

卵黄抗体(IgY)によるモモせん孔細菌病防除の可能性の検討

西井 真理*

Evaluation of yolk antibodies on the prevention of bacterial shot hole on peach

Mari Nishii

要 約

モモせん孔細菌病の原因菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia nigrifluens*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) に対する卵黄抗体の調製と原因菌に対する増殖抑制効果及びモモせん孔細菌病防除の可能性を検討し、次の結果を得た。

1. モモせん孔細菌病の原因菌を抗原として、産卵鶏に2週間おきに4回免疫した場合、抗体価は初回免疫後2週目から上昇し始め、4回の免疫後すなわち初回免疫から8~9週目に最も抗体価が高くなり、この期間の卵黄100g中の精製IgYは336~470mgであった。
2. 精製IgYの原因菌に対する増殖抑制効果は、*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*のみ確認された。
3. 3種類の原因菌のIgYを含む鶏卵を水道水で12,000倍に希釈しモモの樹に散布し、モモせん孔細菌病に対する防除効果を調べたところ、防除価11.3と防除効果は低かった。

キーワード：卵黄抗体 (IgY)、モモせん孔細菌病

結 言

鶏は、体内に侵入した抗原(細菌やウイルスなどの病原性微生物)に応答して血液中に特異抗体(抗体)を産生し、この抗体が卵黄に移行する。この抗体は、鶏卵卵黄抗体(IgY)と呼ばれている¹⁾。従来、研究試薬や臨床検査用に用いられてきた抗体は、ウサギ、ヤギ等のほ乳動物を抗原で免疫し、それらの血液から精製されてきた。一方、鶏卵から得る特異抗体は、採血の必要がなく、血液由来の抗体に比べて多量かつ安価に精製できる利点を有している²⁾。このことから、抗体の新たな利用方法として家畜の下痢症予防³⁾や、養殖魚の感染症予防⁴⁾に利用されつつあり、農産物の感染症予防にも利用できる可能性がある。

そこで、本研究では府内でも生産に大きく影響を及ぼしているモモせん孔細菌病の予防対策の一つとしてIgYの利用可能性について検討する。

材料及び方法

1. IgYの調製

(1) 抗原の調製

モモせん孔細菌病を引き起こす病原菌は

日本では3種類が報告されている^{5,6)}。本実験では、この3種類の菌株(*Pseudomonas syringae* (P.s.) pv. *syringae* MAFF 301429、*Erwinia* (E) *nigrifluens* MAFF301435、*Xanthomonas arboricola* (X.a.) pv. *pruni* MAFF211971)を農研機構農業生物資源ジーンバンクから入手し、産卵鶏に接種する抗原の調製を行った。

供試菌株の復元及び培養に用いる培地及び培養温度は、各入手先のマニュアルに従った⁷⁾。復元した供試細菌は、500mlのねじ口瓶に培地を300mlずつ入れて滅菌後、菌株を加え菌量が $10^7\sim 10^8$ cfu/mlに達するまで振とう培養を行った。この培養液にホルマリン2.5mlを添加し、細菌の不活化処理を行ったあと、培養液を50mlの遠沈管に分注し、12,000rpm 10分間遠心し上清を捨て、滅菌生理食塩水を加えて同様に3回遠心を繰り返して洗浄した。洗浄後、上清を捨て沈殿した死菌に滅菌生理食塩水を加えて溶解し、接種用の抗原とした。このとき、抗原濃度が 10^9 cfu/0.5mlになるように調整した。抗原は、産卵鶏に免疫する直前にフロイントのインコンプリートアジュバント(FIA)と等量混合して抗原乳化液とした。

* 京都府農林水産部農村振興課

(2) 産卵鶏の免疫

産卵鶏(ボリスブラウン)を8羽準備した。試験区分は、単一の抗原を接種する区(①区 *P. s.pv.syringae*、②区 *E. nigrifluens*、③区 *X. a.pv. pruni*)及び3種類の抗原を混合接種する④区(①+②+③)を設定し、各区2羽ずつ割り当てた。そして、(1)で調製した抗原乳化液を、産卵鶏の浅胸筋に2~3か所に分けて1ml/1回接種した。なお、抗原乳化液は2週間隔で合計4回接種した。

(3) 採卵とIgYの精製

抗原接種初回日から12週目までの期間、産卵した鶏卵は全て採卵し、5℃で保存した。保存しておいた卵黄からのIgY分離と精製は、λ-カラギナン法⁸⁾で行った。

保存しておいた鶏卵を割卵し、卵黄を一旦凍結し、解凍後に卵黄に0.4%λ-カラギナン水溶液を加えて攪拌し、静置後、遠心分離(7,500rpm、20℃、20分間)を行った。回収した上清(IgYを含む卵黄水溶性タンパク質)に15%濃度になるよう硫酸ナトリウムを添加して一晚塩析し、遠心分離(7,500rpm、20℃、30分間)を行った。沈殿物に10mMリン酸溶液を加え、透析チューブに移して10mMリン酸水素2ナトリウム水溶液で3回透析を行い、透析内液を回収した。

(4) IgYの抗体価

供試抗原をコーティングした96ウェルマイクロプレートに(3)で集めた鶏卵から得た卵黄をTBS-Tweenで2000倍に希釈した卵黄試料を加え、ELISA法で測定した。各試料のELISA値からブランク(TBS-Tween)のELISA値を差し引き試料の抗体価を求めた。

2. IgYの細菌増殖抑制

- (1) 各区の供試菌株を $10^2 \sim 10^3$ cfu/mlになるよう液体培地で調整した菌液と精製IgY(10mg/ml)溶液を等量混合し、24時間試験管内で感作させた後、平板培地に混合液を塗抹し、24時間培養後の生育菌数を数え、IgY溶液との感作前及び感作後の菌数の比較により、IgYの細菌増殖抑制効果を検討した。
- (2) IgY濃度と細菌増殖抑制

(1)で細菌の増殖抑制効果が認められた試験区について、濃度の異なる精製IgY溶液(0、0.1、1、10mg/ml)を等量混合し、感作12時間後及び24時間後に前述と同様に生育菌数を数え、IgYの有効濃度を調査した。

3. IgYのモモセン孔細菌病発生抑制

(1) 供試IgYの調製

モモセン孔細菌病原菌3種類を混合接種

した④区の鶏卵を15個準備した。散布液は、IgY濃度が約0.1mg/mlとなるよう鶏卵5個を水道水6Lで希釈して調製した。

(2) 散布区制・面積

3反復(3品種)、散布区各5m²

(3) 散布方法

散布は3回(2019年5月16日、5月27日、6月6日)行い、3区画で5.2L、6月6日のみ6L散布した。溶液の散布はエンジン付き背負い動力噴霧器を用いた。

(4) 防除効果判定方法

2019年6月17日に、各区20新梢をランダムに選びその全葉について発病の有無を調査した。

結果及び考察

1. IgYの調製

(1) 抗原の調製

供試菌株のうち、*X.a.p.v.puruni*の増殖速度は遅く、培養液中の細菌濃度が 10^7 cfu/mlに達するまでに要した時間は、①区及び②区の48時間に対し96時間であった。

(2) 産卵鶏の免疫

初回免疫から12週目までに採卵した鶏卵から卵黄を分離してELISA法で免疫した細菌に対する抗体価を調査した結果、抗原を単独で接種した全ての区において、初回免疫後2週目に上昇し始め、免疫回数の増加に伴って上昇した。そして、免疫種終了から4週間後には抗体価の低下し始める個体が多かった(図1)。

抗原を混合接種した④区のELISA値は、抗原を単独接種した場合と同様であり(図2)、抗原の混合接種による影響は認められなかった。

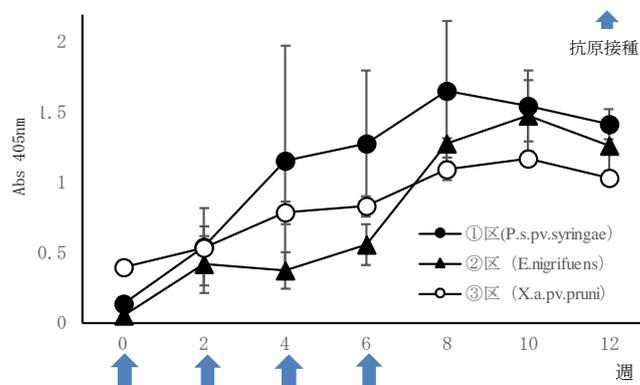


図1 抗原接種後の卵黄中IgYのELISA値の推移(n=2)

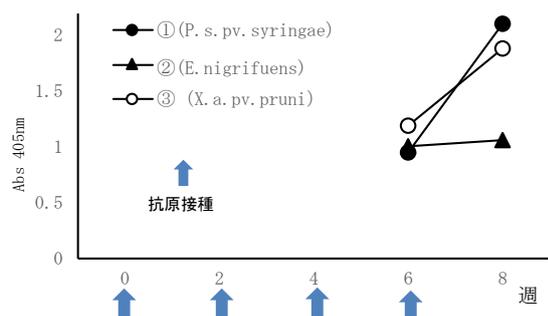


図2 抗原4種混合接種後の卵黄中IgYのELISA値(n=1)

(3) IgY の精製

(2)のELISA値の結果から抗体価が最も高かった初回免疫から8~9週目の卵黄を用いてIgYを精製した結果を表1に示した。各区のIgY濃度は5.9~8.1mg/mlの範囲であった。通常、卵黄に含まれるIgYは20~25mg/mlであり²⁾、4回の免疫によって抗体価が上昇し、効率よく特異的IgYが産生された。

表1 抗原接種開始後8~9週目の卵黄100gあたりのIgY回収量

試験区分	全IgY液量 (g)	IgY濃度 (mg/ml)	精製IgY量 (mg)
① <i>P. s. pv. syringae</i>	57	5.9	336
② <i>E. nigrifluens</i>	58	6.9	470
③ <i>X. a. pv. Pruni</i>	51	8.1	352
④ Mix (①+②+③)	49	7.5	368

2. IgY の細菌増殖抑制

(1) 各区の菌液に対する精製IgYの細菌増殖抑制効果を調査した結果を表2に示した。③区を除く全ての区の菌数は、精製IgYとの感作の有無にかかわらず $10^8 \sim 10^9$ cfu/mlまで増殖し、IgYによる細菌増殖抑制効果は認められなかった。その要因はいくつか考えられる。一つ目は、菌液の調整に液体培地を用いたことである。液体培地は、細菌の増殖に適しており、本実験ではIgY濃度0mg/mlの条件下で①区と②区の菌数は24時間で $10^8 \sim 10^9$ cfu/mlに増殖しており、感作中に細菌に付着するIgYが枯渇した可能性がある。二つ目の要因としては、細菌の増殖速度の違いが考えられる。*Xanthomonas*属の生育は遅いと言われているが⁹⁾、今回、③区の*X. a. pv. pruni*はIgY濃度0mg/mlの条件下でも24時間後の菌数は約 10^4 cfu/mlであり、他区に比べて増殖速度が遅かった。そのため、24時間の感作中に細菌に付着するIgYが枯渇しなかった可能性がある。

表2 供試菌株とIgYの感作24時間後の菌量の変化 (cfu/ml)

区分	供試菌株	開始時菌量	24時間感作後の菌量	
			IgY (0mg/ml)	IgY (10mg/ml)
①	<i>P. s. pv. syringae</i>	1.0×10^2	2.2×10^8	1.6×10^7
②	<i>E. nigrifluens</i>	3.6×10^2	1.3×10^9	8.8×10^7
③	<i>X. a. pv. pruni</i>	3.6×10^2	1.4×10^4	1.0×10^2

(2) IgY 濃度と細菌増殖抑制

(1)の実験でIgYの増殖抑制効果を確認した③区について、濃度の異なるIgY溶液と感作させた後の菌数の変化を図3に示した。

IgY量が0mg/mlの条件では、*X. a. pv. pruni*は時間の経過とともに増殖し、12時間後には10倍、24時間後には100倍の菌数となり(1)の試験結果と同様であった。一方、IgYを添加すると、その増殖スピードは緩やかとなり、IgY量が10mg/mlでは感作12時間後の菌数に変化が認められなかった。しかし、感作24時間後には、IgYの濃度の違いと菌数に差がなくなった。

以上の結果から、暴露する細菌量が $10^2 \sim 10^3$ cfu/mlの場合は、10mg/mlのIgY量でその増殖を一定時間ではあるが抑える可能性が示唆された。

野外において、モモせん孔細菌病の原因菌に暴露される菌量は不明である。しかし、付着した菌が組織内に一旦侵入すると、菌数は 10^8 cfuまで増殖する⁹⁾ため、感染を予防するためには、付着した細菌が組織に侵入する前にIgYと接触することが重要である。

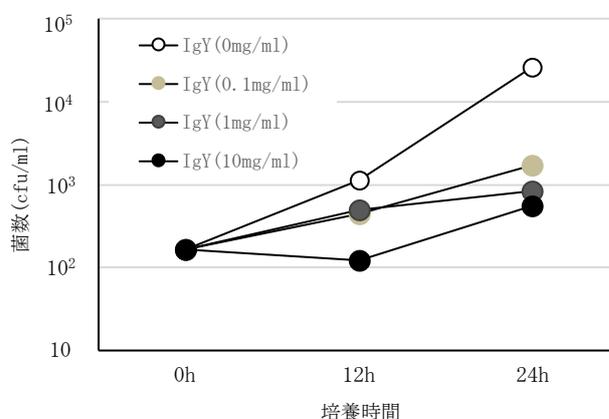


図3 IgY濃度の違いによる*X. a. pv. pruni*の増殖の推移(n=1)

3. モモせん孔細菌病に対する防除効果

IgY 抗体を含む鶏卵希釈液の散布によるモモせん孔細菌病の発病率を求め表 3 に示した。

発病率は両区に差異はなく、防除価 11.3 と防除効果は低い判定結果であった。

その原因のひとつに、試験期間中に 4 日間 (5 月 20 日、5 月 28 日、5 月 31 日、6 月 7 日) 降雨が確認されており、散布した IgY が流れ落ちた可能性も考えられる。

表3 IgY散布によるモモせん孔細菌病防除効果

試験区	回復	品種	調査葉数	発病葉数	発病葉率	防除価
④	I	夢あさま	265	93	35.1	
	II	黄味娘	287	104	36.2	
	III	一宮水密	242	116	47.9	
	平均		264.7	104.3	39.4	11.3
無処理	I	夢あさま	280	125	44.6	
	II	黄味娘	297	133	44.8	
	III	一宮水密	224	98	43.8	
	平均		267	118.7	44.4	

農畜産物の感染症予防に IgY を利用する場合は、費用面から精製 IgY の利用は難しく、試験では IgY を含む鶏卵を全卵のまま希釈して散布した。その結果、散布者からは散布時に鶏卵特有の生臭い匂いが非常に気になる、との感想を得た。

今回の実験結果では、IgY をモモせん孔細菌病の防除に利用できるほどの効果は得られなかった。しかし、降雨による IgY の流れ落ちに対しては展着剤を利用するなど、防除効果の改善も期待できると思われる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、IgY の調製法についてご指導いただいた京都女子大学家政学部食物栄養学科の八田一教授、IgY の精製にご協力いただいた八田研究室の松本愛里香氏、松本千尋氏、並びにモモの木への IgY 散布試験にご協力いただきました、丹後農業総合研究所の久木崎主任研究員に深謝いたします。

引用及び参考文献

1) X Li, T Nakano et al., Effect of yolk and egg weights on yolk antibody (IgY) in laying chickens. Poultry Science, 77: 266-270. 1998.

2) 八田 一. 抗体を食べる: 卵黄抗体 (IgY) と感染症の予防. 食物学会誌. 53. 1-11. 1998.

3) H Yokoyama, R. C. Peralta et al., Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Escherichia coli infection in neonatal piglets. Infection and Immunity, 60: 998-1007. 1992.

4) M. A. Gutierrez, T. Miyazaki et al., Protective properties of egg yolk IgY containing anti-Edwardsiella tarda antibody against paracolo disease in the Japanese ell, Anguilla japonica Temminck & Schlegel. Journal of fish disease, 16: 113-122. 1993.

5) 田部井 英夫ら. 作物の細菌病 診断と防除. 日本植物防疫協会. 252-256. 1991.

6) 出口修平, 伊山公二, 田方康平ら. モモせん孔細菌病 (主に *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) の薬剤感受性に関する研究. 59: 74 - 80. 東京農大農学集報. 2014.

7) 農業生物資源ジーンバンク. 微生物取り扱いマニュアル.
URL: <https://www.gene.affrc.go.jp/manuals-micro-media.php>.

8) H Hatta, M Kim et al., A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". Agricultural and biological chemistry, 54 (10): 2531-2535. 1990.

9) 加来久 敏. 植物病原細菌学. 養賢堂. 180-181. 2016.