

海外で実施した機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) を含有する 鶏卵粉末の野外評価試験

(株)ゲン・コーポレーション 抗体事業カンパニー ゲン免疫研究所 児玉義勝

はじめに

卵黄 γ -リベチンの作製はトリに備わっている「卵黄内への輸送機構」の仕組みを利用する。トリに免疫する接種抗原の種類を変えるだけで、異なる様々な γ -リベチンが開発できる。

リベチンとは、卵黄タンパク質に約30%含まれる卵黄水溶性タンパク質のことであり、 α -、 β -および γ -リベチンの3種類に分類される。それぞれの存在比は、2:3:5であると報告されている(J. Biol. Chem., 179, 349, 1949)。また、 α -リベチンは親鶏の血清アルブミン、 β -リベチンは血清 α 2-グロブリンおよび、 γ -リベチンは血清 γ -グロブリン(IgY)と同一であることが免疫学的に証明されている(Can. J. Biochem. Physiol., 36, 153, 1958)。

筆者らは、この「卵黄内への輸送機構」の仕組みを利用して、ブタの消化・吸収に障害を与えることにより増体量ならびに飼料要求率が低下する、腸管毒素原性大腸菌(K88、K99、987PおよびF18線毛抗原)、浮腫病に因与する大腸菌(O-139およびO-141)、サルモネラ菌(*Salmonella typhimurium*)、クロストリジウム・パーフリゲンズ(毒素も含む)、ロタウイルス、TGEウイルスおよびPEDウイルスなどに対する卵黄 γ -リベチンを開発してきた。

これらの機能性リベチンを含有する鶏卵を粉末化したものを混合飼料として実用化している。鶏卵生産システムを活用することで、病原体ごとに高い活性を有する機能性リベチンを含有する鶏卵粉末について安定して製造でき、現在、10種類のラインナップをもつ。給与する豚の日齢や、用途に合わせて、各種の鶏卵粉末をブレンドして最終製品(混合飼料)を提供している。

ここでは、生産性阻害のメカニズム、卵黄 γ -リベチンの作用メカニズム、腸管内での安定性および、海外で実施し

た機能性リベチンを含有する鶏卵粉末の野外評価試験の結果について紹介したい。

1. 生産性阻害のメカニズム

腸内に生息しているグラム陰性桿菌の内毒素を動物に与えると、増体量ならびに飼料要求率が低下すること、またアヒルに死菌ワクチンを注射すると、増体量が約10%低下し、胸肉歩留も5%低下することが古くから知られている。これらの観察は腸内の細菌性毒素による免疫刺激と生産性低下がリンクしていることを想像させる。

ウイソコンシン州立大学のMark E. Cook教授はその関連性を詳細に研究し、図1に示したような生産性低下のメカニズムを発表した(Feedstuffs, 2000)。

それによると、腸内微生物の増殖によって免疫細胞が活性化されることで、腸管に炎症を起こすTNF- α 、インターロイキン1- β などのサイトカインが誘導される。これが

図1 生産性阻害のメカニズム (Mark. E. Cook)

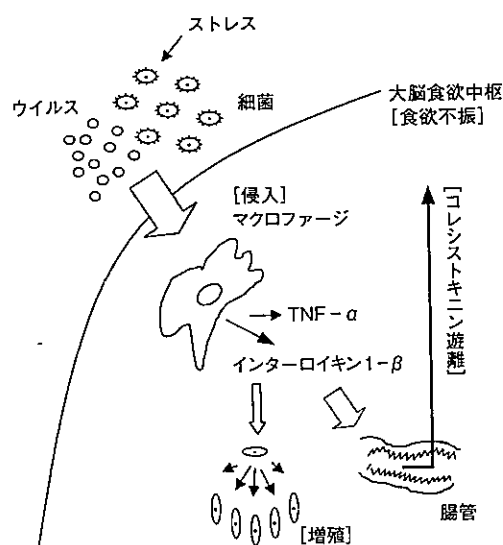
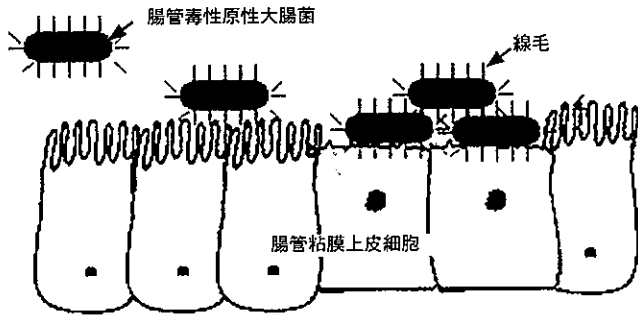


図2-1 腸管毒素原性大腸菌は、菌体表面の線毛によって腸管粘膜上皮細胞に接着してから増殖する



血中に流入すると筋肉組織が破壊され、神経伝達物質として知られているコレシストキニン (CCK) が消化管から遊離して血行に入り、大脳食欲中枢の機能が制御できなくなる。その結果として、食欲不振に陥り動物の生産性は低下する。事実、ブロイラーとブタを用いた実験で、抗CCK抗体を経口投与すると、増体量と飼料要求率は回復する。

抗菌性成長促進剤のメカニズムは、グラム陰性腸内細菌の増殖を抑制することにより免疫細胞の活性化が制御されるため、正常な生産性が維持できるというものである。しかしながら、成長促進剤としての抗菌性物質の使用は「安全・安心」の観点から、国際的に危惧されており、それに代わる機能性素材の開発が望まれている。

2. 卵黄γ-リベチンの作用メカニズム

腸管毒素原性大腸菌はK88、K99、987P、F18などの線毛抗原を有しており、これらの線毛が腸管粘膜絨毛上皮細胞に接着して増殖し、各種のエンテロトキシンが産生される (図2-1)。これらの毒素は強力な細胞障害および免疫刺激となって炎症を引き起こし、生産性に悪影響を及ぼす。筆者らは、腸管毒素原性大腸菌の腸管粘膜絨毛上皮細胞への接着を阻害して菌増殖を抑制することで生産性を向上させることを試みた。即ち、腸管毒素原性大腸菌の接着因子である線毛に対する卵黄γ-リベチンを経口投与することによって消化管内で卵黄γ-リベチンが菌体表面の線毛に結合し、上皮細胞への定着を阻害して、便として排せつされる。このことにより、腸管毒素原性大腸菌の増殖が抑制されてエンテロトキシンによる炎症も抑制される (図2-2)。図3の写真は、卵黄γ-リベチン投与試験のブタ回腸部の走査電子顕微鏡像である。対照群では多数のK88線毛産生大腸菌が定着しているが、卵黄γ-リベチン投与群ではこのような定着像は観察されない (Infect Immun ; 60 : 998-1007, 1992)。

図2-2 機能性リベチンを含有する鶏卵粉末を給与すると卵黄γ-リベチンが線毛に特異的に結合することによって、腸管毒素原性大腸菌は、腸管粘膜上皮細胞に接着できなくなり、増殖が抑制される

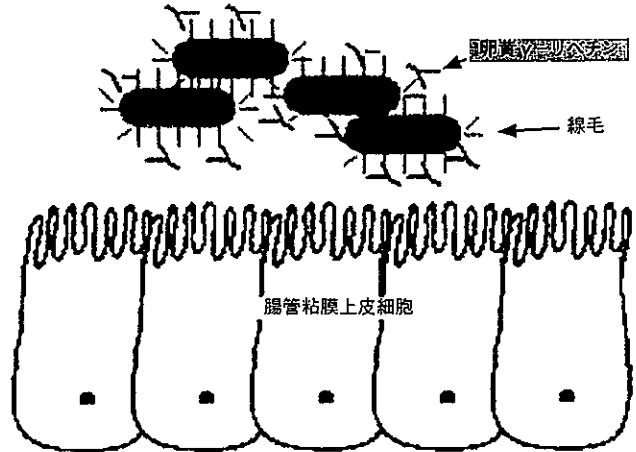
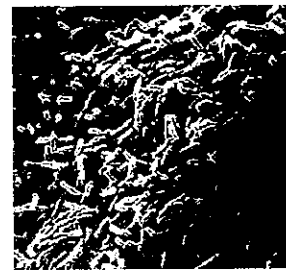
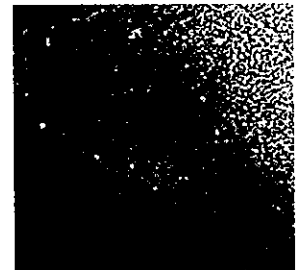


図3 定査電子顕微鏡像

対照群



卵黄γ-リベチン投与群



一方、ロタウイルスは腸管粘膜の絨毛上皮細胞に感染して細胞を破壊する (図4-1)。感染により絨毛は正常時の10分の1に萎縮し、それが回復するのに数日を要する。この間、消化・吸収機能は停滞するので著しい発育遅延が起こる。これに対し、ロタウイルスに対する卵黄γ-リベチンを経口投与すると、消化管内で卵黄γ-リベチンがロタウイルスに結合してウイルスの不活化が起こり、絨毛上皮細胞への感染力を失い死滅する (図4-2)。抗菌性物質にはこのようなウイルス不活化機能は認められない (Vet Microbiol ; 37 : 135-146, 1993)、(Arch Virol ; 138 : 143-148)。

3. 卵黄γ-リベチンの腸管内での安定性

卵黄γ-リベチンは、分子量180kDaからなるタンパク質である。よって、経口投与した卵黄γ-リベチンは、胃酸および消化酵素による変性や分解によって卵黄γ-リベチンが抗原結合力を失うことが想像されるので、筆者らはブタを用いて消化管内での卵黄γ-リベチンの安定性を検証した。

図4-1 ロタウイルスは腸管粘膜上皮細胞に感染して増殖し、細胞破壊を起こすため栄養素の吸収が抑制される

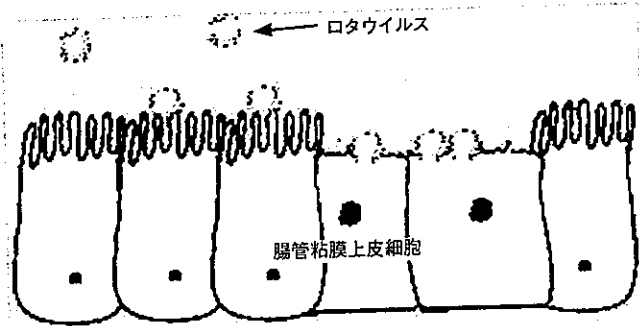


図4-2 機能性リベチンを含有する鶏卵粉末を給与すると、卵黄γ-リベチンがロタウイルスに特異的に結合して、ウイルスを不活化するため、腸管粘膜上皮細胞の破壊は起こらない

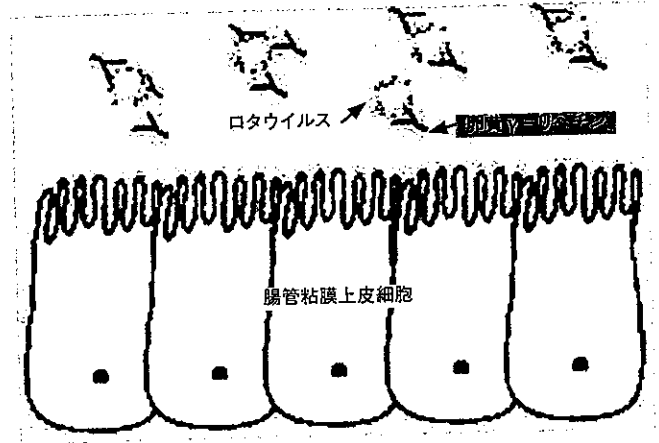
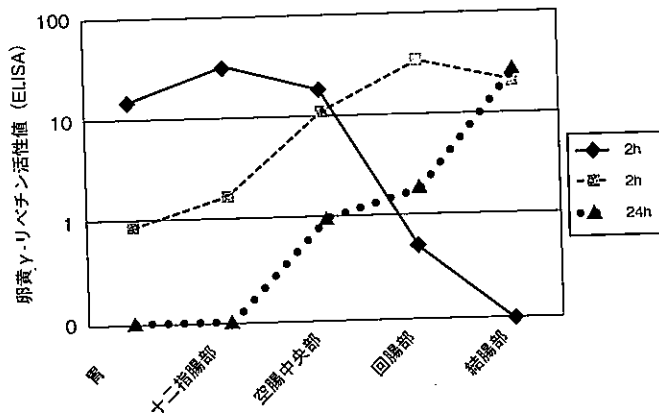


図5 機能性リベチンを含有する鶏卵粉末を子ブタに給与したあとの消化管各部における卵黄γ-リベチン活性の推移



●子ブタへの投与

生後6日齢の子ブタにK88線毛抗原に対する卵黄γ-リベチンをミルクに溶解して単回投与した。その後2時間目、6時間目、24時間目に安楽死させ、胃、十二指腸部、空腸中央部、回腸部および結腸部から消化管内容物および粘膜を採取し、卵黄γ-リベチンを回収した。抗原結合活性を確認するために、K88線毛抗原を固相化したELISAプレートを用いて評価した。図5に結果を示した。卵黄γ-リベチンを投与してから2時間後では、K88線毛抗原に結合する卵黄γ-リベチンが胃から回腸部に検出され、その活性のピークは胃から空腸部であった。6時間後ではそのピークは回腸部から結腸部に移行し、24時間後にはそのピークは結腸部に検出された。このように、各消化管内容物および粘膜の採取検体から抗原結合活性を示す卵黄γ-リベチンが検出されたこと、時間の経過とともに高い抗原結合活性を維持して腸管上部から下部に移行したことから、胃酸や消化酵素の影響をほとんど受けていないと考えられる (Am J Vet Res ; 54 : 867-872, 1993)。

●母豚への投与

直接的な証明ではないが、生産現場において母豚に経口摂取させた試験内容を紹介します。分娩約1週間前から分娩後1週の期間に、O-139血清型大腸菌、O-141血清型大腸菌、K88線毛、クロストリジウム、ロタウイルスに対する卵黄γ-リベチンを含有する本鶏卵粉末を1日10g通常飼料とともに8頭に与え、本鶏卵粉末の無給与の8頭を対照とした。分娩約1週間前時と分娩後1週時に各母豚より新鮮便を採材して、ふん便中の生菌数を測定した。

その結果は以下のものであった。O-141血清型大腸菌の菌数において、本鶏卵粉末無給与の対照群では分娩約1週間前時 $10^{6.1}$ CFU/g、分娩後1週時 $10^{6.4}$ CFU/gと増加しているのに対して、本鶏卵粉末給与の試験群では、分娩約1週間前時 $10^{6.8}$ CFU/g、分娩後1週時 $10^{5.6}$ CFU/gと減少を認めた (図6-1、6-2)。同様に、クロストリジウム・パーフリゲンズでは、対照群は分娩約1週間前時 $10^{4.8}$ CFU/g、分娩後1週時 $10^{4.7}$ CFU/gと変動がないのに対して、試験群では分娩約1週間前時 $10^{5.2}$ CFU/g、分娩後1週時 $10^{4.2}$ CFU/gと減少を認めた (図6-3、6-4)。

この試験結果より、母豚に経口摂取された卵黄γ-リベチン含有本鶏卵粉末は、その抗原結合活性が腸管まで保持して運ばれ(一部は変性、失活していると考え)、各標的病原体と結合して、菌の増殖を抑制していることが示唆される。

4. 機能性リベチンを含有する鶏卵粉末の野外評価試験

●ベトナムでの実施例

試験農場A、BおよびCの3ヶ所で、各々195頭、175頭

図6-1 O-141血清型大腸菌

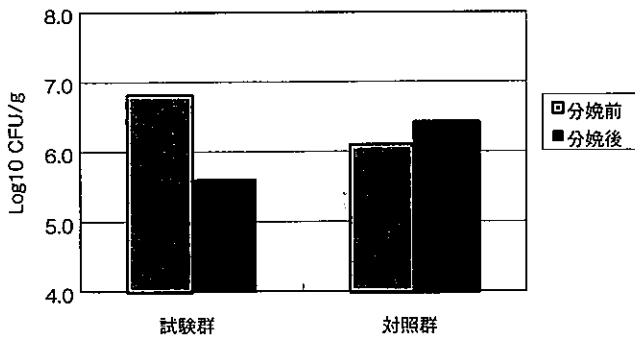


図6-2 大腸菌群

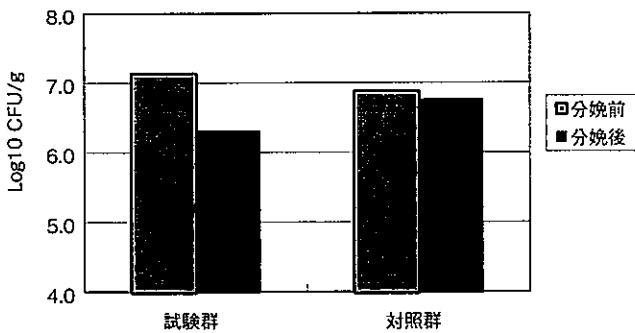


図6-3 C.perfringens

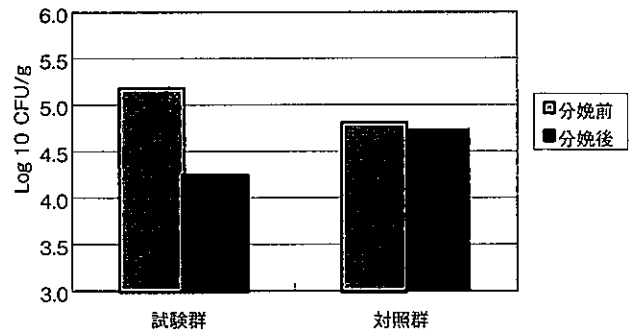


図6-4 菌数減少 (分娩後菌数-分娩前菌数)

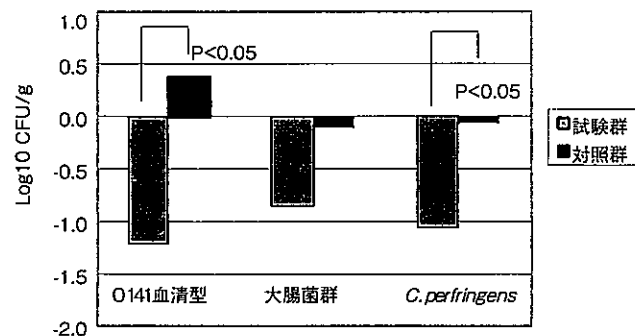


表1-1 ベトナムA農場における機能性リベチンを含有する鶏卵粉末の飼料添加が豚の生長促進に及ぼす効果 (Nguyen Van Sa ら、2005)

項目	試験群	対照群	SD	差 (%)
使用頭数	99	96		
開始時体重 (kg)	1.52	1.49	0.021	+2
最終体重 (kg)				
14日	4.07	3.65	0.072	+11.5a
28日	7.77	6.62	0.140	+17.4a
42日	13.53	12.16	0.230	+11.2a
60日	23.82	22.58	0.401	+5.5a
平均1日増体量 (g)				
14~28日	264	212	7.64	+24.5a
28~42日	412	396	10.42	+4.04a
42~60日	576	571	14.21	+0.9
14~60日	429	411	9.80	+4.4
飼料要求率 (FCR)				
14~28日	0.303	0.363	0.035	-16.5a
28~42日	1.21	1.31	0.050	-7.6
42~60日	1.46	1.55	0.031	-5.8
死亡頭数 (%)	8 (8.33)	6 (6.06)		-2.3

a: p<0.05

*離乳前14日齢から60日齢まで、本鶏卵粉末0.2% (2kg/t) 飼料添加

表1-2 ベトナムB農場における機能性リベチンを含有する鶏卵粉末の飼料添加が豚の生長促進に及ぼす効果 (Nguyen Van Sa ら、2005)

項目	試験群	対照群	SD	差 (%)
使用頭数	88	87		
開始時体重 (kg)	1.31	1.31	0.002	0
最終体重 (kg)				
14日	3.36	3.34	0.021	+0.6
28日	7.43	6.57	0.032	+13.1a
42日	12.5	10.8	0.11	+15.7a
60日	20.6	18.4	0.165	+12.0a
平均1日増体量 (g)				
14~28日	290	230	4.13	+26.1a
28~42日	360	302	6.20	+19.2a
42~60日	450	423	6.50	+6.4a
14~60日	374	327	9.72	+14.4a
飼料要求率 (FCR)				
14~28日	0.31	0.34	0.018	-8.8
28~42日	1.33	1.45	0.062	-8.3
42~60日	1.58	1.69	0.034	-6.5
死亡頭数 (%)	1 (1.2)	6 (7.3)		-6.1

a: p<0.05

*離乳前14日齢から60日齢まで、本鶏卵粉末0.2% (2kg/t) 飼料添加

表1-3 ベトナムC農場における機能性リベチンを含有する鶏卵粉末の飼料添加が豚の生長促進に及ぼす効果 (Nguyen Van Sa ら、2005)

項目	試験群	対照群	SD	差 (%)
使用頭数	44	47		
開始時体重 (kg)	1.28	1.39	0.031	-8.0a
最終体重 (kg)				
14日	4.40	4.61	0.102	-4.6
28日	7.03	7.06	0.167	-0.4
42日	11.8	11.5	0.27	+2.6
56日	17.9	16.6	0.420	+7.8a
平均1日増体量 (g)				
14~28日	187	178	8.82	+5
28~42日	341	315	11.3	+8.2a
42~56日	433	365	18.5	+18.6a
14~56日	321	285	9.52	+12.6a
飼料要求率 (FCR)				
14~28日	0.333	0.413	0.045	-19.4
28~42日	1.23	1.47	0.088	-16.3
42~56日	1.48	1.65	0.062	-10.3
死亡頭数 (%)	1 (2.27)	8 (17)		-14.8

a: p<0.05

*離乳前14日齢から56日齢まで、本鶏卵粉末0.2% (2kg/t) 飼料添加

および91頭のブタを用いて生産現場における評価試験を実施した。本製品は離乳2週間前からプレスター飼料およびスター飼料に0.2%添加して60日齢まで給与した(農場AおよびB)。農場Cでは56日齢まで給与した。試験結果を表1-1、表1-2および表1-3に示した。農場AおよびBの対照群とテスト群の試験開始時体重に有意な差はなかった。対照群に対して、テスト群の期間体重ならびに1日平均増体量は農場AおよびBともに有意な増体効果を示した。とくに、14~28日の1日平均増体量はA農場で24.5%およびB農場で26.1%の改善効果を認めた。これと連動してテスト群で飼料要求率の改善が認められた。とくに、飼料要求率の最も大きな改善効果は農場Aの14~28日のテスト群で16.5%の改善効果であった。

また、テスト群の事故率ならびに下痢発生率は減少した。農場Cでは、両群の試験開始時体重が異なり、テスト群および対照群で各々1.28kgおよび1.39kgであった。しかしながら、56日齢でのテスト群の平均体重は逆転し有意な増体効果を示した。とくに、テスト群の42~56日の1日平均増体量は18.6%向上した。3ヶ所の農場で行った試験結果はすべて有意な生産性の向上が確認された。

表2 台湾における機能性リベチンを含有する鶏卵粉末の飼料添加が豚の生長促進に及ぼす効果 (Chan-Yeu Liu, 2002)

項目	試験群	対照群	差 (%)
・開始体重 (kg)	4.01	4.05	—
・期間体重 (kg)			
14~28日	8.04	7.82	—
28~56日	20.72a	18.85	—
56~120日	74.38b	70.39	—
120~180日	116.21b	107.96	—
・平均1日増体量 (g)			
14~28日	288a	269	+7.1
28~56日	449a	393	+19.2
56~120日	778a	734	+6.0
120~180日	838b	767	+9.3
・1日平均食下量 (g)			
56~120日	2081	2021	+3.0
120~180日	2669	2559	+4.3
・飼料要求率			
56~120日	2.676	2.752	-2.8
120~180日	3.185	3.336	-4.5

a: p<0.05; b: p<0.01

*本試験は Animal Technology Institute Taiwan で実施した。

●台湾での実施例

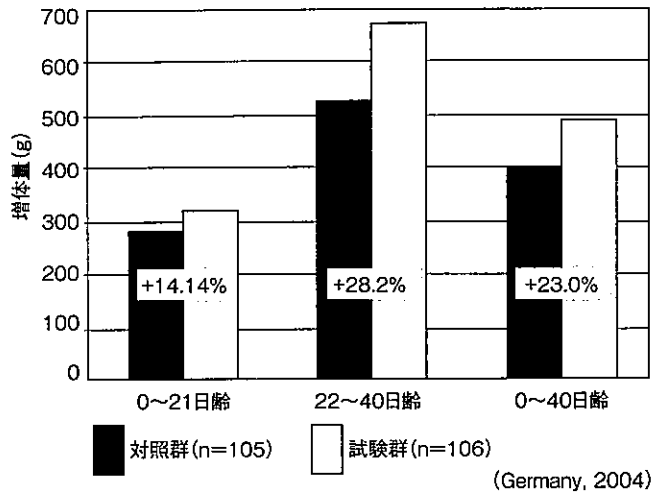
本試験には160頭のブタを用い、本製品の添加量はプレスター飼料およびスター飼料に各々0.2%および0.1%添加し、56日齢まで給与した。生産性の評価軸は期間体重(kg)、1日平均増体量(g)、1日平均食下量(g)および飼料要求率とし、180日齢まで追跡調査を実施した。

試験結果を表2に示した。両群の試験開始時に差は認められなかった。テスト群の14~28日、28~56日、56~120日および120~180日の期間平均体重は対照群に対して有意な増体効果を示した。同様に、テスト群の14~28日、28~56日、56~120日および120~180日の1日平均増体量は各々7.1%、19.2%、6.0%および9.3%の有意な増体効果が観察された。56~120日および120~180日の1日平均食下量は各々3.0%および4.3%増加した。56~120日および120~180日の飼料要求率は各々2.8%および4.5%の改善効果が認められた。

●ドイツでの実施例

本試験には211頭のブタを用い、本製品の添加量はプレスター飼料およびスター飼料に各々0.2%および

図7-1 ドイツにおける野外評価試験 1日平均増体量(g)の推移



0.1%添加して評価した。結果は図7-1 および図7-2に示した。テスト群の1日平均増体量は対照群に対して23%の改善効果が認められ、飼料要求率も16%改善された。

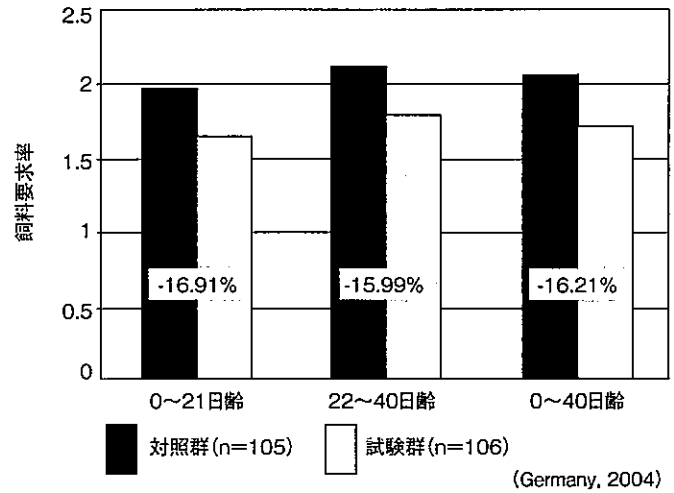
本製品の投与プログラム設定の根拠はプレスターター期間では母乳中の免疫グロブリン量が激減するため、腸管感染症の病原体に対する卵黄γ-リベチンを飼料に補給することによって、母豚のふん便を介した細菌ならびにウイルスによる垂直伝播を防止するためである。また、離乳時から60日までの期間はブタ自身の免疫力が未成熟であること、また腸内フローラも不安定であることから、細菌ならびにウイルスに感染しやすいためである。加えて、この期間には各種のワクチン接種が集中するため、ブタに強い免疫刺激の負荷(ストレス)がかかるためである。この試みは非常に有効な生産性改善の手段であると言える。

おわりに

ブタにおける生産性の低下は腸管内に生息している細菌、ウイルスなどが、ストレスの影響で異常増殖することによって誘導された炎症性サイトカインが、その引き金の役割を果たす。身近な例はヒトの炎症性腸疾患であるクローン病に類似していると思われる。その主要な症状は下痢、腹痛、体重減少などである。治療には炎症性サイトカインの働きを止める免疫療法が1次選択として広く施行されている。原因は不明であるが、正常腸内細菌叢の破綻が関係すると言われている。

卵黄γ-リベチンの作用メカニズムの項で説明したように、各種細菌の線毛、毒素ならびにウイルスに対する卵黄γ-リベチンは、腸管絨毛上皮細胞への標的病原体の接着を阻害し、病原体から産生される毒素を中和して無毒化し、またウイルスを不活化して死滅化することにより炎症反応の進

図7-2 ドイツにおける野外評価試験。飼料要求率の推移



行が抑制されて、最終的には生産性の低下が改善されると考えられる。

海外で実施した野外評価試験の結果は、すべての国で、機能性リベチンを含有する鶏卵粉末の有意な増体効果と飼料要求率の改善効果が観察された。

世界に共通して、食の「安全・安心」を確保する観点から、本製品は鶏卵粉末であるため抗菌性物質と異なり、薬剤耐性化の性質がなく、また食経験も長く安全である。本製品は日本をはじめとし、米国、EU各国、ロシア、南アフリカ、ニュージーランド、タイ、フィリピン、ベトナム、台湾、韓国などで使用されている。