

## 機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) を用いた経口受動免疫の野外応用

▼(株)イーダブルニュートリション・ジャパン

児玉義勝

### はじめに

卵黄リベチン (Immunoglobulin Yolk : 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。これは鳥類に感作する抗原の種類を変えるだけで、特異性の異なる色々な卵黄リベチンが生産できる。リベチンとは、卵黄タンパク質に約30%含まれる水溶性タンパク質のことであり、 $\alpha$ -、 $\beta$ -および $\gamma$ -リベチンの3種類が区分されている。各々の存在比は2対3対5であることが報告されている<sup>1)</sup>。 $\alpha$ -リベチンは親鳥の血清のアルブミンで、 $\beta$ -リベチンは血清 $\alpha$ 2-グロブリンであり、 $\gamma$ -リベチンは血清 $\gamma$ -グロブリンが「卵黄内への輸送機能」によって卵黄に移行した物質であることが証明されている<sup>2)</sup>。

著者らは、鳥類に自然に備わっている血清 $\gamma$ -グロブリンの卵黄内移行のメカニズムを利用して、子牛の消化・吸収機能に障害を及ぼして、生産性を阻害する腸管毒素原性大腸菌K99 (以下、ETEC K99)、サルモネラ菌 (*S. Typhimurium* および *S. Dublin*)、ロタウイルス (G6型およびG10型)、コロナウイルスならびにクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) 原虫に対する卵黄リベチンを開発してきた。

これらの機能性リベチンを含有する鶏卵粉末を「混合飼料」として実用化している。鶏卵生産システムを活用する

ことによって、感作抗原ごとに高い活性を有するリベチンを製造している。給与する子牛の発育ステージに合わせて、各種の卵黄リベチンをブレンドして最終製品を製造している。

ここでは、ETEC K99およびロタウイルスに対するIgYの攻撃試験成績ならびに野外応用試験成績を紹介する。

### 子牛を用いた攻撃試験

#### 1. ETEC K99

抗K99線毛IgYを用いた攻撃試験には、ETEC汚染のないことを確認したホルスタイン種の新生子牛を16頭導入した。試験開始前に初乳1.5Lを給与した。群分けは、無作為に4頭ずつ4群に分け、I群はコントロールIgY投与群とし、II群、III群およびIV群は特異IgY投与群とした。

生後24時間から36時間目に $1.6 \times 10^{11}$ CFUのB44株を経口接種により攻撃した。ETEC攻撃後2時間目からI群にはコントロールIgY、II群、III群およびIV群には菌体凝集活性が各々400倍、800倍および1,600倍のIgYをミルクに溶解して給与し、攻撃後7日間、1日3回同様な方法で給与した。攻撃後7日間は子牛の臨床症状の観察を行い、糞便スコアを記録し、体重測定も実施した。糞便スコアは、0 = 正常な糞便、1 = 軟便、2 = 泥状便および3 = 水様便として記録した。また、糞便から攻撃菌を分離するために、毎日子牛の直腸便を採取し、分離した大腸菌のコロニーは釣菌して抗K99線毛血清 (デンカ生研(株)) を用いたためし

【表-1A】 ETEC K99 (B44株) 攻撃による経口受動免疫効果

群	ETEC K99 菌体凝集活性	死亡頭数/供試頭数 (死亡率%)	下痢持続日数(日)	増体率 (%)
I	8	4/4 (100)	2.0 ± 0.7	-9.7 ± 2.9
II	400	1/4 (25)	2.5 ± 0.9	-3.9 ± 4.7
III	800	0/4 ( 0) <sup>a</sup>	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.3 <sup>b</sup>
IV	1,600	0/4 ( 0) <sup>a</sup>	1.3 ± 0.4	1.9 ± 0.7 <sup>b</sup>

a: P < 0.05 (VS I群)

b: P < 0.01 (VS I群)

【表-1B】 ETEC K99 (B44株) 攻撃による経口受動免疫効果

群	直腸スワブ (攻撃後日数)				小腸部位		
	1日	3日	5日	7日	十二指腸	空腸	回腸
I	4/4	1/1	0	0	4/4	4/4	4/4
II	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4
III	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	4/4	4/4
IV	4/4	4/4	3/4	2/4	1/4	1/4	2/4

凝集試験で判定した。死亡例ならびに試験終了時には子牛を剖検し、十二指腸部、空腸中央部、および回腸部から内容物を採取し、糞便と同様に攻撃菌を特定した。

その結果、I群の子牛はB44株の攻撃により、翌日には激しい水溶性下痢となり、攻撃後3日目に全頭が死亡した(表-1A)。下痢発症後急速に脱水症状が進行し、死亡時の増体率は-9.7 ± 2.9%と著しく体重が減少した。これに対し、IgY投与群ではII群の1頭を除いて子牛は生存した。しかし、II群の子牛は攻撃後水様性下痢となり3日間持続したため、死亡した子牛も含め、その増体率は-3.9%と低下した。菌体凝集活性800倍および1,600倍のIgY投与群では、攻撃後一過性の下痢をしたものの、速やかに回復した。両群共に子牛の体重は増加し、死亡率ならびに増体率において両IgY投与群は対照群に対して、1%の危険率で有意差を認めた。直腸便からの攻撃菌の分離状況は、攻撃後3日目まで全頭から検出されたが、その後、菌体凝集活性が1,600倍のIgY投与群では、攻撃後7日目で4頭中2頭が陰性となった(表-1B)。

IgY投与群から分離された攻撃菌のコロニー形態は小さいのが特徴的であった。一方、小腸各部位からの攻撃菌の分離状況は、試験終了時のIV群の十二指腸部ならびに空腸中央部では4頭中3頭、回腸部では4頭中2頭が陰性となり、抗ETEC K99線毛IgY投与による付着抑制効果が菌

体凝集活性に依存して観察された<sup>3)</sup>。

## 2. ウシロタウイルス

本試験には、糞便検査でA群ロタウイルスに汚染していないことを確認したホルスタイン種の新生子牛24頭を用いた。試験前に初乳1.5Lを給与した。ウシロタウイルスは2種類のG血清型(6および10)が子牛の下痢便から分離されている。この点を考慮し、攻撃試験には島根株(G6)およびKK-3株(G10)を用いた。試験牛は各群4頭とし、抗島根株IgYは中和活性が6,400倍と3,200倍の2群、抗KK-3株IgYは中和活性が12,800倍と6,400倍の2群を設定し、これ以外に各々4頭の中和活性を有しないコントロールIgY投与群を置いた。初回のIgY投与は攻撃時間(午前11時)の2時間前(午前9時)に行い、攻撃ウイルス量は島根株 $1 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/頭、KK-3株 $5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/頭とした。その後、IgYを2回(午後1時と5時)投与した。攻撃日から攻撃後9日目まで、1日3回上記の時間にIgYを連続投与した。IgY粉末はミルクに溶解して給与した。下痢や食欲不振時には代用乳の給与を停止し、経口補液を行った。なお、糞便性状は、3段階に分け、正常便(=0)、泥状便(=1)および水様便(=2)とした。攻撃9日までの糞便スコアの合計を累積糞便スコアとした。これ以外に糞便中のウイルス感染価ならびに増体重を観察した。

【表-2】 ロタウイルス攻撃による経口受動免疫効果

攻撃ウイルス (G血清型)	IgY 特異性	ウイルス 中和活性	累積糞便 スコア	ウイルス 排泄日数	増体重	
					kg	%
島根株 (G6)	コントロール IgY	100	12.8 ± 4.8	7.8 ± 1.3	-3.3 ± 1.6	
	抗島根株 IgY	3,200	12.0 ± 3.6	5.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	-0.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	
KK-3 株 (G10)	コントロール IgY	100	14.5 ± 3.7	7.3 ± 1.0	-4.2 ± 0.7	
	抗KK-3 株 IgY	6,400	6.3 ± 4.9 <sup>a</sup>	6.3 ± 1.3	0.7 ± 0.8 <sup>b</sup>	
		12,800	2.3 ± 4.5 <sup>b</sup>	4.3 ± 1.3 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.8 <sup>b</sup>	

各群 4 頭を割付ける。

a: P &lt; 0.05 (VS コントロール IgY)

b: P &lt; 0.01 (VS コントロール IgY)

【表-3】 北海道で実施した抗ロタウイルス IgY の野外試験

群 (n)	増体重		ウイルス陽性頭数		死亡頭数
	kg	(%)	< 10 <sup>2a</sup>	> 10 <sup>4b</sup>	
試験群 (n = 10)	3.5 ± 5.2 <sup>c</sup>	11.1 ± 17.0	8 <sup>d</sup>	0	2
対照群 (n = 10)	-0.5 ± 2.5	-1.4 ± 9.3	0	7	3

a: ウイルス感染価 < 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/糞便 1 gb: ウイルス感染価 > 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/糞便 1 g

c: P &lt; 0.05 (VS 対照群)

d: P &lt; 0.01 (VS 対照群)

表-2 に島根株および KK-3 株に対する IgY の中和活性と経口受動免疫効果との関係を示した。島根株ならびに KK-3 株攻撃群ともウイルス中和活性が 6,400 倍以上の IgY 投与群の累積糞便スコアならびに平均下痢日数は対照群に対して有意に軽減された (P < 0.05)。ウイルス排出日数においても島根株ならびに KK-3 株攻撃群では、ウイルス中和活性が 3,200 倍以上 (P < 0.01) および 12,000 倍で有意に抑制された (P < 0.01)。一方、増体重では、IgY 投与の効果が顕著となり、島根株および KK-3 株攻撃群ともにウイルス中和活性が 6,400 倍以上の IgY 投与群で下痢による体重減少の有意な抑制効果が観察された<sup>4)</sup> (P < 0.01)。

## 野外応用試験

### 1. A 群ロタウイルスで汚染された北海道の某農場

本試験農場は下痢が多発しており、糞便性状からロタウイルス感染が疑われたので、ウイルス分離を行って、G 血清型の特異性を試みた。その結果、下痢便材料 21 検体から

A 群ロタウイルスが 14 株分離された。そこで、抗島根株 (G6) IgY および抗 KK-3 株 (G10) IgY を用いて、分離したウイルスの中和試験を実施したところ、すべての株は抗島根株 IgY によってのみ中和されたことから、本農場の牛は G 6 型のロタウイルスによって汚染されていることが分かった。

このような状況のもとで、抗島根株 IgY および抗 KK-3 株 IgY 含有鶏卵粉末を用いて予備試験を計画した。ホルスタイン種の初生子牛を無作為に 10 頭ずつ 2 群に割り付けた。試験群には上記鶏卵粉末を 1 日 6 g 代用乳に添加して、初生時から 14 日間連続して給与した。対照群にはウイルス中和活性のない IgY を同様の方法で給与した。この間の観察項目は、糞便中のウイルス感染価を求めるとともに体重測定を実施した。

試験結果を表-3 に示した。試験群では、対照群に対してウイルス排出阻止効果 (P < 0.05) ならびに増体効果 (P < 0.01) が観察された。特に、ウイルス排出に関しては、10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/g 以上の高感染価の子牛は対照群で 7 頭、試

**【表-4】** 抗ロタウイルスIgYおよび抗ETEC K99線毛 IgYをブレンドした鶏卵粉末の投与が下痢症状の軽減に及ぼす効果 (試験-1)

群 (n)	下痢発生率 (%)	下痢持続日数 (日)		死亡率 (%)
		平均±SD		
I IgY 無投与群 (n=80)	38.8	3.5 ± 1.3		8.8
II IgY 2 g投与群 (n=56)	14.3 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.0 <sup>c</sup>		0
III IgY 4 g投与群 (n=53)	15.1 <sup>b</sup>	2.8 ± 1.8 <sup>a</sup>		1.9
IV IgY 8 g投与群 (n=55)	14.5 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.5 <sup>a</sup>		0

サンプルは初生時から14日まで代用乳に添加して給与する  
a: P < 0.05 (VS 無投与群), b: P < 0.005 (VS 無投与群), c: P < 0.001 (VS 無投与群)

**【表-5】** 抗ロタウイルスIgYおよび抗ETEC K99線毛 IgYをブレンドした鶏卵粉末の投与が体重増加に及ぼす効果 (試験-2)

群 (n)	出生時体重 (kg)	投与14日目増体重 (kg)	3カ月目増体重 (kg)
	平均±SD	平均±SD	平均±SD
I IgY 無投与群 (n=27)	38.8 ± 2.9	2.8 ± 1.0	85.2 ± 3.9
II IgY 2 g投与群 (n=23)	38.7 ± 3.2	3.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	88.5 ± 2.3 <sup>b</sup>
III IgY 4 g投与群 (n=32)	38.6 ± 1.6	3.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	89.5 ± 3.6 <sup>c</sup>
IV IgY 8 g投与群 (n=30)	38.2 ± 2.5	3.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	89.8 ± 2.3 <sup>c</sup>

a: P < 0.05 (VS 無投与群), b: P < 0.001 (VS 無投与群), c: P < 0.0001 (VS 無投与群)

験群で0頭であった。このデータは、投与した抗ロタウイルスIgYによって腸内のロタウイルスが中和されて、感染力を失った結果、試験群のロタウイルスによる腸管絨毛上皮細胞が破壊されず、正常な消化・吸収が維持され、成長促進につながったと考えられる<sup>5)</sup>。

## 2. ドイツで実施した試験

### 1) A農場

本農場の初生子牛は主として、A群ロタウイルスに汚染しており、同時にクリプトスポリジウムも検出されており下痢が多発している。しかし、コロナウイルスは検出されず下痢への関与は否定できる。供試動物はホルスタイン種の初生牛を用い、初乳を摂取させた後無作為に4群を設定した。試験-1では、I群は無投与の対照群 (n=80)、II群 (n=56)、III群 (n=53) およびIV群 (n=55) は抗ロタウイルスIgYと抗ETEC K99線毛 IgYをブレンドした鶏卵粉末を各々2g、4g、および8g 1日2回ずつ初生時から14日間まで代用乳に添加して給与した。観察項目は下痢発生率、下痢持続日数、死亡率ならびに増体量とした。

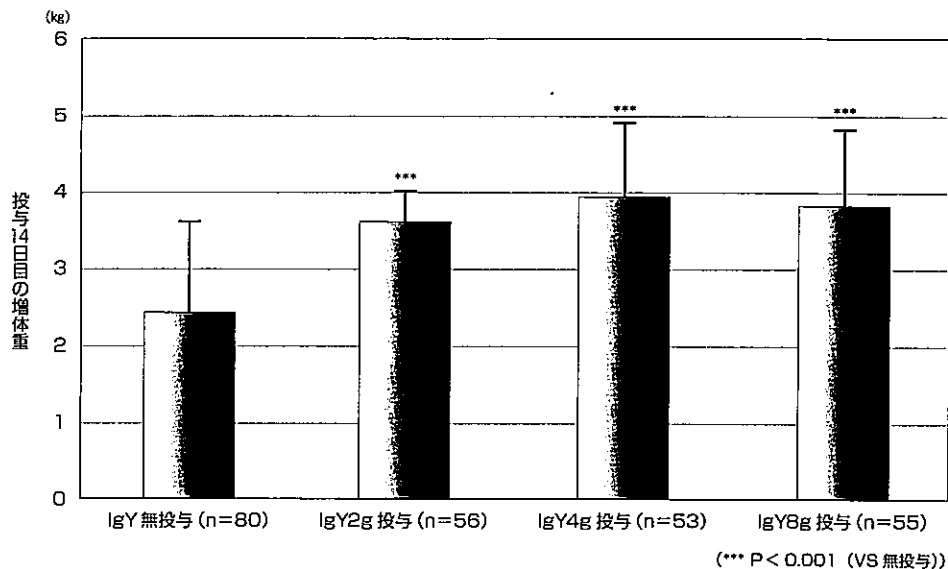
試験-2では、I群 (n=27) は無投与の対照群とし、II群 (n=23)、III群 (n=32) およびIV群 (n=30) は

試験-1と同様な方法で実施した。観察は体重測定のみとし、出生時体重、投与14日目の増体量ならびに3カ月目の体重を測定した。

表-4は抗ロタウイルスIgY含有鶏卵粉末の投与が臨床症状軽減に及ぼす効果を示している。IgY投与群の下痢発生率は投与量とは関係なく、無投与群に対し有意に減少した (14.3%~15.1%) (P < 0.005)。無投与群の平均下痢持続日数は、3.5 ± 1.3日であり、これに対し、IgY投与群の平均下痢日数は2g投与で2.0 ± 0.0日 (P < 0.001)、4g投与で2.8 ± 1.8日 (P < 0.05)、さらに8g投与で2.3 ± 0.5日 (P < 0.05) であった。

図はIgY投与14日目の増体量を示している。無投与群の平均増体量は2.4 ± 1.2kgであったが、IgY投与群のそれは3.5~3.9kgと増体効果を示した (P < 0.0001)。

試験-2の結果を表-5に示した。全群の出生時平均体重は38.2 ± 1.6kg~38.8 ± 3.2kgの範囲であった。IgYの投与が終了する14日目の増体量はIgY投与群で有意に高かった (P < 0.05~P < 0.0001)。3カ月後の無投与群の平均体重は85.2 ± 3.9kgであった。これに対し、2g投与群の平均体重は88.5 ± 2.3kg (P < 0.001)、4g投与群では89.5 ± 3.6kg (P < 0.0001)、さらに、8g投与群で89.8 ± 2.3kg (P < 0.0001) であった。ここで注目すべき点は、14日以降は



【図】 抗ロタウイルスIgYおよび抗ETEC K99線毛IgYをブレンドした鶏卵粉末の給与が及ぼす効果（試験-1）  
 (\*\*\*) P < 0.001 (VS 無投与)

【表-6】 機能性リベチンの投与スケジュール

投与期間	機能性リベチン 25%含有鶏卵粉末
	1日投与量 (g)
1日	20
2日	15
3日	10
4日~14日	6
3週~26週	1

【表-7】 機能性リベチンの投与が生産性に及ぼす効果

評価項目	対照群 (n = 122)	試験群 (n = 94)
	出荷時体重 (kg)	145.4
増体日量 (g)	1,029	1,174
出荷時までの増体日量 (g)	652	731
飼料要求率	1.56	1.49
肥育日数 (日)	223	208

IgYを給与していないにもかかわらず、この状態が少なくとも3カ月まで安定した増体効果が維持されていることである。

腸管絨毛上皮細胞は消化・吸収に直接関与しているが、一方で、ロタウイルスまたはコロナウイルスはこの上皮細胞を自己増殖の標的としているため、ウイルス感染による生産性の低下は甚大な損失をもたらす。本A農場の初生牛の下痢の78.2%がロタウイルスに起因していることが調査によって明らかになっている。このような状況のなかで、IgYの投与は初生時から14日間連続投与され、IgYが腸内でウイルスに結合して不活化して感染力を失い、消化・吸収に関与する絨毛上皮細胞がウイルスの攻撃を免れた結果、成長促進効果につながったと考えられる<sup>6)</sup>。

## 2) B農場

本農場はA農場とは異なり、下痢が多発することはない。

事故率も低い。本試験にはホルスタイン種の初生牛216頭を用い、試験群94頭および無投与対照群122頭を割り付けた。被検サンプルは抗ロタウイルスIgY、抗ETEC K99線毛IgYおよび抗コロナウイルスIgYを含有する機能性リベチンとした。投与量ならびに投与期間は表-6に示した。観察項目は出荷時体重、平均増体日量、出荷時までの増体日量、飼料要求率および出荷時までの肥育日数とした。

表-7に示したように、IgY投与群の増体ならびに飼料要求量は対照群と比較し、良好であり、また肥育日数も15日間短縮された。

## まとめ

3カ所の農場で実施した試験結果から、各種IgYを含有する機能性リベチンの投与は、経口受動免疫を介することによって、生産性が有意に向上した。特に、A群ロタウイ

ルスに高度に汚染された農場では、機能性リベチンの性能がより顕著になったことは興味深い。

初生牛は腸内フローラばかりではなく、腸管局所の免疫機能も未成熟なため、ETEC K99, A群ロタウイルス、コロナウイルス、クリプトスポリジウム原虫などによる腸管感染によって生産性が低下し、離乳後の発育に影響する。その予防対策として、著者は抗原結合力 (Avidity) に優れた各種の機能性リベチンを含有する鶏卵粉末を用いた経口受動免疫の野外応用について啓蒙を行っている。この利点は鳥類に自然に備わっている「血清 $\gamma$ -グロブリン (IgY) の卵黄内への輸送機構」を利用することにより、鶏に感作する抗原の種類を変えるだけで、特異性 (機能) の異なる多様なリベチンの大量生産が可能である。世界に共通して、食の「安全・安心」を確保する観点から、本製品は鶏卵粉末であるため、抗菌性物質と異なりウイルスを不活化でき、また薬剤耐性化の性質を欠くため安全である。

各種のリベチンを含有する鶏卵粉末をブレンドした最終製品は、国内のみならず米国、EU各国、ニュージーランド、南アフリカ、韓国などで使用されている。

#### 参考文献

- 1) Shepard CC, Hottle GA : Studies of the composition of the livetin fraction of the yolk of hen's eggs with the use of electrophoretic analysis., J. Biol. Chem., 179 (1), 349 ~ 357 (1949)
- 2) Martin, WG, Cook WH : Preparation and molecular weight of  $\gamma$ -livetins from egg yolk., Can. J. Biochem. Physiol., 36 (1), 153 ~ 160 (1958)
- 3) Ikemori Y, Kuroki M, Peralta CP, Yokoyama H, et al. : Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic Escherichia coli., Am. J. Vet. Res., 53, 2005 ~ 2008 (1992)
- 4) Kuroki M, Ohta M, Ikemori Y et al. : Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk., Arch. Virol., 138, 143 ~ 148 (1994)
- 5) Kuroki M, Ohta M, Ikemori Y, et al. : Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves., Arch. Virol., 142, 843 ~ 851 (1997)
- 6) Ozpinar H, Erhard MH, Aytug N, et al. : Dose-dependent effects of specific egg-yolk antibodies on diarrhea of newborn calves., Preventive Vet. Med., 27, 67 ~ 73 (1996)
- 7) 児玉義勝 : 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, 14 (2), 68 ~ 73 (2011)
- 8) 児玉義勝 : 卵黄 $\gamma$ -リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) の腸管毒素原性大腸菌 K99 抗原およびウシコロナウイルス抗原に対する抗原結合力と経口受動免疫効果との関連, 臨床獣医, 29 (7), 46 ~ 50 (2011)