

발간 등록 번호

11-1541000-001040-01

계란 난황 유래 기능성 물질을 이용한 비만억제용 제품 개발

(Development of a new diet product for
suppressing obesity by a novel material from egg yolk)

보령제약(주)

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “계란 난황 유래 기능성 물질을 이용한 비만억제용 제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 6 월 24 일

주관연구기관명 : 보령제약(주)

주관연구책임자 : 정한선

연 구 원 : 이송재

연 구 원 : 강승훈

연 구 원 : 정찬희

연 구 원 : 임종진

연 구 원 : 강승훈

연 구 원 : 왕진상

연 구 원 : 양은희

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 최대부

협동연구기관명 : 한국원자력의학원

협동연구책임자 : 박인철

요 약 문

I. 제 목

계란 난황 유래 기능성 물질을 이용한 비만억제용 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 사전연구에 의한 돼지소장유래 BBMV 특이 IgY의 혈당조절 가능성 확인
2. 원료의 대량생산공정확립, 표준화연구 및 비임상연구 필요
3. 혈당조절과 다이어트관련 건강기능식품원료 개발을 통한 고부가가치 창출

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 산란계 접종용 항원 제조 및 항원 특이적 IgY 생성확인
2. 난황으로부터 대량정제공정확립
3. BR-IgY 물리화학적 특성분석
4. 지표물질 시험법 및 안정성시험
5. BR-IgY의 기능성확인
6. BR-IgY의 독성시험

IV. 연구개발결과

1. 돼지소장 유래 산란계 접종항원제조 표준화
2. 난황으로부터 BR-IgY의 대량생산공정 확립 : 건강기능식품 제조승인시설에서 반응조 5톤 규모의 시생산 수행
3. BR-IgY 특성분석 : pH 5이상 24시간, 60℃에서 60분동안 안정
4. 지표물질 시험법확립 : 조단백시험법, 총 IgY 측정 가능한 ELISA법
5. 안정성시험으로 보관조건 설정완료 : 상온, 24개월
6. in vitro 이당류 분해억제 및 세포내 흡수억제능 확인
7. SD-Rat에 단회 및 반복투여를 통한 혈당조절 및 체중조절 가능성 확인
8. GLP시험기관에서 독성시험 완료 : 전 시험에서 이상 없음
 - 1) SD 랫드에 대한 BR-IgY의 단회 경구투여 독성시험
 - 2) 유전독성시험 : 염색체이상시험, 소핵시험, 미생물 복귀돌연변이시험
 - 3) 반복투여독성 : SD 랫드에 대한 BR-IgY의 28일, 90일 반복 경구투여 독성시험

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 : 건강기능식품 원료, 개별인정신청
2. 기술확산 : 학회발표를 통한 홍보
3. 지식재산권 : 논문투고
4. 추가연구 : 질환동물모델 효력시험, 임상시험

SUMMARY

I. Title

Development of a new diet product for suppressing obesity by a novel material from egg yolk

II. Purposes and needs of research development

1. Verify the glycemic control ability of BBMV-specific IgY
2. Large-scale production process, standardization & pre-clinical trial
3. Development of high-valued health functional food materials for glycemic control & suppressing obesity

III. Contents and scopes of research development

1. Antigen manufacture for hen injection & antigen-specific IgY production
2. Large-scale production process from egg-yolk
3. Analyze physical & chemical characteristics of BR-IgY
4. Indicator test and stability test
5. Functional assay
6. Toxicity test

IV. Results

1. Standardization of antigen manufacture
2. Establish the large-scale production process from egg-yolk : five-ton scale pilot production at GMP plant for health food
3. Analyze characteristics : confirm the stability in twenty-four hours at pH five and sixty minutes at sixty celsius degrees
4. Indicator Test : crude protein quantification, ELISA for total IgY
5. Stability Test : room temperature, twenty-four months
6. *In-vitro* inhibition assay of disaccharide hydrolysis & cell membrane absorption
7. Glycemic & weight control test on single & repeated oral diets in SD rat
8. Toxicity test at GLP-grade laboratory : doesn't resulted in any treatment-related abnormal signs
 - 1) Single oral dose toxicity study in SD rat
 - 2) Genotoxicity testing : chromosomal aberration test, micronucleus test & ames microbial test
 - 3) Repeated dose toxicity test : twenty-eight day & ninety days repeated dose toxicity test in SD rat

V. Research outcomes and its application plan

1. Commercialization : health functional food, individual recognition application
2. The spread of technology : promotional presentations
3. Intellectual property : paper submission
4. Further research : efficacy test on diseased-animal model, clinical trial

CONTENTS

I. Summary of research project

1. Purpose of research
2. Needs of research
3. Scope of research

II. Internal and external status of development

1. Development status about internal and external related field
2. Position of results on internal and external status

III. Contents and results of research development

1. Theoretical and experimental method
2. Contents
3. Results

IV. Goal achievement and contribution on related field

1. Goal achievement of research development
2. Contribution on technology development of related field

V. Research outcome and its application plan

1. Commercialization
2. Spread of technology
3. Intellectual property
4. Application on additional research and related research

VI. Collecting information on scientific technology during research development

VII. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 제1절 연구개발의 목적
- 제2절 연구개발의 필요성
- 제3절 연구개발의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 제1절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황
- 제2절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 제1절 이론적, 실험적 접근방법
- 제2절 연구내용
- 제3절 연구결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 제1절 연구개발목표의 달성도
- 제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 제1절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- 제2절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등
- 제3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- 제4절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

인위적으로 병원균등의 항원을 주입받은 어미닭이 이에 대항하는 항체를 체내에서 생산하여 알의 노른자에 축적, 부화되는 새끼에 전달하는 원리를 이용하여 사람이 필요로 하는 특수면역단백질을 추출하는 고도의 신기술이 개발되어 이용되고 있다. 난황중의 항체는 포유류의 IgG 분류의 항체에 해당되나 단백질화학적 성질이 약간 다르고 또한 난황유래의 항체이므로 비교면역학 분야 등에서는 IgY (Immunoglobulin in yolk)라고 한다.

본 연구에서는 난황으로부터 탄수화물의 소화 및 흡수 억제 및 혈당 조절기전을 통한 비만억제용 신규기능성 물질의 난황항체를 함유하는 기능성 원료(이하 BR-IgY)를 개발하고자 한다.

제2절 연구개발의 필요성

1. 기존 비만관련 치료제와 건강 기능성식품의 특징

대표적인 비만 치료제인 제니칼은 지방의 소화 흡수를 억제하는 lipase inhibitor로서 고도비만환자의 치료에 이용되고 있으나 현재 우리의 식단이 서구화되고 있다고는 하지만 서양인과는 달리 한국인 및 동양인의 대부분은 탄수화물이 주식으로, 섭취하는 음식의 총 칼로리 중 65% 이상이 탄수화물이다. 기존의 비만 개선을 위한 식품 원료들은 배변을 촉진하고 변비를 개선하는 물질, 포만감을 주고 영양분 흡수를 저해하는 섬유질 및 지방질의 흡수를 억제하고 분해하는 성분의 생약처방제가 주를 이루고 있으나 원료의 대부분을 수입에 의존하는 현실이다.

2. 연구개발 필요성

가. 사전연구를 통한 가능성 확인

(1) 돼지소장 유래 brush border membrane vesicle(BBMV)를 함유하는 항원을 분리하여 산란계에 접종 후 난황에 생성된 항체가 이당류 분해억제능이 있음을 확인하였다.

그림

(2) Pilot scale생산으로 대량생산을 위한 대략적인 생산공정을 확립하였다. 단, 지질침지 공정 개선, 최종 원료에서 계란 특유의 비린내등 제품화를 위한 개선이 필요하였다.

나. 제품화연구의 필요

(1) 탄수화물의 섭취량이 가장 많은 한국인의 식생활 패턴을 고려 시, 전체 영양소의 섭취

를 제한하는 기존의 비만 및 당뇨에 사용되는 식이요법이나 지방의 소화 흡수 억제를 주된 기전으로 하는 기존의 다이어트 제품은 소비자의 만족을 극대화하기 어려운 실정이다.

(2) 필수적인 무기이온 및 단백질 등의 흡수저해 없이 선택적으로 탄수화물의 흡수를 효과적으로 저해할 수 있는 한국인에게 적합한 차별화된 새로운 방법의 개발이 요구된다.

(3) 본 연구는 이당류 분해 및 흡수 억제기능을 통한 비만억제 기능을 갖는 난황항체를 함유하는 기능성 건강식품원료를 개발을 위한 원료 대량생산 공정표준화와 기능성평가 및 안전성 평가를 하고자 한다. 개발된 원료는 탄수화물의 분해, 흡수를 효과적으로 조절하여 음식물 섭취의 제약 없이 정상인과 비만, 당뇨 환자 및 반환자에 있어 식후혈당관리를 위한 기능적 식사조절 보조제로서의 새로운 고부가가치를 창출하는 경제성이 매우 높은 연구로 기대된다.

제3절 연구개발의 범위

1. 주관연구기관(보령제약)

가. 탄수화물 소화흡수 저해용 난황항체의 원료표준화, 기능성 및 안정성평가

(1) 원료표준화

(가) 산란계 접종용 항원

돼지 소장점막으로부터 BBMV를 포함하는 부분을 분리/정제방법 최적화하고 분리된 BBMV항원의 확인방법을 확립

산란계에 면역 접종량, 접종횟수 표준화

(나) 대량생산공정 확립

난황으로부터 효과적 지질 제거와 난황항체를 포함하는 단백질 회수율 증가를 위한 대량 생산 process 및 정제법 확립

(다) 지표물질 시험법 확립

(라) 안정성시험

장기보존시험 : 24개월동안 실시

가속시험 : 조건에서 6개월간 실시

(2) 기능성평가

(가) in vitro

이당류분해효소 저해시험

(나) in vivo

설치류에서 OGTT 수행으로 혈당조절기능과 반복섭취 효과확인

(3) 안전성평가(GLP시험기관 수행)

(가) 단회투여독성시험 (설치류)

(나) 유전독성시험 (복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)

(다) 반복투여독성자료 (설치류)

2. 협동연구기관(건국대학교)

가. 기능성 난황항체 특성연구

(1) 물리, 화학적특성

(가) pH, 열, 소화효소 안정성확인

(2) 분석법 표준화

3. 협동연구기관(원자력의학원)

가. 당흡수 시험 세포주 모델 확립

(1) 포도당 흡수 억제 역학 조사

(2) 동물 장내 세포 포도당 흡수 억제 시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 국내 기술개발 현황

가. 80년대 후반에서 90년대 초에 이르러 산란계의 달걀을 이용한 난황항체에 대한 연구가 시작되었으며, 이러한 연구는 대부분 혈중 항체 역가의 예측 목적, 즉 질병의 진단을 목적으로 수행되었다[1].

나. 축산업 분야에서 질병의 예방 및 치료 목적으로 닭의 전염성 F 낭병 바이러스 (Infectious bursal disease virus), 닭의 로타바이러스 (Rotavirus) 등의 닭 바이러스를 이용하여 수행됨. 또한 HRV (human rotavirus)의 감염을 예방하고자 HRV에 대한 난황 항체의 개발도 많은 연구가 진행 되었다.

다. 위장병의 원인균인 *Helicobacter pylori*를 비롯하여 *E. coli*, *Salmonella sp*, 충치의 주원 인균인 *S. mutans* 등에 대한 난황항체를 이용하여 식품 첨가제 및 사료 첨가제 등으로 이용되고 있으며 양식 어류에 발생하는 각종 질병에 대한 난황 항체의 이용이 연구 중이다.

라. 위염, 십이지장, 여드름, 유아설사, 충치원인균 등 다양한 난황 면역단백질을 사람이 섭취하여 질병의 예방 및 치료 보조효과 등 전반에 있어서 면역력 강화를 기대하고 있으며 이미 일부 업체에서는 항헬리코박터 항체를 포함한 위염, 십이지장궤양, 식중독에 대한 복합특이항체 계란을 개발하여 위장질환으로부터 탁월한 예방효과를 꾀하고 있다.

마. 단바이오텍 : 난황항체를 이용한 동물용 항생제와 사람 체장 리파아제의 특정 도메인구조에 대한 특이 난황항체를 생산하여, 생체의외(in vitro) 및 생체내(in vivo)에서 리파아제 활성 억제 효과를 검증하고 비만억제제로의 개발 가능성을 연구중이다.

바. (주)바이오인디스트 : 일본의 (주)파마푸드와 공동연구를 통해 복합 인플루엔자(고병원성 조류독감 바이러스(H5N2), 계절성 인플루엔자 바이러스(H1N1), 신종 인플루엔자 바이러스(H5N1))에 대한 난황항체 개발에 성공하였다. 매일유업과 함께 항로타바이러스 난황항체에 대한 환자의 분변에서 바이러스 감소와 증상개선효과를 확인하였다[2].

사. 에드바이오텍 : 난황액보관에 대한 특허를 보유하고 있으며 여드름균에 대한 난황항체를 함유한 화장품 개발하여 판매중이다.

아. 한국 야쿠르트 : 면역난황을 유산균 음료에 혼합하여 판매중이다.

자. 씨제이 : 다양한 질병방어용 IgY를 함유한 동물용사료를 판매중이다.

차. 에그바이오텍 : 기능성 의약소재 개발에 주력하며 질병을 예방할 수 있는 특수 IgY개발중이다.

카. 에그원 : 위염, 소아용설사 IgY강화계란을 생산하고 있고, 어류나 가축 질병예방 항생제 대응 특수 IgY 개발중이다.

타. 동성제약 : 일본에서 난황콜린을 도입하여 치매예방식품을 약국과 대리점을 통해 판매중이다.

2. 국외 기술개발 현황

가. 일본의 영양보조식품社인 오르토 코퍼레이션이 충치균에 예방 효과가 있는 균체에 대한 항체를 포함한 노른자 분말을 개발, 분말을 첨가한 충치 예방 껌 등 면역 항체 식품을 상품화한다고 밝혔다. 발표에 따르면, 껌을 씹기 전의 브러싱 타액의 채취로 얻은 균수와 껌을 씹은 후의 균수를 주 단위로 비교하자 껌을 씹은 후 2~3주간 균수가 꾸준히 감소하는 것으로 나타났다. 이에 오르토 코퍼레이션社는 노른자 분말을 첨가한 새로운 항체 식품으로 껌을 상품화할 계획이며 아울러 구강 세제 등을 포함한 각종 제품을 잇따라 상품화할 예정이라고 밝혔다.

나. 일본에서는 면역우유나 농축유청단백 면역란(卵) 면역글로불린 등의 '항체식품'이 주목받고 있다. 항체식품의 산업화는 면역우유를 선두로 서서히 진행되기 시작했다. 시장규모는 2005년부터 2010년까지 사이에 1000억엔 전후로 신장되었다. '면역란'은 닭에게 항원을 접종하여 계란 노른자위 부분에 항체를 생성시킨 것이다. 소화기계의 질병을 겨냥하고 있는 것은 면역우유와 다르지 않으나 면역우유가 여러 종류의 항원을 동시에 면역화 처리하는 것과 달리 면역란은 단일한 항원에 표적을 두고 만들어진다. 그렇기 때문에 항체가가 매우 높아 강력한 효과를 기대할 수 있다.

다. 일본 다이요화학은 10년 전부터 계란항체에 대해 연구해 왔다. 항체가를 높이는 항원처리 방법이나 정제기술 대량처리 대량생산의 노하우를 갖고 있는데 아직 상품하지는 못했다.

라. 일본 교도유업은 97년에 헬리코박터 파일로리 억제작용을 갖고 있는 계란항체 개발에 성공했다. 이는 저비용으로 간편하게 처리할 수 있는데다 항생물질처럼 내성균에 대한 염려가 없다는 것이 장점으로 실험용쥐를 사용한 실험에서 헬리코박터 파일로리 억제작용이 확인돼 학

회에서 보고한데 이어 오사카대학에서 사람을 대상으로 한 시험에서도 일정한 효과를 얻었다.

마. 일본 (주)겐코퍼레이션면역연구소에서 헬리코박터균의 우레아제(urease)에 대한 항체가 헬리코박터균의 접착 저지효과가 가장 강한 항체의 하나로 보고 고시마 등은 이 우레아제에 대한 항체로서 가장 실용성이 높은 것으로 생각되는 계란항체(IgY)를 만들어 그 제균효과를 마우스를 사용하여 알아봤다. 고시마 등은 마우스에게 헬리코박터균을 감염시킨 다음 이 항체를 0.025% 0.25% 및 2.5%의 농도를 10주 동안 사료에 혼합하여 먹이고서 위조직 내의 균수를 조사했다. 그 결과 항체의 농도가 높을수록 균수가 줄어드는 것으로 확인됐다. 즉 균수가 2.5% 농도 투여군에선 평균 100분의 1 이하로 줄었는데 그 절반에선 완전히 제균됐다. 현재 사람을 대상으로 시험 중인데 유의한 효과가 확인되고 있다.

제2절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

1. 기술적 측면

가. 난황항체의 정제

기존의 난황항체 제품은 난황전체를 열풍건조시켜 사용함에 따라 항원에 대한 특이항체의 함량이 낮았고 계란 노른자 특유의 비린맛과 냄새로 섭취하기에 불편하였다.

본 과제를 통한 난황을 침지와 막여과등의 정제에 의한 BR-IgY는 전체단백질 중 IgY함량이 10% 이상으로 높고 지질이 거의 제거되어 물에 용해도가 좋으며 비린내도 거의 없었다.

나. 난황항체 활성을 고려한 제조공정

난황항체는 단백질이지만 열안정성이 다른 단백질에 비하여 높은 편이다. 그러나, 열에 일정시간 이상 노출시 활성을 소실하게 된다. 이러한 것을 고려하여 최종공정에 동결건조를 하여 IgY의 활성손실을 방지하였다.

다. 혈당조절 및 비만억제 건강기능식품 적용분야

개발되는 난황항체의 적용분야 중 혈당조절 및 비만억제는 새로운 분야로 관련 식품가공 산업 및 건강기능식품에 광범위하게 이용될 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 이론적, 실험적 접근방법

1. 돼지 소장 유래 BBMV 항원의 제조

가. 돼지 소장 유래 BBMV 항원분리

신선한 돼지소장을 이용하며 cold saline 용액으로 장내강의 소화 내용물을 제거하였다. 세척한 돼지소장은 세로로 절개 한 후 cold saline에 보존하며 slide glass로 소장 내강의 용모벽을 수회 긁어 용모 점막을 분리하였다. 분리된 용모 점막은 5배 볼륨의 buffer (ice-cold 50mM mannitol, 2mM Tris-HCl buffer, pH7.1)에 섞은 후 homogenizer로 충분히 균질화하였다. 균질화 후 CaCl_2 를 10mM로 첨가한 후 15분간 정치 후 원심 분리하였다. 지방 침전물층은 버리고 상등액만 회수하여 산란계에 접종용 항원으로 사용하였다[3].

나. 분리항원 확인

(1) Alkaline Phosphatase Activity

분리된 돼지 소장 유래 BBMV 항원을 단백질 정량(BCA protein assay) 한 후, 0.2 mg/ml로 희석하였다. 96 well plate에 37 °C 에서 pre-warming한 Reagent A (100 mM Glycine Buffer with 1.0 mM Magnesium Chloride, pH 8.8 Buffer)를 50 μ l씩 첨가한 후, standard enzyme solution (Phosphatase, alkaline from porcine intestinal mucosa, Sigma #P4002, 1.1 unit/mg) 또는 sample을 well 당 10 μ l씩 첨가하고, 기질로 Reagent B (15.2 mM p-nitrophenyl phosphate solution, PNPP)를 50 μ l씩 첨가하고 혼합하였다. 37°C에서 10분간 정치반응 시킨 후 Reagent C (20 mM sodium hydroxide solution)를 100 μ l씩 첨가하여 반응을 종결시키고 micro plate reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액의 표준농도곡선으로부터 시료의 역가(units/ml)를 계산하고 BBMV 단백질 농도 당 최종 unit/mg값을 계산하였다.

(2) Maltase Activity

Maltase 효소의 Kinetic assay를 통해 맥아당의 분해 정도를 %로 나타내었다. 돼지 소장 유래 BBMV 항원을 총 10ug을 사용하여 기질로서 맥아당을 2mg/ml의 농도로 첨가하였다. BBMV에 포함된 효소에 의해 맥아당으로부터 분해된 포도당은 GO Assay kit (Sigma, USA)를 이용하여 glucose oxidase/peroxidase 반응에 의해 생성된 포도당의 양을 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 실시간으로 측정하여 시간에 대한 포도당의 산출 속도를 측정하였다. 효소-기질 반응에 의한 기질분해속도가 최고에 달하는 값, 즉 V_{max} 는 효소-기질 반응에 의한 시간에 따른 흡광도의 증가, 즉 그래프의 기울기를 의미하며 기울기가 클수록 효소가 기질을 빠르게 분해한다는 것을 의미하고 기울기가 낮을수록 즉, V_{max} 는 값이 작을수록

효소의 활성이 저해되어 효소가 기질을 빠르게 분해하지 못한다는 것을 의미한다

다. 접종항원 준비

(1) Soy bean oil

면역접종용 항원 제조를 위해서 분리한 BBMV 추출물을 BCA protein assay kit (Pierce, IL, USA)을 사용하여 단백질 정량 후 총 단백질 농도가 0.5 mg/ml이 되도록 10mM Tris-HCl (pH 7.1) 완충액으로 희석한 후 adjuvant로 soy bean oil을 사용하였고 soy bean oil과 6:4부피 비로 섞고 0.2% 계면활성제로 유화시킨 후 (BBMV: soybean oil: Tween 20 = 60: 40: 0.15) 사용하였다.

(2) 동물용 Adjuvant

IgY 생성을 비교를 위하여 동물용 Adjuvant인 Seppic社의 Montanide ISA 70을 사용하였다. 무게비로 유상(ISA 70) : 수상(BBMV 항원)을 70 : 30의 비율로 혼합하였고 1,000rpm으로 유상을 교반하면서 수상을 투입 완료 후 4,000rpm으로 3분간 교반하였다. 분리한 BBMV 추출물을 BCA protein assay kit (Pierce, IL, USA)을 사용하여 단백질 정량 후 총 단백질 농도가 0.5 mg/ml이 되도록 10mM Tris-HCl (pH 7.1) 완충액으로 희석한 후 Soy bean oil과 6:4 부피비로 섞고 0.2% 계면활성제로 유화시켜 사용하였다.

2. 산란계에 항원면역 및 항체가 측정

가. 산란계

산란계는 로만브라운 클래식 (LOHMANN BROWN CLASSIC)을 사용하였고, 조인(주)에서 생산 관리하였다.

나. 항원면역

닭의 가슴근육에 0.5 ml씩 근육 주사 하였다. Boosting은 2주 간격으로 총 4회에 걸쳐 접종하였다. 계란은 면역 차수 별로 수집한 후 4°C에 보관하고, 혈액은 wing vein에서 채혈한 후 혈청을 분리하여 -20°C에 보관하였다[4].

다. 항원에 대한 혈중 IgG 항체측정을 위한 ELISA

면역 후 혈청내의 항원특이적인 항체의 함량을 확인하기 위해 BBMV specific IgG ELISA를 수행하였다. 96 well plate(Maxisorp nunc immuno plate, Nunc #439454)에 BBMV를 250 ug/mL로 희석한 후 100 ul씩 분주하고, 37 °C에서 1시간 coating하였다. 1차 항체로는 면역혈청을 1:500로 희석하여 두배씩 단계희석하였다. 2차 항체로는 peroxidase labeled goat anti-chicken IgG(H+L) (KPL #14-24-06)을 1:5000으로 희석하여 사용하였고 기질은 TMB, Sure Blue (KPL)을 사용하였다.

라. 항원에 대한 계란 난황항체(IgY) 측정을 위한 ELISA

난황내의 항원특이적인 항체의 함량을 확인하기 위해 BBMV specific IgY ELISA를 수행하였다. 96 well plate(Maxisorp nunc immuno plate, Nunc #439454)에 BBMV를 250 ug/mL로 희석한 후 100 ml씩 분주하고, 37 °C에서 1시간 혹은 4°C에서 overnight반응시켜 coating하였다. 1차 항체로는 면역란을 각각 100 ug/mL로 희석하여 2배씩 단계희석하였다. 2차 항체로는 면역란에는 HRP conjugated anti-chicken IgY from rabbit (Promega #G1351)를 1:5000으로 희석하여 사용하였고 기질은 TMB, Sure Blue (KPL)을 사용하였다.

3. BR-IgY 제조공정

가. 제조공정

면역 접종한 산란계로부터 회수한 면역란의 난황액을 5-ton 반응조에 난황액과 Ice, 정제수를 1:2:7의 비율로 혼합하고, Arabic Gum을 0.4% w/v으로 첨가한 후, 50~60 rpm으로 30분간 교반하고 36~40 시간동안 저온, 정치하여 지질을 침지시켰다.

침지상등액을 회수하여 ALFA LAVAL연속원심분리기로 7,400 rpm에서 수용액층만을 분리하였다. 연속원심분리 상등액은 다시 0.45- μ m cassette filter membrane 또는 PallSep VMF 진동여과막을 사용하여 MF 여과 과정을 거친 뒤, 100-KDa cut-off UF membrane을 이용하여 10배 농축하여 최종 난황 농축액을 생산하고 이를 72시간 동결건조하여 난황 원말(BR-IgY)을 생산하였다.

4. BR-IgY 특성분석

가. 항체 특이성 분석 (Dot Blot)

항체의 특이적 성질을 생화학적인 방법으로 분석하기 위해서 생산한 기능성 난황 항체 원말의 Dot Blot을 수행하였다. 항원으로 사용한 BBMV (1000 ng/100ul)를 membrane에 흡착시킨 후, BBMV-specific BR-IgY, BR-IgY, control IgY 및 control 정제 IgY를 반응시켰다. Membrane washing 후 HRP-labeled anti-chicken IgY와 TMB substrate를 이용해 발색반응시켜 항체 특이성을 확인하였다.

나. pH/열 안정성

pH 2 - 8의 범위의 buffer에 일정량의 원말을 녹인 후 정량분석 및 정성분석을 통해 IgY의 pH 안정성을 확인하였고, 37°C 및 60, 70, 80°C에서 온도에 따른 IgY 변화를 확인하였다.

5. 안정성시험

가. 장기보존시험

BR-IgY의 안정성을 확인하기 위하여 대량 생산된 난황원말 중 3 lots의 안정성 시험을 수

행하였다. 실리콘, 알루미늄 백으로 2중 포장하였다. 측정 기간은 총24개월이며 측정시기는 0개월, 1개월, 3개월, 6개월, 12개월, 18개월, 24개월에 진행한다. 저장조건은 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도 $60\pm 5\%$ 의 항온항습기에서 보관하였다.

나. 가속시험

장기보존시험과 동일하게 BR-IgY는 실리콘, 알루미늄 백으로 이중포장하여 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$, 명조건에서 6개월동안 보관하면서 시험하였다. 0, 1, 3, 6개월에 정상, 수분함량, 미생물 시험, 지표물질함량, 확인시험, 역가시험을 실시하였다.

6. 지표물질시험법

가. 조단백함량

시료 200mg에 Selenium (merck#1.07714.0050) 1g을 넣고 H_2SO_4 (36N원액) 15ml를 가한 후 1시간 동안 태우고 증류기에 장착한다. 증류액을 붕산(1/25)15ml를 가하고, 지시약 브롬크레졸 그린메틸렛 3~5 방울을 넣은 플라스크에 얻은 후, 이를 0.1N- H_2SO_4 으로 색이 변할 때 까지 적정하였다[5].

나. ELISA

BR-IgY 중 IgY의 함량을 확인하기 위해 total IgY ELISA를 수행하였다. Maxisorp nunc immuno plate(Nunc #439454)에 polyclonal anti-chicken IgY&IgG from rabbit (Sigma #C2288)을 1:2000으로 희석하여 100 ul씩 분주하고, 37°C 에서 1시간 coating하였다. Detection 항체는 goat anti-chicken IgY AP conjugate (Promega #G1151)을 1:5000 희석하여 사용하였다. 기질은 pNPP, phosphatase substrate system(KPL#50-80-00)를 이용하였다.

7. 독성시험[6]

가. SD 랫드에 대한 단회 경구투여 독성시험

식품의약품안전청 고시 중 “의약품등의독성시험기준 해설서”에 근거하여 단회독성시험 한계용량인 2,000 mg/kg 용량으로 시험군을 설정하였으며, 대조군으로는 부형제인 멸균증류수를 투여하는 부형제 대조군을 두었다.

나. 유전독성

(1) BR-IgY에 대한 CHL 세포에서의 염색체이상시험

시험물질의 투여농도는 세포 증식의 약 50 % 억제를 기준으로 결정하였으며, 시험물질의 최고 농도는 직접법과 대사활성화법 모두 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최고농도로 하여 시험하였다. 본시험에서 최고농도 이하 3단계 시험농도와 음성 및 양성대조시험을 포함하여 총 5군의 시험군에 대해 염색체이상을 직접법과 대사활성화법에서 관찰 계수하였다. 최고농도를 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로

하여 확인시험 (24시간 처리군) 도 실시하였다.

(2) BR-IgY에 대한 소핵시험

6주령의 마우스를 일주간 순화시킨 후 시험물질을 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg B.W.의 용량으로 각각의 농도에 대하여 5마리에 1일 1회 2일간 경구 투여하였으며, 최종 투여 후 약 24시간에 골수세포를 수집하여 소핵유발과 세포독성을 평가하였다.

(3) BR-IgY에 대한 미생물복귀돌연변이시험

시험물질은 물(Water)에 용해하여 처리하였고, 5000 µg/plate를 최고농도로 하여 1000, 500, 100 및 50 µg/plate로 단계 희석하여 실시한 농도결정시험을 토대로 하여, 본시험에서는 대사활성화법 미적용 (S9-) 및 적용(S9+) 시 모두 5000, 2500, 1250, 625 및 312.5 µg/plate 농도로 음성 및 양성 대조군과 함께 시험을 실시하였다.

다. 반복투여독성시험

(1) SD 랫드에 대한 BR-IgY의 28일 반복 경구투여 독성시험

단회 경구투여 독성시험 결과에서 랫드에 대한 기능성 난황 항체의 개략의 치사량이 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 판단되었으므로, 이를 바탕으로 랫드에 2, 200 및 2,000 mg/kg B.W. 용량으로 28일간 경구로 반복 투여 후 나타나는 변화를 관찰하여 90일 반복 경구투여 독성시험의 용량을 결정하기 위하여 실시하였다.

(2) SD 랫드에 대한 BR-IgY의 90일 반복 경구투여 독성시험

BR-IgY(Lyophilized IgY powder)의 반복 경구 투여에 의한 전신독성변화와 무독성량을 조사하기 위하여 40, 200 및 1000 mg/kg의 투여용량을 설정하여 SD 랫드에 90일간 반복 경구 투여 하였고, 2주간의 회복성을 관찰하였다. 체중변화, 사료·음수 섭취량, 뇨 검사, 안과학적 검사, 부검소견, 장기중량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 병리조직학적 검사를 실시하였다.

8. 기능성 확인시험

가. in vitro 효력시험

(1) 이당류 분해효소 활성억제

항원으로 사용한 돼지소장 유래 BBMV 내에는 소장에서 탄수화물을 가수분해하여 최종적으로 포도당으로 분해, 흡수하기 위한 여러 소화 효소들과 transporter들이 존재하고 있다고 알려져 있으며, 특히 maltose, sucrose와 같은 이당류들을 포도당으로 분해하기 위한 α-glucosidase 효소의 존재가 알려져 있다. 따라서, BR-IgY가 소장 내 이당류 분해효소들을 효과적으로 억제하는지 확인하기 위한 시험법을 확립하였다.

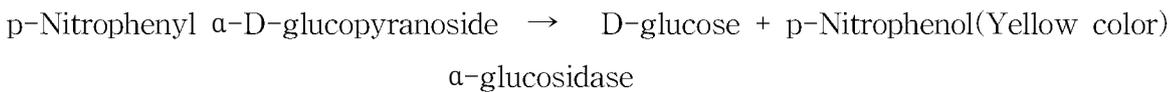
(가) BR-IgY의 BBMV 항원내 포함된 이당류 분해효소의 맥아당(maltose) 분해 저해

분리 정제한 BBMV를 1 mg/ml로 제조하여 0.1 mg/ml로 생리 식염수로 희석하여 활성 효소로 사용하고, 대조군으로 control-IgY와 실험군으로 정제 BR-IgY를 1mg/ml의 농도로 제

조하여 사용하였다. BBMV를 총 50~10ug을 사용하여 30분간 pre-incubation 후 기질로서 맥아당을 2mg/ml의 농도로 첨가하였다. BBMV에 포함된 효소에 의해 맥아당으로부터 분해된 포도당은 GO Assay kit (Sigma, USA)를 이용하여 glucose oxidase/peroxidase 반응에 의해 생성된 포도당의 양을 microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 실시간으로 측정하여 시간에 대한 포도당의 산출 속도를 측정하였다. 효소-기질 반응에 의한 기질분해속도가 최고에 달하는 값, 즉 Vmax는 효소-기질 반응에 의한 시간에 따른 흡광도의 증가, 즉 그래프의 기울기를 의미하며 기울기가 클수록 효소가 기질을 빠르게 분해한다는 것을 의미하고 기울기가 낮을수록 즉, Vmax는 값이 작을수록 효소의 활성이 저해되어 효소가 기질을 빠르게 분해하지 못한다는 것을 의미한다.

(나) pNPG assay

α -glucosidase 효소(maltase)의 활성을 측정하기 위한 Pierre 등의 방법을 변형한 pNPG assay를 실시하였다[7]. pNPG assay는 기질인 p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (pNPG)가 효소인 α -glucosidase에 의해 분해되어 생성된 p-nitrophenol을 400 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 정량하는 방법이다.



Phosphate buffer (67 mM Potassium phosphate buffer with 1.2 mM Glutathione, pH 6.8)에 기저 농도(0.0625 - 1.0 U/mL)의 maltase(Sigma, USA) 효소를 혼합한 후 시료를 첨가하여 37°C에서 10분간 pre-incubation하였다. 10 μ l의 1 mM p-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside (pNPG)를 첨가하여 37°C, 20분간 반응시킨 후, 100 μ l의 0.1 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 종결시키고 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소억제능은 난황 항체를 처리하지 않은 대조구의 흡광도와 비교하여 저해 %를 계산하였다.

(2) 포도당 흡수억제기작확인

(가) BR-IgY의 glucose transporter에 대한 특이성

BR-IgY가 세포 표면의 포도당 transporter와 결합하는지 여부를 immuno-fluorescence 방법을 이용하여 관찰하였다. HT-29 와 HCT116 세포를 cover slip에 1*10⁵ cells/ml의 농도로 seeding하고 early log phase로 성장하는 16시간 후에 paraformaldehyde 용액으로 세포를 고정하였다. Blocking solution을 약 30분 동안 처리한 후에, 시료를 1ug/ml과 10ug/ml의 농도로 2시간 처리하였다. PBS로 washing 후에 secondary antibody (goat anti-Chicken IgY-FITC)를 1시간 처리하고 형광 현미경으로 관찰하였다.

(나) BR-IgY의 정제도에 따른 포도당 흡수 억제확인

HT-29와 HCT116 세포들을 6-well plate에 70% confluent하게 seeding하고 16시간 후

에 Low glucose 배지로 전환하여 1시간 배양한다. 이 후 BR-IgY를 농도별로 2시간 처리하였다. 후에, 18FDG를 2uCi/well의 농도로 1시간 처리하고 PBS로 washing 후에 세포들을 trypsin 처리 하여 떼어낸 세포들을 gamma-counter기를 이용하여 세포내 흡수된 18FDG를 측정하였다. 세포성장 억제여부 확인은 HT-29와 HCT116 세포를 96well plate에 1×10^3 cells/well 되도록 seeding하고, 16시간 후 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. 48시간 후에 MTT 용액 (5mg/ml in PBS)를 20ul/well 되도록 처리하고 4시간 후에 배지를 제거한 후 DMSO를 첨가하였다. 각 well의 흡광도를 480nm에서 측정하여 대조군과 비교하였다.

(다) 동물 장내세포 포도당 흡수억제시험

Mouse primary intestine cell (CHI Scientific)을 12 well에 60% confluent하게 배양 후, low glucose 배지로 전환하고 control-IgY(C-IgY)와 정제 BR-IgY(P-IgY)를 농도별로 2시간 처리하였다. 18FDG를 2uCi/well의 농도로 1시간 처리한 후, PBS로 washing (3times) 후에 γ -counter기를 이용하여 세포내 축적된 18FDG를 측정하였다. 세포 성장저해는 cell을 96well plate에 1×10^3 cells/well 되도록 seeding 하고, 16시간 후 각각의 시료를 농도별로 처리하였음. 48시간 후에 MTT 용액 (5mg/ml in PBS)를 20ul/well 되도록 처리하고 4시간 후에 배지를 제거한 후에 DMSO를 첨가하고, 흡광도를 480nm에서 측정하였다.

나. in vivo 효력시험

(1) 설치류를 이용한 경구 당부하검사

설치류를 이용한 경구 당부하검사 (Oral Glucose Tolerance Test: OGTT)를 수행하였다. 시험 날 이전 24시간 동안 절식시킨 SD Rat 시험동물에 시험물질 투여 후 체중 kg당 2 g의 maltose(MALTOSE MONOHYDRATE, A8908, SIGMA)를 멸균증류수에 녹여 체중 kg 당 10 mL의 투여액량으로 강제 경구 투여하였다. 혈당측정 방법은 1회용 주사기(1 mL)를 이용하여 rat의 미정맥 채혈(100 ~ 200uL)후 혈당측정기 아큐체크액티브(Roche Diagnostic Co., USA)를 사용하여 측정하였다. 혈당 측정은 0 (pre-dose), 15, 30, 60 및 120분에 실시하였다.

(2) 설치류를 이용한 BR-IgY 반복투여시험

SD-Rat을 이용하여 장기간 반복 식이 효과를 확인하였다. 1주간 순화시킨 Rat에 1일 2회씩 총 4주간 10mg/kg(G3)과 100 mg/kg(G4)의 BR-IgY 를 멸균증류수에 녹여 체중 kg 당 10 mL의 투여액량으로 강제 경구 투여하였다. 대조군으로 사료군(G1)과 Control-IgY(G2)군을 두었다. 실험동물의 약물 투여와 사료 식이 시기를 맞추기 위하여 순화시기부터 12시간 단위로 바뀌는 조명을 낮에는 끄고 밤에는 켜서 낮에 투여시기에 사료를 식이 할 수 있도록 조절하였다. 체중과 사료 식이량은 주 1회 측정하였다.

제2절 연구내용

1. 산란계 접종을 위한 돼지 소장 유래 BBMV 항원의 제조

가. 돼지소장에서부터 BBMV를 포함하는 항원을 고순도로 분리하는 방법과 항원을 확인하는 방법을 확립

나. 산란계 접종방법 최적화 및 난황 내 항-BBMV 특이적 IgY생성확인

(1) 항원제조 공정개선

2차년도까지 분리된 돼지 소장 유래 BBMV 항원에 접종용 항원 제조 시 면역 증강제 (adjuvant)를 사용하는 공정을 첨가한 개선 연구를 수행하였다. 원심 분리 공정을 통해 얻은 항원(BBMV)를 현탁화(Emulsify) 하는 공정에서 상용화된 동물용 면역 증강제를 적용하였다.

2. BR-IgY 제조공정 최적화

가. 면역란으로부터 난황분리

나. 난황으로부터 IgY의 대량정제공정 확립

3. BR-IgY 특성분석

가. 항원-항체 특이성 연구

생산 원료의 함량 및 특성 표준화를 하기 위하여 항원-항체 반응을 이용한 BR-IgY의 항원(BBMV)에 특이적인 시험법인 Dot-blot과 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하였다.

나. 물리, 화학적 특성분석

(1) pH/열 안정성

pH 2 - 8의 범위의 buffer에 일정량의 BR-IgY를 녹인 후 정량분석 및 정성분석을 통해 IgY의 pH 안정성을 확인하였고, 37℃ 및 60, 70, 80℃에서 온도에 따른 IgY 변화를 확인하였다.

4. BR-IgY 안정성시험

가. 가속시험

BR-IgY의 가속안정성을 확인하기 위하여 40±2℃, 상대습도 70±5%, 명조건에서 6개월동안 보관하면서 시험하였다.

나. 장기보존시험

BR-IgY의 장기보존안정성을 확인하기 위하여 총24개월동안 25±2℃, 상대습도 60±5% 조건에서 3 lots의 안정성시험을 수행하였다.

5. 지표물질 시험법

BR-IgY에 적합한 지표물질시험법 확립을 위하여 여러방법을 확인하였고 최종 조단백함량 시험법과 ELISA법을 비교하였다.

6. BR-IgY 안전성시험

가. SD 랫드에 대한 단회 경구투여 독성시험

단회 경구투여 독성시험을 의약품 등의 독성시험기준 (식품의약품안전청 고시 제 2005-60호)에 따라 SD 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 2 000 mg/kg 으로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경구 투여 한 후 2주간 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.

나. 유전독성

(1) BR-IgY에 대한 CHL 세포에서의 염색체이상시험

염색체이상 유발여부를 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 Lung Cell (CHL) 을 이용하여 직접법 (-S9 Mix) 과 대사활성화법 (+S9 Mix)의 염색체 이상 시험을 실시하였다.

(2) BR-IgY에 대한 소핵시험

유전독성을 평가하기 위하여 마우스 (ICR) 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

(3) BR-IgY에 대한 미생물복귀돌연변이시험

미생물 복귀돌연변이 유발여부를 평가하기 위하여 Salmonella typhimurium 의 히스티딘 요구성 균주인 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 Escherichia coli 의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA 를 이용하여 시험을 실시하였다.

다. 반복투여독성시험

(1) SD 랫드에 대한 BR-IgY의 28일 반복 경구투여 독성시험

랫드에 2, 200 및 2000 mg/kg 용량으로 28일간 경구로 반복 투여 후 나타나는 변화를 관찰하여 90일 반복 경구투여 독성시험의 용량을 결정하기 위하여 실시하였다.

(2) SD 랫드에 대한 BR-IgY의 90일 반복 경구투여 독성시험

반복 경구 투여에 의한 전신독성변화와 무독성량을 조사하기 위하여 40, 200 및 1000 mg/kg의 투여용량을 설정하여 SD 랫드에 90일간 반복 경구 투여 하였고, 2주간의 회복성을 관찰하였다.

7. BR-IgY 기능성시험

가. In vitro 역가 측정

(1) 이당류 분해효소 활성억제

BR-IgY의 효능을 평가하기 위해 이당류 분해효소인 maltase 억제능을 측정하는 시험법을 확립하였다.

(2) 당 흡수 시험 세포주 모델 확립

세포주를 이용한 실험의 의의는 크게 두 가지로 정의할 수 있는데, 첫째로 정상 세포에서 난황 항체의 세포 독성을 판독할 수 있다. 아직 세포주를 이용한 독성 screening은 크게 활성화되어 있지 않지만 암유발성 시험 및 특수 질환 모델에서 사용 중이며, 생체에 적용 전에 시료의 세포내 독성을 봄으로써, 생체 내 유해성을 쉽고 저렴하게 판독할 수 있다. 또한 위암 및 대장암 세포에 대한 영향을 평가함으로써, 본 원료의 특성인 당 흡수 억제능을 가늠할 수 있다. 일반적으로 암세포는 포도당의 흡수 및 대사가 높아 포도당 흡수를 저해시킬 경우 암세포 사멸 또는 성장저해 효과 있을 것으로 예상되며, 따라서 이를 시험하여 모델을 확립할 수 있을 것으로 예상하였다.

실험에 사용한 암 세포주는 HT-29 Cell line과 HCT-116 Cell line 두 세포주 모두 Colon Epithelial Cancer에서 유래하였으며 이는 본 실험의 장내 세포의 BBMV의 활성화억제 기전을 고려하여 가장 근접한 세포주를 선별한 것이다.

(나) 세포 외부의 포도당 transporter와의 결합 확인

BR-IgY가 세포 표면의 포도당 transporter와 결합하는지 여부를 immuno- fluorescence 방법을 이용하여 관찰하였다.

(다) 방사성 동위원소를 이용한 포도당 흡수 억제 확인 시험

방사성 동위원소로 표지된 포도당 (18FDG, 18Fludeoxyglucose)을 이용하여, BR-IgY를 처리한 후 세포내 흡수되어 축적되는 포도당을 gamma-counter를 이용하여 측정하였다.

나. In vivo 효력시험

(1) 혈당조절능시험

동물효력시험은 BR-IgY의 혈당 상승 억제 효과를 확인하기 위하여 설치류를 이용한 경구 당부하검사 (Oral Glucose Tolerance Test: OGTT)를 수행하였다.

(2) 반복투여시험

제3절 연구결과

1. 1차년도

가. 돼지소장 유래 BBMV 항원 분리 최적화

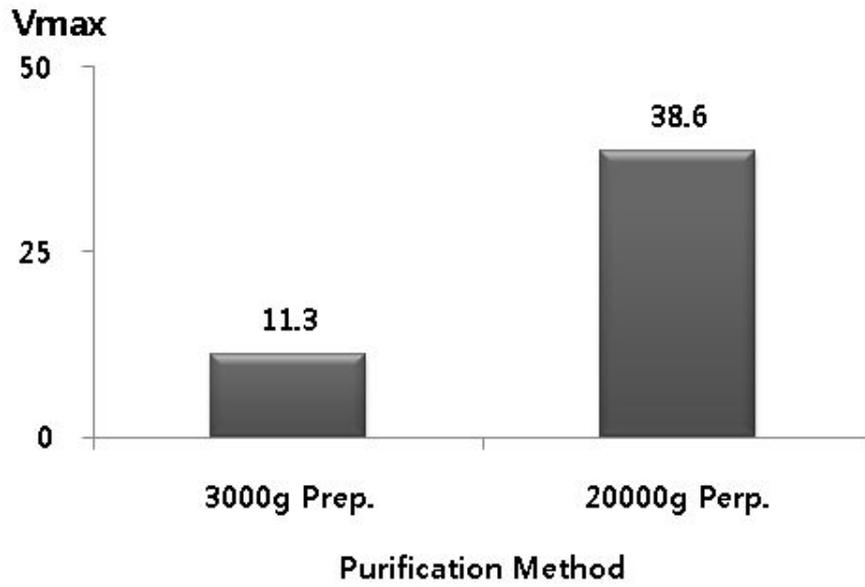
산란계에 면역 접종 후 높은 항체 역가를 얻기 위해서 항원단백질의 순도를 높이고 분리 재현성을 확보할 수 있는 항원 분리 방법의 최적화 연구를 수행하였다. 이를 위해 돼지 소장에서 추출한 혼합물 내 항원단백질인 BBMV의 활성을 향상시키기 위해 정제과정 중 3,000xg 원심분리공정을 개선하여 20,000xg 원심분리공정을 통해 얻은 항원단백질과 순도 및 항원성을

비교, 연구하였다.

BBMV 항원단백질 내 지표물질인 Alkaline phosphatase와 Maltase의 활성이, 동일 단백질 농도 대비 기존 3,000xg 원심분리공정에 비해 개선한 20,000xg 원심분리공정을 적용 시, 각각 6배, 3.4배 증가하여 항원 단백질의 순도를 증가시킬 수 있음을 확인하였다(그림 1).

또한 신규 공정을 통해 제조한 항원단백질의 항원성을 확인하기 위해 SD Rat에 총 4회에 걸쳐 근육주사 후, 혈청 내 anti-BBMV 항체의 역가를 측정된 결과, 그림 2에서 보듯이 면역 후 5주차 Rat 혈청 내 항체 역가가 기존 공정으로 제조한 항원에 비해 신규 공정으로 제조한 항원으로 면역 시, 약 1.6배 가량 증가하여 20,000xg 원심분리 공정으로 제조한 BBMV 항원이 높은 항원성을 나타냄을 확인하였다. 따라서, 이후 산란계 면역 접종용 항원은 신규 공정으로 제조한 항원을 사용하기로 하였다.

(A)



(B)

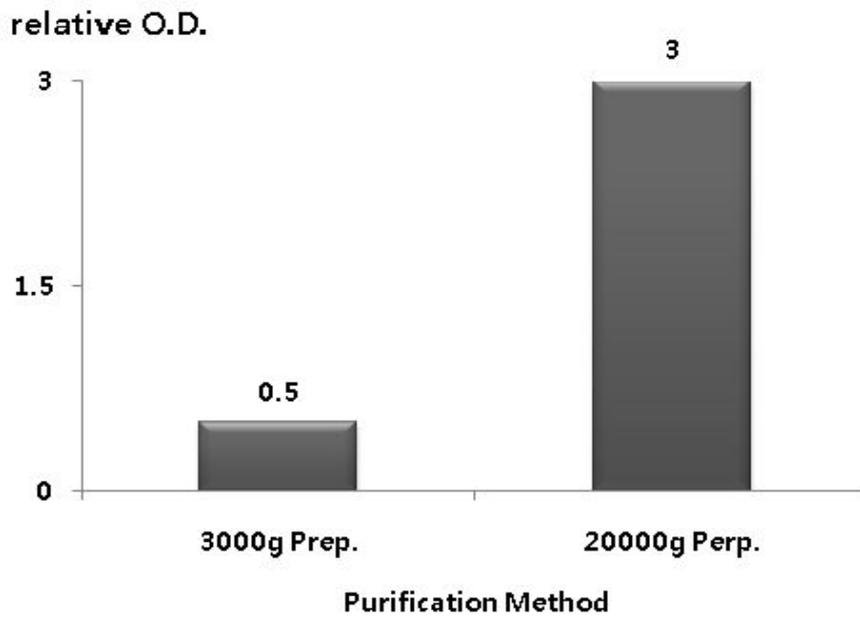


그림 1. 돼지 소장 유래 BBMV항원의 (A)Akaline phosphatase 활성과 (B)Maltase 활성

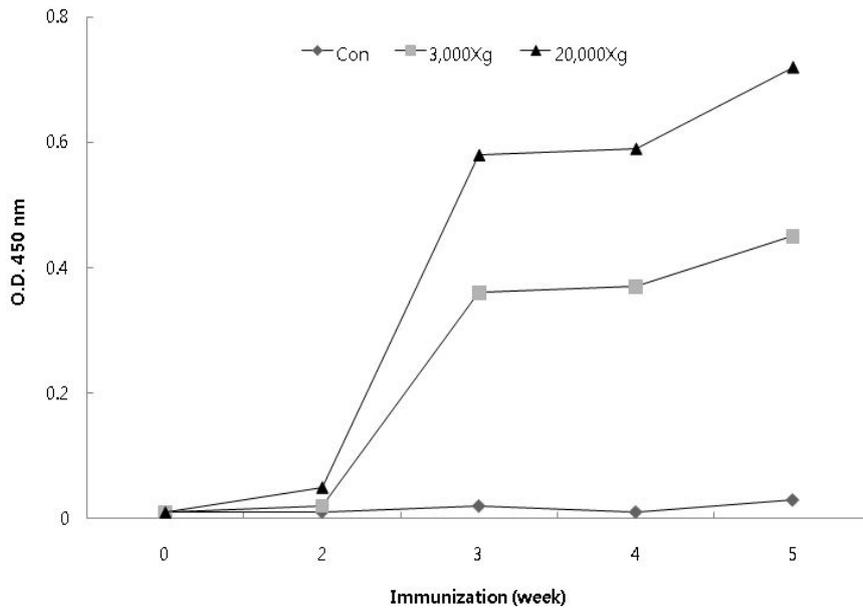


그림 2. 돼지 소장 유래 BBMV항원의 접종횟수에 따른 Rat의 혈청 내 Anti-BBMV IgG 역가

나. 산란계 면역 접종 및 역가 확인

산란계는 조인(주)와의 협약에 따라 충청남도 당진에 소재한 농장에서 이루어 졌으며 총 3000수를 접종하였고, 접종된 닭의 면역 역가를 주기적으로 확인하였다. 4차 Boosting 후 유의한 항체생성을 확인하여 원료 정제 공정에 사용하였다.

다. 난황 항체 대량 생산 공정 최적화 및 시생산

난황 항체 생산 공정의 scale-up과 전임상 시험용 시료 생산을 위해 2008년 11월 3일부터 12월 22일까지 춘천 바이오산업진흥원에서 총 5 Batch 시생산을 실시하였다.

그림 3에 요약한 대로 시생산 공정은 5-ton 반응조에서 3-ton scale로 생산하였으며 ‘난황 침지 → 연속원심분리 → MF 여과 → UF 농축 → 동결건조’ 까지 총 7일의 공정으로 실시되었다. 시생산 후, Batch별 원말 총 무게 및 단백질 함량, Total IgY 함량을 분석한 결과는 표 1에 정리하였다.

시생산 결과에서 알 수 있듯이, 공정 최적화를 위해 여과 공정을 일부 변경하였던 #08002와 #08003 batch를 제외한 나머지 3 Batch 생산 결과, Batch 당 원말 생산 수율은 12.3 ± 0.4 Kg 이었으며, 원말 단백질 함량, Total IgY 함량은 각각 $78.2 \pm 1.0\%$, $14.0 \pm 3.1\%$ 로 Batch별 생산 수율 및 원말 함량이 매우 안정적임을 확인하였다.



그림 3. BR-IgY의 대량생산공정 흐름도

표 1. BR-IgY의 시생산 수율과 분석결과

항목	Batch No.				
	#08001	#08002	#08003	#08004	#08005
생산량(g)	11900.0	6000.0	4300.0	12300.0	12700.0
1%(w/v) 용액의 단백질 농도(mg/ml)	7.9	8.7	9.6	7.7	7.8
총 단백질 양(g)	9412.9	5226.0	4119.4	9483.3	9944.1
IgY/단백질(%)	14.2	16.1	16.0	22.0	20.9
Total IgY(g)	1336.6	841.4	659.1	2086.3	2078.3
단백질 함량(%)	79.1	87.1	95.8	77.1	78.3
Total IgY 함량(%)	11.2	14.0	15.3	17.0	16.4

라. 시생산 원료의 이당류 분해 활성 억제능 분석

BR-IgY의 이당류 분해효소 활성억제는 Malase 효소의 Kinetic assay를 통해 BR-IgY가 기질인 맥아당의 분해를 억제하는 정도를 %로 나타내었다.

10 mg/ml의 난황 원말로 처리 시, 대조구에 비해 49~72%까지 maltase 효소활성을 효과적으로 억제함을 확인하였으며, 이는 난황 원말 내의 BBMV-specific한 난황 항체가 효소를 억제한 것으로 판단되었다(그림 4).

따라서, 시생산 공정을 통해 생산한 원말은 탄수화물의 소화, 흡수 억제를 통해 비만 억제 및 혈당 조절 가능성을 가진 원료로 적합하리라고 예측되며 차후 동물 효력시험을 통해 효능을 보다 확인할 계획이다

마. 분석용 난황 항체 정제

난황 항체의 특성 연구와 지표물질 연구를 위해서 본 공정으로 생산된 BBMV 특이적 난황 항체의 고순도 정제가 필요하였다. 이를 위해 Affinity Column을 이용하여 BBMV-specific IgY 정제 공정을 확립 중에 있다. 그림 5 에서와 같이 BBMV-specific column을 이용하여 정제가 가능함을 확인하였다.

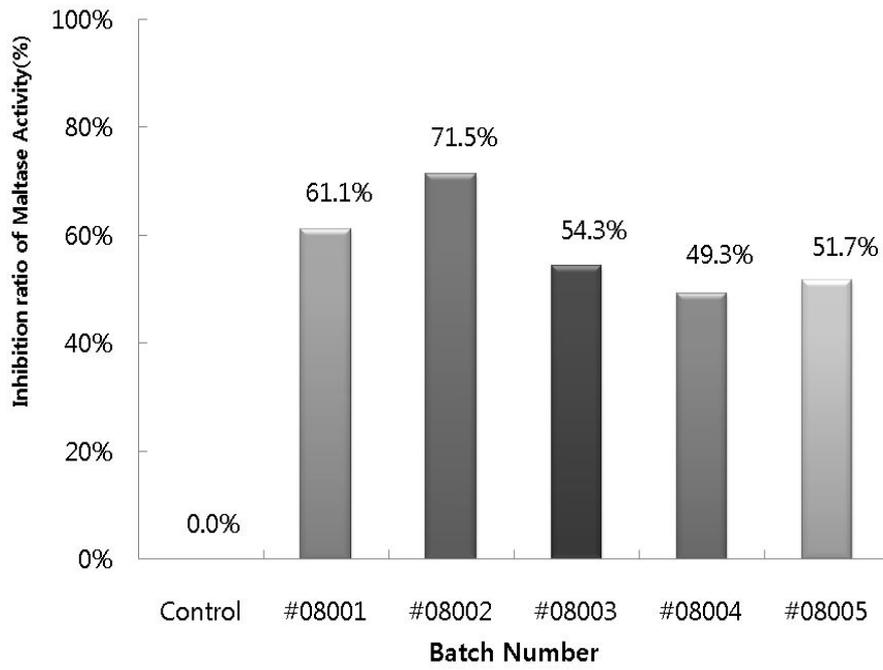


그림 4. 시생산 Batch별 BR-IgY의 Maltase 활성저해 비교

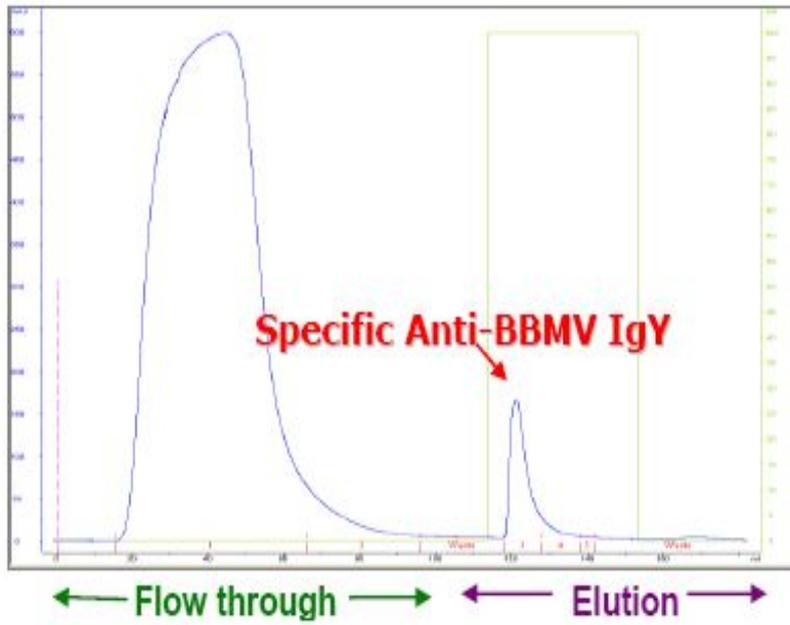


그림 5. BR-IgY의 BBMV affinity 정제 크로마토그램

바. 단회 투여 독성 시험

전북대학교 병원 기능성식품 임상시험지원센터(CTCF2)와 협약하여 GLP기관인 한국화학시험연구원(KTR)에서 독성 시험을 수행하였다. 기존의 기능성 식품의 선례와 KFDA 독성시험 기준에 준하여 시험을 수행하였다. 시험은 2009년 3월 11일에 시작되어 2009년 4월 13일까지 아래와 같이 진행 되었다.

(1) 시험명

SD 랫드에 대한 BR-IgY(Lyophilized IgY powder)의 단회 경구투여 독성시험

(2) 결과요약

BR-IgY(Lyophilized IgY powder)에 대한 단회 경구투여 독성시험을 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청 고시 제 2005-60호)에 따라 SD 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 2 000 mg/kg 으로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경구 투여 한 후 2주간 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.

(나) 일반증상 관찰결과 모든 항목에서 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(다) 생존동물에 대한 체중측정 결과 대조군과 시험군(투여군)간의 체중 증체량의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

(라) 생존동물의 부검 소견 결과 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 BR-IgY(Lyophilized IgY powder)의 투여량을 2 000 mg/kg 으로 설정하여 투여한 결과 사망동물 및 이상소견 관찰 동물이 없었으며, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않았으므로 BR-IgY(Lyophilized IgY powder)에 대한 개략의 치사량은 암·수 모두 2 000 mg/kg 이상으로 사료된다.

사. 당 흡수 시험 세포주 모델 확립

정상세포인 human dermal fibroblast (HDF)를 대상으로 BR-IgY의 세포성장저해효과를 관찰한 결과, 1 mg/mL의 농도까지 세포성장저해가 거의 나타나지 않음을 관찰하였다(그림 6). 이를 통해 본 원료는 세포에 큰 독성이 없는 것으로 확인되었다.

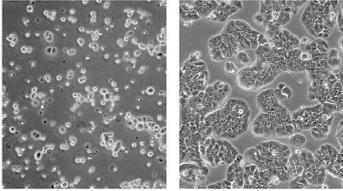
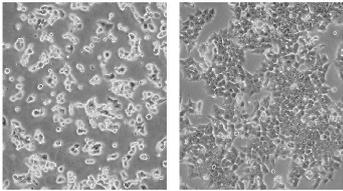
대장암 세포주(표 2)를 대상으로 정제된 난황항체가 세포의 성장 및 사멸에 미치는 영향을 분석한 결과 10 mg/mL의 고 농도에서 세포사멸이 관찰되었으며 1 mg/mL 농도까지 HT29 세포주에서는 약 10%, HCT116 세포주에서는 약 20% 정도의 세포성장 저해 효과를 나타내었다. 두 세포주에서 세포성장저해 효과는 HCT116에서 더 현저하였다(그림 7).

두 세포주를 대상으로 100 ng/mL 까지 저 농도의 난황항체에 대한 세포 성장저해 효과를 관찰한 결과 두 세포주 모두에서 1 ng/mL 농도부터 약 10%정도의 세포성장저해효과를 보였다. 이는 적어도 대장암 세포주에서 100 ng/mL까지의 항체농도는 세포성장을 10% 정도 저해

함을 알 수 있었다(그림 8).

상기의 결과로 볼 때, 난황항체는 대장암 세포의 성장을 100 ng/mL 농도에서 약 10% 가량 세포성장을 저해하며 정상세포에는 전혀 고농도까지 세포성장에 영향을 미치지 않는 것을 확인 할 수 있었다.

표 2. HT2-9와 HCT-116 세포주

	HT-29	HCT-116
Origin	Colon	Colon; Colorectal
Morphology	Epithelial	Epithelial
Histopathology	Adenocarcinoma	Carcinoma
Major genetic variations	p53 mutation(R273H) myc+, ras+	p53 wild type ras mutation
Metabolism	High level of glucose transporter 1	High level of aerobic glycolysis
Morphology		

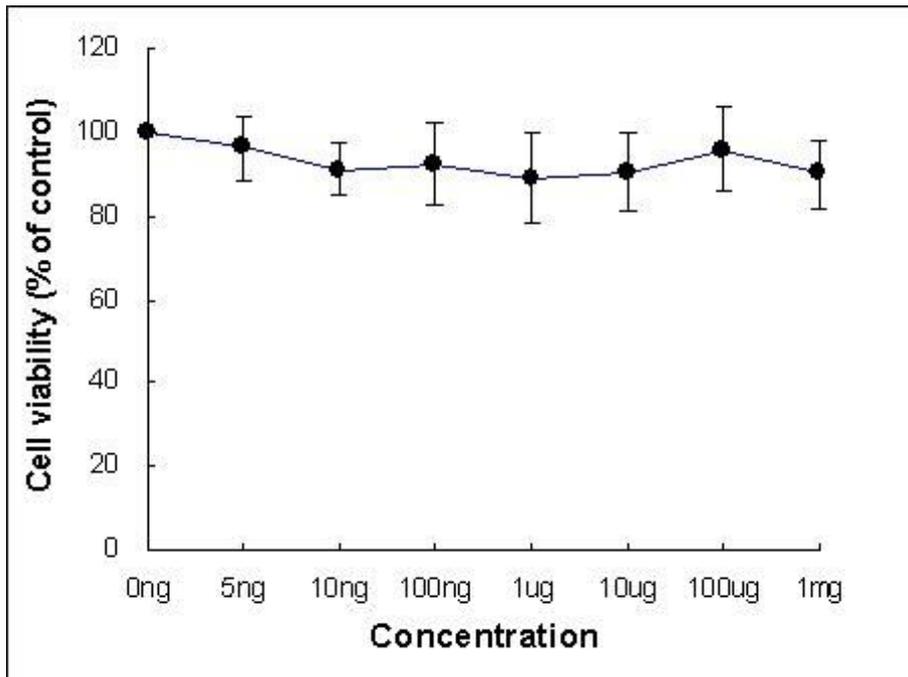


그림 6. BR-IgY에 의한 HDF 세포의 생존율

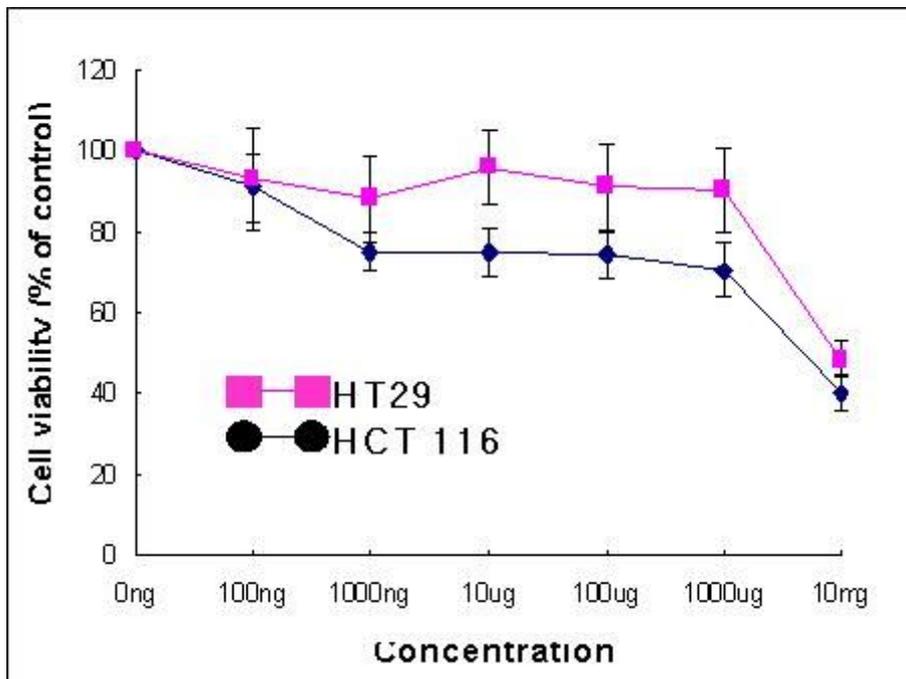


그림 7. BR-IgY에 의한 HT와 HTC 세포의 생존율

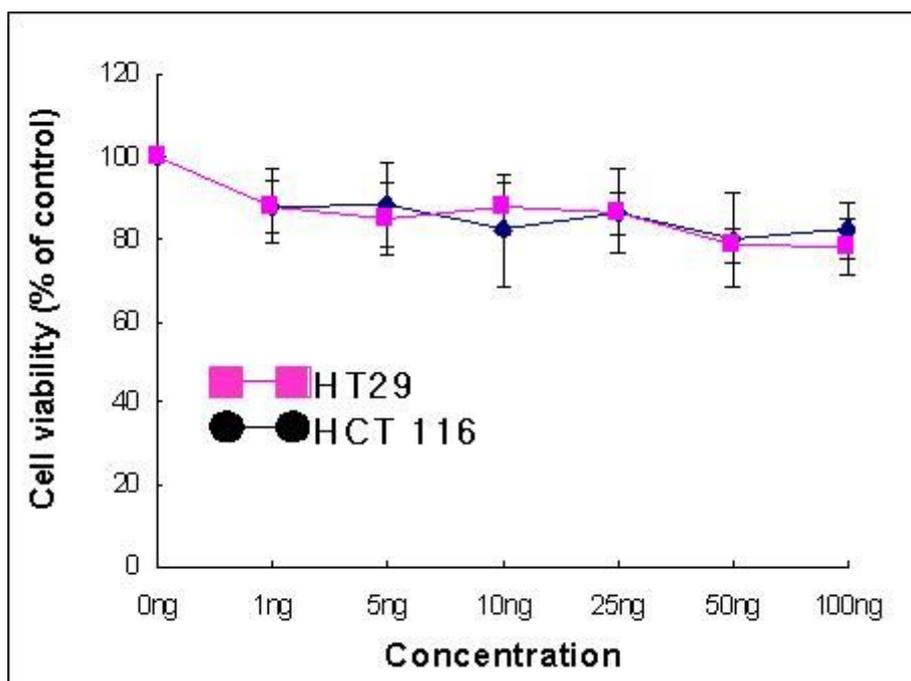


그림 8. 저농도 BR-IgY에 의한 HT와 HTC 세포의 생존율

2. 2차년도 연구결과

가. 대조군 난황항체(Con-IgY) 생산

대조군으로 사용하기 위하여 면역 접종을 하지 않은 계란에서 IgY를 대량 생산하였다. 생산에 사용한 계란은 본 생산에 사용했던 계란과 동일한 산란계에서 얻은 비면역계란을 사용하였고, 할란(割卵)도 동일한 공장에서 동일한 공정으로 수행하였다. 난황으로부터 IgY정제는 BR-IgY생산과 같은 공정을 거친 후 동결건조를 수행하여 최종적으로 수분함량 5% 미만의 Con-IgY 0.4 kg을 생산하였다. 동결건조 후, 5 g 및 50 g 단위로 포장하여 방사선 멸균을 수행하였다.

나. BY-IgY 특성 연구

(1) BR-IgY 함량시험법 연구

BR-IgY의 항원-항체 반응의 특이성을 파악하기 위한 ELISA를 수행하였다. 시료 희석 buffer인 placebo와 면역전 항체 (pre-immune control IgY), BR-IgY 0.1 %(w/v)의 50배 희석액 각각에 특이항체 자사표준품(Specific IgY) 125 ng/ml를 spiking한 시료와 하지않은 시료에 대해 반복 실험하였다. 그 결과 placebo와, Pre-immune control IgY, 난황원말은 본 특이항체 함량 분석법에 영향을 주지 않으며, Placebo와 면역전 항체 (pre-immune control IgY), 난황원말 0.1 %(w/v) 50배 희석액에 spiking한 specific IgY의 평균 회수율은 각각 85.7 %, 96.7 %, 90.8 %로 유의한 수치를 나타내었다(표 3).

위의 결과로 항원특이성이 있는 IgY함량 시험법인 ELISA법을 확립하였고 2008년 생산한 다섯 배치의 항원 특이적 BR-IgY의 함량은 다음과 같다(표 4).

(2) 항체 특이성 분석 (Dot Blot)

특이 항체 자사 표준품(Lane 1)과 기능성 난황 원말(Lane 3)에서만 항원-항체 반응에 의한 발색반응이 관찰되었으며, 대조구 난황 원말 및 대조구 정제 IgY는 반응하지 않는 것을 확인하였다(그림 9). 이는 생산된 난황 원말 내에 항원인 BBMV 특이적으로 결합하는 난황 항체가 존재함을 보여주는 것이다.

표 3. BR-IgY의 항원특이성

시료 No.	Placebo		Control IgY		난황원말 0.1 % (w/v) 의 50 배 희석액	
	Specific IgY 125 ng/ml (-)	Specific IgY 125 ng/ml (+)	Specific IgY 125 ng/ml (-)	Specific IgY 125 ng/ml (+)	Specific IgY 125 ng/ml (-)	Specific IgY 125 ng/ml (+)
1	-0.001	0.084	0.012	0.091	0.139	0.245
2	-0.005	0.077	0.005	0.087	0.127	0.201
3	-0.004	0.073	0.006	0.087	0.127	0.197
4	-0.002	0.082	0.007	0.085	0.123	0.211
5	-0.007	0.078	0.010	0.092	0.128	0.210
6	-0.004	0.089	0.012	0.109	0.111	0.192
7	-0.004	0.082	0.016	0.098	0.126	0.198
8	-0.003	0.080	0.015	0.096	0.135	0.199
9	-0.001	0.088	0.015	0.106	0.142	0.212
평균	-0.003	0.081	0.011	0.095	0.129	0.207
표준편차	0.0019	0.0052	0.0041	0.0085	0.0092	0.0158
농도*	N.D.	107±7.4740	5±5.7214	121±12.8236	175±13.5647	288±22.6464
회수율 (%)**		85.7		96.7		90.8

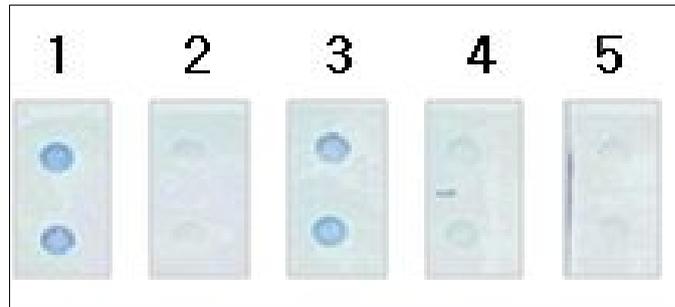
*: 정량곡선의 식($y = 0.001x + 0.022$, y: 흡광도, x: specific IgY 농도)에 대입하여 계산한 합량.

** : $[(\text{Spiking 시료의 specific IgY 농도}) - (\text{Spiking 전 시료의 specific IgY 농도}) / \text{Specific IgY 125 ng/ml}] \times 100$

N.D. : Not Determined (검출함도 미만).

표 4. BR-IgY의 항원 특이적 IgY 함량

항목	Batch No.				
	#08001	#08002	#08003	#08004	#08005
생산량(g)	11900.0	6000.0	4300.0	12300.0	12700.0
1%(w/v) 용액의 단백질 농도(mg/ml)	7.9	8.7	9.6	7.7	7.8
총 단백질 양(g)	9412.9	5226.0	4119.4	9483.3	9944.1
1%(w/v) 원말 Specific IgY 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	111.2	135.9	95.0	128.3	98.2
단백질 당 Specific IgY 함량 (%)	1.4%	1.6%	1.0%	1.7%	1.3%
Specific IgY (g)	132.3	81.5	40.9	157.8	124.7
원말 단백질 함량 (%)	79.1%	87.1%	95.8%	77.1%	78.3%
Specific IgY 함량 (%)	1.1%	1.4%	1.0%	1.3%	1.0%



1. 특이 항체 자사표준품(Specific IgY STD); 1 mg/ml (dilution, 1:500)
2. 대조구 정제 IgY(정제 Control IgY); 1 mg/ml (dilution, 1:500)
3. BR-IgY 난황원말 1% w/v 용액; 10 mg/ml (dilution, 1:500)
4. 대조구 난황원말(Control IgY) 1% w/v 용액; 10 mg/ml (dilution, 1:500)
5. Blocking buffer(Placebo)

그림 9. Dot blot 에 의한 BR-IgY의 항원 특이성

(3) 난황 항체의 물리, 화학적 특성 분석

(가) pH 안정성

pH 2와 3에서는 원말 내 IgY 함량이 반응 1시간 만에 초기 값에 비해 약 60%까지 감소하였으며, 특히 pH 2에서는 24시간 후 IgY 함량이 초기 대비 5% 미만으로 존재함을 확인하였다(그림 10). 이는 정성분석 결과, 낮은 pH 하에서 IgY가 변성되기 때문으로 판단되며 SDS-PAGE 상에서 정상 IgY 단백질 size와 상이한 band를 보이는 것을 확인하였다(그림 11). 그러나, pH 5 이상에서는 반응 24시간까지도 IgY가 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다.

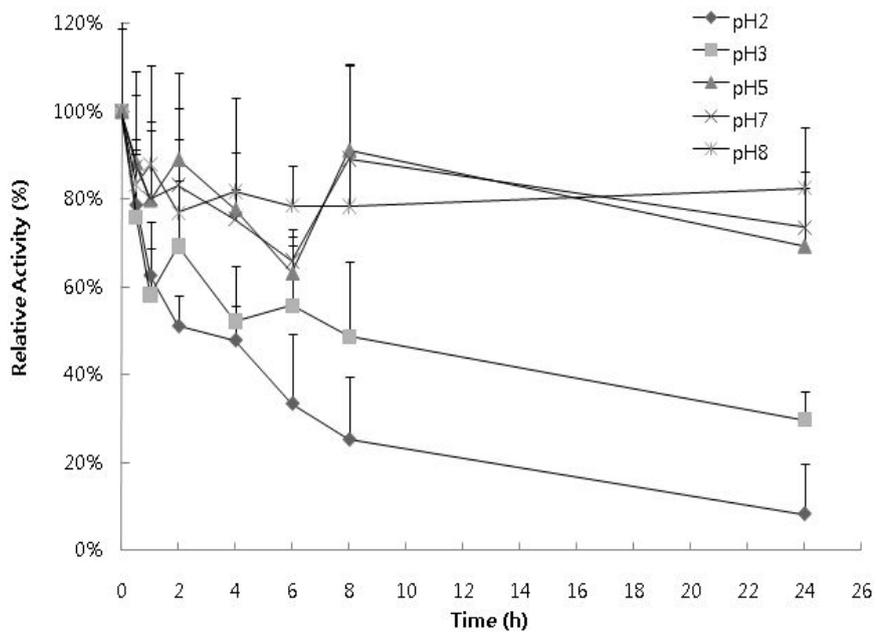
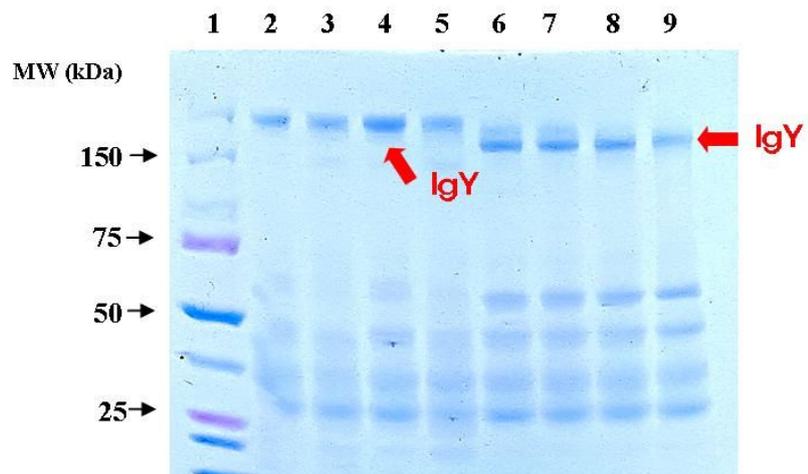


그림 10. BR-IgY의 pH 안정성



1. MW standard
2. pH 2, 0 h
3. pH 2, 24 h
4. pH 3, 0 h
5. pH 3, 24 h
6. pH 5, 0 h
7. pH 5, 24 h
8. pH 8, 0 h
9. pH 8, 24 h

그림 11. BR-IgY의 pH 안정성 시료에 대한 SDS-PAGE

(나) 열(Heat) 안정성

60℃까지는 난황 원말이나 정제 IgY 모두 안정적으로 유지되었으나 70℃ 이상에서는 열에 의한 안정성이 급격히 감소하였으며, 특히 동결건조 원말의 경우 70℃에서 60분간 처리 시 약 20%까지 함량이 감소하는 것을 확인하였다(그림 12). 이는 70℃ 이상의 온도에서는 IgY가 열에 의해 분해되어 파괴되기 때문인 것으로 생각되며, 정성분석 결과에서도 70℃ 이상에서는 IgY band가 분해됨을 확인하였다(그림 13).

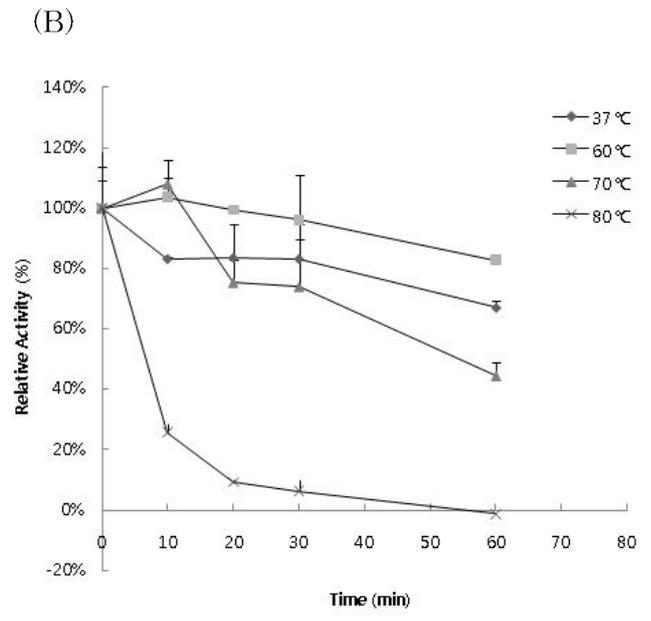
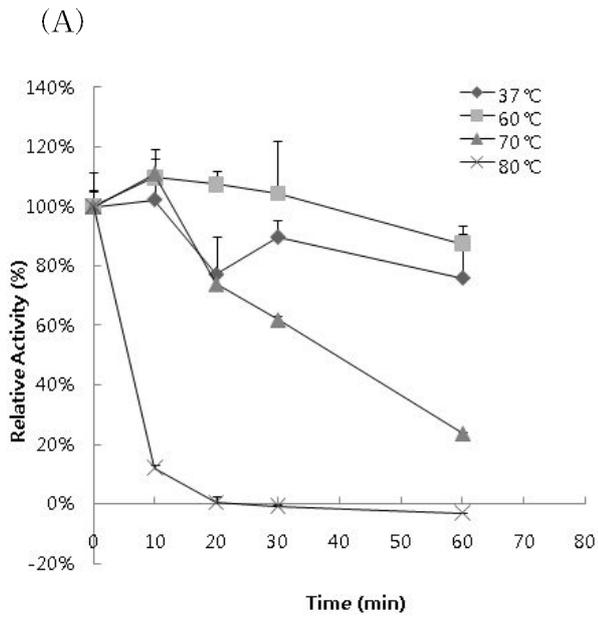
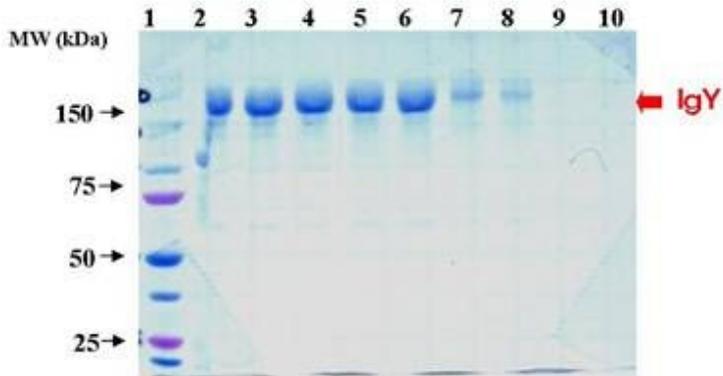


그림 12. BR-IgY의 온도 안정성 (A) BR-IgY (B) 정제 BR-IgY



1. MW standard
2. 0 min,
3. 37°C 30min
4. 37°C 60min
5. 60°C 30min
6. 60°C 60min
7. 70°C 30min
8. 70°C 60min
9. 80°C 30min
10. 80°C 60min

그림 13. BR-IgY의 온도 안정성 시료에 대한 SDS-PAGE

(4) BR-IgY 장기보존 안정성시험

측정 기간은 총24개월이며 측정시기는 0개월, 1개월, 3개월, 6개월, 12개월, 18개월, 24개월에 진행하였다. 저장조건은 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도 $60\pm 5\%$ 의 항온항습기에서 보관하였으며 각 시기의 분석항목은 표 5와 같다.

안정성시험은 현재 12개월 차까지 진행 중이며 아래와 같은 분석항목에서 모두 기준을 만족하였으며 유의한 변화를 보이지 않았다(표6, 그림 14).

표 5. 안정성시험 항목 및 기준

분석항목	시험방법	기준
성상	육안관찰	색깔: 황색 또는 유백색의 건조분말이다. 냄새: 부패취(단백질)나 산패취(지방)가 나지 않아야 한다.
수분	칼피셔법	10% 이하
지표물질	조단백함량시험	50~65% 이내
확인시험	Western blot	난황항체 분자량170 kDa이상이 확인
미생물시험	대장균 균	건강기능식품공전, 제5. 일반시험법 7. 미생물시험법 5) 대장균균에 따라 시험 시 음성
	세균수	건강기능식품공전, 제5. 일반시험법 7. 미생물시험법 2) 세균수(일반세균수)에 따라 시험시 ≤100/g이어야 한다

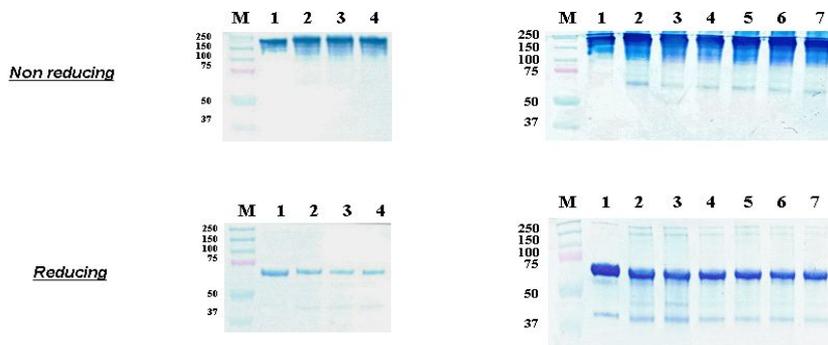
표 6. 장기보존 안정성시험 결과(12개월차)

시험항목	시험법	0개월	1개월	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	색상, 향	양호	양호	양호	양호	양호	양호
수분	건강기능식품공정 (칼피셔법)	2%	6%	5%	6%	5%	5%
미생물	건강기능식품공전 (세균, 대장균)	미검출	미검출	미검출	미검출	미검출	미검출
지표물질	조단백질 함량	61%	61%	56%	52%	56%	56%

(A) 0개월 1개월 12개월



(B) 0개월 12개월



1 : 상용 난황항체 (1 $\mu\text{g}/\text{well}$)
 2 : #08001 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$)
 3 : #08004 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$)
 4 : #08005 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$)

1 : 상용 난황항체 (1 $\mu\text{g}/\text{well}$)
 2 : #08001 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$, 25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$, 60 \pm 5%)
 3 : #08004 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$, 25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$, 60 \pm 5%)
 4 : #08005 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$, 25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$, 60 \pm 5%)
 5 : 상용 난황항체 (1 $\mu\text{g}/\text{well}$)
 6 : #08001 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$, 40 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$, 70 \pm 5%)
 7 : #08004 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$, 40 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$, 70 \pm 5%)
 8 : #08005 난황원말 (10 $\mu\text{g}/\text{well}$, 40 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$, 70 \pm 5%)

(C) 0개월 1개월 12개월

대장균 균



세균 수



그림 14. 안정성 시험결과. (A) 정상, (B) 확인시험, (C) 미생물 시험

다. 독성 시험

(1) 유전독성시험

유전독성 시험은 크게 복귀 돌연변이 시험, 소핵시험 및 염색체 이상 시험으로 나누어 진행하였다. 시험 진행은 전북대학교 의료원 기능성 식품 임상 시험지원센터(CTCF2)의 협력 하에 한국 화학 시험 연구원(KTR)에 위탁하여 식약청의 비임상 독성 시험의 기준에 맞게 진행하였다.

(가) 복귀 돌연변이 시험

예비 농도 결정시험을 진행하고 그 결과에 따라 312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 5단계 농도군과 음성 및 양성 대조군을 대사활성화법 적용 (S9+) 및 미적용 (S9-)으로 본 시험을 실시하였다. 본시험 결과, 모든 군주에 대해 시험물질을 처리한 농도군 모두에서 복귀 돌연변이 집락 수는 음성대조군에 비해 증가 양상을 나타내지 않았다. 이에 따라 생산된 BR-IgY는 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다(표 7).

표 7. 유전독성 복귀 돌연변이 시험 결과

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Colonies/plate(Plate A, B and C)					
			Without S-9 mix			With S-9 mix		
TA98	Test	0	18	19	14	21	26	18
	Article	321.5	17	11	16	16	17	14
		625	19	10	17	20	19	19
		1250	18	15	18	18	20	18
		2500	14	17	15	17	19	15
		5000	17	18	21	17	17	17
TA100	Test	0	118	127	108	135	118	130
	Article	321.5	128	105	134	136	121	122
		625	141	115	111	109	141	135
		1250	131	128	113	130	148	132
		2500	124	144	135	123	133	120
		5000	139	119	109	132	127	143
TA1535	Test	0	16	12	15	17	16	17
	Article	321.5	8	18	16	13	12	19
		625	20	17	15	14	8	17
		1250	17	9	18	16	16	13
		2500	18	12	17	12	20	13
		5000	13	18	26	15	15	22
TA1537	Test	0	6	7	6	11	7	12
	Article	321.5	6	8	5	6	10	8
		625	6	5	4	7	6	12
		1250	3	5	5	15	12	10
		2500	9	4	6	8	8	11
		5000	8	5	10	4	13	11
WP2uvrA	Test	0	34	24	33	31	28	35
	Article	321.5	37	27	35	35	29	29
		625	35	27	38	27	39	21
		1250	40	26	29	30	28	20
		2500	36	30	35	37	26	28
		5000	42	45	34	34	22	37
Positive controls								
TA98	AF-2	0.1	262	303	236			
TA100	AF-2	0.01	584	620	553			
TA1535	NaN3	0.5	350	322	314			
TA1537	9-AA	80.0	752	910	823			
WP2uvrA	AF-2	0.01	420	416	393			
TA98	2-AA	0.5				369	406	344
TA100	2-AA	1.0				556	544	603
TA1535	2-AA	2.0				216	245	210
TA1537	2-AA	2.0				188	245	190
WP2uvrA	2-AA	10.0				213	186	155

NaN3 : Sodium azide
 AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 9-AA : 9-Aminoacridine
 2-AA : 2-Aminoanthracene

(나) 소핵시험

2000 mg/kg B.W.을 투여 최고 농도로 공비 2의 4단계 투여 농도군, 음성대조군, 양성대조군을 설정, 1일 1회 2일간 투여기간으로 하여 시험을 실시한 결과 시험군 중 사망동물 및 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 투여 시와 부검시의 체중을 비교한 결과 어느 투여군에서도 음성대조군에 비해 통계학적인 유의성은 없었다.

부검 후 개체당 2000개의 다염성적혈구를 관찰 결과 용매대조군의 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 0.11 ± 0.04 (%)이었으며, 500 mg/kg B.W. 투여군의 소핵출현빈도는 0.09 ± 0.04 (%), 1000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 0.10 ± 0.05 (%), 2000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 0.09 ± 0.04 (%), 양성대조군의 빈도는 5.61 ± 0.92 (%)의 빈도를 나타내었다. 즉, 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 용매대조군에 비해 모든 투여군에서 소핵출현빈도는 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 한편 양성대조군에서는 소핵 빈도에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다($P < 0.01$).세포독성의 지표인 $PCE/(PCE+NCE)$ 비율은 위와 같은 순서로 평균 52.68 ± 3.32 , 54.40 ± 2.74 , 52.66 ± 1.28 , 53.49 ± 2.42 및 46.05 ± 2.72 로 유의적 차이를 보이지 않았다. 따라서 난황항체분말은 본 시험조건에서 마우스 골수세포에 대해 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다(표 8).

표 8. 유전독성 소핵 시험 결과

Sex	Chemical Treated	Dose (mg/kg)	No. of Animal	MNPCE/2000PCE's (Mean±S.D., %)	PCE/(PCE+NCE) (Mean±S.D., %)
	Vehicle	0	5	0.11 ± 0.04	52.68 ± 3.32
	Test items	500	5	0.09 ± 0.04	54.40 ± 2.74
Male	Test items	1000	5	0.10 ± 0.05	52.66 ± 1.28
	Test items	2000	5	0.09 ± 0.04	53.49 ± 2.42
	CPA	70	5	5.61 ± 0.92 *	46.05 ± 2.72 *

* $P < 0.01$

Vehicle : Water

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

CPA : Cyclophosphamide (positive control)

(다) 염색체 이상 시험

시험물질의 염색체이상 유발여부를 평가하기 위해 CHL (Chinese hamster lung) 세포를 이용하여 직접법 (S9 Mix, 6시간, 24시간 처리) 과 대사활성화법 (+S9 Mix) 하에 염색체이상 시험을 수행하였다. 농도결정시험의 경우, 직접법에서 Mitochondria의 환원효소 측정을 이용하는 생세포 측정법 (MTT시험법)을 이용하여 물질의 세포독성을 측정하여 시험을 실시하였다. 그 결과, 직접법과 대사활성화법에서 시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상빈도는 5 % 미만의 빈도를 나타내었으며, 용량의존성도 관찰되지 않았다 이상의 결과를 종합할 때 난황항체분말은 본 시험 조건 하에서 CHL세포에서 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다 (표 9).

표 9. 염색체 이상 시험 결과

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (μg/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent(%) of cells showing structural aberration									
						Gap	Chromatid type			Chromosome type		Others	Total		Judgement
							g	ctb	cte	csb	cse		-g	+g	
Negative Control	6	0	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2		
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)		
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
			1250	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)		
Test item	6	2500	100	0		1	0	0	0	0	0	1			
			100	0	-	0	1	0	0	0	1	1	-		
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)			
			100	0		1	0	0	0	0	0	1			
			5000	100	0	-	0	1	0	0	0	1	1	-	
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)			
Positive Control (MMC)	6	0.5	100	0		4	14	38	0	0	0	52	56		
			100	1	-	3	11	42	0	0	0	53	56	+	
			200	1 (0.5)		7 (3.5)	25 (12.5)	80 (40.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	105 (52.5) *	112 (56.0)		

g, gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; MMC, mitomycin C; (), avg.

(2) 반복투여독성 예비 시험 (Dose Range Finding)

단회 경구투여 독성시험 결과에서 랫드에 대한 기능성 난황 항체의 개략의 치사량이 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 판단되었으므로, 이를 바탕으로 랫드에 2, 200 및 2 000 mg/kg B.W. 용량으로 28일간 경구로 반복 투여 후 나타나는 변화를 관찰하여 90일 반복 경구투여 독성시험의 용량을 결정하기 위하여 실시하였다.

전 시험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았다. 또한 체중변화, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기 중량 및 부검소견에서 시험물질 투여와 관련된 독성변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 기능성 난황 항체 분말을 2, 200 및 2,000 mg/kg B.W.의 용량으로 28일간 반복 경구 투여 하였을 때, 2,000 mg/kg B.W.의 용량까지 유의할 만한 영향이 관찰되지 않았지만, 수컷 체중증체량 변화가 대조군에 비해 줄어드는 경향을 보여 90일 반복 경구투여 본 시험에서는 투여 기간을 고려하여 고용량을 1 000 mg/kg B.W.으로 설정하고 공비 5로 하여 200 및 40 mg/kg B.W. 농도를 중용량 투여군과 저용량 투여군으로 각각 설정하는 것으로 판단되었다.

위의 시험 결과에 따라 현재 90일(13주) 반복 경구 투여 독성 시험이 진행 중이다.

라. 효력 시험

(1) In vitro 역가 측정

(가) 이당류 분해효소 활성억제

기질인 maltose 농도별 효소반응속도를 LB-plot(Lineweaver-Burk plot)으로 나타낸 결과, 그림 15에서 알 수 있듯이 기능성 난황인 BR-IgY 첨가에 따라 농도의존적으로 maltase activity가 저해되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구의 기능성 난황 원말이 효과적으로 탄수화물 분해를 억제할 수 있음을 확인하였다.

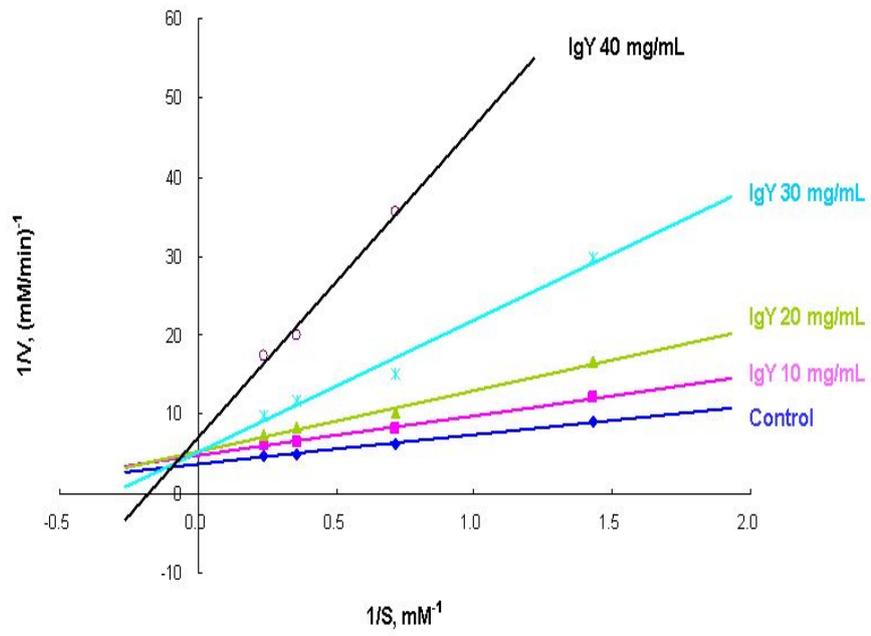


그림 15. BR-IgY의 maltase 활성저해 효과

(나) 세포주 모델(in vitro) 효력 시험

① BR-IgY와 세포 외부의 포도당 transporter와의 결합 확인

Immuno- fluorescence 방법을 이용하여 관찰한 결과 그림 16에서 보듯이 HT-29, HCT116 두 세포주에서 BR-IgY가 세포 표면의 포도당 transporter와 결합하는 것을 관찰할 수 있었다.

② 방사성 동위원소를 이용한 포도당 흡수 억제 확인 시험

방사성 동위원소로 표지된 포도당 (18FDG, 18Fludeoxyglucose)을 이용하여, 기능성 난황항체를 처리한 후 세포내 흡수되어 축적되는 포도당을 gamma-counter를 이용하여 측정하였다.

그림 17에서와 같이 HT-29 및 HCT116 두 세포주에서 기능성 난황항체를 처리한 후 포도당 흡수가 저해됨을 관찰하였다. 흡수 억제효과는 처리한 난황항체의 농도에 비례하였으며, 낮은 농도에서의 효능이 예상한 것과 다르게 낮게 나타나는 것은 난황항체의 특이성, 즉 polyclonal 항체의 특성에 기인한다고 사료되었다.

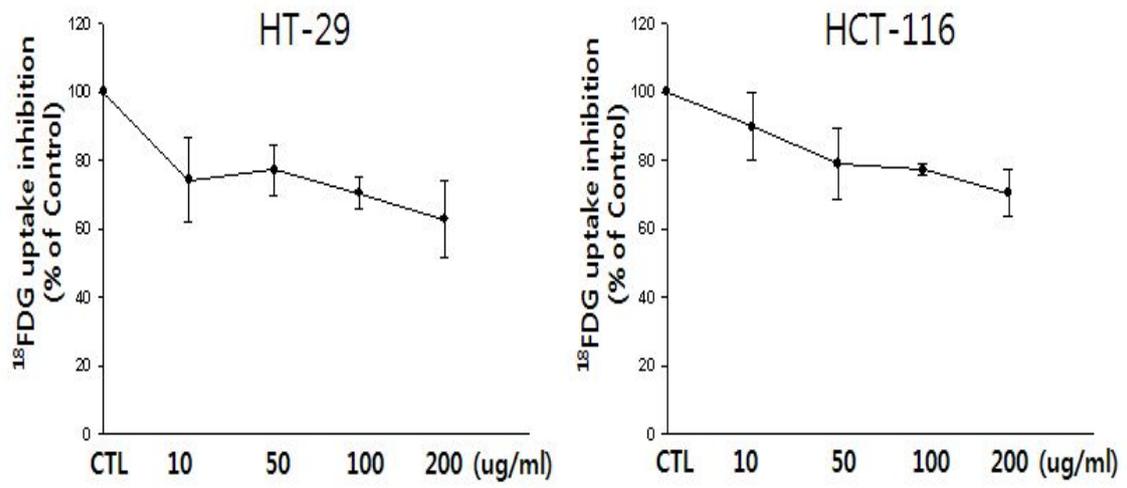


그림 16. ^{18}F FDG를 이용한 난황항체의 포도당 흡수 저해 관찰

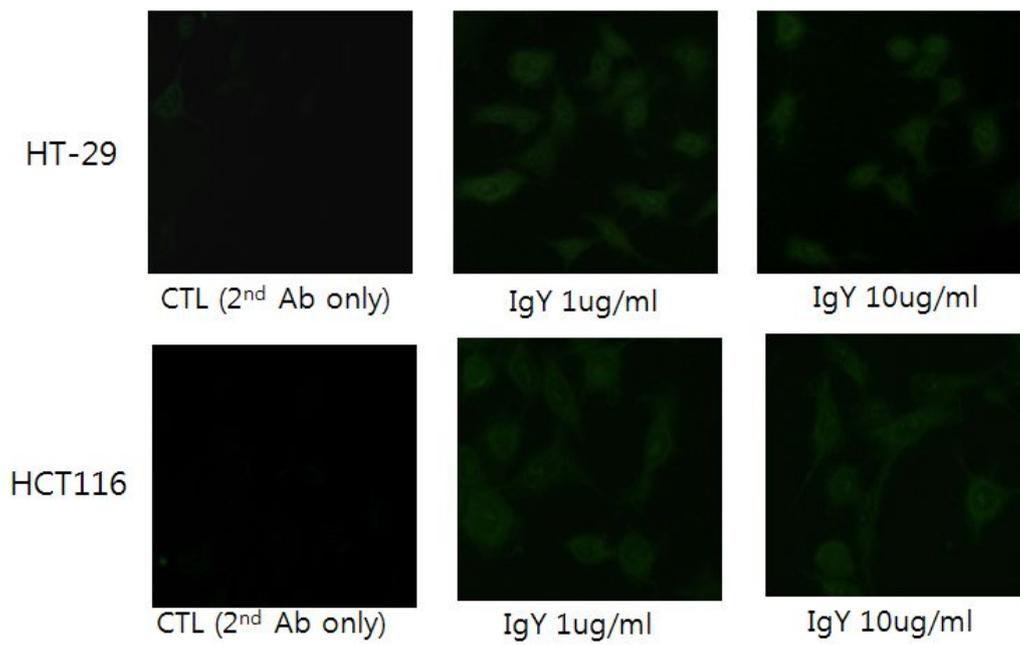


그림 17. 난황항체의 세포표면의 포도당 transporter와의 결합여부 관찰

(2) In vivo 혈당 억제 동물 시험

Rat OGTT 결과에서 보듯이 Vehicle 투여군인 saline 투여군과 음성대조구인 control-IgY 투여군에서는 maltose 투여 후 15분부터 30분까지 급격한 혈당증가를 보였으며, 60분 이후부터는 모든 군에서 급격한 혈당감소를 보였다. 양성대조군(Acarbose 50 mg/kg)의 경우, saline 투여군에 비해 혈당상승이 억제됨을 알 수 있었으며, BR-IgY 투여군도 0.1 mg/kg 및 0.5 mg/kg 투여군에서 대조구에 비해 혈당상승이 억제됨을 확인하였다(그림 18).

이를 통해 볼 때, BR-IgY는 탄수화물 분해 및 흡수 억제 기전을 통해 효과적으로 혈당상승을 억제할 수 있음을 보여주었으며, 3차년도 에서 유효용량 설정을 위한 추가 동물효력시험을 통해 기능성원료 허가등록을 위한 비임상 효력시험 자료를 확보할 예정이다.

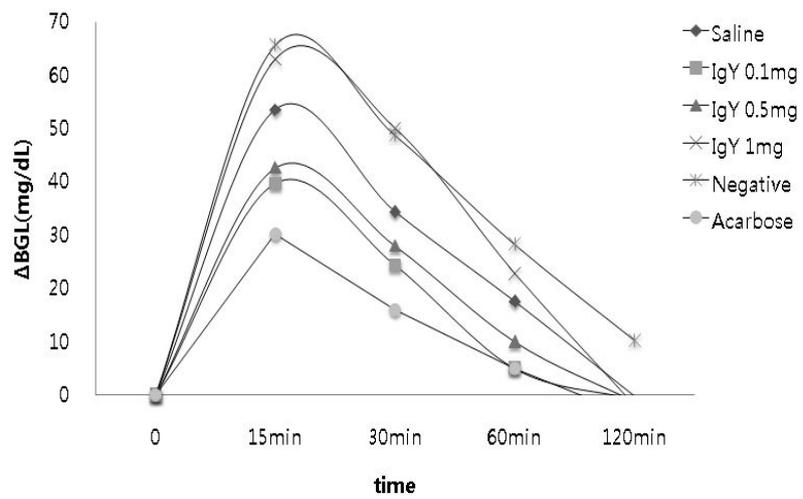


그림 18. SD rat에서 BR-IgY의 OGTT 결과

3. 3차년도 연구결과

가. 접종용 항원제조방법 개선연구

(1) 접종 및 항체생성확인

돼지소장 유래 BBMV 추출물 항원을 1, 2차년도에 사용한 3,000g, 20,000g 그리고 adjuvant인 Montanide70에 현탁화한 항원을 각각 닭의 가슴근육에 0.5 ml씩 근육주사 하였다. 접종은 조인(주)와의 협약에 따라 당진의 조인(주) 소유의 농장에서 이루어 졌으며 추가접종은 2주 간격으로 총 4회 실시하였다. 계란은 면역 차수 별로 수집한 후 4°C에 보관하고, 혈액은 wing vein에서 채혈한 후 혈청을 분리하여 -20°C에 보관하였다. 4회에 걸쳐 모은 계란과 혈청에서의 항체 생성을 ELISA를 통해 확인하였다.

Montanide70을 사용하여 접종한 군이, 나머지 두 군에 비해 혈청 중 항체는 2.5배 이상 증가하였고, 면역란 난황내의 IgY도 2배 이상 증가함을 보였다(그림 19). 또한 항원 제조시에도 현탁화가 잘되었다. 이는 면역 증강제의 구매 비용에 의한 제조 원가 상승의 단점 이상으로 항체가 생성되는 효율을 나타내므로, 생산에 적합한 공정 개선으로 판단되어 항원제조 공정에 사용할 예정이다.

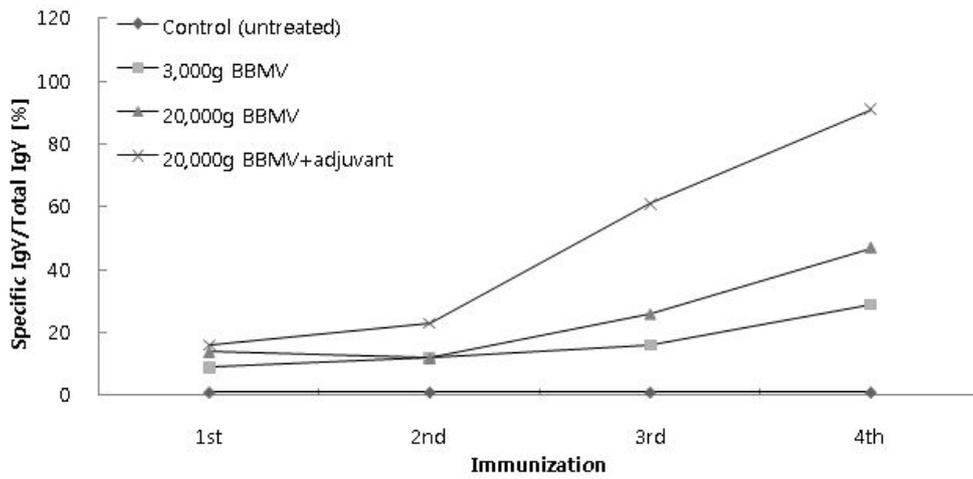
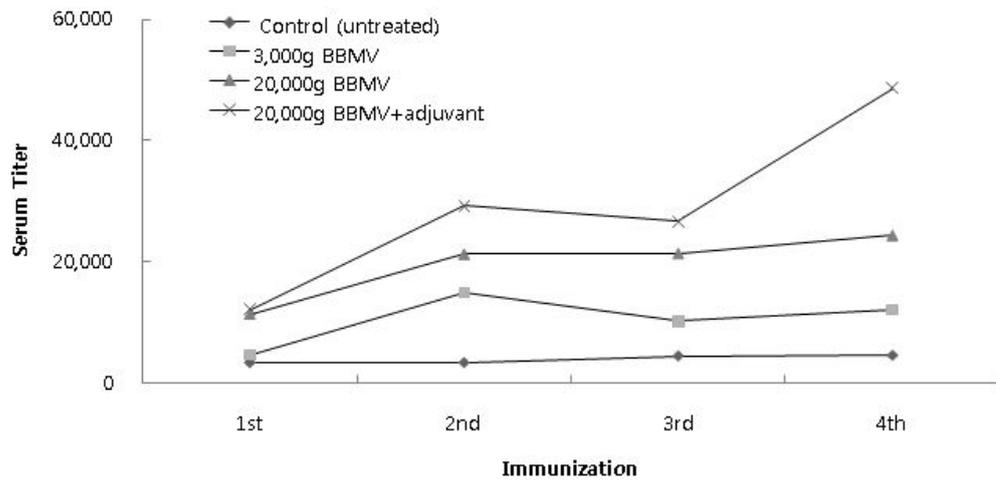


그림 19. 항원과 adjuvant 사용에 따른 항체생성 비교

나. 생산공정 최적화

(1) 생산 공정 표준화

난황 항체 생산 공정의 최적화 및 표준화와 개선된 항체 생산 공정의 결과를 확인하기 위해 2010년 10월 5일부터 24일까지 총 2 Batch (#10001, #10002) 시생산을 실시하였다. 시 생산 공정은 2008년 진행하였던 안정화된 세 생산 배치 (#08001, #08004 및 #08005)에서 수행하였던 공정을 바탕으로 진행하였고, 각 진행 단계의 in process control 기준을 설정하여 생산하였다. 시생산 후, Batch별 원말 총 무게 및 단백질 함량, Total IgY 함량을 분석한 결과는 표 10에 정리하였다.

시생산 결과에서 알 수 있듯이, #10001, #10002 2 Batch 생산 결과, 두 배치 모두 #08001과 #08002와 유사한 단백질 농도가 확인되어 생산 공정은 안정적으로 확립되었다. 또한 원말 내의 IgY의 함량은 원 면역란내의 함량이 항체 생산 공정의 개선으로 증대된 것에 비례하여 약 50% 상승하였다.

표 10. 항원제조방법 변경에 따른 BR-IgY의 IgY함량변화

항목	Batch No.			
	#08001	#08005	#10001	#10002
Total원말무게(g)	11900.0	12700.0	3760.0	4170.0
1%(w/v)원말 단백질농도(mg/mL)	7.9	7.8	8.0	8.1
Total단백질(g)	9412.9	9906.0	3008.0	3377.7
단백질당TotalIgY함량(%)	14.2%	20.9%	25.9%	27.4%
Total IgY (g)	1336.6	2070.4	779.1	925.5
원말 단백질 함량 (%)	79.1%	78.0%	80.0%	81.0%
원말 Total IgY 함량 (%)	11.2%	16.3%	20.7%	22.2%

다. BR-IgY의 기준 및 시험방법설정

(1) 성상

색깔 : 미황색 또는 유백색의 건조분말이다.

냄새 : 부패취(단백질)나 산패취(지질)가 나지 않아야 한다.

(2) 수분 함량시험

칼피셔법으로 측정 시 10%(w/w) 이하로 측정되어야 한다.

(3) 확인시험

자사 시험법의 항원항체 반응(Western blot)에 의하여 측정 시, 난황항체 분자량 170 kDa 이상, 환원시(reduce)난황항체 Heavy chain 65 kDa 이 확인되어야 한다.

(4) 미생물 시험

건강기능식품공전, 제5. 일반시험법 7. 미생물시험법 5) 대장균군에 따라 시험시 음성이어야 한다.

건강기능식품공전, 제5. 일반시험법 7. 미생물시험법 2) 세균수(일반세균수)에 따라 시험시 $\leq 100/g$ 이어야 한다.

(5) 지표물질 함량 시험

건강기능식품 공전 제5. 일반시험법 1. 일반성분시험법 3) 질소화합물 (1) 총 질소 및 조단백질에 따라 시험한다. 질소계수는 6.25로 한다. 본 시험으로 40-65%(w/w)이내이어야 한다.

(6) 역가시험

자사 활성시험에 의하여 측정 시, 대조군 대비 20% 이상의 억제능을 보인다.

라. 가속안정성시험

(1) 결과

(가) 성상

시험기간 동안 특이할 만한 변화 없이 적합하였다(표 11).

(나) 수분함량

시험기간 동안 특이할 만한 변화 없이 적합하였다(표 12).

(다) 확인시험

시험기간 동안 특이할 만한 변화 없이 적합하였다(표 13).

(라) 미생물시험

시험기간 동안 특이할 만한 변화 없이 적합하였다(표 14).

(마) 지표물질 함량 시험

시험기간 동안 적합하였다(표 15).

(바) 역가시험

시험기간 동안 적합하였다(표 16).

표 11. 가속안정성시험: 성상

제조번호	시험횟수	시험기간(개월), 색깔/냄새			
		0	1	3	6
#08001	1	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음
	2	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음
	3	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음
#08004	1	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	황색/ 이상없음
	2	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	황색/ 이상없음
	3	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	황색/ 이상없음
#08005	1	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	황색/ 이상없음
	2	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	황색/ 이상없음
	3	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	미황색/ 이상없음	황색/ 이상없음

[기준]

- 색깔 : 황색 또는 유백색의 건조분말이다.
- 냄새 : 부패취(단백질)나 산패취(지질)가 나지 않아야 한다.

표 12. 가속안정성시험: 수분 함량 시험

(단위 : %)

제조번호	시험횟수	시험기간(개월)			
		0	1	3	6
#08001	1	5.82	4.89	5.06	6.10
	2	5.65	4.88	4.95	6.74
	3	6.09	4.90	5.50	7.03
#08004	1	6.40	5.72	5.41	5.96
	2	6.14	5.18	5.50	7.36
	3	5.96	5.09	5.47	7.35
#08005	1	5.42	5.00	5.59	5.99
	2	5.40	5.27	5.02	7.26
	3	5.29	5.20	5.34	8.01

[기준]

- 칼피셔법으로 측정 시 10% 이하로 측정되어야 한다.

표 13. 가속안정성시험: 확인시험

제조번호	시험횟수	시험기간(개월)			
		0	1	3	6
#08001	1	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
	2	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
	3	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
#08004	1	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
	2	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
	3	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
#08005	1	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
	2	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨
	3	확인됨	확인됨	확인됨	확인됨

[기준]

- 항원항체 반응(Western blot)에 의하여 측정 시, 난황항체 분자량 170 kDa 이상, 환원 시 (reduce)난황항체 Heavy chain 65 kDa 이 확인되어야 한다.

표 14. 가속안정성시험: 미생물시험

제조번호	시험횟수	시험기간(개월), 미생물/세균			
		0	1	3	6
#08001	1	음성/음성	음성/음성	음성/음성	음성/음성
#08004	1	음성/음성	음성/음성	음성/음성	음성/음성
#08005	1	음성/음성	음성/음성	음성/음성	음성/음성

[기준]

- 건강기능식품공전, 제5. 일반시험법 7. 미생물시험법 5) 대장균군에 따라 시험시 음성이어야 한다.
- 건강기능식품공전, 제5. 일반시험법 7. 미생물시험법 2) 세균수(일반세균수)에 따라 시험시 $\leq 100/g$ 이어야 한다.

표 15. 가속안정성시험: 지표물질 함량시험(조단백질)

(단위 : %)

제조번호	시험횟수	시험기간(개월)			
		0	1	3	6
#08001	1	53.4±5.3	46.1	50.6	53.1
#08004	1	59.7	46.1	50.6	53.1
#08005	1	55.0	48.2	51.0	54.4

[기준]

- 건강기능식품 공전 제5. 일반시험법 1. 일반성분시험법 3) 질소화합물 (1) 총 질소 및 조단백질에 따라 시험한다. 질소계수는 6.25로 한다. 본 시험으로 원말의 40-65%(w/w)이내이어야 한다. (50%의 80-130%이내 범위)

표 16. 가속안정성시험: 역가시험

(단위 : %)

제조번호	시험횟수	시험기간(개월)			
		0	1	3	6
#08001	1	35.59	—	37.30	23.17
#08004	1	25.44	—	—	33.76
#08005	1	29.38	—	—	25.68

[기준]

- Maltase 활성 시험에 의하여 측정 시, 대조군 대비 20% 이상의 억제능을 보인다.

(2) 시험결과 종합

난황 원말(BR-IgY)는 6개월 동안 가속안정성을 확인한 결과, 색상, 수분, 확인시험, 미생물 시험, 지표물질, 역가 시험의 전항목에서 기준을 만족하였다.

마. 장기보존 안정성 시험 (2차년도 결과 + 18, 24개월)

(1) 분석항목(표 17)

(2) 결과

안정성시험은 현재 24개월까지 완료하였으며 아래와 같은 분석항목에서 모두 기준을 만족하였으며 유의한 변화를 보이지 않았다(표 18).

표 17. 안정성 시험 분석항목

분석항목	시험방법	기준
성상	육안관찰	색깔: 황색 또는 유백색의 건조분말이다. 냄새: 부패취(단백질)나 산패취(지질)가 나지 않아야 한다.
수분	칼피셔법	10% 이하
지표물질	조단백함량시험	40~65% 이내
확인시험	Western blot	난황항체 분자량 170 kDa 이상, 환원시(reduce)난황항체 Heavy chain 65 kDa 이 확인.
미생물시험	대장균 균	건강기능식품공전, 제5. 일반시험법 7. 미생물시험법 5) 대장균균에 따라 시험 시 음성
	세균수	건강기능식품공전, 제5. 일반시험법 7. 미생물시험법 2) 세균수 (일반세균수)에 따라 시험시 $\leq 100/g$ 이어야 한다

표 18. 안정성시험 결과(24개월)

시험항목	시험법	0개월	1개월	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
성상	색깔, 냄새	양호	양호	양호	양호	양호	양호	양호	양호
수분	건강기능식품공전 (칼피셔법)	2%	6%	5%	6%	5%	5%	5%	5%
미생물	건강기능식품공전 (세균,대장균)	미검출	미검출	미검출	미검출	미검출	미검출	미검출	미검출
지표물질	조단백질 함량	61%	61%	56%	52%	56%	56%	50%	51%

바. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법

(1) 난황원말 지표물질시험법 설정

난황원말에서 기능을 나타내는 물질은 계란노른자내의 항체(IgY)중 특이항원(BBMV, Brush-Border Membrane Vesicles) 면역을 통해 생성된 BBMV Specific IgY이며, 이를 분석하는 방법은 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)방법 뿐이다. 그러나 ELISA 시험법은 건강기능식품 또는 식품공정 상의 시험법에 해당되지 않아 적용하기 어려운 시험방법이다. 이러한 이유로 조단백질함량시험법과 비교하여 가속안정성 시험 6개월 동안 시험하였다(표 19).

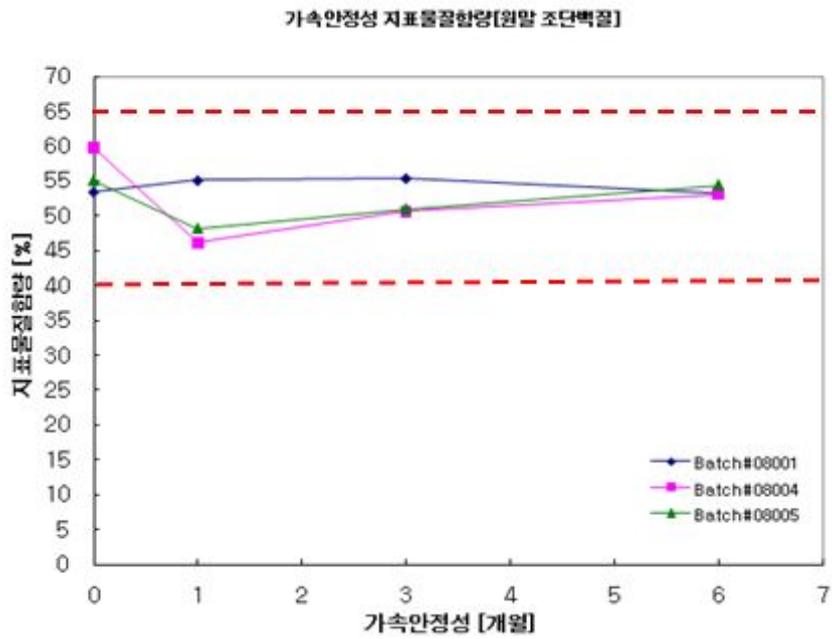
(2) 지표물질 시험법 결과

BR-IgY의 가속안정성 6개월 시험기간 동안 각 시험법 별로 지표물질함량을 분석한 결과 두 방법에서 안정성이 높았다(그림 20). 기능물질과 관련있는 ELISA를 이용한 총 난황항체 시험법이 가장 적절한 지표물질 함량 시험법 인 것으로 판단되나, 식품분야의 ELISA시험법 적용의 어려움이 남아있다.

표 19. 지표물질 함량 시험법

지표물질	분석시료	시험방법
총 난황항체	원말	ELISA
조단백질	원말	건강기능식품공전, 총 질소 및 조단백질 함량시험법

(A)



(B)

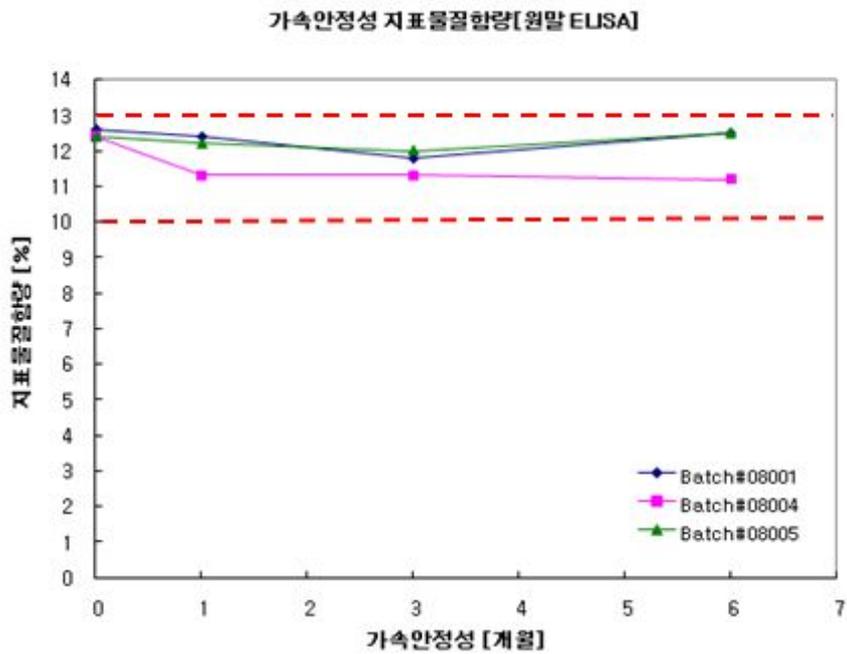


그림 20. 지표물질함량 시험법 (A) 조단백함량 (B) ELISA

마. 안전성

(1) SD 랫드에 대한 BR-IgY의 90일 반복경구투여 독성시험

예비실험인 28일 반복 경구 투여 시험에서 기능성 난황 항체 분말을 2, 200 및 2,000 mg/kg B.W.의 용량으로 28일간 반복 경구 투여 하였을 때, 2,000 mg/kg B.W.의 용량까지 유의할 만한 영향이 관찰되지 않았지만, 수컷 체중증체량 변화가 대조군에 비해 줄어드는 경향을 보여 90일 반복 경구투여 본 시험에서는 투여 기간을 고려하여 고용량을 1 000 mg/kg B.W.으로 설정하고 공비 5로 하여 200 및 40 mg/kg B.W. 농도를 중용량 투여군과 저용량 투여군으로 각각 설정하고 시험을 수행하였다.

간단히 요약하면 40, 200 및 1000 mg/kg의 투여용량으로 SD 랫드에 90일간 반복 경구 투여 하였고, 2주간의 회복성을 관찰하였다. 전 시험기간 동안 모든 시험군에서 시험물질 투여로 인한 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았으며, 체중변화, 사료·음수 섭취량, 뇨 검사, 안과학적 검사, 부검소견, 장기중량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 병리조직학적 검사에서도 시험물질 투여로 인한 독성변화는 인정되지 않았다. 이상의 결과로부터 90일간 반복 경구 투여시 시험물질 투여와 관련된 유의할만한 독성이 인정되지 않았다. 그러므로 무독성량 (NOAEL ; No Observed Adverse Effect Level)은 1000 mg/kg 이상으로 판단하였다.

(2) GLP기관수행 독성시험결과 종합

BR-IgY의 단회투여, 유전독성, 반복투여 독성시험에서 이상이 없었다(표 20).

표 20. BR-IgY의 독성시험 결과 종합

시험항목	용량	결과
SD 랫드에 대한 BR-IgY의 단회 경구투여 독성시험	2 mg/kg	이상없음
BR-IgY에 대한 CHL 세포에서의 염색체이상시험	5000, 2500, 1250 ug/ml	이상없음
BR-IgY에 대한 소핵시험	2000, 1000, 500 mg/kg	이상없음
BR-IgY에 대한 미생물 복귀돌연변이시험	5000, 2500, 1250, 625, 312.5 ug/plate	이상없음
SD 랫드에 대한 BR-IgY의 28일 반복 경구투여 독성시험	2000, 200, 2 mg/kg	이상없음
SD 랫드에 대한 BR-IgY의 90일 반복 경구투여 독성시험	1000, 200, 40 mg/kg	이상없음

바. 기능성

(1) in vitro

(가) BR-IgY의 세포의 glucose transporter(Glut)에 대한 특이성 관찰

대장암세포 HT-29의 whole cell lysate 에서도 BR-IgY에 의해 immunoprecipitation(IP)이 되었으며, BR-IgY(C-IgY)와 purified BR-IgY(P-IgY)에서 유사하게 immunoblot 된 것은 첨가해준 시료의 양에 의해서 500ug의 whole cell lysate가 함유하고 있는 Glut의 양이 모두 IP 되었다고 판단되었다(그림 21).

BR-IgY는 장세포의 glucose transporter에 특이적으로 결합하는 것을 생화학적으로 관찰할 수 있었고, 이러한 특이성은 crude와 purified 두 시료에서 동일하게 일어나는 것으로 보아 IgY의 정제도와는 무관하게 Glut에 특이적인 항체가 난황에 생성되었다는 것을 확인하였다.

또한, HT-29와 HCT-116의 두 세포주에서 purified BR-IgY가 세포 표면의 Glut와 매우 강하게 특이적으로 결합하는 것을 관찰할 수 있었다(그림 22). 그러나, BR-IgY의 경우 purified BR-IgY와 동일한 양 (10ug/ml)으로 세포에 처리를 해주어도 fluorescence의 신호가 상대적으로 약한 것으로 보아 BR-IgY는 비특이성 protein을 함유하고 있는 것으로 확인되었다(그림 23).

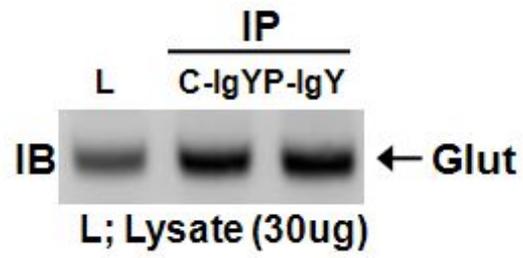


그림 21. HT-29세포 lysate와 BR-IgY의 immunoprecipitation 후 anti-glut 항체에 의한 Immunoblot

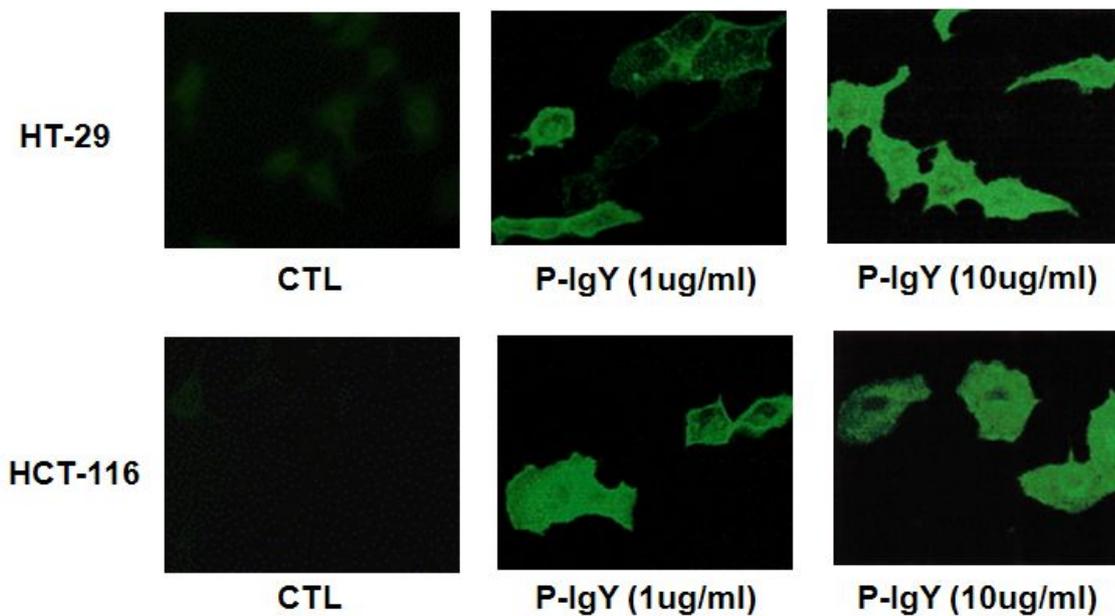


Fig22. Immunofluorescence에 의한 HT-29와 HCT-116세포에 purified BR-IgY의 결합특이성

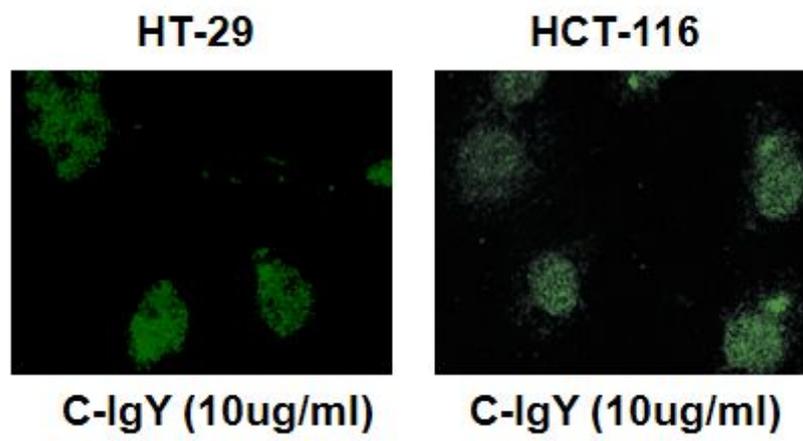


Fig23. Immunofluorescence에 의한 HT-29와 HCT-116세포에 BR-IgY의 결합특이성

(나) BR-IgY의 정제도에 따른 포도당 흡수 억제효과

BR-IgY는 HT-29와 HCT-116세포에서 모두 포도당의 흡수억제 효과가 확인되었고 10 ug/ml 농도에서 Purified BR-IgY(P-10)가 BR-IgY(C-10)보다 흡수억제효과가 더 높았으나, 1 ug/ml 농도에서 억제효과는 유의성이 크지 않았다. 두 세포의 C-1과 P-1의 포도당 흡수억제에 대한 통계학적 유의성은 없었다(그림 24).

(다) purified BR-IgY의 세포성장 억제효과

HT-29와 HCT-116 세포에서 BR-IgY(C)와 purified BR-IgY(P)의 10ug/ml(C-10, P-10)과 50ug/ml(C-50, P-50)이상에서 약간의 성장억제 효과가 관찰되었으나, 성장억제 효과는 매우 적게 확인되었다(그림 25).

(라) Primary intestine cell을 이용한 BR-IgY의 glucose uptake 및 성장 저해 관찰

Primary intestine cell은 epithelial cell의 성격을 가지며 성장속도가 암세포보다 매우 느리다 (48-72hrs/doubling time). 더욱이 세포의 특성상 분화가 끝났으므로 성장인자(EGF)을 배지에 첨가해 주어서 배양하고, serum의 양을 일반적인 배양의 두 배(20%)를 첨가하여 배양해야 한다.

Mouse primary cell의 경우에도, BR-IgY(C)와 purified BR-IgY(P)에 대해서 glucose uptake의 저해 효과가 확인되었으나(그림 26), 세포성장 저해효과는 tumor cell에 비해 적은 것으로 나타났는데(그림 27) 이것은 정상세포의 특징으로 판단되었다. Tumor cell의 경우에는 glucose의 소비가 정상세포에 비해 2배이상 높다고 알려져 있으므로, control에 비해 uptake 억제효과가 크게 나타나지만, 정상세포의 낮은 glucose소비량에 기인한 것으로 판단되었다.

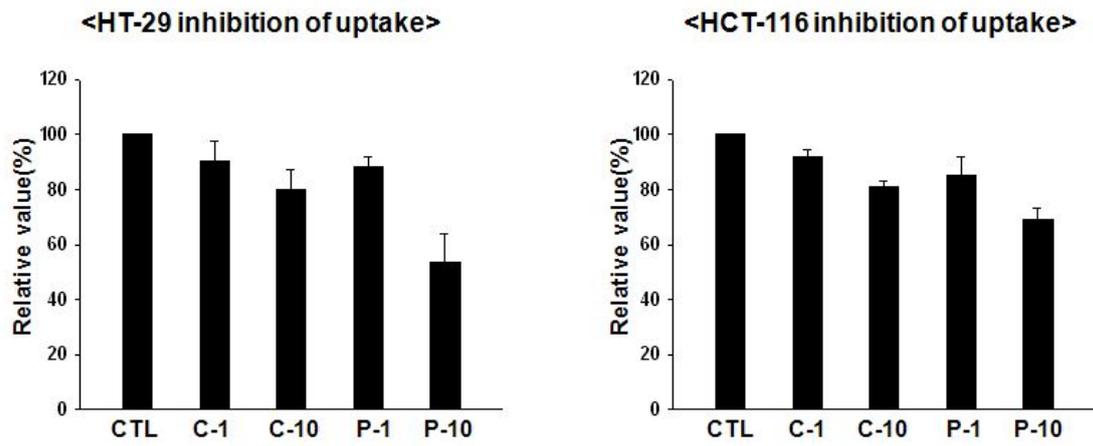
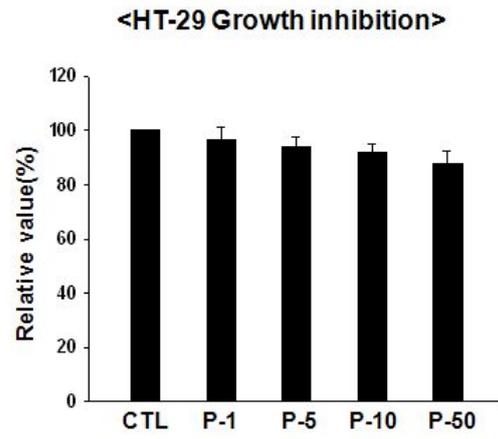
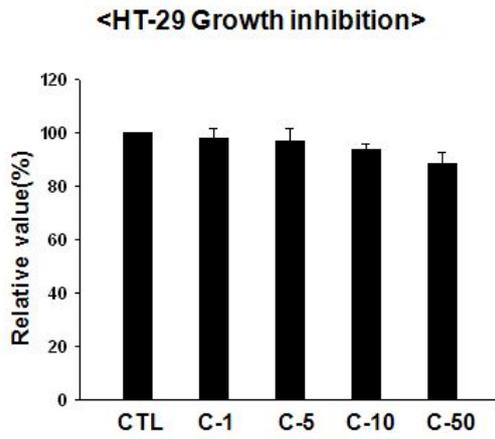


그림 24. HT-29와 HCT-116세포에 BR-IgY의 포도당 흡수억제

(A)



(B)

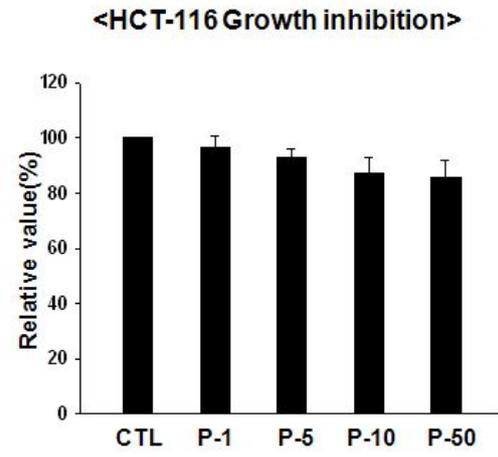
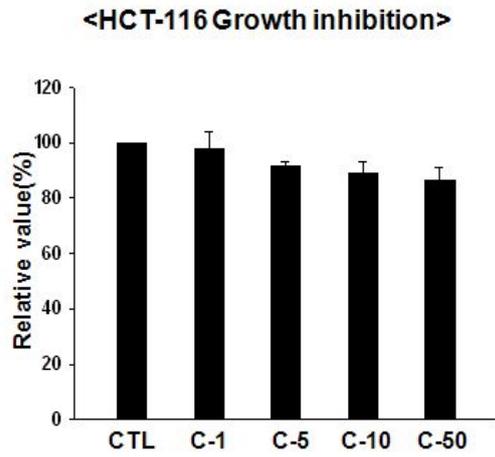


그림 25. BR-IgY에 의한 세포성장 억제. (A)HT-29 (B)HCT-116

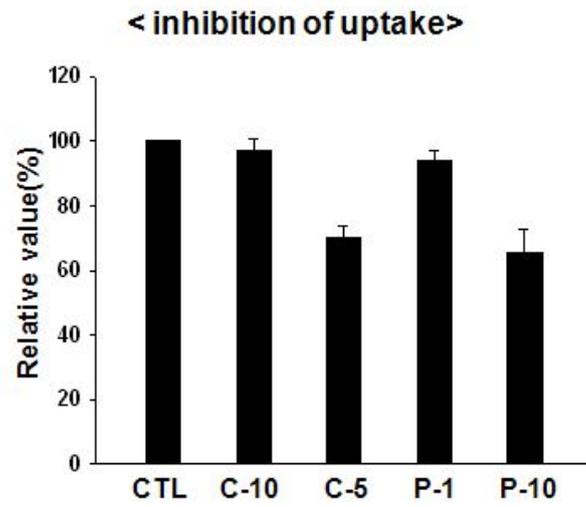


그림 26. BR-IgY에 의한 Mouse primary intestine cell의 glucose uptake 억제

<Primary intestine cell growth inhibition>

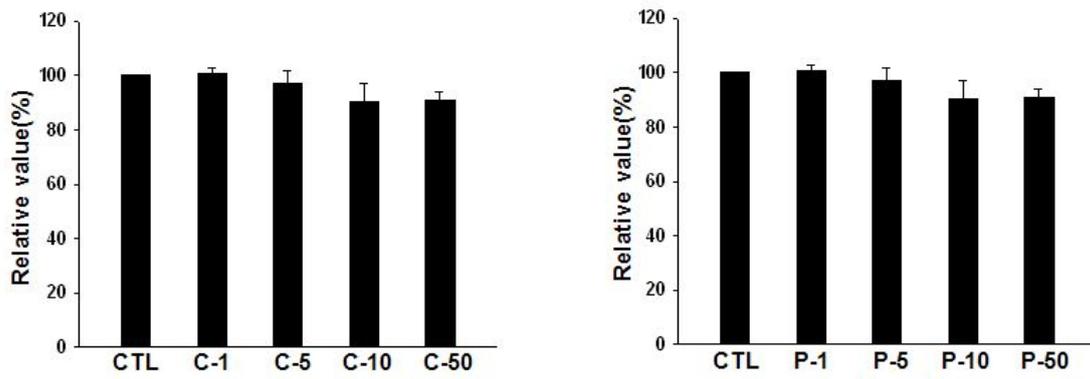
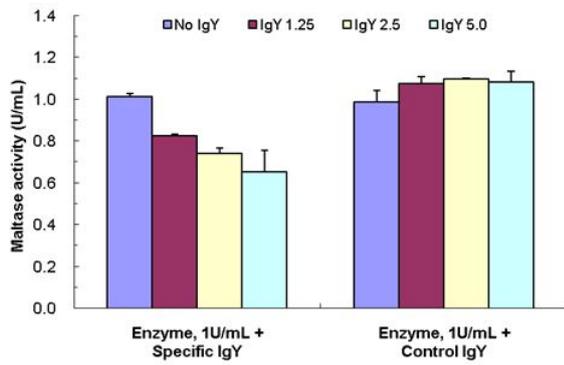


그림 27. BR-IgY에 의한 Mouse primary intestine cell의 성장 억제

(마) 이당류 분해효소 억제시험

그림 28에서 보듯이 maltase 효소와 BBMV 항원에 대한 BR-IgY의 효소 활성 억제능을 확인할 수 있었다. 1 U/mL의 α -glucosidase 효소액에 BR-IgY 난황 원말로부터 정제한 specific IgY와 대조구 IgY를 각각 1.25 - 5.0 μ g까지 처리 시 (그림 28, (A)), BR-IgY는 농도 의존적으로 maltase 효소 활성을 저해하는 것을 확인할 수 있었으며 최대 35.8%까지 효소 활성을 억제하였다. 반면 대조구 IgY는 처리 농도와 상관없이 maltase 활성에 영향을 주지 못하였다. 또한 항원으로 사용한 돼지 소장 유래 BBMV (1 mg/mL)에 IgY를 처리한 결과(그림 28, (B))에서도 BR-IgY가 농도 의존적으로 maltase 효소 활성을 저해하였으며, 5 μ g의 BR-IgY 처리 시 최대 33.3%까지 효소 활성을 억제하여 α -glucosidase 억제 결과와 유사하였다. 따라서 BBMV 항원을 면역접종한 산란계로부터 생산한 BR-IgY가 효과적으로 maltase 효소 활성을 저해함을 확인할 수 있으며, 이를 통해 볼 때 이당류 분해효소들의 활성을 억제하여 혈당 상승을 억제할 수 있으리라 추측할 수 있다.

(A)



(B)

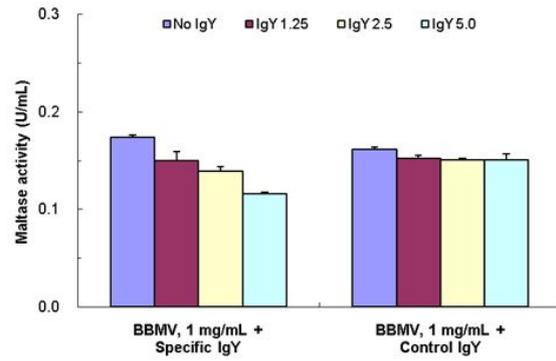


그림 28. BR-IgY의 maltase 활성억제 (A) α -glucosidase, (B) BBMV

(2) in vivo 효력시험

(가) SD-Rat을 이용한 경구 당부하 검사

BR-IgY(#10001)를 BBMV Affinity Column을 이용하여 정제한 BBMV-Specific BR-IgY를 SD-Rat에서 경구 당부하 검사(OGTT)를 수행하였다.

OGTT결과에서 보듯이 PBS 투여군에서는 maltose 투여 후 15분부터 30분까지 급격한 혈당증가를 보였으며, 60분 이후부터는 모든 군에서 급격한 혈당감소를 보였다. 이에 반해 BBMV-Specific BR-IgY 투여군은 20 mg/kg 및 40 mg/kg 투여군에서 농도 유의하게 대조군에 비해 혈당상승이 억제됨을 확인하였다(그림 29).

이를 통해 볼 때, 면역증강제를 변경하여 제조한 항원을 접종하여 얻은 면역란으로부터 얻은 BR-IgY는 효과적으로 혈당상승을 억제할 수 있음을 확인하였다.

(나) SD-Rat에서 체중조절효과

설치류를 이용하여 BR-IgY의 반복 식이를 통한 장기 투여시의 체중 조절 효과를 확인하였다. 모든 군에서 사료 섭취량의 유의적인 차이는 없었다. 음성 대조군인 Control IgY 투여군(G2)은 사료대조군(G1)에 비하여 체중이 약간 증가하였지만 통계적인 유의성은 없었다. BR-IgY 10mg/kg 군(G3)은 G1과 유의한 차이가 없었지만, 100mg/kg를 투여한 군(G4)에서는 나머지 군과 비교시 약간의 체중 감소를 확인하였으나 통계적 유의성이 없었다. 4주까지 군별 사료섭취량은 큰 차이가 없었다(그림 30).

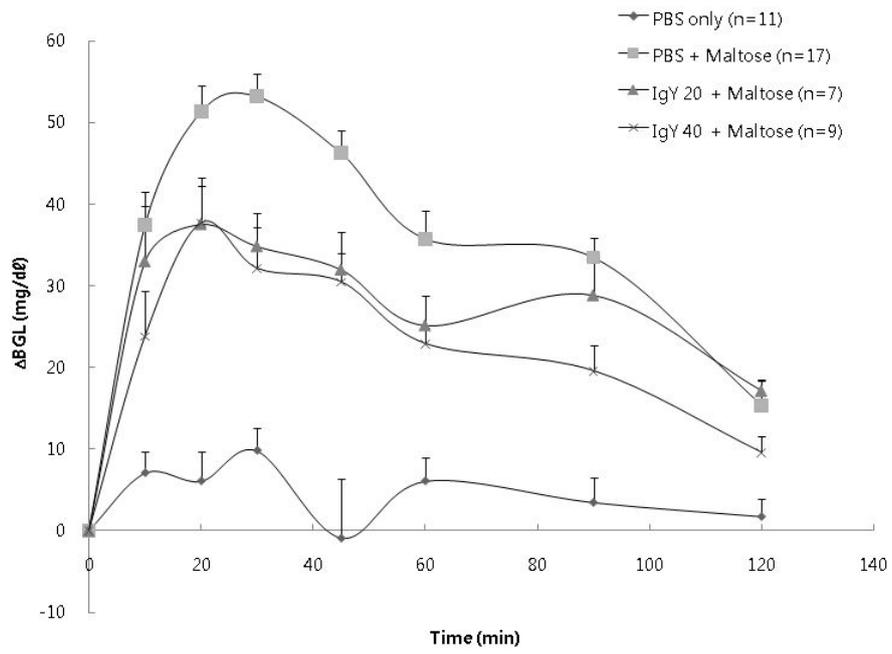
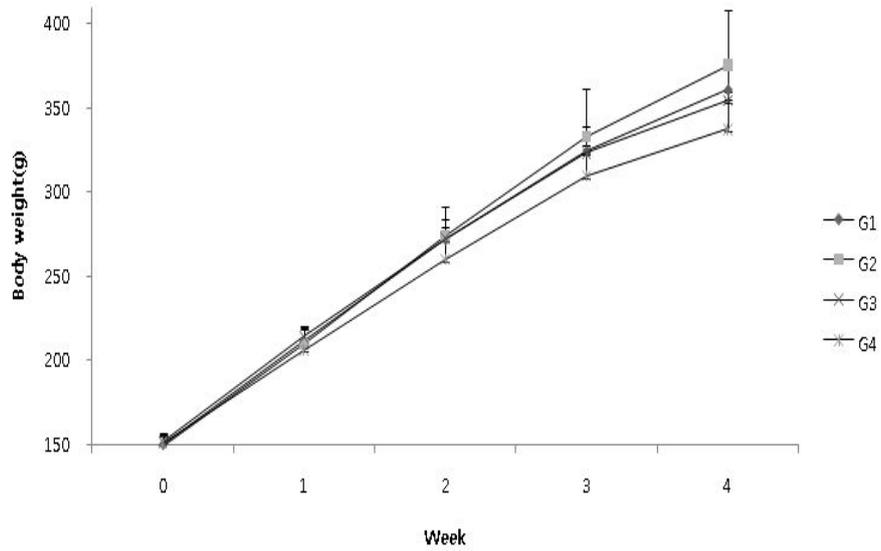


그림 29. SD-Rat에서 BR-IgY의 OGTT

(A)



(B)

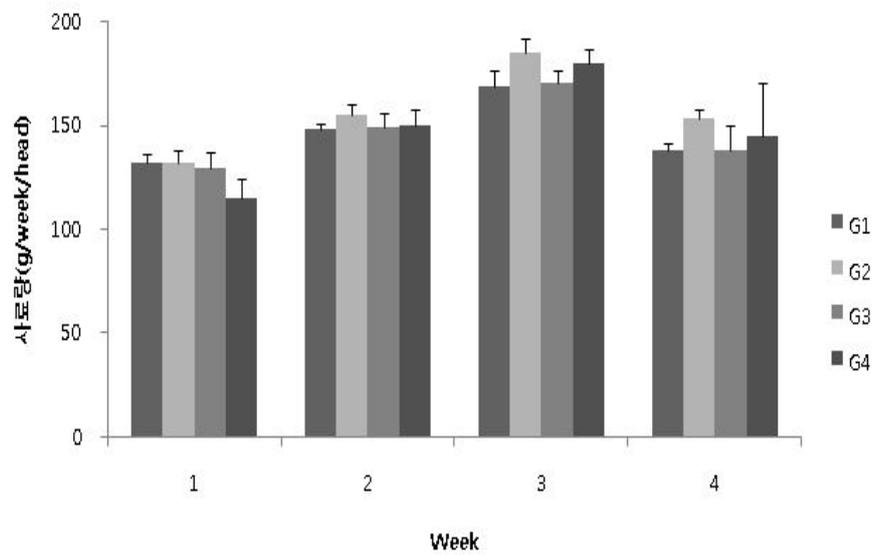


그림 30. BR-IgY 장기투여에 의한 SD-Rat의 체중(A)과 사료섭취량(B), G1:사료대조군, G2: Control IgY 투여군, G3:BR-IgY 10mg/kg 군, G4:BR-IgY 10mg/kg군

사. 개별인정형 허가자료 확보현황

구 분		자료확보 및 시험완료여부	국내 식품검사기관 성적서
기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황등에 관한 자료		완료	
제조방법 및 그에 관한 자료		완료	
원료의 특성에 관한 자료		완료	
기능성분(지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료		완료	필수(완료)
유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료		해당사항 없음	
안전성에 관한 자료		완료	
기능성 및 그에 관한 자료	in vitro	완료	
	in vivo	단회투여 효력완료 반복투여 보완시험 필요	
	인체시험	향후 실시	
의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료		완료	

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발목표의 달성도

1. 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2008)	1세부과제: 항원 및 기능성 난황 생산	항원분리 및 정제	100%	항원 생산 공정 수행 완료
		면역 접종 및 기능성 난황 생산 [1-3차년도 연계 과제]	100%	면역 접종 및 난황 생산
		항체 역가 확인 [1-3차년도 연계 과제]	100%	면역 접종 난황 역가 확인
		난황 분말 대량 정제, 생산 [1-3차년도 연계 과제]	100%	1차년도 대량 정제 생산 완료
		공정 표준화(기준 및 시험법) [1-3차년도 연계 과제]	100%	기준 및 시험법 설정 및 표준화
		혈당변화 동물시험 [1-3차년도 연계 과제]	100%	계획 수립 및 예비 시험 수행
		유전독성 [1-2차년도 연계 과제]	100%	시험 계획 수립 및 동물 순화
		단회투여독성시험 (설치류)	100%	시험 완료
	2세부과제: 기능성 난황 특성 연구	분석용 난황항체 정제 [1-3차년도 연계 과제]	100%	Column을 이용한 정제법 확립
		항원-항체 결합력 조사 [1-2차년도 연계 과제]	100%	결합력을 이용한 분석법 확립
		항체 특이성 분석 [1-2차년도 연계 과제]	100%	특이적 성질에 대한 비교 시험
		난황항체 물리, 화학적 특성 분석 [1-3차년도 연계 과제]	100%	pH, 온도 등에 대한 특성 연구
		난황 항체 안정성 조사 [1-3차년도 연계 과제]	100%	안정성 연구 위한 조건 수립
		이당류 분해효소 활성 억제 [1-3차년도 연계 과제]	100%	객관성있는 실험법 확립
	3세부과제: 효력 평가 모델 연구	당 흡수 시험 세포주 모델 확립 [1-2차년도 연계 과제]	100%	당 흡수에 민감한 세포주들을 시험으로 비교 시험 하여 <i>in-vitro</i> 세포주 모델 확립

2. 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2009)	1세부과제: 항원 및 기능성 난황 생산	면역 접종 및 기능성 난황 생산 [1-3차년도 연계 과제]	100%	면역 접종 및 난황 생산
		항체 역가 확인 [1-3차년도 연계 과제]	100%	면역 접종 난황 역가 확인
		난황 분말 대량 정제, 생산 [1-3차년도 연계 과제]	100%	대조군 난황 분말 대량 정제 생산
		공정 표준화(기준 및 시험법) [1-3차년도 연계 과제]	100%	기준 및 시험법 설정 및 표준화
		비임상 동물 효력 시험 [1-3차년도 연계 과제]	90%	계획 수립 및 예비 시험 수행
		유전 독성시험 [1-2차년도 연계 과제]	100%	독성 시험 완료 (무독성 확인)
		반복투여 독성시험 [2-3차년도 연계 과제]	100%	예비시험(DRF) 완료 본 시험 진행
	2세부과제: 기능성 난황 특성 연구	분석용 난황항체 정제 [1-3차년도 연계 과제]	100%	Column을 이용한 정제법 확립
		항원-항체 결합력 조사 [1-2차년도 연계 과제]	100%	결합력을 이용한 ELISA 분석법 확립 완료
		항체 특이성 분석 [1-2차년도 연계 과제]	100%	Western blot(Dot Blot포함) 을 통한 특이성 연구 완료
		난황항체 물리, 화학적 특성 분 석 [1-3차년도 연계 과제]	100%	pH, 온도 등에 대한 특성 연구
		난황 항체 안정성 조사 [1-3차년도 연계 과제]	100%	안정성 시험 수행 [12개월차까지 수행 진행]
		이당류 분해효소 활성 억제 [1-3차년도 연계 과제]	100%	In vitro 역가 시험법 확립
	3세부과제: 효력 평가 모델 연구	당흡수 시험 세포주 모델 확립 [1-2차년도 연계 과제]	100%	당 흡수에 민감한 세포주들을 시 험으로 비교 시험 하여 <i>in-vitro</i> 세 포주 모델 확립 완료
		방사선 동위원소 이용 당 흡수 억제 시험(<i>in vitro</i>)	100%	확립한 세포주 모델에서 방사선 동위원소로 표진된 포도당을 이용 하여 당 흡수 억제 정도 확인
		당 흡수 억제 동물 시험 모델링 [2-3차년도 연계 과제]	100%	기능성 난황항체에 의한 포도당 억 제 효능의 <i>in vivo</i> 관찰을 위한 모 델 시스템 확보 구상

3. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2010)	1세부과제: 항원 및 기능성 난황 생산	면역 접종 및 기능성 난황 생산	100%	항원접종 및 면역란 생산
		항체 역가 확인	100%	항원과 면역증강제에 의한 항체 생성비교
		난황 분말 대량 정제,생산	100%	pilot-scale 난황분말 정제 및 생산
		공정 표준화 (기준 및 시험법)	100%	생산공정 표준화 및 in process control기준 확립
		대량 공정 개선	100%	pilot-scale정제 및 생산을 통한 전공정단계 확인
		반복 투여 독성 시험	100%	설치류 13주 반복 경구 투여 독성 시험 완료
		비임상 동물효력시험 (단회/반복)	100%	Rat을 이용한 단회/반복투여 효능확인
		개별인정형 허가 자료 확보	100%	기시험 자료 구축
	2세부과제: 기능성 난황 특성 연구	난황 항체 물리,화학적 특성 조사	100%	소화 효소에 의한 분해 정도 등 특성 연구
		난황 항체 안정성 조사	100%	안정성 자료 확보
		이당류 분해 효소 활성 억제 연구	100%	Kinetics 분석 및 억제효능 정량평가
	3세부과제: 효력 평가 모델 연구	포도당 흡수 억제 역학 조사	100%	포도당 흡수 억제 역학 수치 도출
		포도당 당 흡수 억제 후 세포 에너지 생성능 평가를 통한 난황항체 효력 평가	100%	동물 장내세포 추출 세포에서 에너지 생성능 확인 시험 수행
		동물 장내 세포 포도당 흡수 억제 시험	100%	기능성 난황항체의 동물 장내세포 포도당 흡수 억제 확인 시험 수행

제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 기술적 측면

가. 계란을 이용한 산업적인 분리공정의 최적화기술은 계란이외의 고부가가치 생리활성물질의 분리 산업에도 유용하게 이용 가능하다.

나. 한국인의 식생활에 적합하게 다른 필수적인 무기이온 및 단백질 등의 흡수저해 없이 탄수화물의 최종 소화 흡수에 관여하여 비만억제용 원료가 개발되고 동시에 식후 혈당조절 식품으로 개발될 가능성이 크다 즉, 기존의 지방질의 흡수 억제 및 식이 섬유와는 차별화된 새로운 기능성 원료를 확보한다.

다. 순수 국내 생명공학 기술로 당조절의 새로운 기능성을 부각한 혈당 및 비만억제용 난황 원료의 개별인정은 안심하고 섭취할 수 있는 다양한 제품을 개발 할 수 있다는 기술적 부가가치는 더욱더 크게 상승할 것으로 기대된다

2. 경제적·산업적 측면

가. 국내 양계사업의 총 시장 규모는 10조원 정도이며 이 중 계란 자체의 시장규모는 10%선인 1조원으로 전문가들은 추정하고 있으나 이중 특수란(卵) 시장이 30%를 차지하고 있으며 기능성란의 시장이 특수란 시장에서는 현재로서 미약하다. 이 기능성 원료의 성공적 개발 시 공식적으로 인정된 원료성분으로 고부가가치를 지닌 새로운 기능성 식품으로서의 식품시장에 있어 새로운 이윤창출의 축으로 활용이 기대된다.

나. 선진국은 이미 신선한 계란이 소비 증체에 들어간 상태에서 새로운 소비처와 제품을 찾아야만 하는 시점이며 현재 공급 과잉상태에서 포장 및 품질 고급화, 식품 안전성 확보, 냉장 유통 과정을 거치지 않은 국내 현실 또한 향후 유통의 변화 속도가 빠를 수밖에 없으며 소비자의 소리와 과학자들의 연구에 관심은 이제 생산에 있어 양적인 차원보다는 질적으로 차별화를 둔 고 부가가치 계란 가공 산업으로 전환하고 있는 상황이다.

다. 생명공학기술을 응용한 새로운 기능성의 혈당조절 난황 단백질은 개별 인정형 원료로 인정 시 자사를 포함한 국내 및 국외 타사로의 원료공급으로 인한 수익창출과 양계 농가의 소득 향상뿐 아니라 항체 식품에 대한 소비자의 이해도의 증가와 건강한 삶의 질을 향상시키며 난황 단백질의 원료 성분으로서의 개별인정 선례를 제공함으로써 기존 국내 타사에서 개발 중이거나 개발예정인 다른 기능성의 난황 항체 식품의 개발 부흥에 일조할 것으로 예상된다.

라. 개발될 난황 단백질은 소장 내 탄수화물의 최종 소화와 관여하는 효소를 항원으로 하여 탄수화물의 최종 체내 흡수를 억제함으로써 특히 비만의 개선과 당뇨 환자의 식이 요법 시 발생하는 음식물 섭취의 제약을 완화시킬 수 있는 기능성 식품원료로서 비만 및 당뇨인의 삶의 질을 크게 향상시킬 수 있을 뿐 아니라 현재까지 국내 개발된 기능성 원료가 거의 없는 실정이므로 기능성 원료의 수입대체 효과도 매우 클 것으로 판단된다.

마. 국내에서만 약 2003년 약 2조원에 육박할 비만 개선 시장(식품, 의약품 외 운동요법 등을

모두 포함)에서 경쟁력이 있는 유효한 성분으로 활용 가능하며 날로 증가폭이 심한 당뇨병자 및 정상인과 당뇨병자 사이의 반환자군에 있어서도 식후혈당상승 개선 식사조절 보조제 제품 원료로서 삶의 질 향상과 고부가가치 창출 및 세계시장에서의 수출 원료로서의 무한한 가능성 시사한다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 실용화·산업화 계획

1. 건강기능성식품 원료
2. 개별인정형 원료인정

제2절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

1. 홍보 : 학회발표

제3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

2. 논문 : 논문 투고

제4절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

1. 추가연구

가. 단일항원 접종 : 현재는 여러 소화효소가 포함된 복합항원을 사용하여 복합항원에 대한 효과를 기대하고 있으나, 단일항원에 대한 항체제조는 항원 control과 항체품질유지에 도움이 될 것으로 추가연구가 필요하다.

나. 최종제품 제형

(1) 동결건조공정은 난황항체 안정성에 필요하지만 경제성면에서 개선이 필요하다.

(2) 자사 계열사인 보령바이오파마에서 생산/판매중인 경구용 장티푸스백신이 소장으로 전달하기 위한 장용코팅 캡슐제형으로 이 제형을 이용하면 타겟장기인 소장으로 물질을 전달하는 것이 가능할 것임

다. 효력시험

- (1) 질환모델 효력시험

단일항원 접종에 의한 항체역가를 높여 질환모델에 적용하고자 한다.

- (2) 임상시험

동물모델에서 확실한 효력확인 후 사람에 대한 임상시험을 실시하여 혈당 조절을 통한 비만억제제로서 생명공학기술을 이용한 난황 단백질의 원료성분인정을 받고자 한다. 비만억제용식품원료 기능부여 뿐만 아니라 혈당조절에도 이용할 수 있으며, 식품 또는 음료에 첨가제 또는 식품보조제로서 다양한 용도 개발이 예상되며 기호에 맞는 소비자의 구매심리 자극과 포화된 식품산업에 있어서 고부가가치 건강 기능성 원료로서 성장 가능성이 유도될 것으로 판단된다.

2. 의약품개발에 활용

가. 단백질의약품의 지속성을 주는 기술로 human Ig Fc가 융합된 단백질이 개발되고 있는데 사람에게 면역역원성이 없는 IgY구조 일부를 융합하여 원천기술화하는 수 있는 연구

나. 탄수화물 분해효소 단일항원에 대해 생성된 항체를 의약품 grade로 정제하거나 재조합 항체를 제조하여 혈당조절항체의약품 제조

3. 원가절감을 위한 대응책 마련

가. 원가가 계란구매비용이 50%를 차지하므로 원가 절감의 차원에서 계약 단가가 저렴하며, 할란 공정등의 추가 공정단가가 저렴한 사업장을 찾아야 할 것이다. 또한 조류독감에 대비가 잘 되어 있는 농장을 선별하여 계약할 것임.

나. 생산공정 중 동결건조비용이 높아 spray dry와 비교하여 대체여부를 비교 연구 해야 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. IgY를 vaccine 생산분야에서 process control용 시험에 적용하여 비용을 감소시키고 상용 항체의 제조사별 상이함에서 벗어날 수 있었다. IgY의 적용분야 확대가 가능함을 시사하였다[9].
2. 여러 종류의 뱀독에 함께 작용하는 polyvalent한 난황항체를 개발하였다. 본 과제의 IgY도 BBMV내의 Maltase를 비롯한 다양한 효소에 대한 polyvalent한 항체로서 개발의 가능성 재확인하였다[10].
3. 기존 IgY의 정제방식에서 벗어나 One-step purification방법으로 IgY와 affinity가 있는 ligand를 합성하여 순도(92.1%)와 수율(78.2%)을 높였다[11].
4. 기존의 mammalian종 유래 항체(IgG)를 이용한 monoclonal Ab는 중간 crossactivity나 non-specific binding등을 유발하여 immunoassay에 어려움이 있었다. 이러한 문제점을 없애기 위한 기존의 polyclonal IgY에서 발전하여 monoclonal IgY의 개발을 통해 이러한 문제점을 개선하고자 하였다[12].
5. IgY의 경구투여를 위한 방법으로 Chitosan - alginate microcapsule을 이용하였고, 그 효과를 돼지모델을 통한 in vivo시험을 통해 확인하였다. IgY의 건강기능성 개별인정원료 개발에 있어 가장 중요한 안정성문제를 제형개선을 통한 효과를 입증하였다[13].
6. 혈액내에서 돌아다니는 감염항원 (*Schistosoma japonicum*) 을 확인하는 방법으로 anti-IgY bead를 적용함으로써 향후 chemotherapy의 적용 가능성을 확인하였다[14]
7. DNA 바이러스를 닭에 주사하여 그에 대한 항체를 계란을 통해 바로 얻을 수 있어 바이러스 예방을 위한 백신이 아니라 치료제 분야의 발달에 기여할 수 있음을 시사하였다[15]
8. 뱀독에 대한 항체를 IgY를 통해 생산하기 위해 적절한 면역방법과 정제조건 확립하였고 면역주기와 횟수에 대한 연구의 필요성을 확인하였다[16].
9. Egg yolk로부터 IgY의 생산과정 중 버려지는 부산물에서 소실(loss)되는 IgY를 다시 한번 공정을 거쳐 그 생산성을 늘릴 수 있었다. 대량생산과정에서 생산성을 늘리기 위한 방법으로 고려해볼수 있을것이다[17].

제 7 장 참고문헌

1. 정후길, 전호남 : 난황유래 면역단백질 IgY (immunoglobulin-yolk)의 산업적응용. *미생물과 산업*, 28(2), 2002
2. 임인석, 이호석, 김원용, 최웅상, 정동혁, 정후길, 윤승섭, 전호남 : 로타바이러스 감염성 설사에 대한 항-로타바이러스 난황항체의 치료 효과. *Korean Journal of Pediatrics*, 48(12), 2005
3. 홍성길, 김대원, 김정원, 이홍석, 난황항체를 이용한 탄수화물의 체내 소화흡수 저해. *한국조리과학회지*. 18(1):94-1000, 2002
4. Raja C. et al., Hen egg yolk antibodies(IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken : a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(2):295-308, 2009
5. 건강기능식품 공전 : 일반시험법
6. 식품의약품안전청 고시 : “의약품등의독성시험기준 해설서”
7. Pierre et al., p-Nitrophenol- α -D-Glucopyranoside as Substrate for Measurement of Maltase Activity in Human Semen. *Clin,Chem.*, 24:208-211, 1978
8. 식품의약품안전청, 건강기능식품 기능성 원료인정에 관한 규정
9. Catherine A. Young, Frederick G. Silversides, Simon R.M. Jones, Chicken-derived IgY recognizes developing and mature stages of *Loma salmonae* (Microsporidia) in Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp. *Aquaculture*, 273:398 - 404, 2007
10. Cla'udia Maria Costa de Almeida, Cla'udia Let'icia da Silva, Humberto Pena Couto, Rita de Ca' ssia Mothe' Escocard, David Gitirana da Rocha, Lynna de Paula Sentinelli, Thereza Liberman Kipnis, Wilmar Dias da Silva*, Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon*, 52:293 - 30, 2008
11. Dexian Dong, Haoran Liu, Qishi Xiao, Rongxiu Li*. Affinity purification of egg yolk immuno-globulins (IgY) with a stable synthetic ligand. *Journal of Chromatography B*, 870: 51 - 54, 2008

12. Kerstin Greunke¹, Ingke Braren¹, Iris Alpers, Simon Blank, Jan Sodenkamp, Reinhard Bredehorst, Edzard Spillner. Recombinant IgY for improvement of immunoglobulin-based analytical applications *Clinical Biochemistry*, 41:1237 - 1244, 2008
13. Jia-hui Lei, Wen-qi Liu, Cheng-song Sun, Chun-lian Tang, Man-jun Li, Yu-li Chen, Yong-long Li*. Detection of circulating antigen in serum of mice infected with *Schistosoma japonicum* by immunomagnetic bead ELISA based on IgY. *Acta Tropica*, 111:39 - 43, 2009
14. Xiao-Yu Li, Li-Ji Jin, Jude E. Uzonna, Shu-Ying Li, Jun-Jun Liu, Hua-Qiang Li, Ya-Nan Lu, Yu-Hong Zhen, Yong-Ping Xu*, Chitosan - alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): In vivo evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129:132 - 136, 2009
15. Peter T. Witkowski^a, Daniel R. Bourquain^a, Oliver Hohn^b, Rüdiger Schade^c, Andreas Nitsche, Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 341: 146 - 153, 2009
16. A.S. Araújo, Z.I.P. Lobato, C. Chávez-Olortegui, D.T. Velarde*, Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon*, 55:739 - 744, 2010
17. Ismael Marcet, Amanda Laca, Benjamin Paredes, Mario Diaz*, IgY isolation from a watery by-product obtained from an egg yolk fractionation process. *Food and bioproducts processing*, 89:87 - 91, 2011

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발연구과제의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발연구과제의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.