

## 난황으로 부터 항충치 항체의 분리 및 그 특성

손동화 · 노정해 · 김영봉 · 한찬규 · 성기승 · 이남형  
한국식품개발연구원

### Properties of Anti-*S. mutans* IgY Separated from Egg Yolk

Dong-Hwa Shon, Jeong-Hae Rho, Young-Boong Kim, Chan-Kyu Han,  
Ki-Seong Sung and Nam-Hyung Lee  
Korea Food Research Institute

#### Abstract

Chick antibodies (IgY) raised against *Streptococcus mutans* (serotype c) were separated from egg yolk and their properties were investigated. The purity of IgY extracts prepared by the method of  $\lambda$ -carrageenan, gammaYolk™, and EGGstract™ was 20%, 46%, and 48%, respectively, and the yields of IgY extracts from a gram yolk were 11.3 mg, 1.7 mg, and 1.8mg, respectively. Quantitative immunoprecipitation test showed that specific IgY content of crude IgY prepared by  $\lambda$ -carrageenan method was 12.2%, which means that 0.85 g of crude IgY from an egg yolk (15 g) contains about 100 mg of specific IgY. When the reactivity of the specific IgY towards 3 caries-inducing strains (serotype: b, c, f) was examined, the strains cultured in sucrose-added medium showed higher reactivity (the orders were c(+), f(+), b(+)) than those cultured in sucrose-free medium. Heat and pH stability of specific IgY was good, for crude IgY contained 50% of antibody activity after heat treatment at 70°C for 5 min and they were stable at pH 4-8.

Key words: yolk immunoglobulin (IgY), *Streptococcus mutans*, IgY, properties

#### 서 론

난황 중의 항체는 포유류의 IgG (immunoglobulin G)에 해당되나 단백질 화학적 성질이 약간 다르고 난황에서 얻어짐으로 IgY (immunoglobulin yolk)라고도 부른다. 또한 IgY가 어미닭으로 부터 알에 이행되는 성질을 이용하여 면역한 산란계의 난황에서 특이항체 (specific antibody)를 얻을 수 있다<sup>(1,3)</sup>.

난황에서 특이항체를 얻는 방법은 기존 방법에 비하여 여러가지의 잇점이 있다<sup>(4)</sup>. 즉, 채란이 용이함, 간단한 처리로 항체의 분리가 가능함, 생산비용이 저렴함, 시스템화된 면역이 가능함, 섭취시 안전성이 높음, 포유동물유래의 항원에 대하여는 포유동물의 경우보다 산란계에서 우수한 항체를 얻을 수 있음 등이다. 특히 산란계 한 마리가 1년간 생산하는 난황에서 약 40 g의 IgY가 얻어지며, 그 생산성은 토끼의 경우보다 약 120배 높은 것으로 보고되었다<sup>(5)</sup>.

한편, 충치는 최근 발증빈도가 더욱 높아지고 있는

데, 대한치과의사협회(1992)는 우리나라 아동의 90% 이상이 치아우식을 경험했으며 성인들의 80% 이상이 잇몸병을 갖고 있다고 보고하였다. 충치 유발균으로는 *Streptococcus mutans*와 *S. sobrinus* 등이 보고되고 있으며, 설당성분의 존재시에 이들 균이 치아표면에 단단히 들러붙어서 식이로 부터의 각종 당류를 발효하여서 산을 발생시키므로서 충치가 유발된다<sup>(6)</sup>.

충치에 대응하는 방안의 하나는 충치유발 균에 대한 항체를 수동면역하는 것이다<sup>(7,9)</sup>. 따라서 대표적인 충치유발균주인 *S. mutans*에 대한 특이항체를 계란에서 대량생산하고 분리하여 이를 치아의 표면에 도포하거나 유제품, 빙과류, 제과류에 첨가함으로써 충치 예방용 기능성소재로 활용하기 위한 연구를 수행하였다. 본보에서는 생산된 IgY를 분리하고 그 분리효율 및 항체의 특이성과 안정성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 충치 유발균주의 배양

생명공학연구소 유전자은행에서 분양받은 충치 유발균주 *Streptococcus rattus* KCTC 3294 (serotype, b),

Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

*S. mutans* KCTC 3300 (serotype, c), *S. mutans* KCTC 3306 (serotype, f)를 Otake 등<sup>(9)</sup>의 방법에 따라 설탕 5%를 첨가한 brain-heart infusion (BHI) broth (Difco)에서 37°C, 24시간 혐기배양하였다. 필요에 따라 설탕 무첨가 배지에서도 배양하였다. 배양이 끝난 액은 원심분리하고 균체를 회수하여 냉동보관하면서 사용하였다.

#### 항 *S. mutans* 항체의 생산

*S. mutans* (serotype, c)의 균체를 Freund's complete adjuvant (Sigma)와 함께 1:1 유탁액을 만들어 28주령 산란계의 근육에 최초면역하였다. 이때 면역한 균체는 마리당 10<sup>6</sup> cfu를, 유탁액의 부피는 1 mL을 사용하였다. 이후 같은 방법으로 2주간격으로 5차례의 추가면역을 실시하였다. 단 adjuvant는 Freund's incomplete adjuvant (Sigma)를 사용하였다. 항체의 분리를 위하여 사용한 계란은 특이항체의 활성이 높게 나타난 37~47주령의 산란계에서 채취하였다. 산란계는 경기도 용인군 원삼면 소재 덕이농장으로부터 구입한 Hy-Line Brown 7수를 사용하였으며, 사료는 상업적인 표준양계용을 사용하였다.

#### 난황으로부터 항체(IgY)의 분리

$\lambda$ -Carrageenan을 이용한 분리: 난황을 같은 양(w/v)의 증류수와 함께 잘 섞은 후 수분간을 방치하였다. 난황의 4배 분량(w/v)의 0.1%  $\lambda$ -carrageenan (Sigma)을 섞은 후 상온에서 30분간 방치한 다음 10,000×g, 15분간 원심분리하였다. 침전물은 대부분 인지질이므로 제거하고 수용성단백질인 상징액을 Whatman #2 여과지로 여과하였다. 장기 보관하면서 사용하기 위하여 동결건조하였으며 이를 조난황 항체로 칭하였다.

GammaYolk™를 이용한 분리: GammaYolk™ kit (Pharmacia Biotech)의 제품 설명서에 따라 분리하였다. 간단히 설명하면, 10 g의 난황을 5 mL PBS (pH 7.4)를 넣고 섞은 다음 separation reagent 1 을 1.5 mL 넣고 10,000×g, 15분간 원심분리하였다. 상징액(부피, x mL)을 동량의 buffer solution 2와 섞은 후 15분간 방치하고 separation reagent 3을 2 x mL 섞었다. 다시 15분간 방치한 후 10,000×g, 15분간 원심분리하고 침전물을 x mL의 tris buffer (pH 9.0~9.5)에 녹였다. 순도를 높일 경우 침전물을 x mL 물에 녹인 후 separation reagent 3에 의한 단계를 반복하였다.

EGGstract™를 이용한 분리: EGGstract™ kit (Promega)의 제품 설명서에 따라 분리하였다. 간단히 설명하면, 난황 10 g에 solution A를 30 mL 넣고 5분간 섞은 후

10,000×g, 10분간 원심분리하였다. 상징액(부피, x mL)을 4겹의 거즈로 여과하고 solution B를 1/3 x mL 넣고 5분간 섞었다. 다음으로 10,000×g, 10분간 원심분리후 침전물을 10 mL의 PBS (pH 9.0~9.5)에 녹였다. 순도를 높일 경우 침전물을 x mL 물에 녹인 후 solution B에 의한 단계를 반복하였다.

#### 단백질정량 및 전기영동

각 난황 항체 분리물의 단백질 함량은 280 nm에서 용액의 흡광도(A<sub>280</sub>)를 측정하고 여기에 흡광계수(E=13.3)를 나눈 %값으로 구하였다. IgY의 순도를 분석하기 위한 SDS-PAGE는 Laemmli의 방법<sup>(10)</sup>을 참고하여 비환원조건하에서 SDS로 처리한 시료를 phastgel 4-15에 건 다음 PhastSystem™ (Pharmacia Biotech)을 이용하여 행하였다. 여기서 얻어진 각 band의 밀도를 Laser Densitometer (Pharmacia Ultrascan XL)를 이용하여 633 nm에서 측정하고 그 수치로 부터 순도를 구하였다. IgY의 표준품은 Sigma사 제품을 사용하였다.

#### 특이항체의 활성측정

효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 특이항체의 활성을 측정하고 그 흡광도로서 활성을 나타내었다. 즉, coating buffer (0.02 M Tris, 0.15 NaCl, pH 9.0)에 분산한 *S. mutans* (A<sub>660</sub>=0.05) 균체액 100  $\mu$ L를 microplate (Nunc, #446612)의 well에 분주후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 각 well을 washing buffer (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.4) 150  $\mu$ L로 3회 세척후 washing buffer에 희석한 항체(IgY) 용액 100  $\mu$ L씩 넣고 상온에서 1시간 처리하였다. 3회 세척후 washing buffer에 1/10,000로 희석한 2차항체(rabbit anti-chick IgY antibody-HRP conjugate, Sigma)를 100  $\mu$ L씩 상온에서 1시간 처리하였다. 3회 세척후 상기의 기질용액(0.01% TMB, 0.05 M citric acid-phosphate buffer, pH 5.0, 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용 직전에 첨가)을 100  $\mu$ L씩 첨가하고 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응정지액(2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 50  $\mu$ L씩 첨가하고 microplate reader (Molecular Devices, THERMOMax™)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

#### 특이항체의 함량분석

$\lambda$ -Carrageenan으로 분리한 조난황 항체 중 항 *S. mutans* 항체의 함량을 면역침강반응으로 구하였다<sup>(11)</sup>. 조난황 항체 용액 0.5 mL씩에 *S. mutans* 균체분산액 (A<sub>660</sub>=2.3)을 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL씩 혼합

하고 여기에 PBS buffer를 첨가하여 1.5 mL로 조절하였다. 37°C에서 1시간 처리한 후 4°C에서 하룻밤 방치하여 면역복합체(Ag-Ab complex)를 형성시켰다. 이때 균체분산액에서 유래하는 가용성 물질의 영향을 배제하기 위하여 IgY 용액 대신 PBS를 사용하여 위와 같이 처리한 것도 함께 준비하였다. 이들을 3,000×g에서 원심 분리하여 면역복합체를 제거하였다. 각 상정액의 흡광도(A<sub>280</sub>)를 측정하고 각기 그 값에서 항원 무첨가 처리군의 흡광도를 뺀 수치를 균체밀도에 대하여 plot하여 최저 흡광도를 구하였다. 이때, 흡광도는 3.0이하의 범위에서 난황 항체용액의 농도에 정비례함을 확인하였으므로 이를 상대적인 단백질 농도로 간주하였다. 용액의 전체 단백질 중 특이항체의 함량비를 다음식으로 구하였다.

$$\text{Specific IgY} = \frac{A_{280} \text{ of blank} - \text{minimal } A_{280}}{A_{280} \text{ of blank}} \times 100 (\%)$$

**특이항체의 균주특이성 조사**

ELISA에 의하여 혈청형이 서로 다른 충치 유발균주에 대한 특이항체의 반응성을 조사하였다. 각 균주 배양액으로부터 회수한 균체를 coating buffer에 분산한 액(A<sub>660</sub>=0.05), 100 μL를 microroplate의 well에 4°C, 하룻밤 코팅하였다. 이후의 과정은 앞에서 서술한 ELISA방법과 같이 행하였다. 다만, 이차항체는 원액을 1/2,000에서 1/500,000까지 희석배율을 달리하여 처리하였다. 최소흡광도의 50%를 나타내는 희석배율을 구하고 이로부터 각 균주에 대한 특이항체의 반응율을 구하였다.

**항체의 안정성 시험**

조난황 항체 중 IgY의 열안정성을 시험하기 위하여 우선 동결건조한 수용성 단백질을 증류수에 용해하여 1% 및 5%의 용액을 준비하였다. 이를 60~90°C 수욕조에서 5분간 가열하고 냉각한 후 앞의 방법에 따라 특이항체의 활성을 측정하였다. 또한, pH안정성을 조사하기 위하여 pH 5~9의 인산나트륨 용액 및 완충액과 여기에 인산용액을 첨가하여 pH 2~4로 조절한 용

액(0.05 M)에 수용성단백질을 1% 및 5%로 용해하여 37°C, 4시간 방치하였다. 그후 인산나트륨 용액으로 pH를 7.2로 조절하고 특이항체의 활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**난황항체의 분리효율 비교**

면역시킨 산란계의 난황은 특이항체를 함유하고 있으므로 난황을 직접 소재로서 사용할 수도 있다. 그러나, 난황 내의 지질은 항체의 항원에 대한 작용을 방해할 수 있어 항체를 난황으로부터 분리하여 사용하는 것이 바람직하다. 이를 위하여 본 연구에서는 natural gum인 λ-carrageenan을 이용한 분리방법, gammaYolk™에 의한 방법과 EGGstract™에 의한 방법으로 난황 항체를 각각 분리하고 그 효율성을 비교하였다.

난황 10 g으로 부터 항체를 분리하였을 때, 각 방법에 따라 얻은 최종용액의 단백질농도, 순도, 부피는 Table 1과 같다. 비환원상태하의 SDS-PAGE 전기영동도에서 표준품 IgY는 분자량 220 kDa부근에서 나타났으므로 이를 기준으로 scanning하여 순도를 구하였다 (Fig. 1). 환원 상태하의 SDS-PAGE에서 heavy chain

**Fig. 1. Non-reducing SDS-PAGE patterns of IgY solutions on 4-15% gradient Phastgel.** Lane 1, Solution by gammaYolk™ method; lane 2, Solution by EGGstract™ method; lane 3, Water soluble fraction by λ-carrageenan method; lane 4, Standard IgY; lane M, Molecular weight marker.

**Table 1. Efficiency of IgY separation by several methods**

Method	Protein conc. (mg/mL)	Purity (%)	IgY conc. (mg/mL)	Final vol. (mL)	Total IgY (mg)	IgY yield (mg/g yolk)
λ-Carrageenan	14.2	20	2.8	40	113	11.3
GammaYolk™	6.0	46	2.8	6	17	1.7
EGGstract™	3.7	48	1.8	10	18	1.8

(약 70 kDa)과 light chain (약 50 kDa)으로 나뉜 IgY band는 다른 불순물과 중복되어 나타남으로써 정량에 부적합하였다(data 생략). Fig 1에서 상업적인 IgY 분리키트인 gammaYolk™와 EGGstract™를 이용한 경우에 IgY순도가 각각 46, 48%로 높게 나타났으며, 순도를 높이기 위하여 설명서에 따라 한차례 더 추출단계를 반복한 경우에는 81%와 73%를 각각 나타내었다. 반면에  $\lambda$ -carrageenan방법의 경우 IgY순도는 20%로 낮았다(Fig. 1).

그러나, 단백질농도 및 부피를 고려한 IgY 회수율은 난황 1 g당 각각 1.7, 1.8, 11.3 mg으로 나타났으며 (Table 1), 분리시간은 각각 1시간이상, 35분, 20분 가량씩 소요되었다. 따라서  $\lambda$ -carrageenan방법이 다른 두 방법보다 IgY 분리순도는 낮지만 경제성, 간편성, 효율성에서 우수하여 많은 양의 난황항체를 처리할 때 유용한 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이후의 연구에서는  $\lambda$ -carrageenan방법으로 분리한 수용성 단백질 회분을 동결 건조하고 조난황 항체로서 사용하였다.

#### 전체 IgY 중에서 특이항체의 함량 분석

조난황 항체를 여러 농도의 *S. mutans*와 반응시키면역 복합체를 형성시킨 후 원심분리로 이를 제거하고 상정액중에 잔존하는 단백질의 양을 280 nm에서 측정하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 여기에서 상대적인 항원의 농도가 1.0일 때 상정액의 흡광도는 거의 바닥값을 나타내어 *S. mutans*에 대한 특이항체는 거의 제거되었음을 알 수 있다. 따라서 방법에 명시한 식에

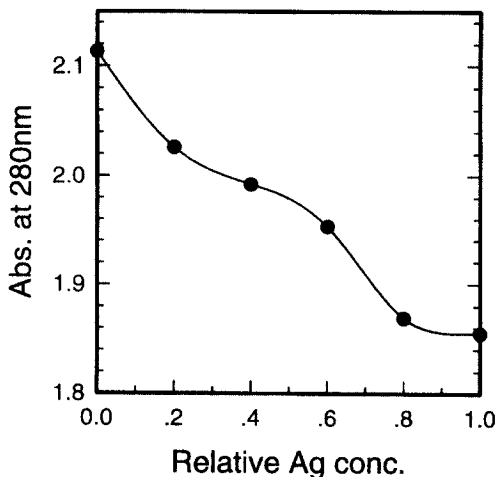


Fig. 2. Quantitative immunoprecipitation of specific IgY and *S. mutans*. The results were shown as the absorbance of the supernatants after removal of the immune complexes.

의하여 수용성 단백질중 특이항체의 비율은 다음의 계산과 같이 12.2%임을 알 수 있었다.

$$[(2.113-1.855)/2.113] \times 100 = 12.2 (\%)$$

또한, 조난황 항체의 IgY순도는 20%이므로(Fig. 1, Table 1), 난황항체(IgY)중에 함유된 특이항체의 비율은 다음의 계산과 같이 61%으로 나타났다.

$$(12.2/20) \times 100 = 61 (\%)$$

그러므로 전체적으로 계란 하나로부터 얻어지는 조난황 항체와 이에 포함된 IgY의 양은 다음과 같다. 계란 65 g에서 난황 15 g을 얻고, 이를  $\lambda$ -carrageenan 처리하여 수용성 단백질(조난황 항체) 0.85 g을 얻을 수 있다. 조난황 항체 중 20%인 170 mg이 난황 항체(IgY)이고, 이중 61%인 104 mg이 특이항체이다.

#### 특이항체의 균주특이성 조사

특이항체의 균주특이성을 세 종류의 충치유발균주(혈청형 b, c, f)에 대하여 조사하였다. Fig. 3의 ELISA결과와 같이 특이항체와 반응성이 가장 뛰어난 균주는 설탕 배지에서 배양한 혈청형 c (이하 c(+)로 표시)이었으며 다음으로 f(+), f(-), b(+), c(-)였으며, b(-)는 시험한 균주 중 다른 균주에 비하여 현저하게 낮은 반응성을 나타내었다. 그림에서 최고 흡광도인 2.8의 1/2 값에 해당하는 흡광도인 1.4를 나타낼 때의 항체 희석 배율을 구하고 그 수치를 비교하여, 특이항체의 각 균주에 대한 반응성을 Table 2에 나타내었다. 본 연구에서 생산한 특이항체는 c(+)에 대한 것이므로 c(+)에 대

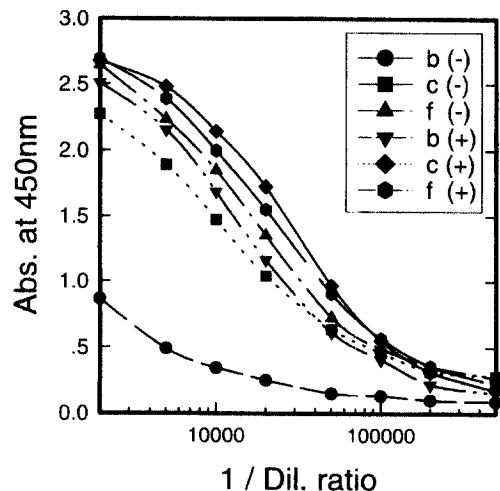


Fig. 3. Reactivity of specific IgY to *Streptococcus* strains at various dilution ratio.

**Table 2. Cross-reactivity of specific IgY to *Streptococcus* strains**

Serotype (sucrose)	EC <sub>50</sub> (1/dil. ratio)	Reactivity (%) <sup>1)</sup>
c (+)	29,940	100.0
c (-)	11,160	37.3
b (+)	14,520	48.5
b (-)	803	2.7
f (+)	24,840	83.0
f (-)	19,100	63.8

$$^1) \frac{EC_{50} \text{ of strain}}{EC_{50} \text{ of c(+)}} \times 100$$

한 반응율을 100%로 하였다.

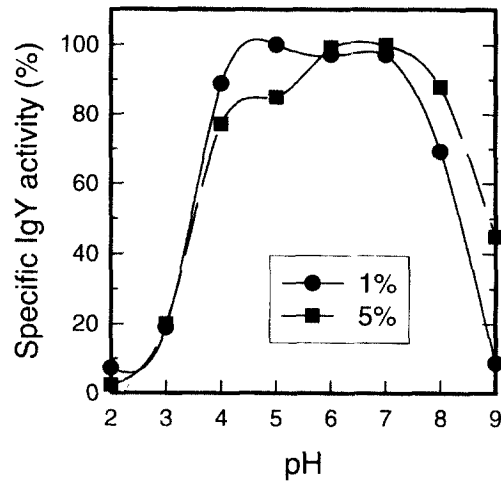
전체적으로 보면 특이항체는 설탕 존재하에서 배양한 균주와 48% 이상의 반응성을 보여 대체로 양호하였으나 설탕이 없는 배지에서 배양한 각 균주와의 반응성은 낮게 나타났다. 이는 설탕 존재하에 배양할 때 균체의 표면에 생성되는 항원이 특이항체와 잘 반응하기 때문으로 추측된다. 특히 혈청형 c 균주의 경우는 설탕첨가에 의하여 특이항체와의 반응성이 37.3%에서 100%로 증가한 것으로 미루어 그 효과가 큰 것으로 생각된다. 한편, 혈청형 b 균주의 경우는 무설탕 배지에서 배양시 특이항체와의 반응성이 3%이하로 매우 낮았다. 이는 아마도 특이항체의 생산시 면역원으로 사용한 *S. mutans*와는 다른 종인 *S. rattus*이었기 때문으로 생각된다.

**난황항체의 안정성**

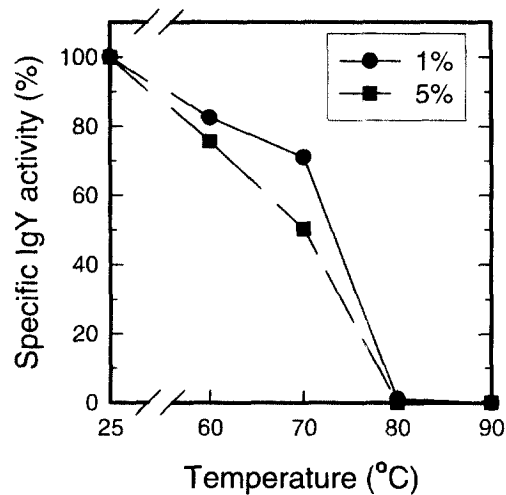
조난황 항체중에 존재하는 특이항체의 열과 pH 안정성을 조사하고, 그 결과를 특이항체에 의한 ELISA 값 (백분율)으로 나타내었다. 우선 pH안정성은 3이하에서는 매우 불안정하였으며 9에서 다소 불안정하였으나 4~8사이에서 대체로 안정하였다 (Fig. 4). 항체의 농도에 따른 차이는 심하지 않았다.

다음으로 열안정성은 대체로 온도 의존적으로 70°C 까지 조금씩 감소하여 50%이상의 활성을 나타내었으나 80°C이상에서는 급격히 감소하여 항체활성을 거의 상실하였다 (Fig. 5). 난황항체의 첨가 농도별로는 1%의 경우가 5%에 비하여 안정하였으며 (Fig. 5) 이보다 훨씬 낮은 농도인 0.001%의 경우에는 65°C까지 항체활성이 거의 감소하지 않았던 점으로 미루어<sup>2)</sup>, 낮은 농도에서 열안정성이 높은 것으로 생각된다. 4°C의 저온에서 난황항체의 항체활성은 수년간 저장하여도 유의적인 손실이 없어 매우 안정하다고 보고되었다<sup>4)</sup>.

본 연구에서 생산한 항 *S. mutans* 항체가 충치 예방



**Fig. 4. pH stability of specific IgY. Water soluble fraction of egg yolk (1% and 5% solution) was pH-treated for 4 hrs and residual activity of specific IgY was assayed by ELISA.**



**Fig. 5. Heat stability of specific IgY. Water soluble fraction of egg yolk (1% and 5% solution) was heat-treated for 5 min and residual activity of specific IgY was assayed by ELISA.**

효과를 나타내기 위해서는 구강내 치아표면 등에 존재하는 충치 유발균주와의 접촉이 중요하다. 그리고 난황항체를 충치 예방용 식품이나 구강제에 활용하는 경우에 제조과정 중 항체활성을 유지하여야 하는데, 위에서 조사한 바와 같이 난황항체는 열과 pH에 대한 안정성이 비교적 양호하므로 가공중 고온이나 극심한 pH 처리를 피하면 일반적인 가공상의 큰 문제는 없을 것으로 생각된다.

## 요 약

충치유발균인 *Streptococcus mutans* (혈청형 c)를 면역한 산란계의 난황에서 항체를 분리하고 그 특성을 조사하였다. 먼저 난황으로부터 항체의 추출효율을 검토하였을 때,  $\lambda$ -carrageenan, gammaYolk™, EGGstract™의 방법으로 얻은 추출물 중 항체의 순도는 전기영동에서 각각 20, 46, 48%로 나타났으며, 난황 1 g에서 얻은 항체의 수율은 각각 11.3, 1.7, 1.8 mg이었다. 정량면역침강반응의 결과,  $\lambda$ -carrageenan방법으로 얻은 조난황 항체 중 특이항체의 비율은 12.2%이었다. 이로부터 계란 하나분인 15 g의 난황에서 얻은 0.85 g의 조난황 항체에는 특이항체가 100 mg가량 함유되어 있음을 알 수 있었다. 세 종류 충치유발균주(혈청형 b, c, f)에 대한 특이항체의 반응성을 조사하였을 때, 설탕 첨가배지에서 배양한 균주는 c(+), f(+), b(+),의 순으로 48%이상의 높은 반응성을 나타내었으나 무설탕 배지에서 배양한 균주의 반응성은 각각 이보다 낮게 나타났다. 조난황 항체의 열 및 pH안정성은 양호하여, 70°C까지 50%이상의 활성을 유지하였고 pH 4~8에서 대체로 안정하였다.

## 문 헌

- Polson A. and von Wechmar, M.B.: Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.*, **9**, 475-481 (1980)
- Shimizu, M., Fitzsimmons, R.C. and Nakai, S.: Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.*, **53**, 1360-1366 (1988)
- 八田一, 赤地重光, 金武祚: 鶏卵抗體の大量生産および産業利用技術の開発. 日本農藝化學會誌, **68**, 1457-1462 (1994)
- Larsson, A., Balow, R.M., Linda, T.L. and Forsberg, P. O.: Chicken antibodies; taking advantage of evolution -a review. *Poultry Sci.*, **72**, 1807-1812 (1988)
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T.: Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1077-1081 (1993)
- Hamada, S. and Slade, H.D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, **44**, 331-384 (1980)
- Filler, S.J., Gregory, R.L., Michalek, S.M., Katz, J. and McGhee, J.R.: Effect of immune bovine milk on *Streptococcus mutans* in human dental plaque. *Arch. Oral Bio.*, **36**, 41-47 (1991)
- Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Kawabata, S., Hiraoka, J., Fujiwara, T. and Ooshima, T.: Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immunol.*, **59**, 4161-4167 (1991)
- Otake, S., Nishihara, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T. and Hirasawa, M.: Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). *J. Dent. Res.*, **70**, 162-166 (1991)
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 日本生化学會 編: 免疫生化学研究法: 續生化学實驗講座, Vol.5. 東京化学同人, 東京, Pp.1-83. (1986)

(1998년 7월 2일 접수)