

ウイルス (GPE-1株) を、ペロ細胞を用いてウイルス培養を行い、不活化したうえで産卵鶏に接種して抗PEDウイルスIgYを含有する卵をスプレードライにて粉末化した。この鶏卵粉末を飼料として子豚に給与することで、PEDウイルスに対する免疫学的アプローチを検証した。

②抗PEDウイルスIgYの作用メカニズム

PEDウイルスは、腸管粘膜上皮細胞に感染して細胞を破壊する(図2-A)。絨毛は感染により正常時の1/10に萎縮し、回復するのに数日間かかる。この間、消化・吸収は停滞するので発育の遅延が起こる。抗PEDウイルスIgYを経口投与すると、腸管内のウイルスにIgYが結合してウイルスが中和され、感染力を失い死滅する(図2-B)。

③子豚消化管内でのIgYの安定性

IgYは、卵黄中に含まれる水溶性タンパク質である。従って、一般的にはIgYを経口投与した場合、胃酸や消化酵素によって分解されてIgYの抗原結合活性が失われると考える。しかし、消化能力が十分でない若齢豚や、ミルクや飼料との同時給与(満腹状態とする)により、胃酸ならびに消化酵素の影響をほとんど受けず、活性をもったIgYが小腸

図2-A 腸管感染性ウイルスによる下痢
腸管上皮細胞に感染したウイルスは、細胞内に侵入、増殖し、細胞を破壊することにより下痢が起こり、経済的損失を与える

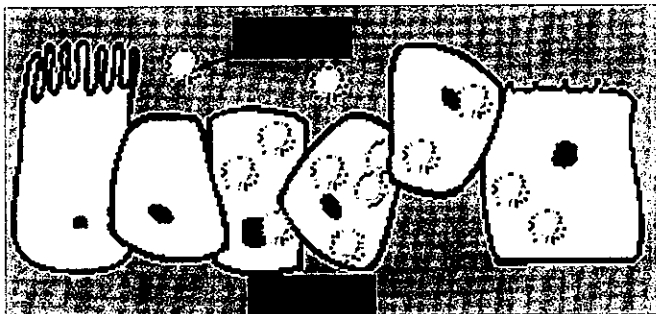


図2-B 経口投与したIgYのメカニズム
IgYはウイルス表面に結合することにより、ウイルスの感染力を失わせ、腸管上皮細胞への侵入を阻止する

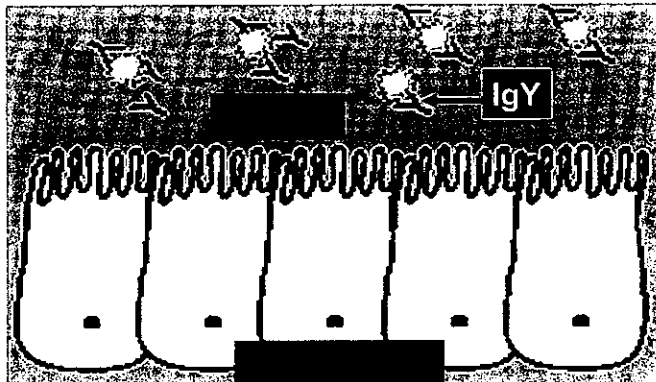
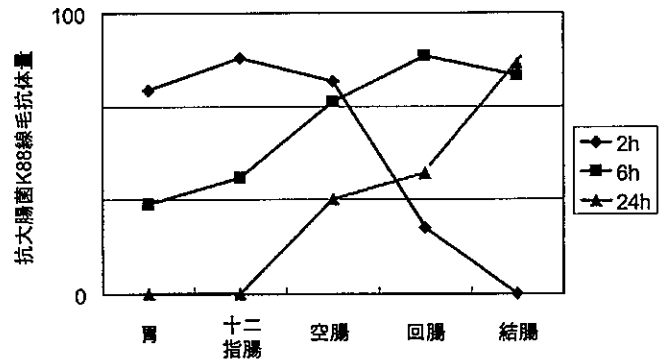


図3 IgYの消化管での安定性
IgYを子豚に給与したあとの消化管各部におけるIgY活性の推移



から結腸まで到達することを以下の試験で確認した。

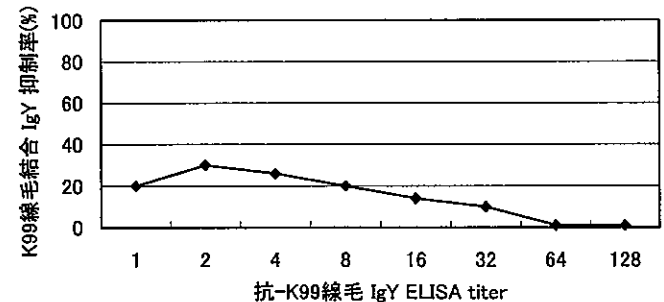
新生豚に抗大腸菌K88線毛IgY含有鶏卵粉末をミルクに溶解して、単回経口投与したあと、2時間、6時間および24時間目に胃、十二指腸、空腸、回腸および結腸部の粘膜組織からIgYを回収して、各部位の抗体活性値(抗体価)をELISAにて測定した。その結果、図3に示したように2時間目の抗体活性値のピークは胃から空腸部に観察され、6時間後にはそのピークは回腸部から結腸部に移行し、24時間後のピークは結腸部に限定して観察された¹⁾。

④IgYと初乳由来IgGの抗原結合力の比較(Avidity)

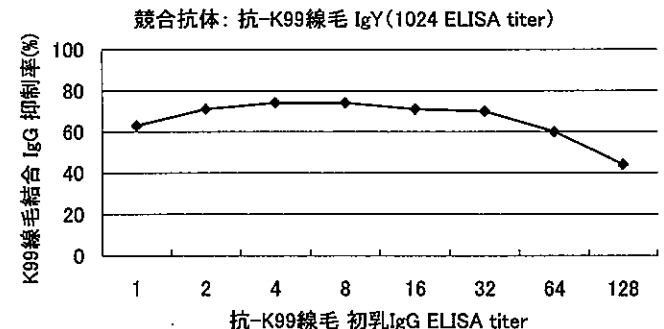
IgYは、哺乳類IgGと比較して抗原結合速度および抗原

図4 免疫競合試験によるK99線毛抗原に対するIgGとIgYの抗原結合力

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)



結合力が強く、この特徴をもつIgYの経口受動免疫によって、感染症による臨床症状の大きな改善に貢献していることが確認されている。

In vitro 試験

抗大腸菌 K99 線毛 IgY および抗大腸菌 K99 線毛 IgG の K99 線毛抗原に対する抗原結合力の差異を 2 とおりの免疫競合試験を用いて測定した。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本試験を実施した。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、1024 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 O.D. 値に対してコンペティターを加えたときの O.D. 値の減少率を抗原結合抑制率とした。その結果、図 4-A に示したように抗 K99 IgG をコンペティターしたときは、抗 K99 IgY の K99 抗原結合を 0~30% 抑制したに過ぎなかった。これに対して図 4-B の抗 K99 IgY をコンペティターとしたときは、抗 K99 IgG の K99 抗原への結合抑制率は、すべての希釈系列において 40~80% と強力な抑制を示した²⁾。本試験結果より、IgY の結合速度が IgG より高いことが確認された。

In vivo 試験

新生牛を用いたウシコロナウイルス感染試験で、抗ウシコロナウイルス IgY および抗ウシコロナウイルス初乳由来 IgG の経口受動免疫力について評価した。試験群は 6 群に割りつけ、第 1 群は Ig 無投与対照、第 2 群は中和抗体価 1280 倍の IgY 投与、第 3 群は 2560 倍の IgY 投与、第 4 群は中和抗体価 2560 倍の IgG 投与、第 5 群は 5120 倍の IgG 投与、第 6 群は 10240 倍の IgG 投与の計 6 群を設定した。導入子ウシは強毒ウイルスで感染させたあと、それぞれの中和抗体価の Ig をミルクリプレーサーに溶解して、朝・夕の 2 回、7 日間給与した。観察項目としてふん便スコア、下痢持続日数、増体量およびウイルス排せつ日数ならびに剖検時の小腸乳剤ならびに大腸乳

剤中のウイルス感染価の測定を実施した。その結果、表 1-A に示したように無投与対照群は、攻撃後 1~2 日目に粘液と血液を含む激しい水溶性下痢便となり、攻撃後 6 日以内に全頭が死亡したことから、極めて重度な感染モデルである。このようなバックグラウンドで第 3 群 IgY 2560 倍に注目すると、一過性の軽度な下痢症状のみで下痢症状等が回復し全頭が生残した。累積ふん便スコアならびに増体量は、無投与群に対し有意差が観察された。

これに反して、同じ中和抗体価 2560 倍の IgG サンプルが与えられた第 4 群は、全頭が発病して攻撃後 6 日以内に全頭死亡している。同じウイルス中和抗体価を示す IgY と IgG の極端な臨床スコア値の違いは、抗原結合力の差を意味していると考えられる。さらに、第 3 群 IgY 2560 倍の結果と同等な結果が得られた IgG 投与群は、第 6 群の IgG 10240 倍であった。臨床症状の裏付として、表 1-B で各群のウイルス検出状況を示しているが、ウイルス排せつ日数が最も短縮されたのは、第 3 群の IgY 2560 倍のグループであった³⁾。本試験結果から、初乳 IgG と比較して、IgY は 1/4 の抗体価で有効性を認め、経口受動免疫に利用できる優れた免疫グロブリンであることが分かった。

抗腸管病原体 IgY の母豚への投与効果

筆者らは、母豚は分娩によるストレスにより腸内フローラ

表 1-A 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/使用数 (%)	下痢数/使用数 (%)	ふん便スコア	増体量 (%)
1	—	—	4/4 (100)	4/4 (100)	30.5±6.1	-7.4±2.3
2	卵黄 IgY	1280 倍	2/4 (50)	2/4 (50)	20.0±7.4	-5.1±10.4
3	卵黄 IgY	2560 倍	0/4 (0) *	0/4 (0) *	3.8±3.8**	6.3±2.4**
4	初乳 IgG	2560 倍	3/3 (100)	3/3 (100)	32.3±0.6	-9.6±1.5
5	初乳 IgG	5120 倍	2/4 (50)	2/4 (50)	28.8±3.4	-8.2±5.3
6	初乳 IgG	10240 倍	0/4 (0) *	0/4 (0) *	14.8±11.3*	1.2±3.2**

1 群に対して、* : P<0.05、** : P<0.01

表 1-B 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	ウイルス排せつ日数 (Ave.±S.D)	ウイルス価 (log10 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	1280 倍	5.5±1.9	2.38±2.74	4.00±1.70
3	卵黄 IgY	2560 倍	1.8±1.5	0.00±0.00*	1.25±1.44*
4	初乳 IgG	2560 倍	6.3±0.6	5.41±0.14	5.08±0.72
5	初乳 IgG	5120 倍	5.5±1.0	2.81±2.08	2.75±2.02
6	初乳 IgG	10240 倍	3.5±2.4	1.25±1.40*	0.63±1.25*

1 群に対して、* : P<0.05

が変動し、病原性微生物数が多くなり哺乳豚への母子感染のリスクが高まると考え、2006年から2010年までブタの下痢便材料から病原菌の陽性率を調査した。その結果、離乳豚と異なり哺乳豚では、圧倒的に*Clostridium perfringens*、*E.coli* O139ならびに*E.coli* O141の陽性率が高く、母豚の陽性率とほぼ同じで(図5)、母子感染の強い可能性が示唆された。同様に哺乳子豚のPED発症原因の1つとして母子感染があげられている。

この調査結果は重要視されるため、抗腸管病原体IgYを母豚に給与して、排せつされる病原性微生物数を減少させて、哺乳豚への感染量(曝露量)を減らしリスク軽減に繋がるかを検討した。

分娩1週間前から分娩後1週間の期間に*C.perfringens*、*E.coli* O139、*E.coli* O141、ETEC K88線毛抗原、および

図5 母豚ふん便および子豚下痢便における病原性大腸菌、クロストリジウム、ロタウイルスの検出率

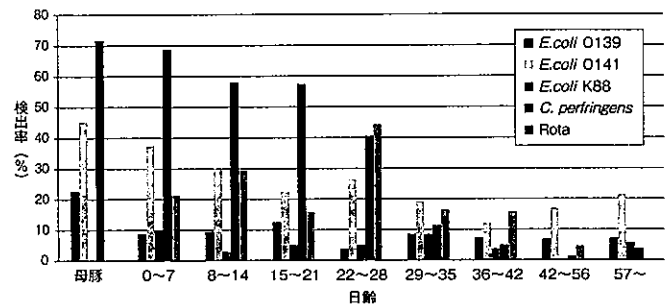
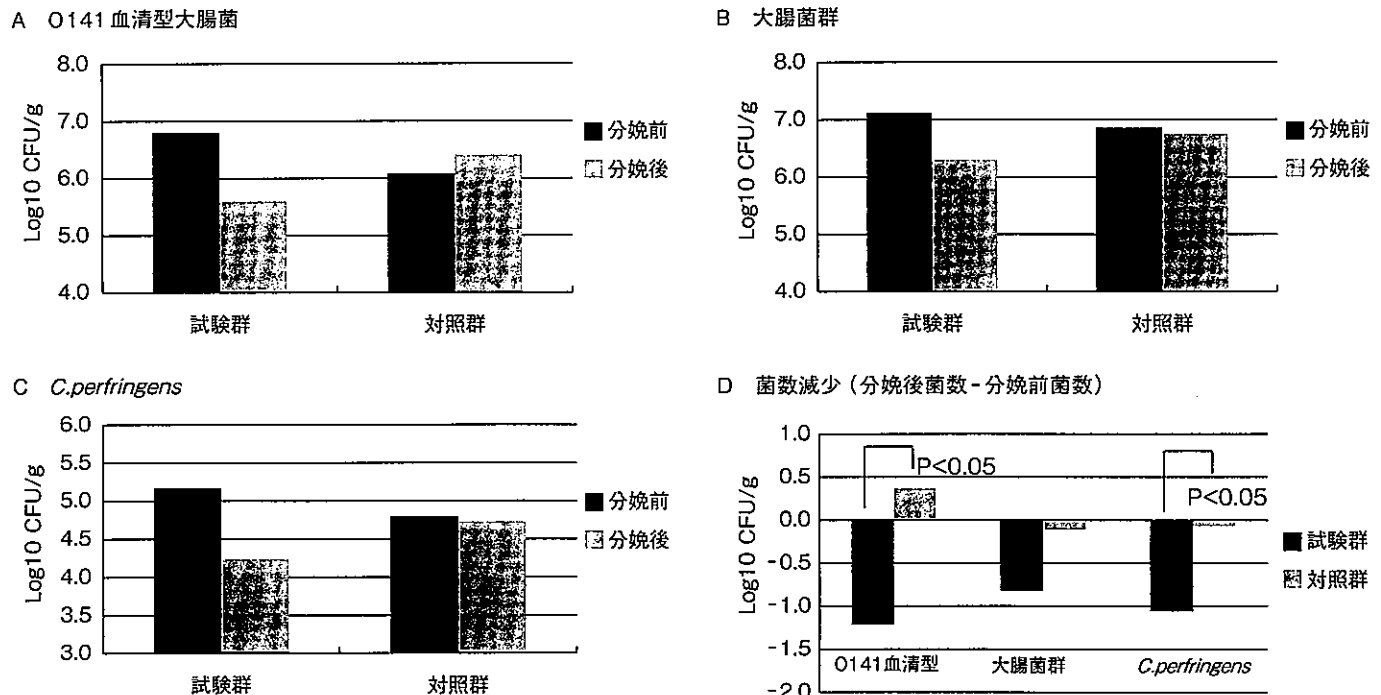


図6 抗腸管感染症IgYの母豚投与による大腸菌および*C.perfringens*の排せつ菌数の減少



抗PEDウイルスIgYの感染防御能

抗PEDウイルスIgY含有鶏卵粉末の感染防御効果および最小有効量の評価試験を実施した。

PED、TGE、ロタウイルス、腸管毒素原性大腸菌が陰性の繁殖農場から搬入した生後1日齢の初生豚16頭を本試験に用いた。表2に試験プロトコールを示した。攻撃ウイルスは下痢便材料から分離したGPE-1株を用い、感染ウイルス量は全群とも 1×10^6 TCID₅₀/ブタとした。第I群は無投与対照とし、第II群は中和抗体価80倍、第III群は中和抗体価160倍、第IV群は中和抗体価320倍とし、各群に4頭を割りつけた。本IgY含有鶏卵粉末は代用乳に溶解して、1日3回、7日間連続して給与した。強毒ウイルスの攻撃は生後3日目に行った。臨床観察として、生残率、下痢持続日数、累積ふん便スコア（正常便0、軟便1、泥状便2、および水溶便3）および増体量を観察した。また、腸管各部位のPEDウイルス抗原の検出は、抗PEDウイルス抗体を用いたstreptavidin-biotin (SAB)染色法によって、本ウイルス抗原の局在面積をベースとした4段階のスコアを設定することによって判定した。

結果は、表3に示したように第I群のブタは水溶性下痢を呈して全頭が死亡したが、第II群の死亡率は1/4頭となり、第III群ならびに第IV群のブタは全頭が生残した ($p < 0.05$)。第I群の下痢持続日数ならびに累積ふん便スコアに対し、本IgYを投与したすべての群で有意な改善効果が観察された ($p < 0.01$)。一方、第I群の増体量が $-18.5 \pm 2.6\%$ であったのに対し、第III群ならびに第IV群の増体量はそれぞれ $+3.9 \pm 4.0\%$ および $+7.8 \pm 4.9\%$ となり、有意な改善効果が確認された ($p < 0.01$)。

図7にSAB染色法を利用した免疫組織化学的検査による

表2 試験プロトコール

試験群	供試頭数	攻撃ウイルス量	投与IgYの中和抗体価
I	4	1×10^6 TCID ₅₀ /ブタ	0 (無投与)
II	4	1×10^6 TCID ₅₀ /ブタ	80倍/ブタ
III	4	1×10^6 TCID ₅₀ /ブタ	160倍/ブタ
IV	4	1×10^6 TCID ₅₀ /ブタ	320倍/ブタ

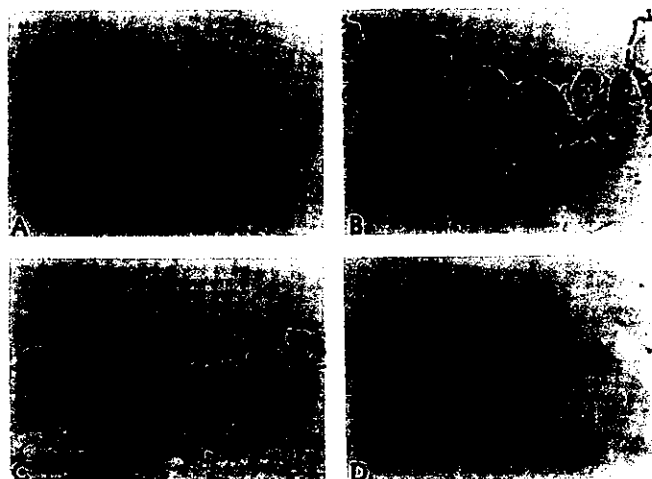
表3 PEDウイルス攻撃後の臨床スコア

試験群	投与IgYの中和抗体価	死亡率 (%)	下痢日数 (日)	累積下痢スコア	増体量 (%)
I	0 (無投与)	100	6.5 ± 0.5	37.3 ± 3.0	-18.5 ± 2.6
II	80倍/ブタ	50	$3.3 \pm 1.3^{**}$	$15.0 \pm 9.1^{**}$	-7.9 ± 14.3
III	160倍/ブタ	0*	$2.3 \pm 0.4^{**}$	$7.3 \pm 3.5^{**}$	$3.9 \pm 4.0^{**}$
IV	320倍/ブタ	0*	$1.3 \pm 1.3^{**}$	$4.5 \pm 4.7^{**}$	$7.8 \pm 4.9^{**}$

I群に対して、* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$

図7 SAB染色法を利用した免疫組織化学的検査によるPEDウイルスの局在

- A: 無感染コントロール ウイルス検出レベル (-)
 B: 感染豚 ウイルス検出レベル (+++)
 C: 感染死亡豚 ウイルス検出レベル (+++)
 D: 抗PED IgY投与豚 ウイルス検出レベル (-)



特異性を示した。写真Aは、非感染空腸部を示しているがウイルス抗原の局在は見当たらない (-)。写真Bは、本IgY非投与群の空腸部を示しているが、粘膜上皮細胞に沿ってウイルス抗原が局在している (+++)。写真Cは、同群の死亡例で粘膜上皮細胞が破壊された部分にウイルス抗原が蓄積している (+++)。写真Dは、第III群および第IV群の空腸部でウイルス抗原の局在は観察されない (-)。表4に全群の腸管各部位に局在したウイルス抗原量を示した。第I群は全頭の小腸各部位から多量のウイルス抗原の局在が観察された。これに対して、第III群ならびに第IV群でのウイルス抗原検出は、第III群の1頭の空腸部を除いてすべて陰性となった。

以上のことから、臨床スコア値と腸管粘膜のウイルス抗原量は、投与したIgYの中和抗体価に依存して低下することが明らかとなり、最小有効量は、中和抗体価で160倍程度と考えられる。

また、前項の「③子豚消化管内でのIgYの安定性」において、IgY投与後24時間目では多くのIgYが結腸まで移動していることから、1日2回以上IgYを投与して絶えず小腸部位にIgYを滞留させる必要があると言える。

表4 SAB染色による小腸各部位の局在ウイルス抗原量の比較

試験群	投与IgYの中和抗体価	抗原検出頭数/供試頭数		
		十二指腸部	空腸中央部	回腸部
I	0 (無投与)	4/4 (++) ~ (+++)	4/4 (+++)	4/4 (+ ~ +++)
II	80倍/ブタ	2/4 (- ~ +++)	4/4 (+ ~ +++)	3/4 (- ~ +++)
III	160倍/ブタ	0/4 (-)	0/4 (-)	1/4 (- ~ +)
IV	320倍/ブタ	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)

抗PEDウイルス抗体を用いたSodium Sulphate Alcian Blue (SAB)染色によるウイルス抗原の検出スコア基準と染色面積割合 (-) = < 5%、(+) = 5 ~ 15%、(++) = 15 ~ 25%、(+++) = > 25%

まとめ

パンデミックを踏まえたPEDウイルスに対する免疫学的アプローチとして、以下のことが考えられる。

1. 異種免疫グロブリンであるIgYの最大の特徴は、哺乳類IgGと対比すると、抗原結合速度および抗原結合力が優れているうえに哺乳豚の腸管でIgY活性が安定していること、そして、鶏卵粉末は豚用混合飼料としての生産方法が確立しており、母豚の乳汁を補う経口受動免疫に利用できる最適な免疫グロブリンである。
2. 抗PEDウイルスIgY含有鶏卵粉末の有効性を攻撃試験によって検討した結果、対照群に対し、本IgY投与群の死亡率の改善をはじめとして、臨床スコア値ならびに腸管に局在するウイルス抗原量は投与した中和抗体価に依存して顕著に減少した。このことから、抗PEDウイルス効果が認められる素材である。
3. PEDウイルス感染母豚がウイルスを排せつして母子感染による低日齢での発症が低生存率に繋がっていることから、分娩前後の母豚飼料に対する抗PEDウイルスIgY含有鶏卵粉末の給与は、母豚が排せつするウイルス量を減少させ、哺乳豚の発症リスクを軽減させる。また、抗PEDウイルスIgY含有鶏卵粉末をペースト化して充填したシリンジを介して新生豚に1日2回の給与を数日連続して行うことで、絶えず腸管内にIgYを滞留させて、哺乳豚が摂取してしまうウイルスを確実にIgYで中和して臨床症状を軽減させる。
4. PEDウイルスの感染によって傷害を受けた腸管上皮細胞が再生するまでの期間、大腸菌やサルモネラ菌などの腸内病原細菌の二次感染を予防するために、抗腸管病原体IgYのカクテル鶏卵粉末を給与して、総合的に被害を軽減させる。

■引用文献

- (1) Yokoyama, H., R. C. Peralta, S. Sendo, et al. 1996. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *Am. J. Vet. Res.* 54: 867-872.
- (2) Ikemori, Y., C. P. Peralta, M. Kuroki, et al. 1993. Avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Poultry Sci.* 72. 2361-2365.
- (3) Ikemori, Y., M. Ohta, K. Umeda, et al. 1997. 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.
- (4) 児玉義勝. 2011.02. 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. *Pig Journal*.

■参考文献

- Hamada, Shigeru and Kodama Yoshikatsu. 1996. Passive immunity against mucosal infections and vaccination for dental caries, 187-197, *Mucosal Vaccines*, Kiyono, H. et al. eds. Academic press, CA.
- Shehofiqur Rahman, Sa Van Nguyen, Faustino C. Icatlo Jr., et al. 2013. Oral passive IgY-based immunotherapeutics. A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9:5, 1039-1048.
- 児玉義勝, 並木秀男, 小澤 智. 2012. 新機能抗体開発ハンドブック第7編 ニワトリ卵黄免疫グロブリン (IgY) の産業への利用. (S.T.S.出版)