



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0100380
(43) 공개일자 2014년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/40 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0040848
(22) 출원일자 2013년04월15일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
JP-P-2013-021411 2013년02월06일 일본(JP)

(71) 출원인
마쓰다니가가꾸고오교가부시끼가이샤
일본국 효고고쨩이따미시기따이따미5초메3반지
(72) 발명자
미야자토 쇼코
일본국 효고쨩 이따미시 기타이따미 5초메 3반지
마쓰다니가가꾸고오교가부시끼가이샤 연구소 내
기시모토 유카
일본국 효고쨩 이따미시 기타이따미 5초메 3반지
마쓰다니가가꾸고오교가부시끼가이샤 연구소 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
채종길

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 IgA 분비 촉진제

(57) 요약

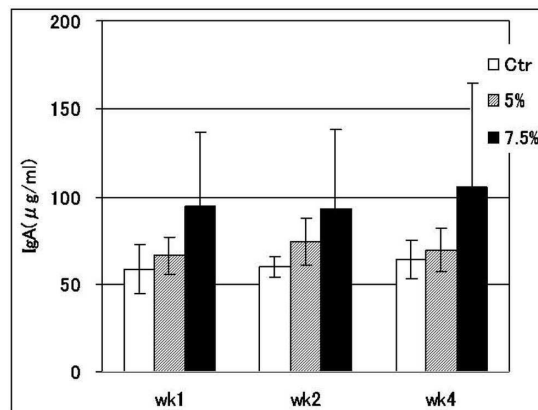
<과제>

점막 면역 부활제로서 유용한 신규 IgA 분비 촉진제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<해결 수단>

난소화성 텍스트린을 경구 투여함으로써 유의한 IgA 분비 촉진 작용이 인지되었다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

호소노 아키라

일본국 도쿄토 지요다쿠 구단미나미 4쵸메 8반 24
고 각코호진 니혼다이가쿠 내

다카하시 교코

일본국 도쿄토 지요다쿠 구단미나미 4쵸메 8반 24
고 각코호진 니혼다이가쿠 내

가미노가와 슈이치

일본국 도쿄토 지요다쿠 구단미나미 4쵸메 8반 24
고 각코호진 니혼다이가쿠 내

특허청구의 범위

청구항 1

난소화성 텍스트린을 유효 성분으로 하는 IgA 분비 촉진제.

청구항 2

제1항에 있어서,

난소화성 텍스트린의 난소화성 성분이 45질량% 이상인 것을 특징으로 하는 IgA 분비 촉진제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

IgA 분비 촉진제가 경구 투여 형태의 제형으로 조제되어 있는 특징으로 하는 IgA 분비 촉진제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 IgA 분비 촉진제를 포함하는 점막 면역 부활제, 항감염증제 또는 항알레르기제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 난소화성 텍스트린을 유효 성분으로 하는 IgA 분비 촉진제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 소화관은 항상 세균, 바이러스 등의 미생물, 병원성 항원, 음식물 항원 등 많은 물질과 접하고 있고, 이들 외래 항원이 생체 내에 침입하는 것을 막기 위해, 장관에는 강력한 점막 면역 기능이 발달해 있다. 특히 장관의 대표적인 림프 조직인 파이어판(Peyer's patch)으로부터 분비되는 IgA는, 점막면역의 세균이나 바이러스의 부착 방지, 외래 항원을 포착하여 체외로 배출하는 이물 배제, 이중 단백질에 의한 알레르기 발증(發症)의 예방 등의 작용을 가지고 있고, 점막 면역 기능에 있어서 중요한 작용을 담당하고 있다. 따라서, IgA의 분비를 촉진하는 것은 점막 면역 기능을 증강시키고, 감염증이나 알레르기 질환을 예방하는 등의 효과를 기대할 수 있기 때문에, IgA 분비 촉진 작용을 가지는 식품 소재의 개발이 요망되고 있다.

[0003] 근년 들어, 프리토올리고당(특허문헌 1), 갈락토올리고당(비특허문헌 1), 이소말토올리고당(비특허문헌 2), 락토수크로스(비특허문헌 3), 시클로이눌로올리고당(특허문헌 2) 등, 난소화성이고 저분자인 올리고당이 IgA 분비 촉진 작용을 가지는 것이 보고되어 있다. 올리고당에는 몇 개인가의 종류가 있지만, 소장에서의 소화 흡수를 피하여 대장에 도달하고, 거기서 장내 세균에 자화(資化)되고 비피더스균을 증가시키는 등 장내 환경을 개선한다는 기능은 일치하고 있고, 거의 통일된 견해가 나타나 있다.

[0004] 그러나, 식물 섬유에 관해서는, 그 종류는 다종다양하고, 기원, 물성, 구성 당, 결합 양식, 장내 세균에 의한 자화성의 유무나 정도 등, 각각 다른 특성을 가지고 있다. 예를 들면, 식물 섬유는 수용성과 불용성의 차이에 따라 생리 기능이 다른 것은 잘 알려져 있지만, 같은 수용성 식물 섬유라도, 각각이 가지는 기능이나 효과의 강도는 달라, 한 마디로 논할 수는 없다. 실제로 IgA 분비 촉진에 관해서는, 같은 실험으로 복수의 식물 섬유를 비교한 결과가 보고되어 있고, 수용성 식물 섬유라는 공통된 물성이라도, 펙틴에는 IgA 분비 촉진이 인지되었지만 곤약만난에서는 촉진되지 않았다(비특허문헌 4)라는 논문이나, 구아검, 글루코만난, 펙틴에서는 IgA 생산량이 증가했지만, 구아검 분해물에서는 증가하지 않았다(비특허문헌 5)라는 논문이 발표되어 있다. 또한, 비교적 저분자이고 저점도의 수용성 식물 섬유인 폴리텍스트로스(비특허문헌 6) 및 뉴트리오스(비특허문헌 7)는 IgA 분비량이 감소하였다고 보고되어 있다. 이와 같이, 같은 수용성 식물 섬유라도 IgA 분비 촉진에 관해서는 통일된 결과가 얻어지지 않고, 물성이 유사하여도 IgA 분비 촉진 작용의 유무를 예상할 수는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 일본 특허공개 2003-201239호 공보
(특허문헌 0002) 일본 특허 제4382465호

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) 일본 영양·식량학회지 2008, 61, 79-88.
(비특허문헌 0002) 기능성 당질 소재의 개발과 식품에의 응용, 시엠시출판, 131-132, 2005.
(비특허문헌 0003) J. Appl. Glycosci., 2007, 54, 169-172.
(비특허문헌 0004) J. Nutr., 1997, 127(5) 663-7.
(비특허문헌 0005) Biosci. Biotechnol. Biocem., 2003, 67(2) 429-33.
(비특허문헌 0006) British J. Nutr., 2007, 98, 123-33.
(비특허문헌 0007) Inflamm. Bowel Dis., 2010, 16(5) 783-94

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 그래서 본 발명은 점막 면역 부활제로서 유용한 신규 IgA 분비 촉진제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명자들은, 경구 섭취에 의해 안전하고 계속적으로 용이하게 섭취할 수가 있고, 점막 면역 기능을 부활(賦活)하는 것이 가능한 IgA 분비 촉진제를 제공하기 위해, 당해 작용을 가지는 식품 소재의 평가를 행하였다.
- [0009] 마우스에 의한 사육 실험의 결과, 수용성 식물 섬유질의 일종인 난소화성 텍스트린을 배합한 사료로 사육한 마우스에서는, 장관 내에 분비된 IgA 및 분변 중의 IgA량이 난소화성 텍스트린의 용량에 의존하여 증가하고, 신규 IgA 분비 촉진제로서 유효하다는 것이 분명하게 되었다.
- [0010] 따라서, 난소화성 텍스트린이 점막 면역의 부활 작용을 가지는 것이 분명하게 되었다.
- [0011] 난소화성 텍스트린에 관해서는, 혈당 저하 작용, 지질 저하 작용, 체지방 저하 작용 등 대사증후군에 유효한 기능을 가지는 것이나, 장내 세균에 의해 자화되는 성질을 가지기 때문에 장내 균총에 영향을 미치는 것도 보고되어 있다. 그러나, IgA의 분비나 장관 면역에 미치는 영향에 관해서는 지금까지 보고된 예는 없다. 또, 전술과 같이, 난소화성 텍스트린과 동일한 수용성 식물 섬유이고, 물성이나 기능이 극히 유사한 뉴트리오스나 폴리텍스트로스는, 장내 세균에 자화되고, 장내 균총을 개선하는 효과를 가지지만, IgA 분비를 촉진하지 않는다는 보고가 있다. 즉, 장내 균총을 개선하는 것이 반드시 IgA의 분비를 촉진한다고는 할 수 없고, 난소화성 텍스트린이 IgA 분비를 촉진하는 것은 종래의 보고로부터 예상할 수는 없다. 우리는 의외로 난소화성 텍스트린의 IgA 분비 촉진 작용을 알아내는 것에 성공하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0012] 즉 본 발명은 난소화성 텍스트린을 유효 성분으로 하는 IgA 분비 촉진제이다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 있어서의 IgA 분비 촉진제는, 난소화성 텍스트린을 유효 성분으로 한 새로운 IgA 분비 촉진제이고, 안전하며 경구 섭취가 가능하고 또한 계속적으로 섭취할 수가 있다. 난소화성 텍스트린은 수용성으로 점도가 낮고, 단맛이나 특유의 맛을 가지지 않기 때문에, 모든 식품이나 의약품에 이용이 가능하다. 즉, 본 IgA 분비 촉진제는 음식품이나 의약품 등에 폭넓게 응용할 수 있는 범용성이 높은 것이다. 본 발명에 있어서의 IgA 분비 촉진

진제를 경구 섭취하면, 장관 점막에 있어서 IgA 분비를 촉진함으로써, 병원성 미생물의 소화관 점막에의 부착을 저해하여 감염을 예방할 수가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 마우스를 이용한 난소화성 텍스트린의 IgA 분비 촉진 효과를 평가하는 실험에 있어서의, 소화관 내용물 중의 IgA량의 측정 결과를 나타낸다.
- 도 2는 마우스를 이용한 난소화성 텍스트린의 IgA 분비 촉진 효과를 평가하는 실험에 있어서의, 분변 중의 IgA량의 측정 결과를 나타낸다.
- 도 3은 마우스를 이용한 난소화성 텍스트린의 IgA 분비 촉진 효과를 평가하는 실험에 있어서의, 적출 소장 파이어판의 배양 세포액 중의 IgA량을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 마우스를 이용한 난소화성 텍스트린의 IgA 분비 촉진 효과를 평가하는 실험에 있어서의, 적출 소장 파이어판의 배양 세포액 중의 IL-12량을 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 난소화성 텍스트린을 유효 성분으로 하는 IgA 분비 촉진제로 이루어진다. 즉, 본 발명의 IgA 분비 촉진제는, 배소 텍스트린을 α -아밀라제 및/또는 글루코아밀라제로 소화시켜 얻어지는, 난소화성 성분이 적어도 45질량%인 난소화성 텍스트린을 유효 성분으로서 포함하는 것을 필수요건으로 한다. 본 발명에 사용하는 난소화성 텍스트린에는 난소화성 텍스트린의 수소 첨가물(환원물)도 포함된다.
- [0016] 본 발명에 있어서의 IgA 분비 촉진이란, IgA의 분비를 부활화·활성화하고, 분비물이나 배출물에 있어서의 IgA의 총량을 상대적으로 증가시키는 기능을 말한다. 예를 들면, IgA 분비 촉진제를 섭취한 후에, 본 명세서의 실시예의 평가 시험에 기재된 방법으로 분비물이나 배설물 중의 IgA량을 측정한 경우에, 대조와 비교하여 IgA량이 증가하고 있는 것을 의미한다.
- [0017] IgA 분비량의 측정 방법으로서, IgA ELISA Quantitation Kit(코스모바이오(주))나 Salivary EIA Kit(후나코시(주)) 등의 키트가 시판되고 있고, 이러한 키트를 이용하여 IgA 분비량을 측정할 수가 있지만, 후술하듯이 독자적으로 설계한 ELISA를 이용하여 측정할 수도 있다.
- [0018] 난소화성 텍스트린류를 제조하기 위해서 이용되는 배소 텍스트린이란, 전분을 염산 등의 무기산 또는 옥살산 등의 유기산의 존재하에, 120~200℃로 가열하여 얻어지는 건식 전분 분해물이고, 소량의 비소화성 성분을 포함하는 텍스트린이다.
- [0019] 보다 상세하게는, 배소 텍스트린은 전분에 광산(예를 들면, 염산, 질산, 황산), 바람직하게는 염산을, 전분 100질량부에 대해서, 예를 들면, 1질량%의 염산 수용액으로서 3~10질량부 첨가하고, 가열 처리하여 얻어진다. 가열 처리 전에 전분과 광산의 수용액을 균일하게 혼합하기 위해, 적당한 믹서 중에서 교반, 숙성(수시간)시키고 나서, 바람직하게는 100~120℃ 정도에서 예비 건조시켜, 혼합물 중의 수분을 5질량% 정도까지 감소시키는 것이 바람직하다. 가열 처리는 120~200℃, 바람직하게는 150~200℃에서 10~120분, 바람직하게는 30분~120분이 적당하다. 가열 처리의 온도는 높게 하는 쪽이 목적 생성물 중의 난소화성 성분의 함량을 증가시키지만, 180℃로부터 착색 물질을 생성하는 경향이 있으므로, 보다 바람직하게는 150~180℃이다. 배소 텍스트린의 산에 의한 분해에 있어서 이용되는 산은, 유기산(예를 들면 옥살산, 구연산)이라도 무기산(예를 들면 염산, 질산, 황산)이라도 좋지만, 염산, 옥살산 등이 바람직하고, 염산이 더 바람직하다.
- [0020] 난소화성 텍스트린의 보다 상세한 제조 방법은 다음과 같다. 배소 텍스트린을 20~45질량% 정도의 수용액으로 하고, 배소 텍스트린 수용액의 pH를 5.5~6.5로 조정하고, α -아밀라제를, 예를 들면 터마밀 60L(상품명, 노보노르디스크바이오인더스트리사 제조)의 경우는, 배소 텍스트린에 대해 0.05~0.2질량% 첨가한다. 다른 α -아밀라제를 사용하는 경우는, 그 효소의 역가에 따라 동등한 양을 첨가하면 좋다. α -아밀라제의 첨가 후에 용액을 가열하고, α -아밀라제의 작용 온도인 85~100℃(α -아밀라제의 종류에 따라 다르다)에서 30분~2시간 가수분해한다.
- [0021] 다음에 온도를 120℃ 정도(α -아밀라제의 실활 온도)로 상승시켜 α -아밀라제 작용을 정지시킨다. 이때 염산이나 옥살산 등의 산을 가하여 pH를 α -아밀라제가 실활할 정도, 즉 pH4 정도까지 저하시켜도 좋다.
- [0022] 이와 같이 하여 얻어지는 배소 텍스트린의 가수분해물은, 저분자 구획분의 제거, 탈염, 탈색 등의 후처리를 행

하면 난소화성 텍스트린으로서 본 발명의 IgA 분비 촉진제로서 사용할 수 있지만, 바람직하게는 또 글루코아밀라제에 의한 가수분해를 행하여 난소화성 성분의 함량을 높인다. 즉, 액온을 60℃까지 내리고, pH를 4~5, 바람직하게는 4.5로 조정하고, 고형분 질량에 대해 0.05~0.4질량%의 글루코아밀라제를 첨가하여 55~60℃에서 4~48시간 가수분해를 행하여, 난소화성 성분 이외의 성분을 포도당으로 분해한 후, 온도를 80℃까지 올려 글루코아밀라제의 효소 작용을 종료시킨다. 이 글루코아밀라제로서는 시판품을 모두 사용할 수 있지만, 예를 들면 글루크자임 NL4.2(상품명, 아마노엔자임사제) 등이 있다. 이후는 통상의 활성탄 탈색, 여과, 이온교환수지에 의한 탈염, 탈색을 행하고, 50중량% 정도의 농도까지 농축한다.

[0023] 이 액을 강산성 양이온교환수지탑에 통액하여 크로마토그래피 분리의 방식으로 난소화성 텍스트린과 포도당 부분으로 분리하여, 난소화성 성분을 고형분당 적어도 45질량%, 바람직하게는 60질량% 이상, 더 바람직하게는 85~95질량% 함유하는 난소화성 텍스트린을 얻을 수가 있다.

[0024] 상기 난소화성 텍스트린은 레이니니켈(Raney nickel) 등의 금속 촉매의 존재하, 80~120kg/cm², 120~140℃의 조건에서 수소 가스를 접촉시켜 접촉 환원하여 이용해도 좋다. 시판의 난소화성 텍스트린 제제로서는 파인파이버, 파이버솔 2, 파이버솔 2H(이상 마츠타니화학공업주식회사제)를 들 수가 있다.

[0025] 본 발명의 IgA 분비 촉진제는 난소화성 텍스트린 또는 환원 난소화성 텍스트린 그 자체라도 좋지만, IgA 분비 촉진 기능을 가지는 다른 화합물과 더 조합하여 사용할 수가 있다. 다른 IgA 분비 촉진 기능을 가지는 다른 화합물로서는, 예를 들면, 프럭토올리고당, 펙틴, 갈락토올리고당 및 이소말토올리고당을 들 수가 있다.

[0026] 또, 본 발명의 IgA 분비 촉진제로는, 다른 성분, 예를 들면 각종 전분, 가공 전분, 전분 분해물, 당류, 당알코올류, 대두 다당류 등을 배합해도 좋고, 또 감미료, 착색료, 보존료, 증점안정제, 산화방지제, 껌베이스, 향신료, 고미료(苦味料), 효소, 광택제, 산미료, 조미료, 유화제, 글루텐, 영양 강화 목적의 강화제 등을 배합할 수가 있다. 배합 비율은, IgA 분비 촉진제를 섭취, 혹은 IgA 분비 촉진제를 배합하여 제조 조리된 식품을 먹을 때의 처방량, 첨가량, 또한 섭취 대상을 고려하여 설계되어야 할 것이고, 유효 성분인 난소화성 텍스트린은 표준적인 성인이면 1일당 적어도 3g, 바람직하게는 적어도 5g, 보다 바람직하게는 적어도 10g 섭취하도록 설계되는 것이 바람직하다.

[0027] 상기의 방법으로 얻어진 본 발명의 IgA 분비 촉진제는 여러 가지 제형으로 할 수가 있다. 예를 들면, 의약품으로서 경구 투여하는 경우에는 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 환제, 액제, 유제, 현탁제, 용액제, 주정제, 시럽제, 진액제, 엘릭시르제로 할 수가 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 또, 제제에는 약제적으로 허용할 수 있는 여러 가지 담체를 가할 수가 있다. 예를 들면, 부형제, 결합제, 붕괴제, 활택제, 착향제, 착색제, 감미제, 교미제(矯味劑), 용해보조제, 현탁화제, 유화제, 코팅제를 포함할 수가 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 IgA 분비 촉진제를 지속성, 서방성의 것으로 해도 좋다.

[0028] 본 발명의 IgA 분비 촉진제의 섭취 방법은 특히 한정되지 않지만, 예를 들면 수용액, 정제, 과립 등의 형상으로 경구 섭취하는 것이 바람직하다.

[0029] 또, 본 발명의 IgA 분비 촉진제는 가공 전분의 적용이 알려져 있는 음식품에 배합하여 섭취할 수가 있다. 예를 들어, 베이커리 식품, 면류, 오코노미야키나 타코야끼, 핫케이크 등의 스낵 식품, 일본식 과자, 어육을 으깨어 만든 식품, 튀김의 반죽, 프리터, 요구르트, 푸딩, 젤리, 마요네즈나 소스 등을 포함한 드레싱류, 고명류, 아이스크림 등의 빙과, 축육 제품, 쌀밥류, 인조미, 분말음료, 청량음료, 탄산음료, 소프트 요구르트, 젤리음료 등의 각종 드링크 등에서의 배합이 예시되고, 바람직하게는 베이커리 제품, 면류, 젤리음료에서의 배합이다.

[0030] 한편, 사료로서 사용할 때에는, 본 발명의 IgA 분비 촉진제를 이미 알려진 가축, 애완동물용 사료에 배합하여 투여해도 좋고, 그대로의 형태로 투여해도 좋다. 또, 프리믹스로서 공급하는 것도 가능하다.

[0031] 본 발명의 IgA 분비 촉진제는 점막 면역 기능 부활제, 감염증 예방제, 항알레르기제로서도 사용하는 것이 가능하다.

[0032] 이하, 실시예에 의해 본 발명의 IgA 분비 촉진제에 관한 효과를 설명하지만, 본 발명은 이것에 한정되는 것은 아니다.

[0033] <실시예>

[0034] 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 1주간 고형 사료로 예비 사육한 후, 3군으로 나누어, 콘트롤 사료, 콘트롤 사료에 난소화성 텍스트린(상품명: 파이버솔 2)을 5질량% 배합한 사료, 콘트롤 사료에 난소화성 텍스트린을 7.5질

량% 배합한 사료로 각각 사육하였다. 사육 기간 중 사료 및 물은 자유롭게 섭취시켰다. 시험 개시로부터 1주째, 2주째 및 4주째의 3회에 걸쳐, 아침 8시부터 다음날 아침 8시까지의 24시간분의 분변을 회수하고, 그 후 해부하여 소화관 내용물을 채취하였다. 얻어진 분변 중 및 소화관 내용물 중의 IgA를 하기의 샌드위치 ELISA법에 의해 측정하였다.

[0035] ELISA에 의한 총IgA의 정량

[0036] 0.1M 인산이수소나트륨(pH9.0)으로 10 µg/ml로 희석한 염소항마우스 IgG F(ab')₂ 항체(SIGMA)를 96웰 마이크로타이터 플레이트(Nunc)에 50 µl/well 첨가하고, 4℃에서 하룻밤 인큐베이트(incubate)하여 항체를 플레이트에 흡착시켰다. 0.05% Tween-20 함유 Phosphate buffered saline(PBST)으로 웰을 3회 세정 후, 1% BSA-PBS를 100 µl 첨가하여 실온에서 2시간 인큐베이트하여 블로킹(blocking)을 행하였다. PBST로 3회 세정 후, 4℃, 300G, 10분간의 원심분리에 의해 얻어진 배양 7일째의 파이어판(PP) 세포의 배양 상청(上淸)을 1% BSA-PBST로 1/50로 희석하여 50 µl 첨가하였다. 장 내용물 추출액은 마찬가지로 1/2000로 희석하여 50 µl 첨가하였다. 표준액은 정제 마우스 골수종 IgA 항체(Kappa)(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)를 1% BSA-PBST로 200ng/ml로 희석하고, 1/2씩 단계 희석하였다. 이것을 50 µl 웰에 첨가하고, 검량선 작성을 위한 표준액으로서 이용하였다. PBST로 4회 세정 후, 1% BSA-PBST로 1/2000로 희석한 알칼리포스파타제 표지 염소항마우스 IgA(α chain specific) 항체(Southern Biotech, Birmingham, AL)를 50 µl 첨가하고, 실온에서 2시간 인큐베이트하였다. PBST로 8회 세정 후, 4-니트로페닐인산이나트륨(토코화성공업, 도쿄)을 디에탄올아민 완충액에 1mg/ml의 농도로 용해하여 50 µl 첨가하였다. 차광한 플레이트를 37℃에서 20~30분 인큐베이트 후, Microplate Reader Model 550(Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive Hercules, CA)으로 405nm의 흡광치를 측정하고, 해석은 Micro Plate Manager III(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 행하였다.

[0037] 또, 시험 개시로부터 2주째에 있어서는, 해부시에 각 군의 마우스로부터 소장 파이어판을 적출하고, 효소를 이용하여 세포를 분산시키고, 세포 현탁액을 조제하였다. 트리판블루 염색에 의해 현미경하에서 생존 세포수를 계수하고, 생존 세포 농도를 8×10^6 개/mL로 조정한 세포 현탁액을 배양 플레이트에 1웰당 500 µl 분 붓고, CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 난소화성 텍스트린의 계속 섭취에 의한 파이어판의 IgA 분비에 대한 잠재 능력의 유무를 평가하기 위해, 각 군의 배지에 자극제로서 리포폴리사카라이드(LPS) 혹은 콘카나발린 A(conA)를 등량 첨가한 조건하에서도 마찬가지로 배양을 행하고, 배양액 중의 IgA 및 IgA 분비 능력의 지표로서의 인터류킨-12(IL-12)를 측정하였다. IL-12는 하기 샌드위치 ELISA법에 의해 측정하였다.

[0038] ELISA에 의한 IL-12의 측정

[0039] 0.1M 인산이수소나트륨(pH9.0)으로 2 µg/ml로 희석한 래트항마우스 IL-12(p40/p70) 항체(BD pharmigen, San Diego, CA, USA)를 96웰 마이크로타이터 플레이트(Nunc)에 50 µl/well 첨가하고, 4℃에서 하룻밤 인큐베이트하여 항체를 플레이트에 흡착시켰다. PBST로 웰을 3회 세정 후, 1% BSA-PBS를 100 µl 첨가하여 실온에서 2시간 인큐베이트하고 블로킹을 행하였다. PBST로 3회 세정 후, 4℃, 300G, 10분간의 원심분리에 의해 얻어진 배양 24시간 후의 PP 세포의 배양 상청을 50 µl 첨가하였다. 표준품은 재조합 마우스 IL-12 p40(BD pharmigen, San Diego, CA, USA)을 1% BSA-PBST로 4000pg/ml로 희석하고, 1/2씩 단계 희석하였다. 이것을 50 µl 첨가하고, 검량선 작성을 위한 표준액으로서 이용하였다. PBST로 4회 세정 후, 1% BSA-PBST로 2 µg/ml로 희석한 비오틴 표지 래트항마우스 IL-12(p40/p70) 항체(BD pharmigen, San Diego, CA, USA)를 50 µl 첨가하고, 실온에서 2시간 인큐베이트하였다. PBST로 6회 세정 후, 알칼리포스파타제 표지 스트렙타비딘(Zymed, San Francisco, CA)을 1% BSA-PBST로 0.6 µg/ml로 희석하여 50 µl 첨가하고, 실온에서 2시간 인큐베이트하였다. PBST로 6회 세정 후, 4-니트로페닐인산이나트륨(토코화성공업, 도쿄)을 디에탄올아민 완충액에 1mg/ml의 농도로 용해하고 50 µl 첨가하였다. 차광한 플레이트를 37℃에서 약 120분 인큐베이트 후, Microplate Reader Model 550(Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive Hercules, CA)으로 405nm의 흡광치를 측정하고, 해석은 Micro Plate Manager III(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 행하였다.

[0040] 그 결과 소화관 내용물 중의 IgA량은 사료에 배합한 난소화성 텍스트린의 용량에 의존하여 증가하였다(도 1). 또, 분변 중 IgA량도 마찬가지로 난소화성 텍스트린의 용량에 의존하여 증가하였다(도 2).

[0041] 세포 배양액 중의 IgA는, LPS 및 conA를 첨가했을 때에 난소화성 텍스트린 섭취군에서는 증가하고 있고, 난소화성 텍스트린은 파이어판의 IgA 산생능(産生能)을 항진시키는 것이 분명하게 되었다(도 3).

[0042] IL-12에 관해서도, 분비 활성제를 첨가한 경우는, 난소화성 텍스트린 섭취군에서 IL-12량이 증가하였다(도 4). IL-12는 NK 세포에 대한 현저하게 드러난 활성화 작용을 특징으로 하는 사이토카인이다. IL-12는 B 세포 및 단

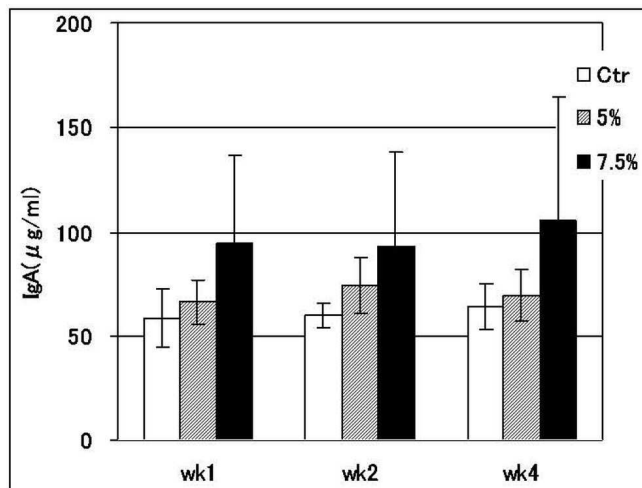
구계 세포로부터 산생(産生)되고, T 세포나 NK 세포에 대해서 세포 증식의 촉진, 세포 상해 활성 유도, IFN- γ 산생 유도, LAK 세포 유도 등의 작용을 나타낸다. 이러한 세포성 면역 기능에의 역할로부터, IL-12에는 감염 방어나 면역 부전증의 개선에 있어서의 임상 응용이 기대되고 있다. 예를 들면, HIV 감염 환자의 말초혈 림프구에 있어서의 IL-12 산생, IFN- γ 산생 혹은 NK 세포 활성은 모두 유의하게 저하하고 있지만, IL-12의 투여에 의해 이들을 정상인과 동일한 정도까지 증강시키는 것이 알려져 있다. 따라서, 난소화성 텍스트린의 섭취에 의해 IgA 분비능 및 IL-12 산생능이 높아지는 것은, 난소화성 텍스트린이 점막 면역을 부활하는 것을 나타내고 있다.

[0043]

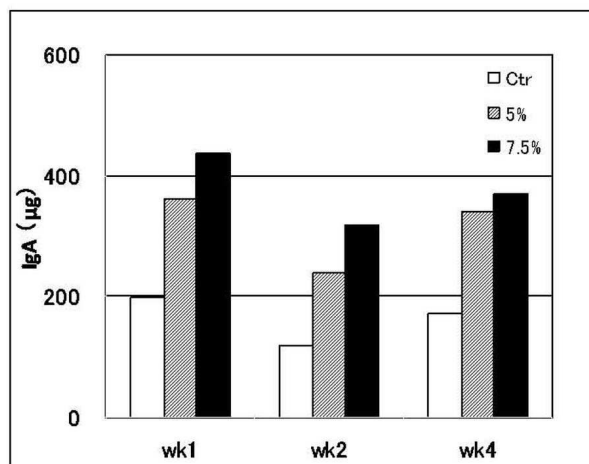
이상의 결과로부터, 난소화성 텍스트린은 IgA 분비 촉진제로서 유용하고, 또한 점막 면역을 부활하는 작용을 가지는 것이 분명하게 되었다.

도면

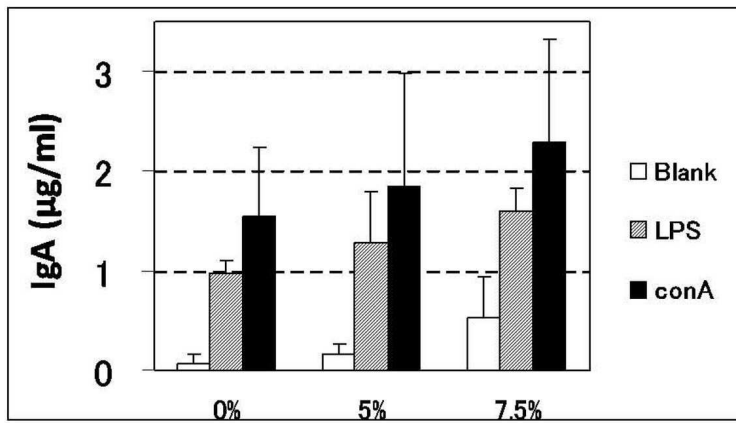
도면1



도면2



도면3



도면4

