Complete Freund's Adjuvant와 섞어 각각 피하주사한 후 10일 뒤에 이개 정맥(magina ear vein)에서 채혈하여 혈청을 얻고, guinea pig에서는 ASA실험에서와 동일하게 면역한 뒤 복대정맥에서 채혈하여 혈청을 얻었다.

PSA 실험－기니픽 암수 한쌍씩(500g 내외) 3군으로 나누었다. 제1군에는 기니픽에서 BST에 의해 형성된 항혈청을, 제2군에는 토끼에서 BST에 의해 형성된 항혈청을, 제3군에는 Reference로 토끼에서 형성된 항혈청을 0.2 ml씩 각각 정맥주사하였다. 주사한지 18시간이 지난뒤, 제1군과 제2군에는 BST를 제3군에는 Reference를 각각 0.033 mg/kg씩 정맥주사하고 2일간에 걸쳐 ASA에서와 동일한 방법으로 anaphylaxis를 관찰하였다.

Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA)－IgE항체의 생성여부를 관찰하기 위해서 ASA 실험뒤에 각 군별로 1마리씩 채혈하여 항혈청을 얻고, PSA 실험에 사용한 항혈청의 IgE 생성을 조사하였다. 비특이 반응을 없애기 위하여 각 항혈청을 생리적 식염수로 1 : 100으로 희석한 후 주사하였다. 암수 한쌍씩 2개군의 기니픽에 등의 털을 제거하고, 희석된 항혈청을 0.1 ml씩 피하주사하고 3시간뒤에 제1군은 BST와 Evan's Blue혼합용액(10 mg/ml)을 제2군은 동일농도의 Reference와 Evan's Blue 혼합용액을 각각 1 ml씩을 부전골정맥(metatarsal vein)으로 주사한 후에 30분뒤 항혈청 주사부위에 형성되는 청색반점을 관찰하였다.

항체가 측정－유도된 BST에 대한 항체가는 Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)법으로 측정하였다(1988, D. M. Kemeny 등). 실험중에 분리한 항혈청의 항체가는 먼저 96 well immunoplate에 50 mM carbonate buffer(pH 9.6)으로 BST를 20 μg으로 희석한 후 100 μl씩 plate에 첨가한 후 4℃에서 18시간정도 coating하였다. 항원이 coating된 plate를 0.05% 트윈-인산완충용액(T-PBS, pH 7.4)으로 5회 세척하여 비특이적으로 흡착된 BST를 제거하고 단백질이 흡착되지 않은 부위의 비특이 반응을 없애기 위해 0.5% G-PBS(0.5% Gelatine in PBS) 용액을 100 μl씩 첨가하여 실온에서 2시간동안 blocking시켰다. 다시 T-PBS 용액으로 5회 세척후, G-PBS 용액으로 1 : 25가 되게 희석된 항혈청을 96 well plate 첫번째줄에 50 μl씩 첨가한 후 아래 방향으로 2배씩 G-PBS 용액으로 희석하였다. 이 plate를 실온에서 2시간동안 반응시키고 TPBS(0.05% Tween 20 in PBS) 용액으로 5회 세척한 후 기니픽혈청과 토끼혈청을 반응시킨 줄은 1 : 100으로 희석한 protein G-HRP를 100 μl씩 각 well에 첨가하고 다시 실온에서 1시간 반응시킨 뒤에

Table 1. Symptoms of each group of guinea pigs after first injection

Symptoms \ Group	I (Buffer)	II (BSA)	III (Low)	IV (high)	V (Reference)
Restlessness	−	−	−	−	−
Trembling	−	−	−	−	−
Rubbing nose	−	+	−	−	−
Sneezing & Cough	−	+	−	+/−	−
Urination	−	−	−	−	−
Respiratory depress	−	−	−	−	−
Jumping & Rushing	−	+/−	−	−	−
Gasping & Writhing	−	−	−	−	−
Convulsion	−	+	−	−	−
Death	−	+	−	−	−
Evaluation of the intensity	O	III	O	I	O

O; negative I; mild II; moderate III; severe

Table 2. Symptoms of each group of guinea pigs after second injection

Symptoms \ Group	I (Buffer)	II (BSA)	III (Low)	IV (high)	V (Reference)
Restlessness	−	−	−	−	−
Trembling	−	−	−	−	−
Rubbing nose	−	−	−	+/−	−
Sneezing & Cough	−	+/−	−	+/−	−
Urination	−	−	−	−	−
Respiratory depress	−	−	−	−	−
Jumping & Rushing	−	+/−	−	−	−
Gasping & Writhing	−	−	−	−	−
Convulsion	−	−	−	−	−
Death	−	−	−	−	−
Evaluation of the intensity	O	I	O	I	O

O; negative I; mild II; moderate

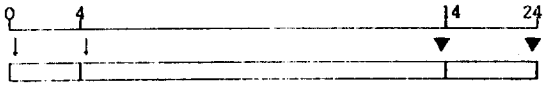
TPBS로 5회 세척하였다.

발색은 2,2′-Azinobis(3-ethybenzthiazoline sulfonate) 용액(ABTS) (0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.0)에 ABTS가 0.98%와 0.02% 과산화수소수를 v/v으로 1 : 1 혼합)을 100 μl씩 각 well에 첨가하고 1시간동안 발색시킨 후 0.5 mM NaN_3로 100 μl를 첨가하여 발색반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, Reference를 492 nm를 두었다.

결과 및 고찰

Active Systemic Anaphylaxis－각군의 기니픽를 2회 감작시키고 14, 24일 2회에 걸쳐 정맥주사(metatarsal vein)로 유발투여를 한 결과는 Table 1, 2와 같다.

첫번째 정맥 주사에서는 Table 1에서와 같이 양성대조군인 BSA투여군이 매우 심한 anaphylatic shock를 보였고, 암수 구분없이 group중 반수 정도



↓: S. C. injection
▼: I. V. injection

Fig. 1. Design of Experiment.

Table 3. Passive systemic anaphylatic responses in guinea pigs which were intravenously injected anti-rabbit serum to BST[a] or anti-guinea pig serum to BST

Group	Antiserum	Antigen	Results
I	Anti-rabbitserum to BST	BST	normal
II	Anti-G.P.[b] serum to BST	BST	normal
III	Anti-rabbitserum to Reference	Reference	normal

[a] BST: Bovine Somatotrophine, [b] G.P.: Guinea Pig

가 기침과 경련이 있었으며 경련이 있은 후 사망하였다(Fig. 2). 저용량 투여군과 Reference 투여군에서는 anaphylaxis라 할 수 있는 어떠한 임상에도 관찰되지 않았으나 고용량 투여군에서 Rubbing nose현상이 있었으나 곧 회복되었다.

두번째 정맥 주사에서는 첫번째와는 달리 BSA 투여군이 거의 정상에 가까운 미약한 반응이 있었고, 고용량 투여군에서는 약간의 과민반응이 보였다. 이러한 현상은 BST 자체와 기니픽 growth hormone과의 구조의 상이성에 기인되는 것으로 생각

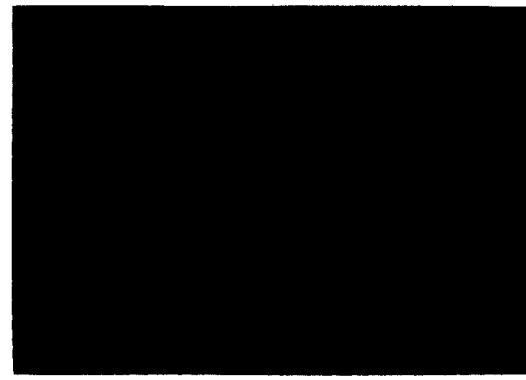


Fig. 2. After intravenously injecting bovine serum albumine, Guinea pig died of shock.

되어 진다.

Passive Systemic Anaphilaxis－토끼 및 기니픽에서 분리한 항혈청과 BST와 Reference를 이용하여 검사한 결과는 Table 3에 나타난 것처럼 BST에 의한다고 생각되는 아나필랙틱 쇼크를 관찰할 수 없었다.

Passive Cutaneous Anaphilaxis－ASA 시험중 실제 형성된 IgE량을 측정하기 위해 PCA시험을 하였다. 각 항혈청을 희석하여 피내주사하고 항원과 Evan's Blue와 BST 혼합용액을 정맥주사한 결과는 Table 4에서 나타낸 것처럼 피내반응을 나타내는 개체가 한마리도 관찰되지 않으므로 BST와 관련된 IgE의 형성이 되지 않은 것으로 생각되어 진다.

항체가 측정－실험에 사용한 항혈청의 항체가를 측정한 결과는 기니픽에서 BST에 대한 항체의 형성은 낮게 나타났으며(1 : 50 이하), 토끼에서 1 : 1000정도로 높게 나타났다.

Table 4. Passive cutaneous anaphylatic responses in guinea pigs

Sensitization (Subcutaneously)	PCA Reaction		
	Positive/Recipients		Extravasated Dye
	I	II	
Anti-BST from Rb[a](Reference)	0/2	0/2	0
Anti-BST from Rb	0/2	0/2	0
Anti-BST from G.P.(low dose)	0/2	0/2	0
Anti-BST from G.P.(high dose)	0/2	0/2	0

[a] Rb: Rabbit, I: Antigen-BST(Lucky Ltd.), II: Antigen-Reference (USA)

국문요약

기니픽과 New Zealand White Rabbit에서 BST에 대한 항원성 시험을 국립보건안전연구원 예규에 따라 1) Active Systemic Anaphylaxis(ASA), 2) Passive Systemic Anaphylaxis(PSA), 3) Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA) 시험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) ASA, PSA 실험에서 anaphylaxis와 관련된 어떠한 특이적인 임상증상을 나타내지 않아 BST가 기니픽과 토끼에서 anaphylaxis를 유발하지 않는 것으로 생각된다.

(2) PCA 실험에서 청색반점이 관찰되지 않은 것으로 보아 BST-specific IgE가 생성되지 않은 것으로 생각되어 진다.

참고문헌

1. Ashimov, G. J.: The lactogenic preperations from the anterior pituitary and the increase of milk yield in cows, *J. Dairy Sci.*, **20**, 298 (1937).
2. Baumruker, C. R.: Insulin like growth factor I (IGF 1) and insulin stimulates lactating bovine mammary tissue DNA synthesis and milk production *in vitro*, *J. Dairy Sci.*, **69**, 120 (1986).
3. Chalupa, W.: Somatotropins and their metabolic effects, NFIA Nutrition Institute, West Demoines.
4. Cowie, A. T., Knaggs, G. S. and Tindal, J. S.: Complete restoration of lactation in the goat after hypophysectomy, *J. Endocrinol.*, **28**, 267 (1964).
5. Denamur, R.: Review of progress of diary science. Section a physiology. Hormonal control of lactogenesis, *J. Dairy Res.*, **38**, 237 (1971).
6. Evans, H. M. and Simpon, M. E.: Hormones of the anterior hypophysis. *Am. J. Physiol.*, **96**, 511 (1931).
7. Lyons, W. R.: The direct mammotrophic action of lactogenic hormone, *Pro. Soc. Exptl. Bio. and Med.*, **51**, 308 (1942).
8. Reotutar, R.: Bovine growth hormone raise national concern, *JAVMA*, **196**, 1018 (1990).
9. Spencer, G. S. G. and Williamson, E. D.: Increased growth in lambs following auto-immunization against somatostatin, *Anim. Prod.*, **32**, 376 (1981).
10. 국립보건안전연구원 예규, 독성시험에 관한 지침 (1988).