

卵黄 γ -リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) の腸管毒素原性大腸菌 K99 抗原およびウシコロナウイルス抗原に対する抗原結合力と経口受動免疫効果との関連

▼(株)イーダブルニュートリション・ジャパン

児玉義勝

はじめに

卵黄 γ -リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) の作製は鳥類に備わっている「卵黄内への輸送機構」の生物学的な仕組みを利用する。これはニワトリに感作する抗原の種類を変えるだけで、特異性の異なる様々な卵黄 γ -リベチンが生産できる。リベチンとは、卵黄タンパク質に約30%含まれる水溶性タンパク質のことで、 α -、 β -および γ -リベチンの3種類に分類される。各々の存在比は2対3対5であることが報告されている¹⁾。また、 α -リベチンは親鳥の血清アルブミン、 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²⁾。

筆者らは、この「血清 γ -グロブリンの卵黄内への輸送機構」を利用して、子牛の消化・吸収に障害を与えることにより増体重および飼料要求率に悪影響を及ぼす腸管毒素原性大腸菌、サルモネラ菌 (*S. typhimurium* および *S. Dublin*)、ロタウイルス (G6 および G10 型)、ウシコロナウイルスならびにクリプトスポリジウム原虫に対する卵黄 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の卵黄 γ -リベチンを含有する鶏卵粉末が安定して製造ができている。給与する子牛の日齢や用途に

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。子牛における下痢症は、上記の病原体感染による発症が60~70%であり、重症化により死亡率、損耗率へと影響する。この機能性リベチンを含有する鶏卵粉末を代用乳への添加、ペースト形態として給与することで、健康な子牛の育成に役立てることができる。

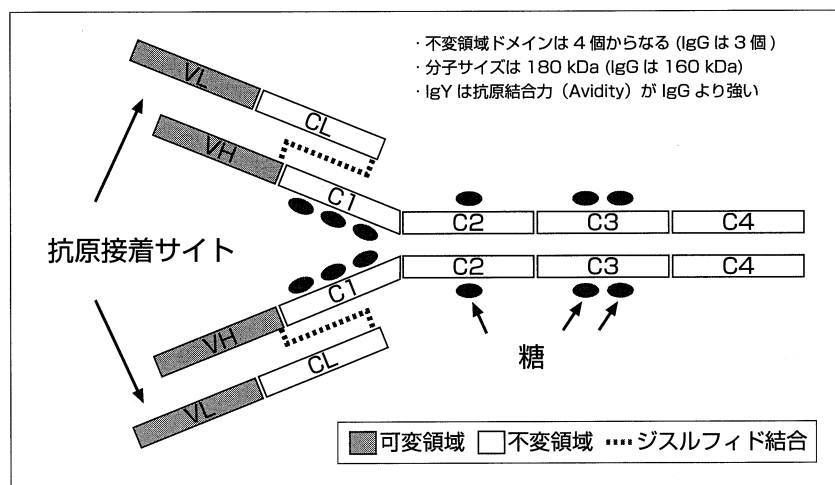
ここでは、Immunoglobulin Yolk (IgY) の性状、作用メカニズム、子牛消化管での安定性、IgY と IgG の抗原結合力の比較およびIgYを経口受動免疫に応用する利点などについて紹介をしたい。

IgYの性状

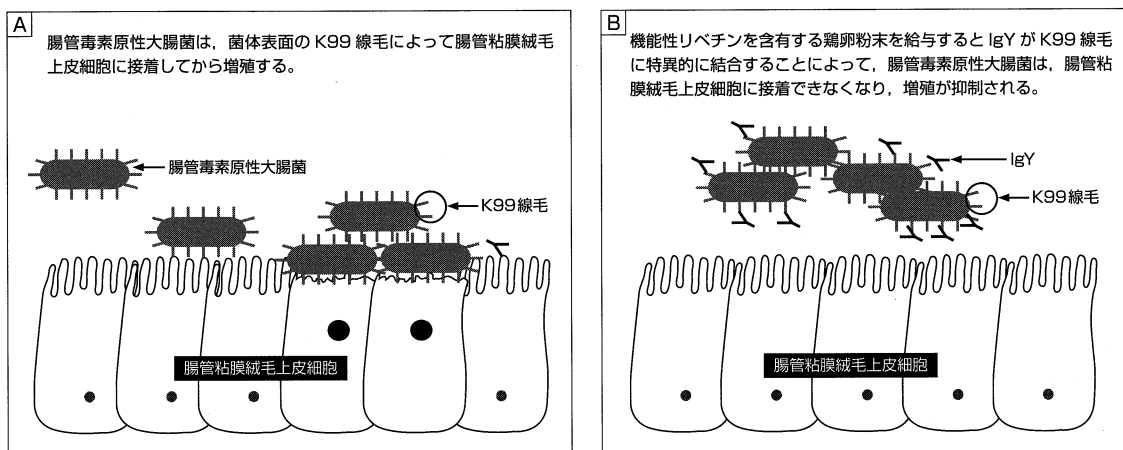
ニワトリ卵黄中のIgYは7SタイプのIgGであり、 γ -リベチン (livetin) とも呼ばれている。哺乳類IgGよりも分子サイズは大きく180キログルトン (kDa) である。IgY分子の特徴は、図-1に示したようにH鎖不変領域が4個のドメインからなっており、H鎖に関しては哺乳類IgGとまったく異なる構造である。

IgYの作用メカニズム

ウシ由来の腸管毒素原性大腸菌は菌体表面にK99線毛抗原を有しており、この線毛が腸管粘膜絨毛上皮細胞に接着して増殖し、エンテロトキシンが産生される (図-2A)。



【図-1】 IgYの構造



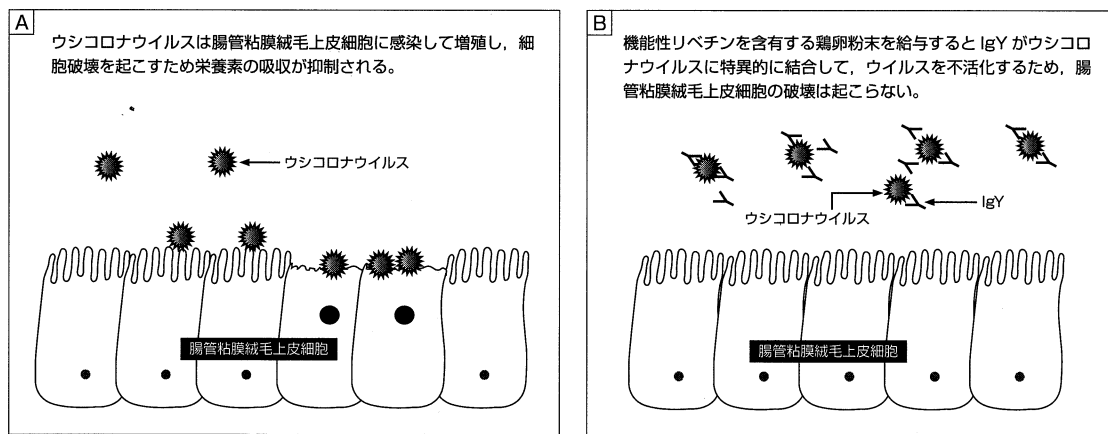
【図-2】 腸管毒素原性大腸菌に対するIgYの腸管粘膜絨毛上皮細胞への防御作用機序

こ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。筆者らの実験では、K99線毛抗原に対するIgYが本大腸菌の腸管粘膜への接着を抑制することによって菌増殖が阻害され、その結果、子牛の生産性が向上した³⁾(図-2B)。一方、コロナ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-3A)。感染により絨毛は正常時の1/10に萎縮し、それが回復するのに数日間かかる。この間、消化・吸収機能は停滞するので発育遅延が起こる。これに対して、コロナウイルスに対するIgYを経口摂取すると、腸管内で本ウイルスと結合して不活化(中和)が起こり、絨毛上皮細胞への感染力を失い死滅する⁴⁾(図-3B)。なお、抗菌性成長促進剤はこのようなウイルス中和機能を持たない。

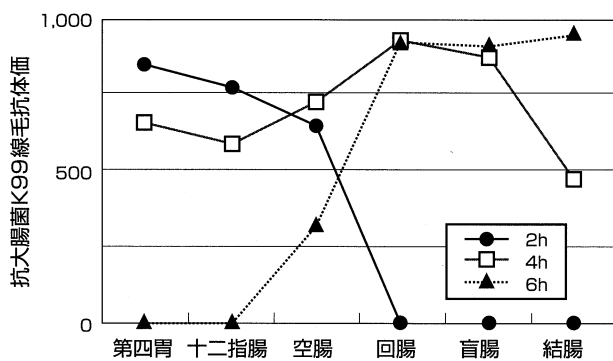
子牛消化管内でのIgYの安定性

IgYは分子サイズ180 kDaからなるタンパク質であり、経口投与したIgYは胃酸・消化酵素によって変性または分解を受けて抗原結合力を失う可能性がある。そこで、生後7日齢の子牛に、K99線毛抗原に対するIgY含有鶏卵粉末をミルクに溶解して単回投与後、2時間、4時間および6時間後に安楽死させ、第四胃、十二指腸部、空腸中央部、回腸部、盲腸部ならびに結腸部の粘膜組織を採取して残存しているIgYの抗体活性をELISAで測定した。

その結果、図-4に示したように、投与2時間目の活性値のピークは胃から空腸部に認められ、4時間後にはそのピークは回腸部から盲腸部に移行し、6時間後にはそのピークは盲腸部から結腸部にかけて観察された。



【図-3】 ウシコロナウイルスに対するIgYの腸管粘膜絨毛上皮細胞への防御作用機序



【図-4】 子牛の消化管におけるIgYの動態

この観察結果から、経口投与したIgYの抗原結合活性のピークは経時的に消化管上部から下部に移行したことより、胃酸ならびに消化酵素の影響をほとんど受けないで消化管下部まで移行したと考えられる⁵⁾。

IgYとウシ初乳IgGの抗原結合力の比較

確実な経口受動免疫を誘導するためには抗原結合力(Avidity)は、最も重要な要素である。

1. In Vitro 試験

抗K99 IgYと抗K99 IgGのK99抗原に対する抗原結合力の差異をELISAを用いた2種類の免疫競合試験を実施した。第1試験では、抗K99 IgYをプローブとし、抗K99 IgGをコンペティターとした。第2試験では、逆に抗K99 IgGをプローブとし、抗K99 IgYをコンペティターとして実施した。本プローブはELISA抗体価が1倍から128倍

に希釈調整し、本コンペティターは1,024倍の抗体価に調整したものを本試験に用いた。各希釈について対照OD値に対してコンペティターを加えた時のOD値の減少率を抗原結合抑制率とした。IgYとIgGのすべての組み合わせで試験を行い、各組み合わせにおいてK99抗原結合抑制率の平均値を算出した。

その結果、抗K99 IgGをコンペティターとした場合は、これらのK99抗原結合抑制率は0～30%に過ぎなかった(図-5A)。これに対してIgYをコンペティターとした場合には、抗K99 IgGのK99抗原への結合は、すべての希釈において40%から80%と強く抑制された(図-5B)。これらことから、IgYはIgGと比較し強い抗原結合力を有することが示唆された⁶⁾。

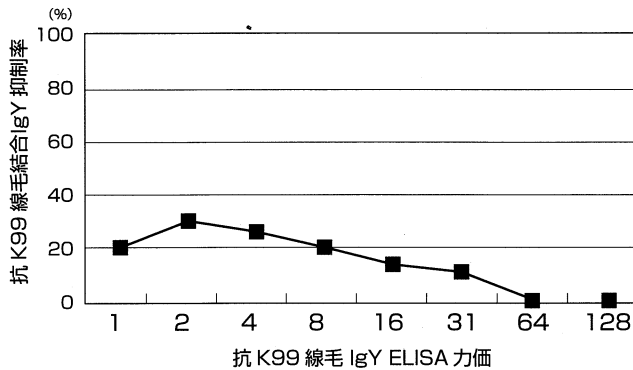
2. In Vivo 試験

抗コロナウイルスIgYならびにウシ初乳IgGの経口受動免疫効果を感じ子牛を用いて比較検討した。

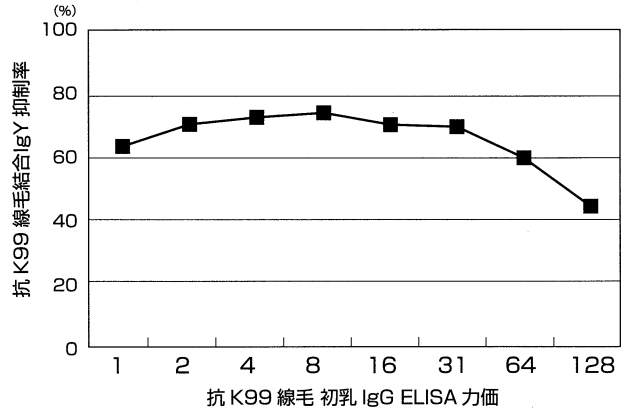
初乳未摂取のホルスタイン種の新生子牛23頭を生後直ちに導入した。生後36～48時間目にコロナウイルス掛川株をチャレンジした。子牛を無作為に6群に割り付け、第1群を無投与対照群、第2群はIgY 1,280倍投与群、および第3群はIgY 2,560倍投与群とした。第4群、第5群および第6群は初乳IgG投与群とし、ウイルス中和抗体価が各々2,560倍、5,120倍および10,240倍の初乳IgGを投与した。

掛川株をチャレンジ後6時間目から各々のサンプルを1.5～2.0Lの代用乳に添加して給与し、その後1日2回同様な方法で7日間連続して給与した。無投与対照群には同量の代用乳のみを給与した。

【A】第1試験 (コンペティター: 抗K99線毛初乳IgG)



【B】第2試験 (コンペティター: 抗K99線毛IgY)



【図-5】 抗K99 IgYと抗K99 IgGのK99抗原に対する抗原結合力の比較

【表-1】 ウシコロナウイルスに対するIgYとウシ初乳IgGの受動免疫効果の比較—臨床的観察

群	抗体の由来	ウイルス中和抗体価	死亡数/頭数 (%)	下痢数/頭数 (%)	累積糞便スコア	増体重 (%)
1	-	-	4/4 (100)	4/4 (100)	30.5 ± 6.1	-7.4 ± 2.3
2	卵黄IgY	1,280倍	2/4 (50)	2/4 (50)	20.0 ± 7.4	-5.1 ± 10.4
3	卵黄IgY	2,560倍	0/4 (0) *	0/4 (0) *	3.8 ± 3.8 **	6.3 ± 2.4 **
4	初乳IgG	2,560倍	3/3 (100)	3/3 (100)	32.3 ± 0.6	-9.6 ± 1.5
5	初乳IgG	5,120倍	2/4 (50)	2/4 (50)	28.8 ± 3.4	-8.2 ± 5.3
6	初乳IgG	10,240倍	0/4 (0) *	0/4 (0) *	14.8 ± 11.3 *	1.2 ± 3.2 **

* : P < 0.05 ** : P < 0.01

チャレンジ後7日間、子牛の臨床症状の観察と体重測定を行い、糞便スコアは1日2回記録した。スコア1は正常便、スコア2は泥状便、スコア3は水様便とし、7日間の累積糞便スコアを求めた。また、子牛の糞便材料を毎日採取し、死亡例ならびに試験終了時には、子牛を剖検するとともに小腸ならびに大腸を採材し、コロナウイルスの検出を実施した。

その結果、無投与対照群に子牛は掛川株をチャレンジ後1日~2日目から粘液と血液を含む水溶性下痢便となり、チャレンジ後6日目までに全頭が死亡した(表-1)。死亡子牛の体重は激しい脱水症状のため著しく減少し、増体率は-7.4 ± 2.3%であった。IgY 1,280倍投与群である第2群は子牛の死亡を防御できず、チャレンジ後4日目と7日目に各々1頭ずつ死亡した。この群の2頭は生存したが、累積糞便スコアは20.0 ± 7.4となり、また増体率も減少し-5.1 ± 10.4となった。これに反して、第3群IgY 2,560倍においては、一時的に軽度な下痢症状が認められたが、直ちに回復し全頭が生残した。増体率は良好で+6.3%とな

り、また累積糞便スコアも3.8 ± 3.8と良好であった。無投与群との比較で有意な差を認めた(P < 0.01)。

一方、初乳IgG投与群の4群IgG 2,560倍では、チャレンジ後4日目までに激しい脱水症状のため全頭が死亡し、第5群IgG 5,120倍投与群でも4頭中2頭が死亡した。また、累積糞便スコアならびに増体率は無投与対照群とほぼ同じであった。第6群IgG 10,240倍投与群では、全頭が生残したものの、4頭中3頭が激しい水様性下痢便となり、4日から5日間持続したため、累積糞便スコアならびに増体率は悪化し、各々14.8 ± 11.3および1.2 ± 3.2%となった。

一方、糞便へのウイルス排泄日数は第3群IgY 2,560倍投与群で1.8 ± 1.5日で無投与対照群の6.0 ± 0.8日と比較すると短縮される傾向が認められた(表-2)。

初乳IgG投与群においても、投与中和抗体価に依存してウイルス排泄日数が短縮する傾向が観察された。腸管粘膜組織からのウイルス検出に関して特に注目できる点は第3群の小腸ならびに大腸からのウイルス検出が有意に低下し、小腸ではウイルスは検出できなかった。これに対し、

【表-2】 ウシコロナウイルスに対するIgYとウシ初乳IgGの受動免疫効果の比較—腸管乳剤からのウイルス分離

群	抗体の由来	ウイルス中和抗体価	ウイルス排泄日数 (Ave. ± S.D)	ウイルス価 (log ₁₀ TCID ₅₀ /g)	
				小腸乳剤 (Ave. ± S.D)	大腸乳剤 (Ave. ± S.D)
1	—	—	6.0 ± 0.8	4.63 ± 0.14	5.00 ± 1.00
2	卵黄 IgY	1,280 倍	5.5 ± 1.9	2.38 ± 2.74	4.00 ± 1.70
3	卵黄 IgY	2,560 倍	1.8 ± 1.5	0.00 ± 0.00 *	1.25 ± 1.44 *
4	初乳 IgG	2,560 倍	6.3 ± 0.6	5.41 ± 0.14	5.08 ± 0.72
5	初乳 IgG	5,120 倍	5.5 ± 1.0	2.81 ± 2.08	2.75 ± 2.02
6	初乳 IgG	10,240 倍	3.5 ± 2.4	1.25 ± 1.40 *	0.63 ± 1.25 *

* P: < 0.05

初乳IgG投与群では投与した中和抗体価に依存してウイルス検出量が低下する傾向が観察された⁷⁾。

以上のことから、IgYとIgGの有効性のレベルを比較検討すると、第3群IgY 2,560倍と第4群IgG 2,560倍投与群の死亡率、糞便スコア、剖検時の小腸ならびに大腸乳剤中のウイルス感染価を比較すると、IgY投与群は有意に安定した経口受動免疫効果が誘導されることが確認された。なお、抗原結合力の違いとH鎖ドメインとの関連性は今後の検討課題である。

IgYの生産面での優位性

- ① 1羽の親鶏は、1年間で約300個の卵を生むので、これをIgY重量に換算すると約30gとなり、低コストの生産が可能である
- ② 連続ワクチン接種器を用いれば免疫抗原を一度に大羽数の接種が可能となる
- ③ 食品としての殺菌液卵ならびに粉卵の生産ラインは工業化されており、食品衛生基準に従った大量生産が可能である
- ④ IgYの抗原結合力はIgGより約4倍強いので、安定した経口受動免疫効果が期待できる
- ⑤ 鶏卵は古くから食経験があり、「安全・安心」を保障できる

まとめ

初生牛は腸内フローラならびに局所免疫力が未成熟なため、大腸菌、ロタウイルス、コロナウイルスまたはクリプトスポリジウム(腸管寄生原虫)などによる腸管感染によって生産性が低下し、とくに離乳後の発育が遅延する。その

予防対策として、筆者は抗原結合力(Avidity)に優れた各種の機能性リベチンを含む鶏卵粉末を用いた経口受動免疫の野外への応用を提案する。この利点はトりに感作する抗原の種類を変えるだけで機能を異にする鶏卵を大量に生産でき、また初生牛への給与はミルクにこれらの鶏卵粉末を添加するだけなので普及性がある。世界に共通して、食の「安全・安心」を確保する観点から、本製品は鶏全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、公衆衛生的にも安全である。

各種の鶏卵粉末をブレンドした最終製品(混合飼料)は、国内のみならず米国、EU各国、ニュージーランド、南アフリカ、韓国などで使用されている。

参考文献

- 1) Shepard CC., Hottle GA.: Studies of the composition of the livetin fraction of the yolk of hen's eggs with the use of electrophoretic analysis, J. Biol. Chem., 179 (1), 349 ~ 357 (1949)
- 2) Martin WG, Cook WH: Preparation and molecular weight of gamma-livetin from egg yolk., Can. J. Biochem. Physiol., 36 (1), 153 ~ 160 (1958)
- 3) Ikemori Y, Kuroki M, Peralta CP, et al.: Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic Escherichia coli., Am. J. Vet. Res., 53, 2005 ~ 2008 (1992)
- 4) Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, et al.: Passive protection of neonatal calves against bovine corona virus- induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder, Vet. Microbiol, 58, 105 ~ 111 (1997)
- 5) Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, et al.: Passage of chicken egg yolk antibody treated with hydroxypropyl methylcellulose phthalate in the gastrointestinal tract of calves. J. Vet. Med. Sci., 58, 365 ~ 367 (1996)
- 6) Ikemori Y, Peralta CP, Kuroki M, et al.: Avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic Escherichia coli fimbriae. Poultry Sci., 72, 2361 ~ 2365 (1993)
- 7) Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, et al.: Passive protection of neonatal calves against bovine corona virus- induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder, Vet. Microbiol, 58, 105 ~ 111 (1997)
- 8) 児玉義勝: 海外で実施した機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk: IgY) を含む鶏卵粉末の野外評価試験, Pig Journal, 14 (2), 68 ~ 73 (2011)