

抗 *Helicobacter pylori* ウレアーゼ免疫グロブリンの有用性

鈴木秀和* 野村幸子** 日比紀文*

細菌感染の重要な第1段階は、局所へ菌の定着である。生体は抗原に特異的な抗体を産生することで、病原体を排除する。この抗体を中心とした生体防御には、能動免疫と受動免疫がある。自然感染やワクチンによって成立するのが能動免疫であり、これに対して母乳に含まれている抗体など、すでに形成された抗体が別の個体に移入されるのが受動免疫である。この抗体食品の抗体源として卵黄抗体が注目されており、最近、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の菌体外膜に局在するウレアーゼを抗原として精製した抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY が開発された。本抗体は、食品として摂取可能であり、抗生物質とは異なる面から、*H. pylori* を標的とするものとして注目されている。

はじめに

胃・十二指腸潰瘍は、従来より「潰瘍症」といわれてきたように、胃切除、迷走神経切除などの外科的治療が唯一の治療法だった時代を経て、H₂受容体拮抗薬やプロトンポンプ阻害薬 (PPI) の登場で内科的にコントロール可能な疾患になった後も、頻繁に再発をくり返すため、なかば一生、酸分泌抑制薬を服用することが多かった。しかし、1980年代前半の Warren と Marshall¹⁾による

Helicobacter pylori (*H. pylori*) のはじめての分離培養成功から、胃炎や胃・十二指腸潰瘍を感染症とする概念が定着し、その除菌療法によって、とくに、消化性潰瘍の再発が、酸分泌抑制薬による維持療法なしでもほぼ阻止できるようになった。つまり、*H. pylori* 発見により、潰瘍症の自然史は大きくかわり、患者の QOL を改善したことは間違いない。わが国でも、欧米に遅れて、2000年11月より抗生物質を用いた除菌療法が消化性潰瘍患者のみを対象に保険適用になったが²⁾、除菌療法の普及に伴い、抗生物質に対する耐性菌の出現が問題となってきた。また、感染症であるにもかかわらず、本菌の感染ルートはいまだ説明されておらず、感染予防策の確立も望まれている。このようななか、産・官・学のあらゆる角度から *H. pylori* の予防および治療法が検討されている。

words *Helicobacter pylori* words
immunoglobulin Yolk (IgY)
ウレアーゼ
免疫鶏卵
acid secretion
words

* SUZUKI Hidekazu, HIBI Toshifumi/慶應義塾大学医学部消化器内科

** NOMURA Sachiko/早稲田大学生命医療工学研究所

1. 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など(抗原)に対して「抗体」とよばれる蛋白質を血液中に産生し、細菌やウイルスなどを無毒化し、排除するという自己防御システムを有している。抗体は、魚類以上のすべての動物のもつ蛋白質であり、物理化学的特性および機能の違いにより分類されている。哺乳類の場合は、IgG, IgM, IgA, IgD および IgE の 5 種類を、一方、鳥類は、IgG, IgM, IgA の 3 種類をもっている³⁾。以上のなかで、血液中に最も多く含まれている IgG は分子量が約 15 万、Y 字形をしており H 鎖と L 鎖のそれぞれ 2 本ずつから構成される。N 末端側は可変領域とよばれ、その先端部分に抗原結合部位が存在し、そのわずかなアミノ酸配列の差異がその抗原特異性に関連する。ある抗原が動物の体内に侵入した場合、免疫機能が刺激され抗原に特異的結合能を有する抗体が動物の体内に産生される。この機能を応用することで特定の抗原に対する特異抗体を動物から得ることが可能である。従来、特異抗体は、ウサギ、ヤギなどの動物に過免疫し、その血液で調製されてきた。たとえば、ウサギにある抗原を筋肉注射すると投与した抗原に対する特異抗体が血中に産生されるので、それを採血し、血清を分離・精製することで IgG を主とした特異抗体を得る。血中に産生された特異抗体はヒトをはじめウサギ、ウシなどの哺乳動物の場合、子孫を守る目的で母乳中に移行される。

2) 卵黄抗体とは

さて、母乳も胎盤も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？

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⁴⁾。なかでも血液中の IgG は、卵黄にのみ選択的に蓄積され、卵黄液 1 ml あたり約 10 mg 含有される。ニワトリ 1 羽は、1 年間に約 250~300 個の卵を産卵するため 1 年間に得られる抗体量は約 40 g となり、この量はウサギ 30 羽分から得られる抗体量に相当する。ニワトリは、大量飼育も容易なので、目的の抗原

に対する特異抗体を大量に調製することができる。ところで、卵黄に含まれる抗体は IgG クラスではあるが、哺乳類 IgG とは物理化学的な性質が若干異なることから immunoglobulin Yolk (IgY) と表される³⁾。IgY は、分子量 18 万で⁵⁾、等電点は pH 約 1 単位酸性側⁶⁾、哺乳類の補体を活性化せず、プロテイン A やリウマチ因子との結合性がない。以上の点は、哺乳類 IgG にはない特徴で、IgY を幅広く利用するうえでの利点である。

2. *H. pylori* 特異的経口抗体による受動免疫の効果

感染症に対する治療法や予防法には、抗生物質のほかにも上述した抗体によって病原体を排除する方法がある。抗体を中心とした生体防御系は能動免疫と受動免疫に分かれるが、能動免疫は自然感染によって、あるいはワクチンによって防御免疫が獲得される。これに対して受動免疫では母乳に含まれている抗体など、すでに形成された抗体が移入される。*Helicobacter felis* (*H. felis*) のマウス感染モデルを用いた実験では、菌体の lysate (溶解物) を母親マウスに免疫することによって、母乳中に特異的抗体が誘導され、新生児マウスの感染を予防することが報告された⁷⁾。さらに、菌体を免疫したウシの乳など抗原特異的な抗体を含む抗体食品についてもいくつかの研究がなされており、初乳に含まれる抗 *H. felis* 抗体をマウスに経口投与することによって、*H. felis* 感染が抑えられる⁸⁾ことが報告された。

最近、この抗体食品の抗体源として卵黄抗体 IgY が注目されている。Shimamoto ら⁹⁾は、*H. pylori* 感染動物モデルであるスナネズミにおいて、*H. pylori* で免疫したニワトリから得られた IgY が、*H. pylori* 感染により引き起こされるびらん形成および血清抗体価の上昇を抑制することを明らかにした。また、Shin ら¹⁰⁾は、抗 *H. pylori* IgY をスナネズミに経口投与することによって、感染に伴う胃粘膜への炎症細胞の浸潤が抑えられることを報告した。しかし、この菌体溶解物に対する抗体は、*H. pylori* のさまざまな蛋白抗原と結合すると同時に、ヒトの腸内細菌にも交差反応性を示す¹¹⁾ことから、*H. pylori* に対する特異的な効果が減少し、腸内フローラに対しても未知の影響を及ぼす可能性がある。

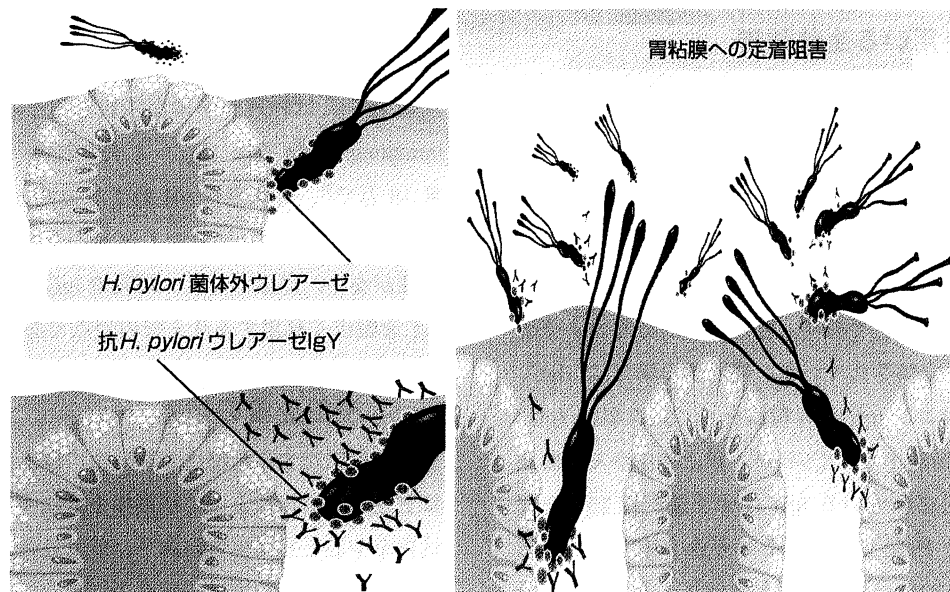


図1 *H. pylori* 菌体外ウレアーゼによる胃粘膜への定着機序と経口抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY の効果 (仮説)

H. pylori ウレアーゼは菌体内および菌体外膜に存在し、尿素からアンモニアを産生して胃酸を中和するはたらきをもつと考えられているが、本菌の胃内定着にもかかわっていることが示唆される。このウレアーゼを特異的にブロックすることにより、*H. pylori* の胃粘膜への付着を阻害することが考えられる。

[Suzuki H, Masaoka T, Miyazawa M *et al* : Gastric mucosal response to *Helicobacter pylori*. *Keio J Med* 51 (suppl 2) : 40-44, 2002 より許可を得て転載]

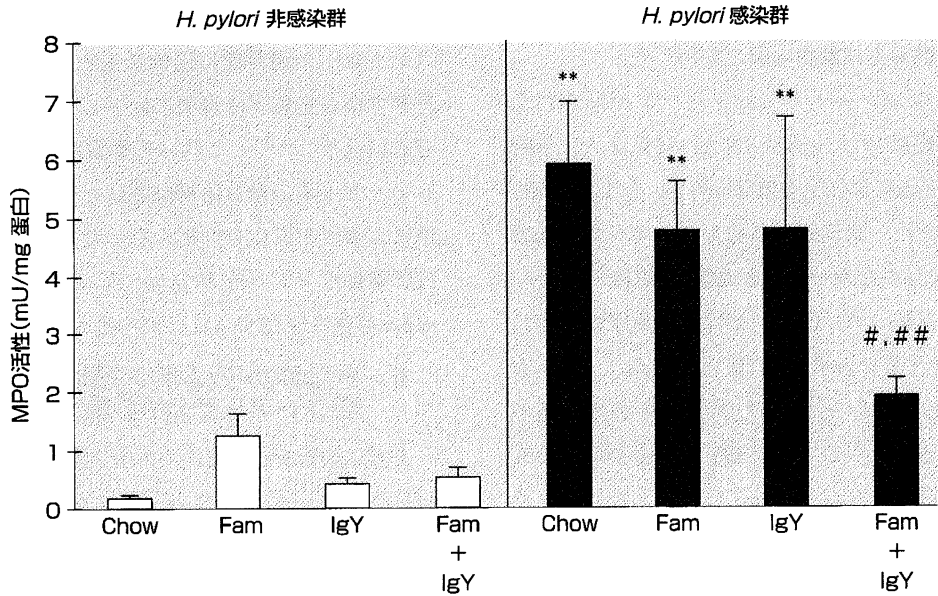
3. *H. pylori* 感染定着における菌体外膜ウレアーゼの役割と抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY の開発

H. pylori に選択的に作用する抗体を作製するためには、*H. pylori* に特異的に発現している蛋白を抗原として用いなければならない。Blanchard ら¹²⁾は、*Helicobacter* のウレアーゼに特異的な抗体を経口投与することによって、マウスの *H. felis* 感染が予防できることを報告している。この報告では、マウスの *H. felis* 感染においてウレアーゼがどのような役割を果たしているか明らかにされなかったが、感染の第一関門となる本菌の胃粘膜接着機構については、精製 *H. pylori* ウレアーゼが胃粘膜ムチンに対して結合し、とくに pH4.0 付近で高い親和性を示すことが証明されている¹³⁾。以上の知見より、*H. pylori* の菌体外膜に局在するウレアーゼが、宿主である胃粘膜に接着することから感染のはじまる可能性が高い。つまり、胃粘液層表面は酸性条件であるため、*H. pylori* は胃粘液

層に到達するとまず、菌体外膜上のウレアーゼが胃粘液層中のムチンに結合し、定着への足がかりとなると考えられる¹⁴⁾。これらのことから、ウレアーゼと特異的に結合する抗体を作製することにより、胃粘液ムチンへの *H. pylori* の付着を阻害し、さらに抗原抗体反応により菌体が凝集し、徐々に体外に排泄されると推測される (図 1)。

4. *H. pylori* 感染に対する抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY 含有鶏卵の効果

Icatlo ら¹³⁾は、液体培地で培養した *H. pylori* より、アフィニティーゲル Cellufine Sulfate を用いてウレアーゼを精製している。ウレアーゼ活性の高かったフラクションは酵素を構成している α および β サブユニットから成り、このフラクションが精製ウレアーゼである。抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY を調製するため、精製ウレアーゼを適切なアジュバンドと混合しニトリに免疫し、その後試験的に採卵し、ELISA 法にて抗体価が最高となった



図② 経口抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY の *H. pylori* 感染スナネズミ胃炎に対する効果

MPO: ミエロペルオキシダーゼ

Chow: 標準食群

Fam: ファモチジン含有食群

IgY: IgY 含有食群

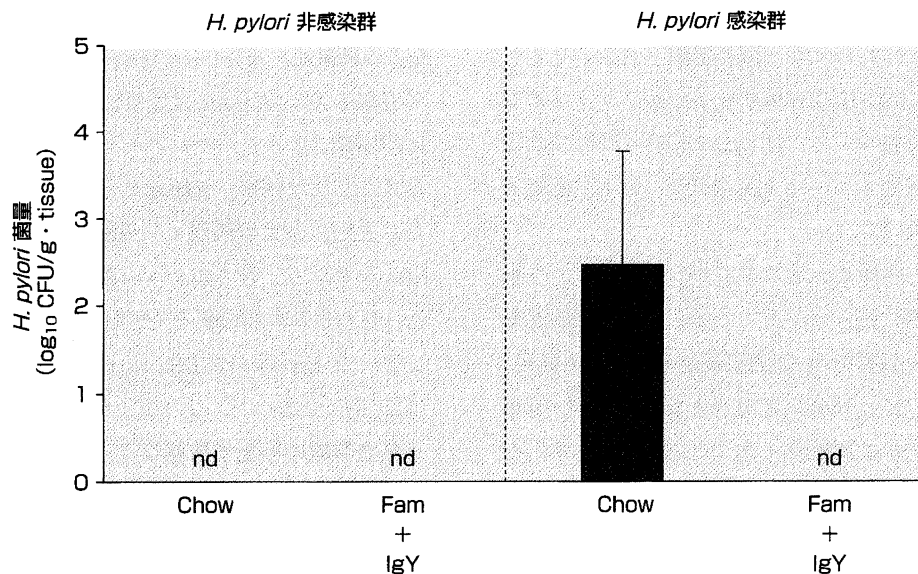
Fam + IgY: ファモチジンおよび IgY 含有食群

** : $p < 0.01$ vs *H. pylori* 非感染 Chow 群

: $p < 0.05$ vs *H. pylori* 感染 Fam 群

: $p < 0.01$ vs *H. pylori* 感染 Chow 群または *H. pylori* 感染 IgY 群

(Nomura S et al, 2005¹⁶ 参照)



図③ 経口抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY の *H. pylori* 感染に対する予防効果

Chow: 標準食群

Fam + IgY: ファモチジンおよび IgY 含有食群

nd: コロニー形成なし

(Nomura S et al, 2005¹⁶ 参照)

段階の卵を回収する。この免疫鶏卵を脱脂したものを、ボランティア試験および動物実験に使用した。

生来健康でインフォームド・コンセントの得られた *H. pylori* 陽性被験者 17 人（男性 15 人，女性 2 人，年齢 30～58 歳）に，抗体を含む脱脂鶏卵 900 mg を 1 日 3 回，4 週間，摂取させた。試験期間を通して，すべての被験者に有害事象は認めなかった。試験期間前後に施行した¹³C-尿素呼気試験（¹³C-UBT）では，標識尿素薬投与前後の¹³CO₂の変化量を表す UBT 値（ $\Delta^{13}\text{CO}_2$ ）が 17 人中 13 人で低下し，4 人で上昇した¹⁵。UBT 値の全体の平均値は，抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY 鶏卵粉摂取後で有意に低下しており，胃内の *H. pylori* に抑制的な影響を及ぼすものと示唆された。しかし， $\Delta^{13}\text{CO}_2$ のカットオフ値である 2.5 %未満となった例はなく，菌量が減少した可能性は考えられるが，除菌はできなかった¹⁵。

5. 抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY 含有鶏卵の効果と酸分泌抑制薬

抗体を経口的に摂取する場合，抗体が胃酸などの影響で活性を失ってしまう可能性が高い。Shimamoto ら⁹)による臨床試験では，抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY を摂取する前に H₂受容体拮抗薬（シメチジン）を服用することによって *H. pylori* 陽性ボランティアの UBT 値が半減したと報告している。われわれも，酸の影響を減少させるため，鶏卵抗体とともに H₂受容体拮抗薬であるファモチジンをスナネズミに投与して，*H. pylori* 動態や胃の炎症に対する抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY の効果，および感染予防効果を検討した¹⁶。

まず，*H. pylori* 感染スナネズミに IgY 含有飼育，ファモチジン含有飼料，IgY およびファモチジン含有飼料およびコントロール飼料を 10 週間摂取させた。その結果，各群間で胃内 *H. pylori* 菌量に差を認めなかったが，好中球浸潤の指標である胃粘膜ミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性は IgY 非含有飼料の感染群に比較し IgY+ファモチジン含有飼料の感染群で有意に低下した（図 2）。また，ファモチジン含有飼料あるいは IgY 含有飼料の単独投与群ではこのような有意な減少は認められなかった（図 2）。

つづいて，予防効果を調べるために，IgY+ファモチジ

ン含有飼料を感染前にスナネズミに投与した。その結果，コントロール飼料群に比較し IgY+ファモチジン含有飼料群で菌の定着率は著明に低下し（図 3），MPO 活性も有意に低下した¹⁶。これらの動物実験から抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY は酸分泌抑制療法との併用で，*H. pylori* 感染による胃の炎症を抑制すると考えられ，また，酸分泌抑制薬併用下での抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY 摂取は，*H. pylori* 感染を予防することが示唆された。

6. *H. pylori* のムチン接着に対する抗ウレアーゼ IgY の阻害効果と pH の影響

上記，動物実験で証明された免疫鶏卵の感染予防効果が抗ウレアーゼ IgY の *H. pylori* 接着阻害効果に起因するかを明らかにするために，免疫鶏卵より IgY を単離して *in vitro* の試験をおこなった。ウレアーゼ免疫鶏卵より単離された抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY は，ウエスタンブロット法によってウレアーゼの α および β サブユニットに特異的に結合することが確認された。しかし，ウエスタンブロット法の pH 条件を変えて酸の影響を調べた結果，抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY のウレアーゼに対する結合は pH5 では確認されたが，pH3 では認められなかった¹⁶。

つぎに，われわれは，*H. pylori* のムチン接着に対する IgY の効果を，mucin-coated plate を用いた ELISA 法にて評価した。*H. pylori* の接着は抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY 処理によって，ウレアーゼのリガンドである硫酸デキストラン（DSS）を加えたときと同様に著しく減少した。また，非免疫鶏卵より単離した IgY（コントロール IgY）を処理してもこのような阻害効果は認められなかった。IgY 非処理群の値を 0%阻害とすると抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY および DSS によるムチン接着の阻害率はほぼ 60%であった。このことから，動物実験で認められた免疫鶏卵の感染予防効果は，ウレアーゼ特異的な IgY が *H. pylori* のムチン接着を阻害することに起因すると思われる¹⁷。

さらに，*H. pylori* と胃粘膜の相互作用によって誘導される炎症性サイトカインの増加も，IgY によって抑制される可能性が示されている。*H. pylori* が培養上皮細胞に表出している MHC クラス II を介して細胞に接着し，ア

ポトースを誘導することによりヘルパー T 細胞タイプ 1 (Th₁) による組織傷害を助長していることが示唆された¹⁸⁾。また、上皮細胞の MHC クラス II に対する *H. pylori* 側のリガンドがウレアーゼであることも証明されている¹⁹⁾ことから、感染動物に経口的に投与された抗ウレアーゼ抗体が胃粘膜におけるウレアーゼ-MHC クラス II 間相互作用を阻害していたことが予想される。とくに、本菌との接触によって粘膜上皮細胞および粘膜固有層マクロファージより産生される IL-8²⁰⁾は好中球の遊走や活性化を引き起こすため、ウレアーゼ特異的な IgY が *H. pylori* の胃粘膜への接着を阻害し、好中球の浸潤を伴う一連の炎症反応を抑制して、感染動物胃粘膜の MPO 活性を低下させた可能性が考えられる。

しかし、*H. pylori* のムチン接着に対する抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY の阻害率は、pH5 では高い値を保持していたが pH3 では著明に低下した。したがって、強酸性の条件下では、抗 *H. pylori* ウレアーゼ IgY が *H. pylori* のムチン接着を阻害することは困難であり、抗ウレアーゼ IgY の効果を維持するためには、酸分泌抑制薬の併用などによって胃内環境を pH5 付近に保つことが必要となる。

おわりに

H. pylori ウレアーゼに特異的な IgY を含む鶏卵抗体は、接着因子をダイレクトに、また特異的にブロックすることにより胃内の *H. pylori* の菌数を減少させるものであり、耐性菌の発生はもちろんのこと、卵由来であるため卵白アレルギーを除けば副作用の問題もなく、安全性においても問題の少ない新規素材である。鶏卵抗体が現在の *H. pylori* 除菌療法の補助療法として、また、感染の新たな予防法のひとつとして貢献する可能性が考えうるが、さらに有効性を発揮させるために、耐酸性の向上などのモダリティの工夫が重要であろう。

文 献

- Warren JR, Marshall BJ : Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* i : 1273-1275, 1983
- Asaka M, Satoh K, Sugano K *et al* : Guidelines in the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan. *Helicobacter* 6 : 177-186, 2001
- Leslie GA, Carwile HF : Immune response of rats to group A streptococcal vaccine. *Infect Immun* 7 : 781-785, 1973
- Malkinson M : The transmission of passive immunity to *Escherichia coli* from mother to young in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Immunology* 9 : 311-317, 1965
- Hatta H, Kim M, Yamamoto T : A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric Biol Chem* 54 : 2531-2535, 1990
- Altschuh D, Hennache G, Van Regenmortel MH : Determination of IgG and IgM levels in serum by rocket immunoelectrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens. *J Immunol Methods* 69 : 1-7, 1984
- Corthesy-Theulaz I, Corthesy B, Bachmann D *et al* : Passive immunity in *Helicobacter*-challenged neonatal mice conferred by immunized dams lasts until weaning. *Infect Immun* 71 : 2226-2229, 2003
- Marnila P, Rokka S, Rehnberg-Laiho L *et al* : Prevention and suppression of *Helicobacter felis* infection in mice using colostrum preparation with specific antibodies. *Helicobacter* 8 : 192-201, 2003
- Shimamoto C, Tokioka S, Hirata I *et al* : Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by orally administered yolk-derived anti-*Helicobacter pylori* antibody. *Hepatogastroenterology* 49 : 709-714, 2002
- Shin JH, Yang M, Nam SW *et al* : Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 9 : 1061-1066, 2002
- Shin JH, Nam SW, Kim JT *et al* : Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to *H. pylori*-specific egg-yolk immunoglobulin. *J Med Microbiol* 52 : 217-222, 2003
- Blanchard TG, Czinn SJ, Maurer R *et al* : Urease-specific monoclonal antibodies prevent *Helicobacter felis* infection in mice. *Infect Immun* 63 : 1394-1399, 1995
- Icatlo FCJ, Kuroki M, Kobayashi C *et al* : Affinity purification of *Helicobacter pylori* urease. Relevance to gastric mucin adherence by urease protein. *J Biol Chem* 273 : 18130-18138, 1998
- Icatlo FC, Goshima H, Kimura N *et al* : Acid-dependent adherence of *Helicobacter pylori* urease to diverse polysaccharides. *Gastroenterology* 119 : 358-367, 2000
- Suzuki H, Nomura S, Masaoka T *et al* : Effect of dietary

- anti-*Helicobacter pylori*-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* **20** (suppl 1) : 185-192, 2004
- 16) Nomura S, Suzuki H, Masaoka T *et al* : Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* **10** : 43-52, 2005
- 17) 野村幸子, 鈴木秀和, 正岡建洋ほか : *Helicobacter pylori* 感染に対する抗 urease 鶏卵抗体の効果. *消化器と免疫* **41** : 90-93, 2004
- 18) Fan X, Crowe SE, Behar S *et al* : The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells : a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J Exp Med* **187** : 1659-1669, 1998
- 19) Fan X, Gunasena H, Cheng Z *et al* : *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol* **165** : 1918-1924, 2000
- 20) Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H *et al* : Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* **65** : 3218-3224, 1997