

ニワトリ卵黄免疫グロブリン (Immunoglobulin Yolk : IgY) の産業への利用 概論

株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン 児玉 義勝

第1章 概論

1 はじめに

ブタの初乳には IgG と分泌性 IgA が大量に含まれている。子ブタが生後 48 時間以内に初乳を摂取すると IgG は腸管絨毛上皮細胞から吸収されて血中 IgG (移行抗体) となり、全身性感染症の防御に働き、また分泌性 IgA は腸管粘膜にとどまり局所感染症を防御する。子ブタはこのように初乳によってのみ、免疫グロブリンの母子移行が起こる。鳥類では親鶏の生んだ卵の卵黄成分に含まれる免疫グロブリン (IgY) を胎児が吸収することにより孵化したヒナに母子移行が成立する。

特異的 IgY の作成は鳥類に備わっている「卵黄内への輸送機能」の生物学的な仕組みを利用する。これは目的とするターゲット抗原を親鶏に接種することで、血清中に接種抗原に対する免疫グロブリンが産生され、それを卵黄に蓄積して産卵する。親鶏に接種する抗原の種類を変えるだけで、特異性の異なるいろいろな IgY が生産できる。この IgY は、哺乳類の IgG に相当するもので分子サイズは大きく 180 kDa であるが H 鎖不変領域は 4 個のドメインからなり、H 鎖は哺乳類 IgG と異なる。

2 製品開発のコンセプト

飛沫感染性インフルエンザウイルスおよび消化管粘膜をターゲットとした病原因子に対する IgY が、医薬以外の産業分野で健康維持の目的で 2 とおりのアプローチが試みられている。

IgY は、卵黄タンパク質に約 30% 含まれる水溶性タンパク質の中に含まれている。この水溶性タンパク質を抽出したものをエアフィルターに担持して空気清浄機やマスクに応用されている。この技術は、空气中に飛散しているインフルエンザウイルスがフィルターにトラップされてフィルター上で IgY

とウイルスが抗原抗体反応を起こして感染性が中和されることによって不活化される仕組みである。

一方では、口腔を含めた消化管粘膜に感染する細菌の病原因子に対する IgY を含有する卵黄液または卵黄粉末が機能性食品原料として利用されている。食品分野においては機能性成分である IgY を精製して利用するのではなく、一般の食品として利用されている卵黄液や卵黄粉末と同じ形態で利用する。

食品カテゴリーにおいては IgY ではなくリベチンとして表記される。リベチンとは、卵黄の水溶性タンパク質のことであり、 α -リベチン、 β -リベチンおよび γ -リベチンの 3 種類に区分され、各々の構成比は 2 対 3 対 5 であることが報告されている¹⁾。 α -リベチンは親鶏の血清アルブミンで、 β -リベチンは血清 α_2 -グロブリンである。 γ -リベチンは、血清 γ -グロブリンが卵黄内輸送機能によって卵黄に移行したものである²⁾。また、ターゲットに対する特異 IgY は、卵 1 個あたり数~数十 mg 程度含まれている。

消化管粘膜に対応した特異的 IgY は、細菌またはウイルスと結合してクリアランス機能を発揮する。摂取した卵黄成分の IgY は腸管粘膜上皮細胞から吸収されて血行に流入することはない。

用途として卵黄液はヨーグルト、プリンなどに用いられ、卵黄粉末はタブレット、デンタルペースト、ガムなどに利用されている。これらは、健康人を対象とした機能性食品として、日常の食生活の中で摂取することによって保健効果を期待するものとして応用されている。

3 産業利用における IgY の優位性

前項のコンセプトにおいて、ウシ IgG の学術研究もなされてきたが、生産面および抗体活性の機能

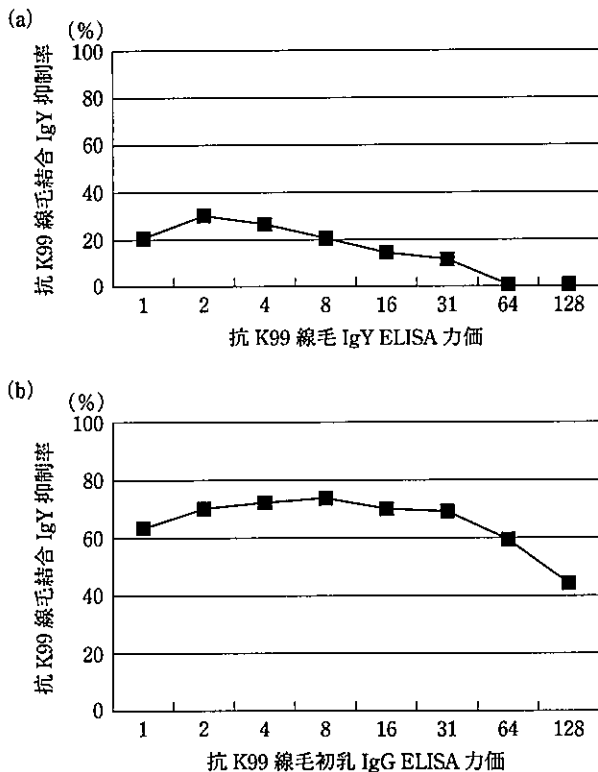


図1 抗K99-IgYと抗K99-IgGのK99抗原に対する抗原結合力の比較
(a)第1試験(コンペティター:抗K99線毛初乳IgG), (b)第2試験(コンペティター:抗K99線毛IgY)

面からウシIgGより鶏IgYが産業利用に適していることがわかった。ウシ初乳IgGは、分娩後数日間の乳に多く含まれているがそれ以降の乳中のIgGは激減する。また、乳および乳製品の成分規格等に関する省令により、分娩後1週以内の乳は食品として使用できない。産卵鶏は1年間で1羽あたり約300個の卵を産み、近年の養鶏技術向上により数万羽単位での飼育がなされていること、鶏病予防のためワクチンの免疫がルーチン化しており、そのノウハウを応用することで、目的に合わせた抗原を数万羽単位で接種することが可能である。さらに食用卵および卵食品としての流通、殺菌液卵ならびに粉卵の生産ラインが工業化されており、食品衛生基準に従った大量生産ができるので、低コストの大量生産が実現でき、かつ「安全・安心」を保障できる。なお、産卵鶏は、ウイルス、細菌およびマイコプラズマの病原体に感染すると産卵率が低下し経営を圧迫する。そのため、鶏病予防のワクチン接種がルーチン化しており、マーケットに流通している卵にはワクチン抗原に特異性を有するIgYが含まれている。長

い食経験の中でこのIgYが原因で異常を訴えた例は報告されていない。

4 IgYとウシ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)が最も重要な要素であり、IgYは高い抗原結合力を有する優れた免疫グロブリンであることが証明されている。

4.1 *in vitro* 試験

抗腸管毒素原性大腸菌(ETEC)K99-IgYと抗ETEC K99-初乳IgGのK99抗原(線毛)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。

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%にすぎなかった(図1(a))。これに対し、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、40%から80%と強く抑制された(図1(b))³⁾。*in vitro*試験でIgYはIgGより優れた抗原結合力を有することが示唆された。

4.2 *in vivo* 試験

子ウシに水溶性下痢を引き起こすウシコロナウイルス抗原(NCDC株)を産卵鶏または妊娠ウシに各々高度免疫することにより、抗コロナウイルスIgYならびに初乳IgGを作成し、各々のウイルス中和抗体価とコロナウイルス感染子ウシにおける経口受動免疫能を比較した。

その結果、IgY-2,560倍投与群の子ウシは一過性の下痢症状が観察されたが回復し、累積下痢スコアならびに増体率は無投与対照群に対して、有意に改善された。これに反し、IgG-2,560倍投与群の子ウシは強毒ウイルス攻撃後4日目までに水溶性粘血便を呈して全頭が死亡した。また、IgY-2,560倍投与群の腸管粘膜における攻撃ウイルスの感染価を検査したところ、小腸では本ウイルスは検出されず、大腸での感染価は無投与群ならびにIgG-2,560倍に対し有意に減少した⁴⁾。

5 IgY の消化管における安定性

IgY は 180 kDa のタンパク質であるため、胃酸や消化酵素によって変性または分解され、抗体活性が失活することが考えられる。そこで、生後7日齢の子ウシならびに離乳前の子ブタに各々抗 ETECK99-IgY および抗 ETECK88-IgY を単回経口投与した後、経時的に腸管各部位の抗体活性を測定した。その結果、子ウシにおいては投与2時間目の抗体価のピークは胃から空腸中央部に観察され、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⁵⁾。また、子ブタにおいては投与2時間目で抗体価のピークは胃から空腸中央部に確認され、6時間後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のみに観察された⁶⁾。これらの観察から、子ウシならびに子ブタともに各腸管粘膜から各々抗 K99-IgY および抗 K88-IgY が検出され、時間の経過に伴って抗体価のピークは上部から下部に緩やかに移行したことから、大半の IgY が消化酵素などの影響を受けていないと考えられる。

【引用・参考文献】

1) C.C. Shepard and G.A. Hottle : Studies of the composi-

tion of the levetin fraction of the yolk of hen's eggs with the use of electrophoretic analysis, *J. Biol. Chem.*, **179**, 349-357 (1949).

- 2) W.G. Martin and W.H. Cook : Preparation and molecular weight of γ -levetin from egg yolk, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **36**, 153-160 (1958).
- 3) Y. Ikemori, R.C. Peralta, M. Kuroki et al. : Avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae, *Poultry Sci.*, **72**, 2361-2365 (1993).
- 4) Y. Ikemori, M. Ohta, K. Umeda et al. : Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder, *Vet. Microbiol.*, **58**, 105-111 (1997).
- 5) Y. Ikemori, M. Ohta, K. Umeda 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) H. Yokoyama, R.C. Peralta, S. Sendo et al. : Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by the use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing, *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 867-872 (1993).

<児玉 義勝>

ニワトリ卵黄免疫グロブリン (Immunoglobulin Yolk : IgY) の産業への利用
IgY のエアフィルターへの応用

早稲田大学 並木 秀男

ダイキン工業株式会社 小澤 智

株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン 児玉 義勝

第2章

IgY のエアフィルターへの応用

1 はじめに

酵素のような生体由来のバイオ素材をフィルターに応用しようとする試みは、以前から研究開発が行われてきたが、バイオテクノロジーの急速な進歩とあいまって、近年実用化のレベルまで到達できるようになった。筆者らが着目した抗インフルエンザウイルス IgY は、酵素と比較した場合、迅速な反応性と非常に高い特異性をもっている。酵素は至適温度より低い温度条件で使用した場合には、反応速度が極端に低下する。例えば、酵素が熱に弱いというデメリットを耐熱性酵素でクリアしようとした場合、確かに安定性は向上するが、室温ではまったく酵素反応が進まないというようなジレンマが生じてしまう。それに対し、IgY は安定性が高く、さらに人が生活する温度域では迅速な反応速度を維持しているという特徴を有している。また、研究試薬や臨床検査試薬として研究が進んでおり、高い特異性とそのメカニズムが明確に解析されている。

筆者らは、とくに IgY に着目して、この技術を工業的に利用すべく、空気中のインフルエンザウイルスを迅速に不活化するバイオフィルターの開発を行った。

2 バイオフィルターのメカニズム

人がインフルエンザウイルスに感染すると、体内で増殖したウイルス粒子は液性免疫系を活性化し、ウイルスに対する特異的な抗体が B リンパ球から産生される。この抗体により、ウイルスの捕獲と中和反応が進行し、速やかにウイルスが不活化されていく。この作用を、空気中に浮遊するインフルエンザウイルスに対して実施したのが、抗ウイルス IgY を利用したバイオフィルターである。図 1 に示したように、空気中に浮遊するインフルエンザウイルス

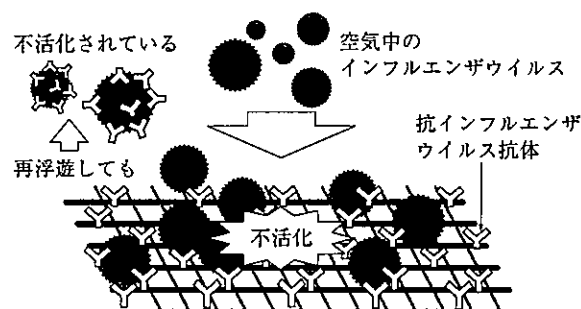


図 1 バイオ抗体フィルターのメカニズム

スはフィルター上の抗インフルエンザウイルス IgY に捕獲され、抗原抗体反応メカニズムにより直ちに不活化される。また、一度捕獲されたインフルエンザウイルスが再浮遊したとしても、ウイルス表面に IgY が吸着していることから、ヒトへの感染性は完全に失われる。これは、ヒトへのインフルエンザウイルスの感染には、気道粘膜細胞のエンドサイトーシス作用が関連していて、ウイルス表面のスパイクに IgY が作用することで、このエンドサイトーシスが阻害されるためである。

3 IgY を空気質フィルターに応用する問題点と解決策

しかし、抗インフルエンザウイルス抗体を利用したバイオフィルターを実用化しようとした場合に、二つの大きな問題点があった。一つ目は、抗体が非常に高価であることであり、二つ目は、抗体は乾燥状態ではまったく働かないということである。我々はこの問題を、IgY を利用することと、フィルターに調湿性繊維を利用することで解決した。

3.1 IgY の利用による解決策

抗体は通常ラット、ウサギ、ヤギなどの動物を抗原で免疫し、その血液から精製する。抗原で免疫を

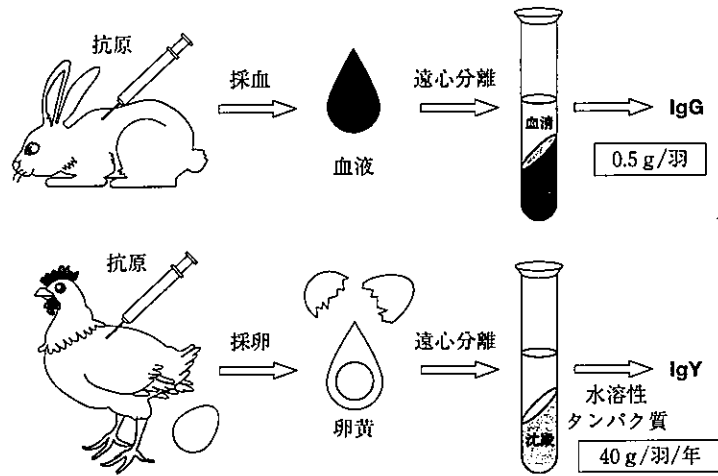


図2 ウサギと産鶏卵における抗体採取量の比較

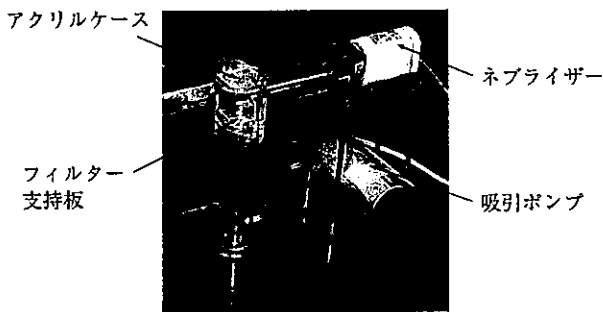


図3 バイオ抗体フィルター試験装置

するのに時間がかかることと、血液を採取することにより動物を犠牲にしなければならないため、コスト高となり、研究試薬や臨床検査試薬など、限られた用途にしか利用されていなかった。近年、ニワトリの卵黄からIgYを産生する技術が開発されたことから、筆者らは、この技術を利用して抗インフルエンザウイルスIgYを用いたフィルター開発を行った。図2に示したように、通常の抗体が動物を殺して採血するのに対して、IgYでは、特別管理下のニワトリに抗原を接種して得られた卵の卵黄からIgYを抽出する。接種されたニワトリは抗インフルエンザウイルスIgYを含んだ卵をほぼ毎日生み続けることから、製造コストは飛躍的に低下する。

3.2 調湿性繊維の利用による解決策

人体の抗原抗体反応は、血液やリンパ液などの体液中で起こる。抗体は乾燥状態では機能しないことから、空気質フィルターには使えないのが常識であった。そこで、フィルター材料に調湿性繊維を使用することで、空気中の湿度を吸って、マクロには

ドライであっても、展着IgY近傍のマイクロな環境ではウェットな状態を作り出すことに成功した。

IgYと調湿性繊維の利用によって、IgYをバイオ素材として空気質フィルターへの適用が可能となった。

4 バイオフィルターの性能評価

バイオフィルターの性能は、ウイルス不活化能力を中和実験で、IgYスペクトルをELISAによって評価した。ウイルス中和実験は、図3のバイオIgYフィルター試験装置で行った。抗インフルエンザウイルスIgYと、コントロールとして対照IgY(インフルエンザウイルスを接種していないニワトリが産卵した卵黄より作製)を担持したフィルターを用意する。各フィルター1cm²をフィルター支持板に固定し、ウイルス溶液50μL(総数約1.2×10⁹個)をネブライザーから噴霧する。フィルター上に捕捉されたウイルスを洗い出し、希釈後発育鶏卵に接種し、継代培養後、赤血球凝集(HA)試験でウイルスの感染・増殖性の有無を測定する。この試験により、バイオフィルター上に捕捉されたインフルエンザウイルスは、99.99%以上が1分以内に不活化することが確認された¹⁾。

IgYの反応性については、ヒトインフルエンザウイルスとしてメジャーなA型H1N1株、A型H3N2株、B型株および鳥インフルエンザとして注目を浴びているH5リコンビナントで評価した。バイオフィルターはいずれの抗原とも交差性をもち、本IgYは広いスペクトルをもつことが確認された。

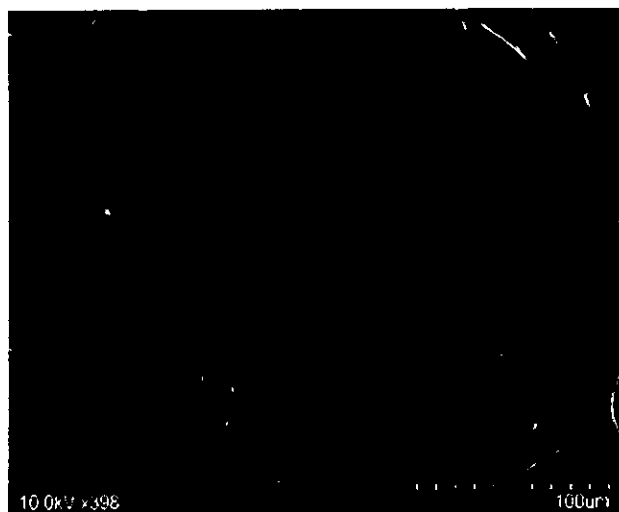


図4 バイオ抗体フィルターの走査電子顕微鏡写真(弱拡大)

また、バイオフィルター上でIgYに捕捉されたインフルエンザウイルスの走査電子顕微鏡像の図4は弱拡大のフィルター繊維の写真で、図5は強拡大した写真で、フィルター上に捉えられたウイルス粒子が多く確認される。この写真は、山形大学医学部によって世界で初めて撮影された。

インフルエンザウイルスは、患者の口から咳・くしゃみとして空気中に飛散する。このときウイルスは唾液の水滴の中に含まれる「飛沫」として存在している。飛沫はミクロンオーダーの大きさがあるので、通常のフィルターには容易に捕まえられる。しかし、飛沫は短時間で乾燥し、ウイルス粒子そのものの「飛沫核」となる。インフルエンザウイルスの大きさは80～120nmである。従来のウイルス不活化機能をもったフィルターでは、不活化までの時間がかかるため、捕まったウイルスを再飛散させてしまい、インフルエンザウイルス感染の予防効果はない。それに対してIgYを利用したバイオフィルターでは、捕

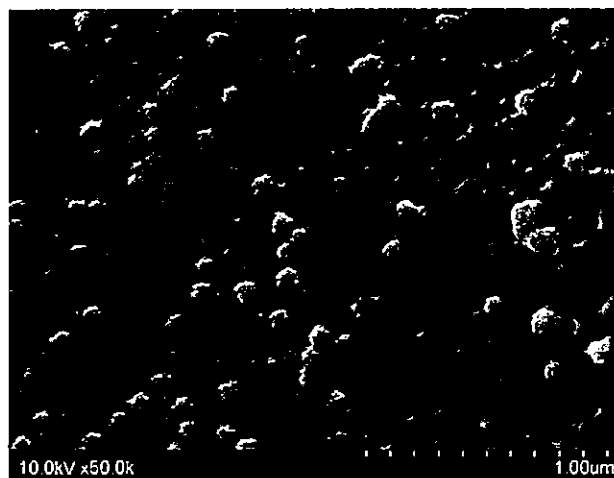


図5 バイオ抗体フィルターの走査電子顕微鏡写真(強拡大)

獲して1分以内で99.99%以上を不活化する効果があるので、感染予防に力を発揮できる。さらに開発を進めトリ由来A型H5N1Clade 1ならびにH5N1Clade 2.1インフルエンザウイルスに対するIgYは、A/Hanoi30408/2004(Clade1)およびA/Hanoi31461/2007(Clade 2.3.4)を中和すること、ヒト由来インフルエンザウイルスIgYとブタ由来インフルエンザウイルスIgYの混合IgYで2009年に流行したヒト新型インフルエンザウイルス(A/H1N1: HN31868)を中和することが検証された(Dr. Le thi Quynh Mai ハノイ衛生疫学研究所, 2009)。

【引用・参考文献】

- 1) 並木秀男：バイオ抗体フィルター，バイオ EXPO(総説)(2006)。

<並木 秀男/小澤 智/児玉 義勝>

ニワトリ卵黄免疫グロブリン (Immunoglobulin Yolk : IgY) の産業への利用
機能性食品への応用と可能性

株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン 児玉 義勝

第3章

機能性食品への応用と可能性

1 はじめに

抗生物質や抗菌性物質などはヒトの治療や健康維持などに必須なものである。しかしながら、有用細菌に対する影響や正常菌叢を崩してしまうこと、薬剤耐性菌の誘導などのデメリットももち合わせる。

一方で、免疫グロブリンの最大の特徴は特異的結合反応である。すなわち、鍵と鍵穴の関係のようにターゲットとする抗原のみに対して反応するため、上記のデメリットがない。消化管粘膜をターゲットにしている細菌の病原因子に対するIgYは病原因子に結合して増殖を抑制する。抗ウイルスIgYは消化管粘膜上皮細胞に感染したウイルスに結合して中和反応が起こり、ウイルスの感染性が不活化される。

2 抗ウレアーゼ IgY の開発

ピロリ菌は急性ならびに慢性胃炎を引き起こすとともに胃十二指腸潰瘍の原因となる。ピロリ菌除菌治療の主役はクラリスロマイシン(CAM)+アモキシシリン+プロトンポンプ阻害薬3剤の7日間投与である。最近、CAMに対する耐性ピロリ菌の増加が著しく、耐性率は20%を越え、当初の除菌成功率90%以上から現状では70%台まで低下しているといわれている。

2.1 ピロリ菌の胃粘膜への接着因子ウレアーゼとそのメカニズム

接着因子として想定されたウレアーゼの簡便で再現性のある精製方法を、硫酸化セルロファイニアフィニティゲルを用いて確立した。この方法により精製したウレアーゼをビオチンでラベルして使用することにより、ウレアーゼとそのリセプターとの相互作用を高感度で検出することを可能にした。この検出方法は、*in vitro*における硫酸化アフィニティ

ゲルへのウレアーゼの接着性に基づいており、生体内におけるムチンのような硫酸化多糖体との相互作用を示唆している。*in vitro*試験の結果、ウレアーゼは酸性pH領域においてのみ、その接着性を有し、またヘパリン、硫酸化多糖類および胃ムチン型糖タンパク質を含むいくつかの負電荷を有する多糖類を認識することが判明した。これらの結果は、ウレアーゼ非産生株を用いた実験で、ウレアーゼは接着因子として機能しないという報告を否定するものであった¹⁾。

次に、ウレアーゼリセプターを解明するため多数の構造物につき、そのウレアーゼ結合性につき検討した。ウレアーゼの接着機能は酸依存性であり、胃ムチン、上皮細胞膜上のO抗原を含む異なる形態の多糖によるヘテロ特異的であることが確認された。この特殊な接着パターンとピロリ菌がウレアーゼの酵素活性に依存しないメカニズムで、酸性条件下で生存できるという事実から、とくに、ウレアーゼの酵素活性が酸により不可逆的に失われる領域、つまり酸性度が保持されている領域において、この酸依存性の接着性がきわめて重要であると思われる²⁾。このような背景から、酸性領域で接着するピロリ菌のクリアランスに抗原結合力に優れたIgYを選定した。

2.2 スナネズミを用いた抗ウレアーゼ IgY とファモチジンとの併用試験

生後4週齢のスナネズミに抗ウレアーゼIgY(25 mg/g)とファモチジン(0.16 mg/g)を配合したダイエットを7日間給餌した群を試験群とし、コントロールダイエットのみを同様に給餌した群を対照群とした。その後、両群はピロリ菌(ATCC43504)でチャレンジを行い、8週間飼育した。剖検後、胃粘膜のピロリ菌数ならびにミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性を測定した。その結果、試験群のピロ

表1 ミュータンス菌 MT8148 株(血清型 c) から精製した菌体外および菌体結合型 GTase の性状

性状	菌体外 GTase	菌体結合型 GTase
分子量	156 kDa	156 kDa
至適 pH	5.5 ~ 6.5	6.7 ~ 7.0
グルカン溶解性	98%可溶	98%不溶
免疫学的交差性	なし	なし
IgYによる抗う蝕作用	なし	あり

り菌検出は測定限界以下となり、MPO 活性は対照群に対し有意に低下した³⁾。

2.3 抗ウレアーゼ IgY 含有ソフトカプセルの経口摂取試験

健常者を対象とした本試験には、尿素呼気試験測定値がピロリ菌陽性と判定された17名(年齢30～58歳で、男性15名、女性2名)が参加した。被検サンプルは、抗ウレアーゼ IgY 卵黄粉末 300 mg を含有するゼラチンカプセルを用いた。摂取方法は、毎食後3粒を4週間摂取した。呼気試験測定は試験開始時と摂取4週目に実施した。その結果、ボランティア17名のうち13名は、試験開始時の測定値が4週後に有意な減少を示した⁴⁾。実用化研究は継続して実施している。

3 抗グルコシルトランスフェラーゼ IgY の開発

ミュータンス連鎖球菌は代表的なバイオフィーム感染症を引き起こす。口腔内に感染した本菌は、菌体外膜のタンパク質成分を介して歯面にある唾液成分と弱く結合する。そこにシュークロースが供給されると、菌体外膜結合型のグルコシルトランスフェラーゼ(CA-GTase)によって不溶性グルカンが形成され、歯面に蓄積すると歯周病発症に関与する細菌群も増殖して強く固着し、酸を貯留したグルカン層が出来上がる。この酸によってエナメル質が脱灰されう蝕病変が形成される。

3.1 病原因子としての CA-GTase の性状

Hamada ら(1989)は、不溶性グルカンを合成する GTase は菌体結合型であり、水溶性グルカンを合成

する酵素(CF-GTase)は培養上清に産生されることを報告している⁵⁾。表1に示したように両酵素の分子量は156 kDaであるが、至適 pH ならびにグルカン溶解性は全く異なる。両酵素の免疫学的交差性は認められない。また、抗 CA-GTase IgY は抗う蝕作用があるが、抗 CF-GTase IgY はその作用がない⁶⁾。

3.2 抗 CA-GTase IgY を用いた *in vitro* 試験

CA-GTase 抗原の調製は、ミュータンス菌(MT8148R 株)を培養した菌体から8M尿素で抽出すると高純度の抗原が得られるので、ニワトリに免疫すると高力価の IgY が作製できる⁵⁾。本 IgY はシュークロース存在下で IgY 濃度依存的に CA-GTase 活性を顕著に抑制したが、CF-GTase 活性は抑制しなかった。CF-GTase 活性は抗 CF-GTase IgY によってのみ抑制され、抗 CA-GTase IgY ならびにコントロール IgY によって抑制されなかった。一方、抗 CA-GTase IgY はシュークロース存在下でミュータンス菌の平滑面への接着を IgY 濃度依存的に抑制したが、抗 CF-GTase IgY ならびにコントロール IgY は抑制しなかった⁶⁾。このように、CA-GTase はミュータンス菌の主要な病原因子と考えられる。

次に、唾液をコーティングしたハイドロキシアパタイトを用いて抗 CA-GTase IgY によるミュータンス菌各血清型の接着抑制率について検討した。その結果、血清型の異なる MT8148R 株(c)、P-4 株(e)、および SE-11 株(f)は本 IgY によって80%以上の接着抑制効果が観察された⁷⁾。

3.3 ミュータンス菌(MT8148R)感染 SPF ラットにおける抗 CA-GTase IgY の摂取試験

ダイエット2000(56%微粉糖含有)に抗 CA-GTase IgY、CF-GTase IgY またはコントロール IgY を配合したダイエットの摂取試験を実施した。評価には剖検後のプラークスコアならびにカリエススコアを用いた。その結果、抗 CA-GTase IgY 摂取群のプラークスコアならびにカリエススコアはコントロール IgY に対し有意な改善効果が観察された。図1にコントロール IgY と抗 CA-GTase IgY 摂取群のう蝕病変の写真を示した。

これに対し、抗 CF-GTase IgY 摂取群の両スコアのレベルはコントロール IgY 摂取群と同等であった⁶⁾。

唾液腺切除 SPF ラットを用いた実験においても抗 CA-GTase IgY 投与群のカリエスコアの有意な軽減効果が観察された⁸⁾。

3.4 健常者ボランティアによる抗 CA-GTase IgY の摂取試験

本試験の割付は無作為に本 IgY 含有食品摂取群 49 名およびコントロール IgY 含有食品摂取群 50 名に割り付けた。本食品の摂取回数ならびに摂取期間は 1 日 5 回(各々 IgY 400 mg/日)で 5 日間とした。唾液中の総嫌気性細菌数ならびに付着性ミュータンス菌数を測定するため、本試験開始時ならびに試験終了時に両群から唾液を採取した。その結果、試験食品摂取群の付着性ミュータンス菌数は摂取 5 日後に有意に減少したが、コントロール IgY 食品摂取群では有意な減少は確認されなかった⁷⁾。また、総嫌気性細菌数は両群において有意な変動は観察されず、口腔内の正常フローラに及ぼす影響は確認されなかった。

その後の実用化研究によって、本 IgY 含有卵黄粉末を配合した清涼菓子が内外で販売されている。本製品は幼児やその母親を対象にして販売されているので、低年齢時から応用することにより、日常のブラッシング後のプラークコントロールを実践することにより幼児からのう蝕予防が達成できる可能性を秘めている。加えて、母親も本 IgY を子どもとともに摂取することで、ミュータンス菌の母子感染リスクの低減化が期待される。

4 抗ジンジパイン IgY の開発

ジンジバリス菌(*Porphyromonas gingivalis*)はミュータンス菌とともに口腔内に強固なプラークを形成するバイオフィーム感染症のひとつである。歯周病疾患は咀嚼、発音、唾液分泌などの口腔機能の低下にとどまらず、全身性疾患、例えば循環器系疾患、糖尿病などの発症や進行に影響することが指摘されている。このようなことから、本病は、歯科領域だけでなく、他の臨床分野と連携することにより、この病因の解明と予防対策の確立が望まれている。

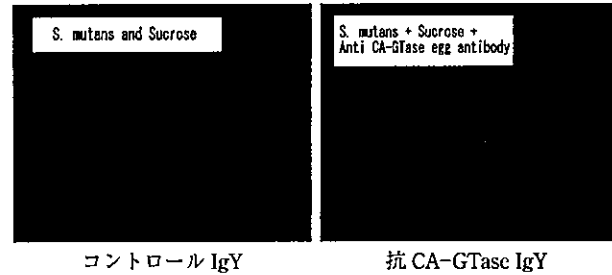


図1 ミュータンス連鎖球菌による感染によって発生したラットのう蝕病変

(浜田茂氏提供)

4.1 病原因子としてのジンジパイン (gingipain)

ジンジパインはジンジバリス菌が産生する主要なシステインプロテアーゼであり、それらはアルギニン残基(Arg)のC末端側を切断するRGP(Argジンジパイン)とリシン(Lys)残基のC末端側を切断するKGP(Lysジンジパイン)の二つのプロテアーゼ酵素群から成り立つ。ジンジバリス菌の染色体上にはRgpをコードする*RgpA*と*RgpB*遺伝子ならびにKgpをコードする一つの遺伝子がある。*RgpB*遺伝子は*RgpA*遺伝子のC末端領域にある付着因子ドメインを欠くが、プロテアーゼドメインを有する。*RgpA*と*Kgp*遺伝子は、プロテアーゼドメインの他にC末端に付着因子ドメインがある。Kadowakiら(1998)は、*RgpA*ならびに*Kgp*遺伝子のプロテアーゼドメインが協調しながら歯周病原性機能を発揮することを明らかにしている⁹⁾。①両プロテアーゼは、コラーゲンならびにフィブロネクチンなどの細胞間質タンパク質分解能が高い。②両酵素はサイトカイン分解能が高い。③両酵素は好中球に対し強い傷害能がある。④両酵素はフィブリノーゲンならびにフィブリンに対し分解能を有す。⑤ジンジバリス菌の表層には、線毛が放射状に広がっているが、両酵素はこの線毛生成に関与している。

4.2 抗ジンジパイン IgY を用いた *in vitro* 試験

4.2.1 ジンジパイン酵素に対する活性阻害

精製ジンジパインをタンパク濃度で、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整して、各々に抗ジンジパイン IgY(50 mg/mL)またはコントロール IgY(50 mg/mL)を加えて反応した後、ジンジパインの酵素活性を測定した。その結果、抗ジ

ンジパイン IgY は、各々のジンジパイン濃度でプロテアーゼ活性を有意に抑制したが、コントロール IgY の活性阻害効果は観察されなかった¹⁰⁾。

4.2.2 ヒト口腔上皮細胞(Ca9-22)に対する細胞傷害抑制

上記の精製ジンジパインを3段階に希釈した系列に抗ジンジパイン IgY(50 mg/mL)またはコントロール IgY(50 mg/mL)を加えて反応した後、その混合物を単層培養ウェルに移して培養し、ジンジパインを加えなかったPBSコントロールの生細胞数を100%としたときの細胞傷害抑制率を求めた。その結果、抗ジンジパイン IgY を加えると本細胞傷害活性は、コントロール IgY に対し有意に抑制された¹⁰⁾。

4.2.3 ヒト歯肉上皮(KB)細胞に対するジンジパリス菌の接着抑制

抗 Rgp-IgY, 抗 Kgp-IgY, 抗 Rgp-IgY+抗 Kgp-IgY およびコントロール IgY を用いてジンジパリス菌の接着抑制試験を行った。その結果、コントロール IgY とジンジパリス菌の組み合わせでは、95%の菌が細胞に接着した。抗 Rgp-IgY または抗 Kgp-IgY とジンジパリス菌の組み合わせでは、その接着率は各々 31%および 35%のジンジパリス菌が接着した。これに対し、抗 Rgp-IgY+抗 Kgp-IgY とジンジパリス菌の組み合わせでは、その接着率はわずか 6%にすぎなかった¹¹⁾。この事実を裏付ける実験例として、ジンジパリス菌野生株は表層に線毛が放射状に伸びているが、RgpA および Kgp の両遺伝子欠損株は菌体表層の線毛構造が脱落している。抗ジンジパイン IgY が、ジンジパリス菌のプロテアーゼ活性を阻害することから、本 IgY は線毛形成に直接影響すると思われる。

4.3 歯周病犬を用いた抗ジンジパイン IgY の摂取試験

近年、伴侶動物の歯周病はダイエットの改良ならびに予防衛生の強化などで長寿化が達成できたが、それに伴って歯周病の罹患率が増大しその対策が望まれている。その糸口は歯周病罹患犬の歯周ポケットに生息している *Porphyromonas gingivalis* ならびに *Porphyromonas gulae* が保有する線毛によって *Actinomyces naeslundii* または *Fusobacterium nucleatum* などの細菌群と共凝集が起きていることである。この凝集塊は成熟して厚いバイオフィルムを形

成する。このバイオフィルム層に唾液中のカルシウム・リン酸塩が侵入すると石灰沈着が起これ、歯面に歯石が形成される。このプロセスが抑制できれば予防につながると思われる。

本摂取試験に用いたイヌは中等度の歯周病を呈しているビーグル、ミニチュアダックスおよびキャバリア種である。本試験は15頭を無作為に5頭ずつ3群に割り付けた。試験群1は抗ジンジパイン IgY の 35 mg/kg 体重を1日1回とし、試験群2は抗ジンジパイン IgY の 17.5 mg/kg 体重を1日2回給餌した。対照群はコントロール IgY の 35 mg/kg を1日1回とした。これらの IgY 卵黄粉末はドライフードに配合して8週間給餌した。口腔内診査は試験開始時と試験終了時(8週)に実施した。評価軸は歯肉炎スコアならびに歯周炎スコア、プロービング時の歯肉出血(BOP)、歯周ポケットの深さ(PD)および歯石脱落面積とした。

その結果、両試験群の歯肉炎スコアならびに歯周炎スコアはベースラインのスコアに対し試験終了時に有意に改善されたが、対照群では変動は確認できなかった。BOP 値においても両試験群ではベースラインに対し顕著な改善効果が観察されたが、コントロール群では変動は確認できなかった。試験終了時の試験群1および2の歯石脱落状況は各々 4/5 頭および 2/5 頭のイヌで歯石面積が縮小し、各々 42%および 22%に改善されたが、対照群では歯石の脱落状況に変動は確認されなかった¹²⁾。

現状の伴侶動物の歯周病治療は、機械的にプラークおよび歯石を除去するが、そのつど全身麻酔処置を施行するため体力の消耗がある。また、抗生物質の投与は正常細菌叢に影響を与えるばかりではなく、耐性菌の出現も危惧される。これに対し、IgY 卵黄粉末は安全であるばかりではなく加工特性にも優れている。このことから、抗ジンジパイン IgY 卵黄粉末を配合したドライフード、ガム、デンタルペースト、ジャーキー、ふりかけなど多様な製品が販売されている。本製品のコンセプトは、日常の飼育環境の中でプラークコントロールを実践することによって、健康な歯茎を維持することである。

【引用・参考文献】

- 1) E.C. Icatlo, Jr., M. Kuroki, C. Kobayashi et al. : Affinity purification of *Helicobacter pylori* urease : Relevance to gastric adherence by urease protein, *J. Biol. Chem.*,

- 273, 18130-18138(1998).
- 2) F.C. Icatlo, Jr., H. Goshima, N. Kimura et al. : Acid-dependent adherence of *Helicobacter pylori* urease to diverse polysaccharides, *Gastroenterology*, **119**, 358-367(2000).
 - 3) S. Nomura, H. Suzuki, T. Masaoka et al. : Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* in Mongolian gerbils, *Helicobacter*, **10**, 43-52 (2005).
 - 4) H. Suzuki, S. Nomura, T. Masaoka et al. : Effect of dietary anti-*Helicobacter pylori*-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection, *Aliment Pharmacol. Ther.*, **20**, 185-192(2004).
 - 5) S. Hamada, T. Horikoshi, T. Minami et al. : Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype c *Streptococcus mutans*, *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 335-344(1989).
 - 6) S. Hamada, T. Horikoshi, T. Minami et al. : Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.*, **59**, 4161-4167(1991).
 - 7) Sa N. Nguyen, F.C. Icatlo, Jr., T. Nakano et al. : Anti-cell-associated glucosyltransferase immunoglobulin IgY suppression of salivary mutans streptococci in healthy young adults, *JADA*, **142**, 943-949(2011).
 - 8) C. Kruger, S.K. Pearson, Y. Kodama et al. : The effect of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats, *Caries Res.*, **38**, 9-14(2004).
 - 9) T. Kadowaki, K. Nakayama, F. Yoshimura et al. : Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*, *J. Biol. Chem.*, **273**, 29072-29076(1998).
 - 10) K. Yokoyama, N. Sugano, A.K.M.S. Rahman et al. : Activity of anti-*Porphyromonas gingivalis* egg yolk antibody against gingipains *in vitro*, *Oral Microbiol. Immunol.*, **22**, 352-355(2007).
 - 11) 児玉義勝, スグエン・バン・サー, ア.ケ.アムシヨフイクルラハマン, 他: 歯周炎を治療または予防するための組成物, 特開 2011-16843.
 - 12) A.K.M.S. Rahman, M. Ebrahim, El-Sayed, E. Isoda et al. : Effect of passive immunization by anti-gingipain IgY on periodontal health of dogs, *Vet. Sci. Develop.*, **1**, e8, 35-39(2011).

<児玉 義勝>

ニワトリ卵黄免疫グロブリン (Immunoglobulin Yolk : IgY) の産業への利用 今後の展望

株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン 児玉 義勝
早稲田大学 並木 秀男
ダイキン工業株式会社 小澤 智

第4章 今後の展望

IgY含有卵黄粉末は大量生産が容易なことに加えて機能性素材としての汎用性が高いこと、特異的抗原結合力にも優れていることから、インフルエンザウイルスを不活化するバイオフィルターの空調機器やマスクなどへの応用、機能性食品として多様な製品形態や製品コンセプトを実現している。親鶏に接種する抗原の種類を変えるだけで、特異性の異なるいろいろなIgYが製造レベルで生産できる本技術を利用して次の新たな実用化研究が進められている。

1. IgYバイオフィルターの応用は、反応を促進できる調湿性繊維の導入によって応用範囲が広がり、家電メーカーとの実用化研究が進展している。病原体からの予防に加え、住宅構造の高断熱化・高气密化によって増加しているダニアレルギーの対策として抗アレルギーIgYの応用研究が行われている。

2. 機能性食品としては、高齢者や介護者の健康な口腔環境・味覚の維持によるQOLの改善が期待されている。高齢化社会を迎えている我が国において、高齢者や介護者における口腔ケアがますます重要視され、さまざまな取り組みが行われている。QOLをいっそう低下させる口腔内微生物の真菌属のうち、*Candida albicans*(CA)は、口腔内に強固なバイオフィルムを形成する。とくに、義歯装着高齢者、免疫能低下者、抗菌剤、抗がん剤およびステロイド剤服用者などの舌組織からCAが高頻度で検出される。誤嚥性肺炎の原因は、口腔内ならびに義歯の清掃不良と嚥下咀嚼に関与する神経・筋肉・知覚の低下、唾液分泌低下に伴うドライマウスなどが関与するといわれている。著者らは、抗CA IgYを作製して*Candida*属の各菌種との交差反応性を検討したところ、高い交差反応性が確認された。*in vitro*試験ならびにCA感染マウスモデル実験により本IgYの効果を検証した。その結果、本IgYは扁平上皮が

ん細胞(FaDu細胞)へのCAの付着を抑制したが、コントロールIgYは抑制しなかった。動物実験の結果、コントロールIgY投与群の舌組織表面に病変が形成されたが、本IgY投与群では舌病変は観察されなかった。本IgY投与群の舌、肺および腸管におけるCAのCFU/gは、コントロールIgY投与群に対し、有意に低下した¹⁾。目下、舌スワブからカンジダ属菌数が100CFU以上検出された65歳以上の健康者ボランティアを対象にして抗CA IgY卵黄粉末含有タブレットを用いた摂取試験を実施中である。最終的に、抗CA IgY含有卵黄粉末を配合したトロミ食品などへの応用、さらに口腔内の保湿とカンジダ菌のクリアランスを目的とした口腔化粧品ジェルなどへの展開も計画している。

3. 腸管感染症病原体に対するIgY含有卵黄食品による途上国および津波等災害地域における国際支援活動への可能性が期待されている。ライフラインが整備されていない地域や津波等による災害地域において衛生環境の整備とともに腸管感染症対策が重要な課題となっている。

これまでに、コレラ菌、腸管毒血症性大腸菌、サルモネラ菌などに対するIgYのクリアランス機能が*in vitro*ならびに*in vivo*試験にて証明されている^{2)~4)}。腸管感染症対策の提言を踏まえて、ロタウイルス感染乳幼児を対象とした臨床研究を実施するため、ミャンマー国小児科病院に脱水症状で入院した生後3~14ヵ月齢の乳幼児をスクリーニングして、脱水症状を呈しロタウイルス陽性と判定された52名を選定した。無作為に抗ロタウイルスIgY含有卵黄粉末群($n=26$)およびプラセボIgY卵黄粉末群($n=26$)を割り付けた。被検食品として抗ロタウイルスIgYおよびコントロールIgY含有卵黄粉末を用いた。被験食品はORFに溶解して1日4回8日間投与した。評価パラメータは経口補液(ORF)と点滴用補液(IVF)量(mL)、下痢回数と下痢持続日

数および便からのロタウイルスの検出とした。その結果、コントロール IgY 群に対し、抗ロタウイルス IgY 群の ORF ならびに IVF 量は減少し、下痢回数ならびに下痢持続日数も有意に減少した。また、抗ロタウイルス IgY 群でロタウイルスに対し有意なクリアランス効果が観察された⁵⁾。本研究で、抗ロタウイルス IgY のクリアランス機能が確認できたことから本 IgY 配合ドライミルクを用いた臨床研究の実施が期待される。

【引用文献】

- 1) El-Sayed Moustafa Ibrahim, A.K.M.S. Rahman, R. Isoda et al. : *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY), *Vaccine*, **26**, 2073-2080 (2008).
- 2) K. Hirai, H. Arimitsu, K. Umeda et al. : Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera, *Acta Med. Okayama*, **64**, 163-170 (2010).
- 3) P. Neri, S. Tokoro, R. Kobayashi et al. : Specific egg

yolk immunoglobulin as a new preventive approach for Shiga-toxin-mediated diseases, *PLoS ONE*, **6** : e26526 : doi : 10 : 1371/journal.pone.0026526 (2011).

- 4) H. Yokoyama, K. Umeda, R.C. Peralta et al. : Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*, *Vaccine*, **16**, 388-393 (1998).
- 5) A.K.M.S. Rahman, K. Moriguchi, K.W. Htum et al. : Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients, *Vaccine*, **30**, 4661-4669 (2012).

【参考文献】

- S. Hamada, and Y. Kodama : Passive immunity against mucosal infection and vaccination for dental caries, in H. Kiyono et al. (eds.), *Mucosal Vaccines*, pp.187-197, Academic Press, CA (1996).

<児玉 義勝 / 並木 秀男 / 小澤 智>