

## 抗*Helicobacter pylori* ウレアーゼ卵黄抗体

谷 典子\* 五島英雄\*\* 金 武祚\* 兒玉義勝\*\*

現在までに*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) と消化器系疾患との関連性が明らかになってきており、胃・十二指腸潰瘍など消化器系疾患の治療の際、*H. pylori* を除菌することで再発率が低下することが報告されている<sup>1)2)</sup>。除菌方法としては、抗菌薬と胃酸分泌抑制薬などを組み合わせた多剤併用療法がおこなわれているが、副作用、耐性菌の問題も指摘されており、安全で負担の少ない新しい除菌方法の開発が望まれている。一方、最近では食品成分による除菌方法も種々検討されており、なかでも抗*H. pylori* ウレアーゼ卵黄抗体は、鳥類がもつ特徴的な免疫システムを利用して得られた免疫食品成分であり、*H. pylori* ウレアーゼにのみ特異的に作用する卵由来の蛋白質(抗体)である。安全でしかも除菌効果が期待されているまったく新しいタイプの食品素材である。

### はじめに

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) が1982年に発見されてから、各国において胃粘膜からの本菌の検索が実施され、本菌の感染者は全世界に存在することが知られている。

本菌は、消化器系疾患患者だけでなく、健常者からも検出され、感染者のすべてが消化器系疾患を発症するとは限らない。しかし、*H. pylori* は、胃炎または胃潰瘍患者の約90%の人が感染しており、除菌治療をおこなうことで症状が治癒することが確認されていることより、*H.*

*pylori* が消化器系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。米国では、NIHから胃・十二指腸潰瘍の患者において*H. pylori* の除菌治療が必要であるとの答申も出され、*H. pylori* 除菌は消化性潰瘍治療の必須条件であると考えられている。一方、わが国においては、上記消化器系疾患の患者に対する*H. pylori* 感染の診断および除菌治療が保険適応になり、多くの病院で診断および除菌治療がおこなわれている。

### 1. *H. pylori* 除菌療法の現状

これまでに除菌療法に関する検討が数多くおこなわれてきた。現在おこなわれている除菌療法としては、抗菌薬とプロトンポンプ阻害薬(PPI)との併用などであるが、耐性菌、副作用の問題が懸念されており、いまだに最も

*Helicobacter pylori*  
卵黄抗体 (IgY)  
ウレアーゼ  
接着因子

\*TANI Noriko, KIM Mujo/株式会社ファーマフーズ研究所

\*\*GOSHIMA Hideo, KODAMA Yoshikatsu/株式会社ゲン・コーポレーション免疫研究所

望ましい方法は確立されていないのが現状である。

抗菌薬による除菌の場合、1種類の抗菌薬では除菌率が低く、そのため数種類の抗菌薬と胃酸分泌抑制薬なども併用した除菌療法がおこなわれている<sup>3)</sup>。抗菌薬による除菌が困難である理由として以下のことが考えられる。

- ① *H. pylori*は、胃の表面の粘液層に生息するため除菌に必要な濃度の抗菌薬が届きにくいこと。
- ② *H. pylori*は、抗菌薬に対して耐性菌をつくりやすい菌であるため、短期間で抗菌薬に対する耐性を獲得してしまうこと。

以上のような原因により抗菌薬を用いた除菌を実施する場合は、通常の2倍以上の使用量が必要とされている。そのため腹部膨満感、胃部不快感、下痢、嘔吐、悪心などの副作用が出やすくなるといった問題点が指摘されている。このような背景から、安全で簡便な除菌方法の開発が必要とされており、そのひとつとして、いろいろな機能性食品素材を用いた除菌方法が検討されている。なかでも抗*H. pylori*ウレアーゼ卵黄抗体は、その機能において最も注目されている素材のひとつであろう。

## 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など(抗原という)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、魚類以上の動物のすべてに存在する蛋白質であり、物理化学的特性および機能の違いにより各種類に分類されている。哺乳類の場合は、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEの5種類が認められており、一方鳥類の場合は、IgG、IgM、IgAの3種類が知られている<sup>4)</sup>。

このうち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できる。

このようにして得られた特異抗体は現在、おもに研究、臨床検査分野において広く利用されている。

従来特異抗体は、ウサギ、ヤギなどの動物に過免疫し、その血液より調製されてきた。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。全採血をおこない、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ことができる。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ことが広く知られている。

### 2) 卵黄抗体とは

一方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?

ニワトリ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>5)</sup>。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1mlあたり約10mg含有される<sup>6)</sup>。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40g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、元来鶏病予防の目的でワクチネーションがおこなわれており、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でこの鳥類に特徴的な免疫システムを利用すること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可能となった(図1)。すなわち鳥類に特徴的な免疫システムを利用することでこれまで利用範囲が限られていた抗体を幅広く使用することが可能になる。具体的な利用分野としては、経口受動免疫の開発が注目されている。経口受動免疫とは、ほかの動物で病原体に対する特異抗体を調製し、その抗体を経口摂取することにより病原体からの感染を予防する方法であるが実用化においては、特異抗体を大量に調製する必要があるため、この分野における卵黄抗体の利用価値は非常に高い。つまりは、ニワトリの免疫システムを利

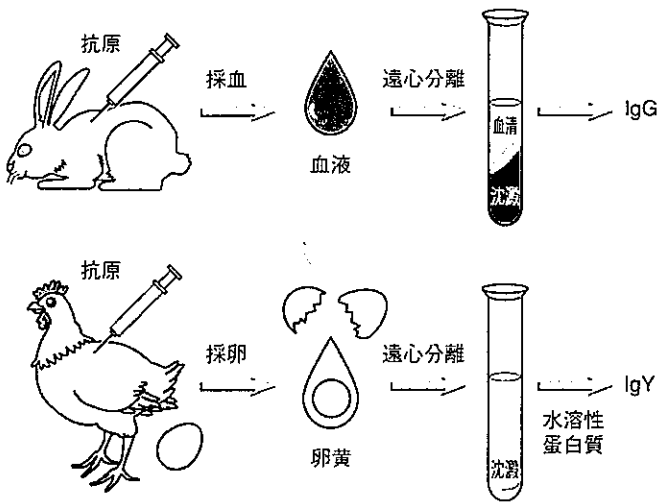


図1. 哺乳動物と産卵鶏の抗体採取方法  
IgY: Immunoglobulin Yolk

**分子量**

IgYの分子量は約18万  
IgGの分子量は約15万  
末端(Fc領域)の鎖長が異なる

**等電点**

IgYの等電点はIgGより、  
pH約1単位酸性側

**交差性 (=安全性)**

IgYは哺乳類の補体を  
活性化しない

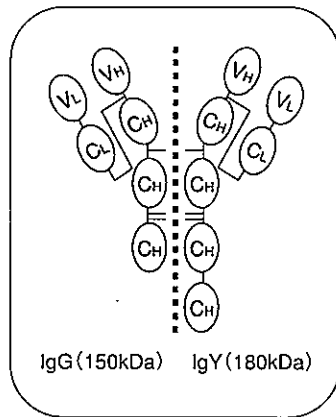


図2. IgYの生化学的特徴

用することによりはじめて機能性食品素材として抗体を利用することが可能になったといえる。

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<sup>4)</sup>(図2)。

哺乳類IgGと異なるIgYの特徴としては以下のことが報告されている。

- ①分子量 (IgG: 15万, IgY: 18万)<sup>7)</sup>
- ②IgYの等電点はpH約1単位酸性側<sup>8)</sup>
- ③IgYは哺乳類の補体を活性化しない<sup>9)</sup>
- ④IgYはプロテインAとの結合性がない<sup>9)</sup>

⑤IgYはリウマチ因子との結合性がない<sup>10)</sup>

哺乳類の補体を活性化しない点、リウマチ因子と結合しない点は、哺乳類IgGにはない特徴であり、IgYを幅広く利用するうえでの利点となる。

以上のような背景からわれわれは、消化器系疾患の原因といわれている*H. pylori*由来のウレアーゼを抗原としてニワトリに過免疫し、得られた卵を機能性食品素材として利用する研究を開始した。

### 3. 抗*H. pylori* urease IgYの開発

*H. pylori*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、*H. pylori*が宿主に付着することからはじまると考えられる。しかし、*H. pylori*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。

そこでわれわれはこの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)で胃粘液ムチンときわ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1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>11)12)</sup>。

つまり、胃粘液層の上部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、宿主である胃粘膜に付着することから感染がはじまると考えられる。

そこでわれわれは、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、*H. pylori*が胃粘膜に付着できなくなることで除菌が可能になるのではと考え、*H. pylori*のウレアーゼに対する卵黄抗体(抗*H. pylori* urease IgY)を開発した。

### 4. 抗*H. pylori* urease IgYの調製

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た<sup>13)</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。抗体力価の測定はELISA法にておこなった。

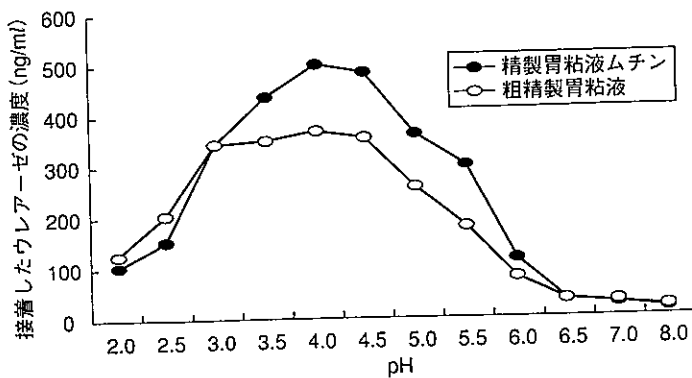


図3. ウレアーゼは酸性条件下で胃粘液および胃粘液ムチンに結合する (Icatlo FC Jr et al, 1998<sup>11)</sup>を一部改変)

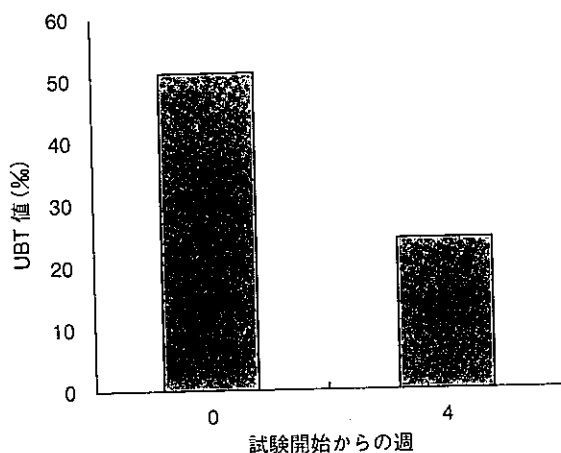


図4. ボランティア試験における尿素呼気試験(UBT)の結果 抗*H. pylori* urease IgY添加ヨーグルト

ウレアーゼに対する抗体価が最も高くなった段階の卵を用いて以下に示す*H. pylori*除菌効果試験を実施した。

### 5. 抗*H. pylori* urease IgYの食品への応用およびその効果

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、その効果を検証するために韓国にてボランティア試験を実施した。被験者は29人(尿素呼気試験において*H. pylori*陽性と判定された者)、平均年齢37.3歳、摂取期間4週間とした。摂取量は、抗*H. pylori* urease IgY含有卵黄液として4.5g/日(卵黄約1/4個分)とした。なお、摂取期間中の副作用などは何ら報告されなかった。

その結果、抗*H. pylori* urease IgYを摂取後4週間で被

験者の尿素呼気試験による $\Delta^{13}C$ 値が摂取前と比較して有意に減少し、本抗体を用いた食品が胃内の*H. pylori*の菌数を減少させることが示唆された(図4)。

効果のメカニズムとしては以下の作用機序が考えられる。本抗体が菌体外膜上のウレアーゼと特異的に結合することにより、*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察される。

抗*H. pylori* urease IgYは、抗体という特徴的な蛋白質であることより、ほかの食品素材にはない「特異性」を有する。そのため*H. pylori*以外の常在菌などには影響をあたえることなくポイントを絞ったより効果的な保健機能食品を提供することが可能である。また、「卵」という誰もが日常的に食している素材であることより、安全性も高く有用な除菌素材であるといえる。食品への応用を考えた場合には、液卵、粉末卵など種々の形態が可能であり、さまざまな食品への応用が可能である。

たとえば本抗体をヨーグルトに応用した場合、それぞれの有効成分が胃(抗*H. pylori* urease IgY)および腸内(乳酸菌)において機能を分担し、消化管全体の環境を整える食品の作製が可能となる。

### おわりに

現在実施されている*H. pylori*の除菌療法は複数の抗菌薬を用いるものであり、耐性菌の発生および副作用の問題もある。本抗体は、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、卵由来であるため副作用もなく、安全性においても問題の少ない新規素材であると考えられる。本抗体が現在の除菌療法の代替あるいは補助療法として貢献できることを願っている。

### 文献

- 1) Labenz J, Borsch G: Evidence for the essential role of

- Helicobacter pylori* in gastric ulcer disease. *Gut* 35 : 19-22, 1994
- 2) Asaka M, Ohtaki T, Kato M *et al* : Causal role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer relapse. *J Gastroenterol* 29 (suppl 7) : 134-138, 1994
  - 3) Bazzoli F, Zagari RM, Fossi S *et al* : Short-term, low-dose triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7 : 9-11, 1994
  - 4) Leslie GA, Carwile HF : Studies on the secretory immunologic system of fowl. 3. Serum and Secretory IgA of the chicken. *J Immunol* 110 : 1-9, 1973
  - 5) 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
  - 6) Rose ME, Orlans E, Buttress N : Immunoglobulin classes in the hen's egg. their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol* 4 : 521-523, 1974
  - 7) Hatta H, Kim M, Yamamoto T : A novel isolation method for hen egg yolk antibody. "IgY". *Agric Biol Chem* 54 : 2531-2535, 1990
  - 8) Altschuh D, Hennache G, Van Regenmortel MH *et al* : Determination of IgG and IgM levels in serum by rocket immunoelectrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens. *J Immunol Methods* 69 : 1-7, 1984
  - 9) 八田一, 赤池重光, 金武祚 : 鶏卵抗体の大量生産および産業利用技術の開発. *日本農業化学会誌* 68 : 1457-1462, 1994
  - 10) Larsson A, Sjoquist J : Chicken antibodies : a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation test. *J Immunol Methods* 108 : 205-208, 1988
  - 11) Icatlo FC Jr, Yokohama H, Kodama Y *et al* : Affinity purification of *Helicobacter pylori* urease. : Relevance to gastric mucin adherence by urease protein. *J Biol Chem* 273 : 18130-18138, 1998
  - 12) Icatlo FC Jr, Goshima H, Kodama Y *et al* : Acid-dependent adherence of *Helicobacter pylori* urease to diverse polysaccharides. *Gastroenterology* 119 : 358-367, 2000