

# 卵黄IgG

堀越俊雄 (鐘紡株式会社, 化粧品研究所)

う蝕発生メカニズムの解明に伴ない、数多くの予防法が提案され、いくつかが実用化されている。それらは、歯質強化、スクロース摂取の制限、*S. mutans*の抑制に着目したものに分類される。

我々は、う蝕が感染症であることから、*S. mutans*のビルレンス因子を特異的に阻害する方法に着目し、新たな予防法の開発を試みた。特異性が最も高い方法としては予防ワクチンが考えられ、病因となる*S. mutans*菌体またはビルレンス因子の不活化ワクチン・弱毒ワクチン等を人体に直接投与する方法や、腸管免疫を利用して免疫抗体の産生を促進し、感染を予防することが試みられている。しかしながら、能動免疫法は安全性や効果発現の点で未だ解決できない多くの課題を抱え、実用化されるに至っていない。

そこで我々は、特異性、効果、安全性を同時に満足する方法として、別に調製した特異抗体を、直接口腔内に投与する受動免疫の応用を試みた。抗体を安定かつ大量に入手する方法として鶏卵の利用に着目し、ビルレンス因子の中から有効な抗原の選択、抗原の大量調製方法の確立、ニワトリへの免疫方法、卵黄中からの大量精製技術について検討したので報告する。

## 1. 抗原の調製

う蝕抑制効果を発揮する抗体を得るために最も有効な抗原を探索する目的で、菌体結合型GTase (cell-associated GTase: CA-GTase)、培養上清由来のGTase (cell-free GTase: CF-GTase)、全菌体、タンパク抗原 (protein antigen: PAc) を調製した。CA-GTaseはTTY培地で培養後の*S. mutans* MT8148 (血清型c) 菌体から8M尿素によって抽出した。精製したCA-GTaseは、SDS-PAGE分析において156kの単一バンドとして検出され、またスクロースからの水不溶性グルカン合成活性を有していた。一方、培養上清から精製されたCF-GTaseは、水溶性グルカン合成活性を有することを確認した。

## 2. 卵黄抗体の作製

各抗原をフロイントの完全アジュバント (FCA) と共に免疫したニワトリの卵黄からクロホルムを用いて脱脂処理を行ない、卵黄中の水溶性画分 (WSF) を得た。さらにWSFを硫酸アンモニウム塩析、ついでDEAE-Sephacelのカラムクロマトグラフィーを行なうことにより、SDS-PAGE上で分子量220kの単一バンドとして検出される精製卵黄抗体 (yIgG) を得た。*in vitro*実験にはこの精製yIgGを用いた。

抗CA-GTase、抗CF-GTase、抗全菌体、抗PAcの各yIgGのELISA抗体価は、それぞれ7.6, 2.8, 4.7,  $3.1 \times 10^4$ であった (表1)。各抗体の反応性をELISAを用いて調べた結果、抗CA-GTase yIgGはCA-GTase及び全菌体と強く反応したが、CF-GTaseとの反応はほとんど認められなかった。一方、抗CF-GTase yIgGはCF-GTaseと特異的に反応し、CA-GTaseとの交叉反応は示さなかった。抗全菌体yIgGは全菌体と強く、またPAc, CA-GTase

とも明確に反応したが、CF-GTaseとはほとんど反応を示さず、さらに偽免疫を行なった $\gamma$ IgGはいずれの抗原とも反応しなかった。なお、各精製抗原で免疫して得られる抗体の力価は、全菌を免疫して得られたものよりも高かった。さらに抗CA-GTase  $\gamma$ IgGを用いて免疫ブロッキング法で解析すると、同抗体は全菌抽出液中のCA-GTaseのバンドとのみ反応した。上記のように、得られた $\gamma$ IgGはきわめて明確な免疫化学的特異性と高力価を示した。

表 1.  $\gamma$ IgG の免疫化学的特異性

$\gamma$ IgG	ELISA 法による力価 ( $\times 10^4$ )			
	CA-GTase	CF-GTase	全菌体	PAc
CA-GTase	7.55	0.32	2.09	0.36
CF-GTase	0.30	2.79	0.12	0.08
全菌体	2.40	0.45	4.67	1.51
PAc	0.09	0.23	1.24	3.06
偽免疫	0.05	0.05	0.05	0.05

### 3. $\gamma$ IgG の *S. mutans* に対する *in vitro* 作用

抗全菌体  $\gamma$ IgG は、最も低濃度で *S. mutans* の菌体を凝集した。また抗CA-GTase  $\gamma$ IgG、抗PAc  $\gamma$ IgG も *S. mutans* 菌体に対して凝集を誘発したが、抗CF-GTase  $\gamma$ IgG や偽免疫  $\gamma$ IgG は菌体凝集を誘発せず、また、調べたかぎりすべての抗 *S. mutans*  $\gamma$ IgG は *S. sobrinus* 菌体を凝集しなかった。

次に *S. mutans* による不溶性グルカンの合成に対する  $\gamma$ IgG の抑制作用を検討した。抗CA-GTase  $\gamma$ IgG、および抗全菌体  $\gamma$ IgG はCA-GTaseによる不溶性グルカンの合成を有意に抑制した。しかし、抗CF-GTase  $\gamma$ IgG、及び偽免疫  $\gamma$ IgG には、そのような阻害作用は認められなかった。一方、CF-GTaseによる水溶性グルカンの合成は、抗CF-GTase  $\gamma$ IgG によって特異的に阻害された。さらに、*S. mutans* のスクロース依存性平滑面付着に対する阻害効果を調べたところ、抗CA-GTaseおよび抗全菌体  $\gamma$ IgG は、用量依存的に *S. mutans* の付着を強く阻害した。

### 4. ラット実験系における卵黄抗体のう蝕抑制効果

上記に示したように、いくつかの *S. mutans* 抗原に対する極めて特異性が高い卵黄抗体を得ることができたことから、ラット実験う蝕における *in vivo* 抑制作用を調べた。抗体試料としては、WSF ( $\gamma$ IgG の含有は20%) を用いた。CA-GTaseに対するWSFを投与したラット群では、コントロール群及び偽免疫WSF配合群に比べう蝕スコアが有意に低下し、明確なう蝕抑制効果が確認された(図1)。

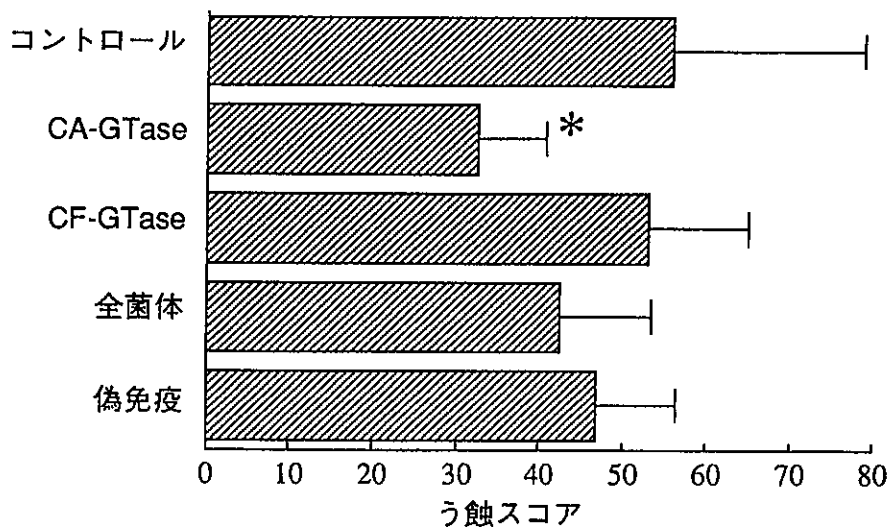


図1 卵黄抗体(WSF)のラット実験う蝕抑制効果

\* CA-GTase 卵黄抗体投与群ラットはコントロールに比べて有意に低い値を示した。(p<0.01, t-検定)

一方、全菌体に対するWSFを投与したラットにおいてもう蝕スコアの減少傾向を認めたが、統計的な有意差はなかった。また、CF-GTaseに対するWSF及び偽免疫WSFは全く効果を示さなかった。なお、同時に観察したプラーク指数の結果もう蝕スコアと同様の傾向を示した。

#### 5. 抗CA-GTase精製卵黄抗体のう蝕抑制効果における用量依存性試験

上述のように、CA-GTaseに対するWSFのう蝕予防効果が確認されたので、つぎに精製抗体(yIgG)を用いて投与量依存性と最小有効濃度を調べた。純度99%以上のyIgGは、CA-GTaseで高度に免疫したニワトリの卵黄からエタノール精製法(後述)を用いて作製した。このyIgGをう蝕誘発性飼料2000に配合して、*in vivo*でのう蝕抑制効果を調べた結果、抗CA-GTase yIgGのう蝕抑制効果は総う蝕スコア、平滑面う蝕スコアとも飼料への配合量に依存し、最小有効配合量は0.1%であった。また、プラーク指数も同様の結果を示した。

#### 6. yIgGの製造方法の確立

##### 1) ニワトリへの免疫方法と抗体の卵黄への移行

CA-GTaseをFCAと共にニワトリに免疫後の血清及び卵黄中の抗体価の推移を図2に示す。

血清中のCA-GTaseに対する特異抗体は初回免疫後約2週で検出され、5週目で最高値に達した。その後、抗体価は下降し始めたが5週目で追加免疫を行なうと再度上昇し始め、その

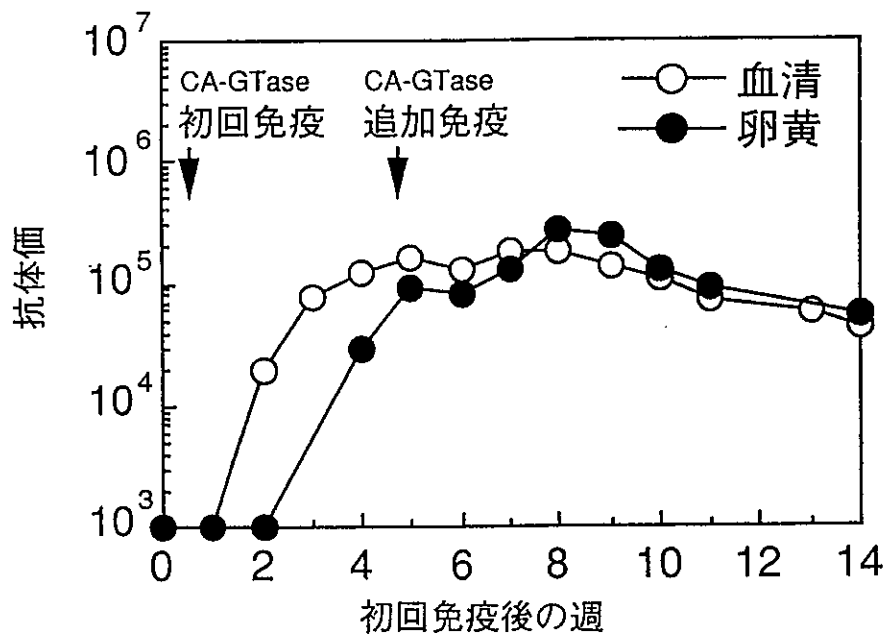


図2 ニワトリ血清から卵黄への抗CA-GTase抗体の移行

高い抗体価は初回免疫後約14週まで維持された。一方、卵黄中の特異抗体は血清中の特異抗体の変化に対し、約1週遅れて同様のパターンを示した。また卵黄中の抗体価は、血清中のそれとほぼ同程度のレベルであった。

## 2) 卵黄からの抗体の精製

我々は、CA-GTaseに対して高力価の抗体を生じたニワトリの卵黄から、エタノール分画法を利用した抗体の大量精製技術を開発した。精製スキームの概略を図3に示す。yIgGの回収率は卵黄に対して40%、純度はHPLC分析により99%以上であった。

## 7. 抗CA-GTase卵黄抗体の物理的及び化学的性質

上述の製造方法で得られた卵黄IgG抗体は、分子量176,000のタンパク質であった。このIgG抗体の反応特異性を調べたところ、CA-GTaseには強く反応したが、*S. mutans*の菌体成分であるPAC, CF-GTase, LTA, 多糖抗原には反応せず、CA-GTaseに対する特異的な反応性を有していることが確認された。また、ヒト心臓組織との交叉反応性を調べたところ、抗CA-GTaseyIgGは全く反応性を示さず高い安全性が示された。

卵黄IgGは、粉末状態で40°C、6か月以上その反応性を保持し安定であった。また、70°C、24時間処理後も抗体活性の70%を保持していた。また、チューインガムへの配合安定性も確認した。

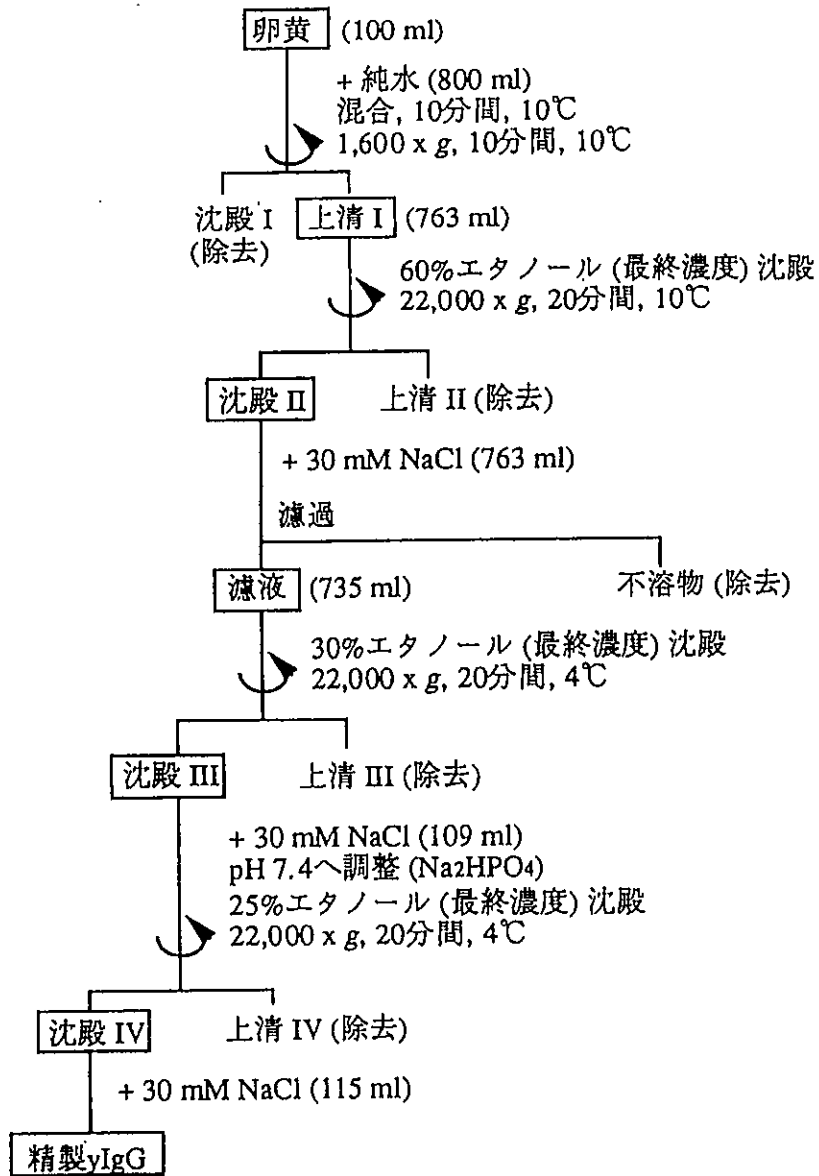


図3 yIgGの精製スキーム