

# 抗ピロリ菌鶏卵抗体(IgY)の開発と食品への応用

松下記念病院 山根 哲郎、グリコ乳業(株) 斎藤康雄・瀧澤 悟、  
(株)ゲン・コーポレーション 免疫研究所 五島 英雄・児玉義勝、(株)ファーマフーズ研究所 堀江 典子・金 武祐

## 1. *Helicobacter pylori*とは

ヘリコバクター・ピロリ菌(以下ピロリ菌とする)は、1982年にオーストラリアのMarshallとWarrenによって胃の組織から発見されたグラム陰性の桿菌である。らせん状の形態をした微好気性菌であり、数本の有鞘鞭毛を持ちその形態的特徴からヘリコプターのヘリコと同じ意味で*Helicobacter*と名付けられた<sup>1)</sup>。極めて強いウレアーゼ活性を有し、胃粘液中の尿素を分解することでアンモニアを産生し、胃酸を中和しており、このシステムによりピロリ菌は強酸性の胃内でも生育することができると考えられている。

その後、この菌と胃疾患との関連性が注目され世界中で研究が進められている。日本国内における感染率は、40歳代以上で約80%と報告されており、先進国の中では非常に高い感染率を示している(図1)。

本菌は、消化器疾患患者だけでなく、健常人からも検出され、感染者の全てが消化器疾患を発症するとは限らない。しかし、ピロリ菌は、胃炎または胃潰瘍患者の約90%が感染しており、除菌治療を行うことで潰瘍が治癒することが確認されている。このことによりピロ

リ菌が消化器疾患における重要な危険因子であることは明らかである<sup>2)</sup>。

日本国内においても、消化器系疾患の治療にはまずピロリ菌の除菌が必要であるとの指針が厚生労働省から出されており、抗生物質と胃酸分泌抑制剤を組み合わせた2~3剤併用療法が行われている。

## 2. 抗体を用いる生体防御

### (1)抗体とは

動物は、外部から侵入してくる細菌やウイルス等(抗原という)に対して「抗体」と呼ばれる蛋白質を血液中に産生し、細菌やウイルス等を無毒化し、排除するという自己防御システムを有している。

哺乳動物の場合血液中に産生された特異抗体は、子孫を守る目的で母乳中に移行されることも広く知られている。

### (2)卵黄抗体とは

一方母乳も胎盤も持たない鳥類はどのようにして子孫を感染症から守っているのか?

鶏の母子間における免疫移行システムについては、100年以上前から調べられており、親鶏が獲得した血液中の免疫抗体は、卵白、卵黄中に移行蓄積されることが知られている<sup>3)</sup>。中でも血液

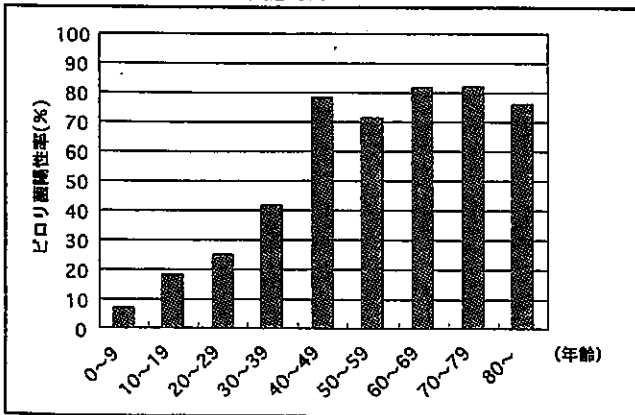
中のIgGは、卵黄にのみ選択的に蓄積され、YolkにちなんでIgYとよばれている。卵黄液1mlあたり約10mg含有される<sup>4)</sup>。鶏1羽は、1年間に約250~300個の卵を産卵することから非常に有効な抗体の供給源といえる。鶏は、元来鶏病予防の目的でワクチネーションが行われており、連続的な免疫操作もシステム化されている。さらには大量飼育も容易なことから鳥類に特徴的なこの免疫システムを利用することで各種抗原に対する特異抗体を大量に調製することが可能となった(図2)。

そこで我々は、抗原としてピロリ菌を選定し、抗*H. pylori* IgYを開発し食品へ添加することで、より有効で副作用のない除菌が可能になるのではないかと考えた。

## 3. 抗*H. pylori* urease IgYの開発

ピロリ菌感染が消化器系疾患の原因となるとすれば、消化器系疾患も通常の感染症と同様に、ピロリ菌が宿主に付着することから始まると考えられる。しかし、ピロリ菌の胃粘膜への付着メカニズムについては、これまで多くの研究者により研究されてきたが、明確な解答は得られていなかった。

図1 日本におけるピロリ菌感染率



Asaka M, Kimura T, Kudo M, et al: Gastroenterology 102:760-766, 1992<sup>2)</sup>

図2 哺乳動物と産卵鶏の抗体採取方法の比較

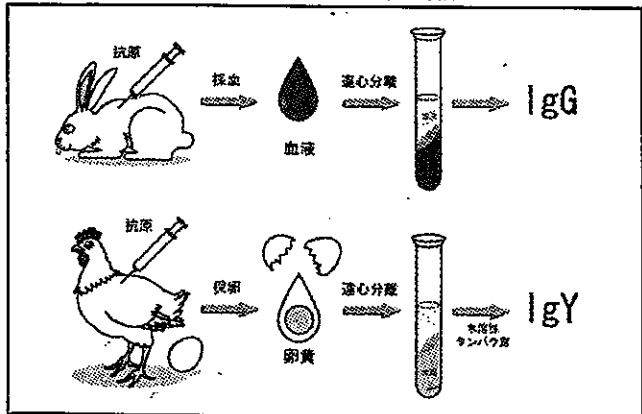
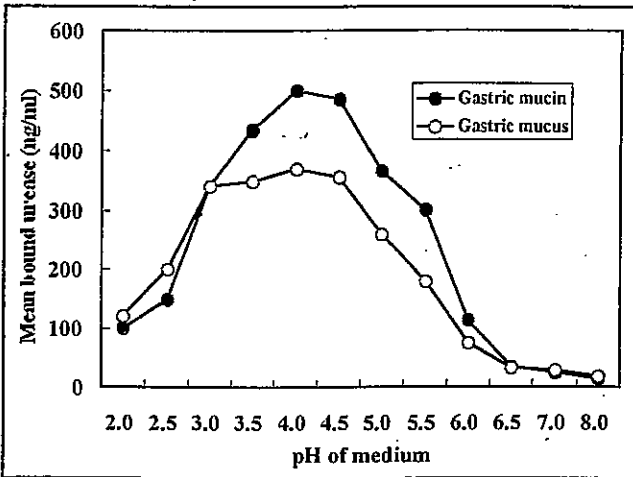


図3 ウレアーゼはpH依存的に胃粘液及び胃粘液ムチンに結合する



Icatlo FC et al. 1997<sup>7)</sup>を一部改変

そこで著者のグループの児玉らはこの付着メカニズムを解明するために研究を重ねた結果、ウレアーゼが酸性条件下(至適pH4.0)で胃粘液ムチンと極めて高い親和性を有することを見出した(図3)。

このことは、感染の第一段階における接着因子として菌体外膜に局在するウレアーゼが関与していることを明らかにするものである<sup>6,7)</sup>。

我々は、この付着メカニズムの解明により、菌体外膜上の接着因子であるウレアーゼを特異的にブロックすることにより、ピロリ菌が胃粘膜に付着できずその結果除菌可能になるのではと考え、ピロリ菌のウレアーゼに対する卵黄抗体(抗*H. pylori* urease IgY)を開発した。

抗原の調製法としては液体培地で培養したピロリ菌よりウレアーゼを精製した<sup>8)</sup>。精製したウレアーゼを適当なアジュバントと混合し、採卵鶏に免疫した。ウレアーゼに対する抗体価が最も高くな

図4 ボランティア試験における尿素呼気試験の結果

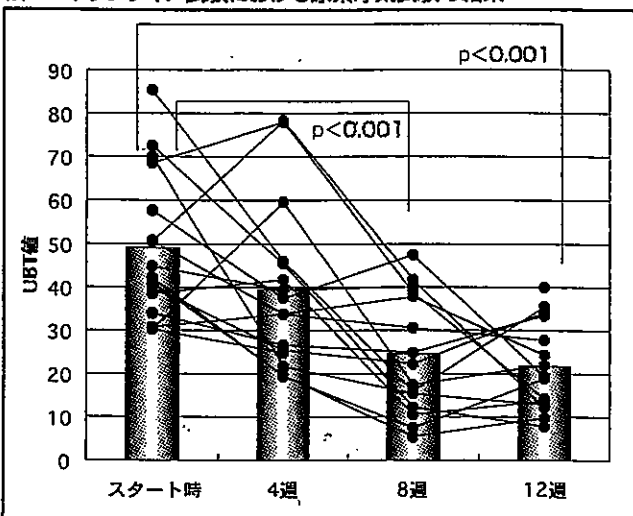
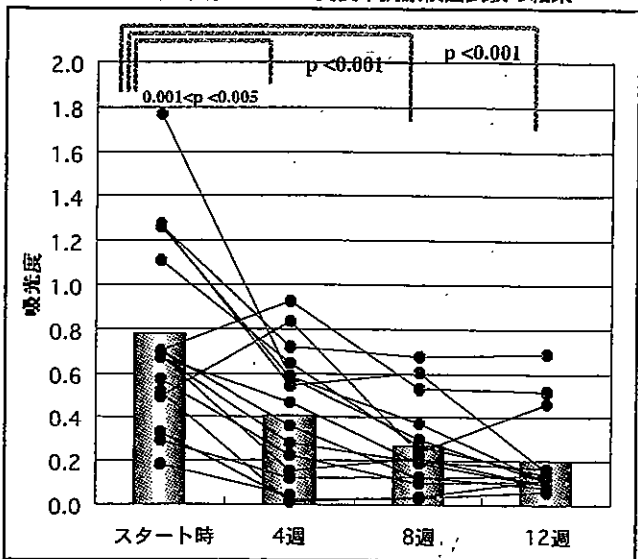


図5 ボランティア試験における糞便中抗原検出試験の結果



った段階の卵黄を用いて以下に示すピロリ菌除菌効果試験を実施した。

#### 4. ピロリ菌の除菌効果試験

ピロリ菌の感染及び除菌効果の判定には種々の検査方法があるが、最も簡便で非侵襲性の試験法として広く実施されているのが尿素呼気試験(UBT)である。

<sup>13</sup>Cでラベル化した尿素を経口投与すると、胃内にピロリ菌が存在する場合にはその強力なウレアーゼ活性によりアンモニアと二酸化炭素に分解される。<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>は消化管より血中に吸収され肺より呼気中に放出される。呼気中の<sup>13</sup>C量を測定することでピロリ菌感染の有無を判定する。

また、便中のピロリ菌抗原をELISA法で検出する新しい方法も開発され、簡便で侵襲のない検査方法として広く普及しつつある。

我々は、抗*H. pylori* urease IgYの食品への応用を検討するために、本抗体を配合したヨーグルトを作製し、ボランティア試験を実施した。

スクリーニングは健常人174名(男性:112名、女性:62名、平均年齢32.7±10.5歳)で行った。スクリーニングの結果UBT値3.0%以下の陰性者は134

名、UBT値3%~30%以下の陽性者が24名、UBT値30%以上の強陽性者が16名という結果となった。

試験は、スクリーニングでUBT値30%以上のピロリ菌感染強陽性者をボランティアとして選定した。ヨーグルト1個あたりの抗*H. pylori* urease IgY含有卵黄液の添加量は2.0gとし、朝、夕食後に1日2回(4.0g/日、IgY摂取量40mg)摂取させた。

ピロリ菌除菌効果の検査は、UBTテスト及び糞便抗原検出検査とし、4週目、8週目、12週目の計3回行った。

また、2種類の検査と共に胃痛などに関するアンケート調査を実施した。尚、摂取期間中の副作用等は何ら報告されなかった。

#### 5. ボランティア試験結果

ボランティア試験の結果、抗*H. pylori* urease IgYヨーグルトを摂取後8週間で被験者の尿素呼気試験(UBT)による $\Delta^{13}C$ 値が摂取前と比較して有意に減少することが確認できた。UBT値と胃の中のピロリ菌数は、ある程度相関があると考えられており<sup>9)</sup>、UBT値の低下は菌数の低下を示唆するものと考え、本抗体を用いた食品がピロリ菌を胃内より排除する効果を有することが確認された(図4)。

また、糞便中のピロリ菌抗原検出試験においては、4週目で有意な低下が確認され8週目、12週目と時間の経過に伴って徐々に減少する傾向が認められた(図5)。糞便中の抗原検出試験については、近年開発された新しい方法

ではあるが、便中の*H. pylori*抗原をELISAで検出するものであり、UBT等に比較してより直接的な検査方法であるといえる。

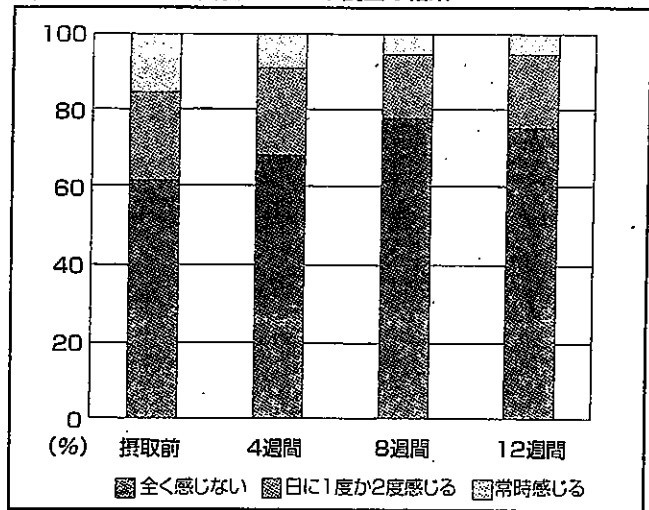
被験者へのアンケート調査の結果では、胃痛の項目において「胃痛を常時感じる」としていたヒトの割合が減少し、自覚症状の改善傾向が認められた(図6)。

今回、尿素呼気試験と糞便抗原検出試験を同時に行いその有効性が得られたことははじめての報告であり、抗体の食品への利用の有用性を示すものとして大変興味深いと考えた(図4、5)。

効果発現の作用機序としては本抗体が菌体外膜上のウレアーゼと特異的に結合し、ピロリ菌の胃粘膜への付着を阻害することにより、徐々に本菌を胃内より排除すると推察される。

ここで注目すべきことは、まず被験者において、問題となる副作用が全く起きなかったこと、次に「胃痛が軽減した」などの体感が得られたことである(図6)。この結果を基に抗*H. pylori* urease IgYを添加したヨーグルトが発売される予定である。おいしく、しかも効果が体感できる機能性食品として注目されるが、中でも抗*H. pylori* urease IgYは、今後最も注目される食品素材の1つであると考えられる。

図6 ボランティア試験アンケート調査の結果



[1965]

- 5) M. E. Rose et al: Eur. J. Immunol., 4, 521-523, 1974
- 6) Icatlo FC et al: Affinity purification of *Helicobacter pylori* urease.: Relevance to gastric mucin adherence by urease protein. J Biol Chem 273: 18130-18138, 1997
- 7) Icatlo FC et al: Acid-dependent adherence of *Helicobacter pylori* urease to diverse polysaccharides. Gastroenterology 119: 358-367, 2000
- 8) Perri F, Clemente R, Pastore M, Quitadamo M, Festa V, Bisceglia M, Libergoli M, Lauriola G, Leandro G, Ghos Y, Rutgeerts P, Andriulli A., The 13C-urea breath test as a predictor of intragastric bacterial load and severity of *Helicobacter pylori* gastritis., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 58, 19-28, 1998.

〈著者略歴〉

山根哲郎(やまね てつろう)

- 74年 京都府立医科大学卒業
- 82年 京都府立医科大学大学院医学研究科修了
- 同年 京都府立医科大学助手
- 83年 医学博士取得
- 89年 京都府立医科大学講師
- 96年 松下記念病院外科部長兼京都府立医科大学客員講師
- 現在に至る

〈参考文献〉

- 1) Goodwin CS, Armstrong JA et al: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. and *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. Int J Syst Bacteriol 39: 397-405, 1989
- 2) Asaka M, Kimura T, Kudo M, et al: Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. Gastroenterology 102: 760-766, 1992
- 3) Asaka M et al: Causal role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer relapse. J Gastroenterol 29(suppl 7): 134-138, 1994
- 4) M. Malkinson, Immunology, 9, 311

# Development of anti *Helicobacter pylori* Urease IgY and Its Application for Food Product

Matsushita Memorial Hospital Tetsuro YAMANE, Glico Dairy Yasuo SAITO Satoru TAKIZAWA  
GHEN Corporation Immunology Research Institute Hideo GOSHIMA Yoshikatsu KODAMA,  
Pharma Foods International Co., Ltd. Noriko HORIE Mujo KIM

## 1. What is *Helicobacter pylori*?

*Helicobacter pylori* (hereafter abbreviated as *H. pylori*) is a gram-negative rod, which was discovered from the stomach tissue by Marshall and Warren, Australians, in 1982. This is a microaerophilic bacterium with a helical shape and has several flagella. The name of *Helicobacter* was derived from the word "helicopter" based on its morphological characteristics 1). *H. pylori* has very strong urease activity, producing ammonia by degrading urea in the gastric mucosa, which neutralizes gastric acid. It has been considered that such system enables *H. pylori* to grow even in the stomach with its very strong acidity.

Since then, the relevance of *H. pylori* to gastropathy has received great attention and has been studied throughout the world. The rate of *H. pylori* infection in Japan has been reported to be about 80% in people at 40 years or more of age, which is very high in the developed countries (Fig. 1).

*H. pylori* is detected in the healthy people as well as in the patients with the digestive diseases, indicating that all persons infected with *H. pylori* do not necessarily suffer from the digestive diseases. About 90% of patients with gastritis or gastric ulcer are, however, infected with *H. pylori*, and it has been confirmed that gastric ulcer can be cured by the *H. pylori* eradication therapy. From this fact, it is obvious that

*H. pylori* is a crucial risk factor in the occurrence of the digestive diseases 3).

In Japan, the Ministry of Health, Labor and Welfare issued the guideline that the *H. pylori* eradication is the first thing that must be done in treating digestive system diseases and the combination therapy of 2 or 3 drugs including antibiotics and inhibitors of gastric secretion, is being administrated.

## 2. Biophylaxis with antibody

### (1) What is an antibody?

Animals have a self-defense system, in which proteins called "antibodies" are produced in the blood to act against bacteria, viruses, etc. (called antigens) entering from the outside, detoxifying and removing these bacteria, viruses, etc.

In case of mammals, it has been well known that a specific antibody produced in the blood is transferred into mother's milk to protect offspring.

### (2) What is egg yolk antibody?

On the other hand, how do the birds having neither mother's milk nor placenta protect offspring from infection?

The transfer system of immunity from the hen to the chick has been investigated for more than 100 years, and it has been found that an immunoantibody produced in the blood of the hen is transferred and stored in the albumen and the yolk 4). Among these immunoantibodies, IgG

produced in the blood is stored specifically only in the yolk, and its IgG has been termed as IgY after Yolk. About 10 mg of IgY is contained in 1 mL of the yolk liquid 5). Since one hen lays about 250 to 300 eggs per year, it can be effective source as antibody supplier. Chickens have been vaccinated for the prevention of diseases, and now there is a continuous system for immunity generation. Since chickens are managed easily on a large scale, a large amount of specific antibodies against various antigens can be prepared by utilizing the immune system characteristic of the chicken. (Fig. 2)

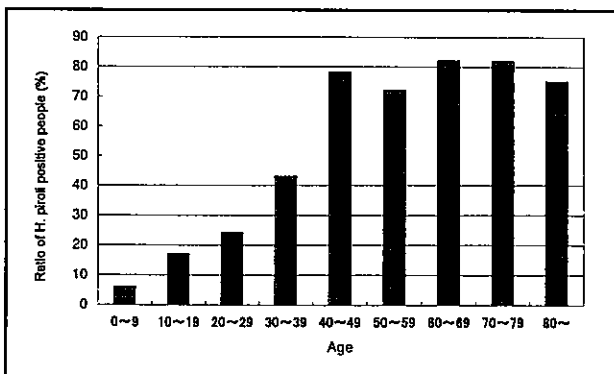
Thus we selected *H. pylori* as an antigen to develop anti *H. pylori* IgY for use as a food material, which can be expected to be more effective for *H. pylori* eradication than present treatments, and without their side effects.

## 3. Development of anti *H. pylori* urease IgY

If *H. pylori* infection is a cause of digestive system diseases, it is considered that the digestive system diseases are triggered by the adherence of *H. pylori* to the host like in the usual infections diseases. The adherence mechanism of *H. pylori* to gastric mucosa has not been clearly elucidated in spite of many studies.

Thus Kodama et al. in our research

Fig. 1 Incidence of *H. pylori* infection ratio in Japan



Asaka M. Kimura T. Kubo M, et al:Gastroenterology 102:760-766,1992 2)

Fig. 2 Illustration of antibody extraction from mammal and chicken egg

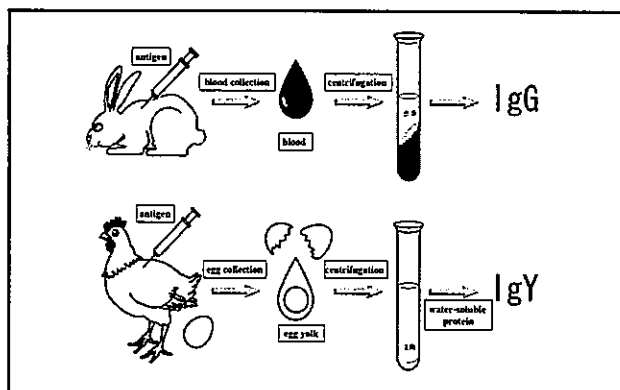
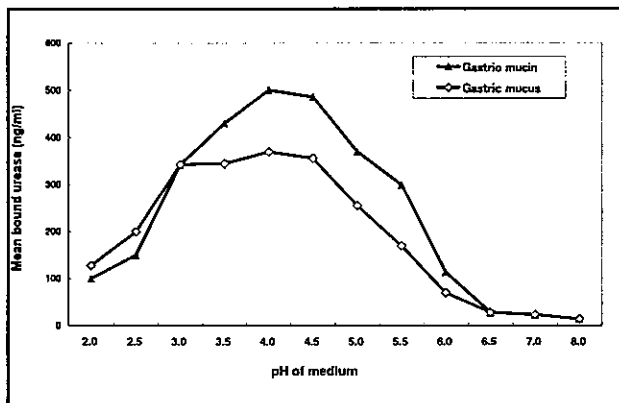


Fig. 3 Urease binds to gastric mucosa and gastric mucin in a hp-dependent manner



group have made repeated attempts to elucidate the adherence mechanism and found that urease has very high affinity to the gastric mucous liquid mucin under acidic conditions (optimal pH: 4.0) (Fig. 3). This result indicates that urease localized at the outer membrane of *H. pylori* serves as an adherent factor in the first step of infection (6,7).

We considered from this elucidation of the adherence mechanism that *H. pylori* would not be able to adhere to gastric mucosa if urease were specifically blocked. Thus, we developed egg yolk antibody against urease of *H. pylori* (anti *H. pylori* urease IgY).

The antigen was prepared by purifying urease from *H. pylori* cultivated in a liquid medium (6). The purified urease was mixed with an appropriate adjuvant, and immunized to layer hens. Using the egg yolk antibody against urease with the highest titer value, the following efficacy study of *H. pylori* eradication was conducted.

Fig. 4 Urea Breath Test (UBT) result in volunteer study

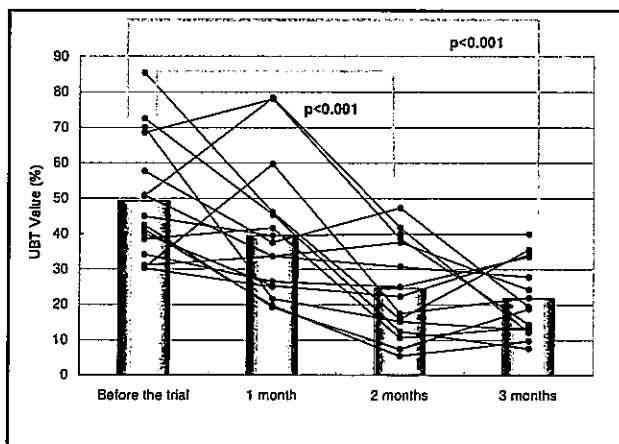
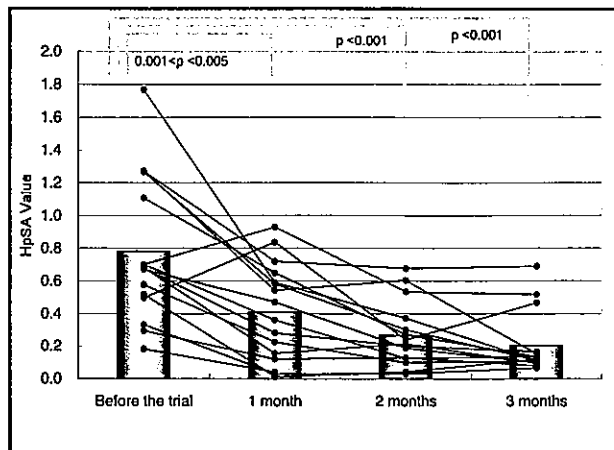


Fig. 5 Antigen detection test result in feces in volunteer study



#### 4. Efficacy Study of *H. pylori* eradication

Although there are various test methods for the detection of *H. pylori* infection and for the evaluation of the efficacy of *H. pylori* eradication, the urea breath test (UBT) has been used widely, being a most convenient and non-invasive test method.

<sup>13</sup>C-labeled urea administered orally is decomposed to ammonia and carbon dioxide by strong urease activity of *H. pylori* in the stomach, if present. <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> is absorbed into the blood from the digestive tract and released into the expired air from the lung. The *H. pylori* infection can be determined by measuring the amount of <sup>13</sup>C in the expired air.

A new method which detects an antigen of *H. pylori* in feces by using ELISA, also has been developed and is now becoming widely used as convenient and non-invasive method.

In order to examine the application of anti *H. pylori* urease IgY in food products, we conducted a volunteer study using yogurt mixed with this antibody.

The screening test was performed with 174 healthy volunteers (male: 112, female: 62, mean age: 32.7 ± 10.5 years). As the result, the number of volunteers exhibiting negative UBT values, 3.0% or lower, was 134, the number of

volunteers exhibiting positive response, 3% to not more than 30%, was 24, and the number of volunteers showing strong positive response, 30% or more, was 16.

The study on the efficacy of the *H. pylori* eradication was performed in volunteers showing strong positive reaction, UBT value of 30% or more. The dosage of the yolk liquid containing anti *H. pylori* urease IgY added into one bottle of yogurt was 2.0 g, and the yogurt was given to each volunteer twice a day, after breakfast and after supper (4.0 g/day, intake of IgY: 40mg).

The efficacy of the *H. pylori* eradication was evaluated at weeks 4, 8 and 12, 3 times in total, by the UBT test and by the fecal antigen detection test.

Together with these two tests, a questionnaire concerning gastralgia etc. was performed. No adverse reactions were reported during the administration period.

#### 5. Results of volunteer study

The result of the volunteer study confirmed that the value of Δ<sup>13</sup>C obtained by the UBT in subjects administered yogurt containing anti *H. pylori* urease IgY for 8 weeks was significantly lower compared with the pre-administration value. It is considered that there is a proportional relation between the UBT value and the number of *H. pylori* in the stomach to some extent (8). Thus, a decrease in the UBT value indicates a decrease in the number of *H. pylori*. Therefore, it was confirmed that a food product containing this antibody was effective for eradicating *H. pylori* from the stomach (Fig. 4).

In the *H. pylori* antigen detection

test in feces, the significant decrease was confirmed at week 4, and the value continued to decrease through weeks 8 and 12 with the elapse of time (Fig. 5). The antigen detection in which *H. pylori* antigen in feces is detected, ELISA, has been developed recently. It can be more direct detection method compared to UBT etc.

The result of the questionnaire to the subjects showed a decrease in the percentage of the persons that answered "always have a stomachache" to the question on gastralgia, indicating a tendency toward improvement in the subjective symptoms (Fig. 6).

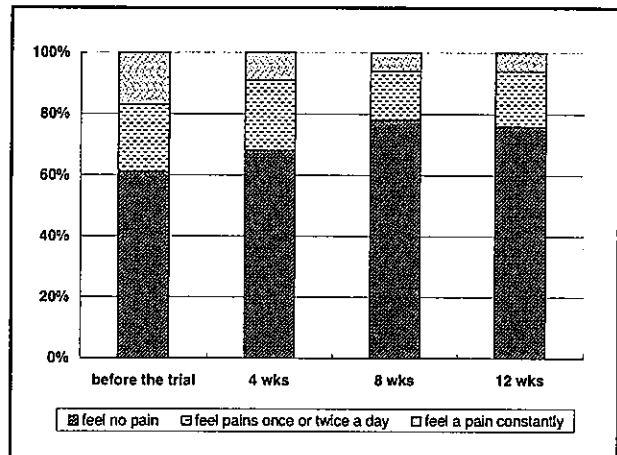
In the present study, the efficacy of anti *H. pylori* antibody on the *H. pylori* eradication was observed in both the UBT and the antigen detection test in feces, and this is the first report of such effectiveness. We considered the result, which indicated that the application of antibody for food product was useful, very interesting (Figs. 4 and 5).

We surmise that in the course of this treatment, this antibody eliminates *H. pylori* gradually from the stomach by binding specifically to urease on the outer membrane of *H. pylori* to inhibit the adherence of *H. pylori* to gastric mucosa. There are two points to be given attention: firstly, no adverse reactions occurred in the test subjects, and secondly, the subjects felt that "stomachache was alleviated" (Fig. 6). Based on this result, yogurt added with anti *H. pylori* urease IgY is scheduled to be put on the market. Functional foods with both delicious taste and efficacy is received great attention. Among such foods, anti *H. pylori* urease IgY is especially likely to receive great attention.

#### <References>

- 1) Goodwin CS, Armstrong JA, et al.: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustataiae* to *Helicobacter* gen. nov. and *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustataiae* comb. nov. respectively. *Int J Syst Bacteriol* 39: 397-405, 1989
- 2) Asaka M, Kimura T, Kudo M, et al.: Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology* 102: 760-766, 1992

Fig. 6 Questionnaire in volunteer study



- 3) Asaka M, et al.: Causal role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer relapse. *J Gastroenterol* 29 (suppl 7): 134-138, 1994
- 4) M. Malkinson, *Immunology* 9, 311 (1965)
- 5) M. E. Rose et al.: *Eur. J. Immunol.*, 4, 521-523, 1974
- 6) Icatio FO et al: Affinity purification of *Helicobacter pylori* urease: Relevance to gastric mucin adherence by urease protein. *J Biol Chem* 273: 18130-18138, 1997
- 7) Icatio FO et al.: Acid-dependent adherence of *Helicobacter pylori* urease to diverse polysaccharides. *Gastroenterology* 119: 358-367, 2000
- 8) Perri F, Clemente R, Pastore M, Quitadamo M, Fests V, Bisceglia M, Libergoili M, Lauriole G, Leandro G, Ghos Y, Rutgeerts P, Andriulli A., The 13C-urea breath test as a predictor of intragastric bacterial load and severity of *Helicobacter pylori* gastritis., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 58, 19-22, 1998

#### <Brief history of author>

##### Tetsuro Yamane

- 1974 Graduated from Kyoto Prefectural University of Medicine
- 1982 Completion of Medical Graduate Course at Kyoto Prefectural University of Medicine
- 1982 Assistant at Kyoto Prefectural University of Medicine
- 1983 Received M. D.
- 1988 Instructor at Kyoto Prefectural University of Medicine
- 1995 ~ Director of Surgery at Matsushita Memorial Hospital and guest instructor at Kyoto Prefectural University of Medicine