

卵黄抗体(IgY)が牛の接触感染による病原菌の感染リスク低減に及ぼす効果の検討

上羽 智恵美、 岩間 小松*

Investigation of the effect of egg yolk antibody (IgY) on reducing the risk of pathogen transmission by contact infection in cattle.

Chiemi Ueba Komatsu Iwama

要 約

菌が原因となる感染症の多くは、環境中や同居感染牛の病原菌が体表に付着することにより感染し発症する。感染症予防として、肉用牛は皮膚糸状菌症を、乳用牛は黄色ブドウ球菌による乳房炎を対象として、鶏卵卵黄抗体(以下 IgY) の菌増殖抑制効果により、牛の皮膚、体表上の感染経路を遮断することによって、感染リスクを低減する可能性を検討した。

皮膚糸状菌症原因菌の抗原(「胞子のみ」、「胞子・菌糸」)を鶏に接種し作製した IgY は、「胞子のみ」では ELISA 法で高い抗体価を示したが、有効な特異抗体量が十分でなく、実験室内での静菌効果は確認されなかった。また、黄色ブドウ球菌に対する IgY を精製し、実験室内での静菌効果を調査したが、明確な効果は認められなかった。

牛の体表への展着剤の塗布試験では、流動パラフィン、ワセリン、ヒマシ油の順に長く残存し、乾燥粉末とはワセリンが混合しやすかった。皮膚糸状菌症病患部に展着材であるワセリンと混合した抗体含有卵黄を塗布したところ、塗布部位に腐敗や病患部の悪化は確認されず、薬剤治療部位と比較して差は見られなかった。

真菌を用いた IgY の調製や静菌効果の検証方法が十分確立していなかったため、実験室内で期待した静菌効果が確認できなかった。また、黄色ブドウ球菌でも同様であった。その結果、有効な特異抗体量が十分でなく、今回は具体的な野外での IgY 応用方法が提案できなかった。IgY を用いた人や家畜用の静菌資材はすでに実用化されているものもあり、今回の試験の結果や工程をシーズとして次に生かしたい。

キーワード：卵黄抗体(IgY)、皮膚糸状菌症、黄色ブドウ球菌、感染リスク低減

結 言

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。

鶏卵卵黄抗体(IgY)¹⁾は、鶏が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)に应答して血液中に産生した特異抗体(抗体)が卵黄に移行したものである。

この鶏卵から得る抗体は、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⁾に利用されつつある。

菌が原因となる感染症の多くは接触感染で、牛では環境や同居感染牛の病原菌が体表に付着

することにより感染経路が確立しやすい。肉用牛で発症が見られる牛の皮膚糸状菌症^{5,6)}は接触により感染し、患部の脱毛などによる外観の汚損などのため肉用牛の売買時における商品価値の下落などの損害がある。また、公衆衛生面では人獣共通の伝染性疾患であるために、牛の飼養者に対する飼養管理上の障害となっている。

また、乳用牛の乳房炎は酪農家にとって最も経済的被害が大きい疾病であり、その原因菌の一つに黄色ブドウ球菌がある。黄色ブドウ球菌は抗生物質による排除が困難で難治性乳房炎になるため、予防が重要である。感染分房や乳頭皮膚などに生息し、搾乳者の手指、タオルなどを介して他の分房や他の牛に感染する。

そこで、牛の皮膚糸状菌症、牛の黄色ブドウ球菌性乳房炎を対象に、IgY の菌増殖抑制効果により、牛の皮膚、体表上の感染経路を遮断すること

によって、感染リスクを低減する可能性を検討した。

材料及び方法

1. IgY の調製

(1) 抗原の調製

ア 牛の皮膚糸状菌

(*Trichophyton verrucosum*)

頭頸部に落屑・脱毛を伴う肉用牛の皮膚病変から回収した痂皮の直接鏡検において球状で長連鎖した分節胞子を確認。チアミン・イノシトール加サブローブドウ糖寒天培地(クロラムフェニコール 50mg/l 添加)⁷⁾で37°C 2週間微好気培養にて分離培養後、培地固着性の灰白色塊状で隆起性のあるコロニーを確認し、牛の皮膚糸状菌と判定。チアミン・イノシトール加サブローブドウ糖寒天培地(クロラムフェニコール 50mg/l 添加)⁷⁾37°C 10日間微好気培養し増菌した。抗原は「胞子のみ」と「胞子・菌糸」の2種類を調製(図1)。

「胞子のみ」はポリソルベート 80 を 0.01%と、クロラムフェニコール 0.05%を添加した滅菌生理食塩水(以下ポリソルベート 80 添加生理食塩水)を培地 1 枚当たり 3ml 滴下し、培地上の胞子と液をコンラージ棒で混合し、ピペットで混合液を回収した。10 枚分の回収液を 50ml 遠沈管に入れ、ホルマリン液を回収液の 0.2%添加、37°C 18 時間静置し菌の不活化処理をおこなった。

「胞子・菌糸」はチアミン・イノシトール加サブローブドウ糖寒天培地(クロラムフェニコール 50mg/l 添加)での培養時、培地にのせたシリンジフィルター(穴径 0.45 μm)⁸⁾上に接種し、37°C 10日間微好気培養。メンブレンフィルターごと回収し 50ml 遠沈管に入れ、ポリソルベート 80 添加生理食塩水を 20ml 加え、混和後、ホルマリン液を食塩水の 0.2%添加、37°C 18 時間静置。洗浄前にメンブレンフィルターを取り除いた。

「胞子のみ」と「胞子・菌糸」とも滅菌生理食塩水で3回洗浄、菌量を 10⁹cfu/0.5ml に調整後、超音波破碎を 10 回行ったものと破碎後遠心分離した上澄み(可溶性抗原抽出)を、接種まで-80°Cで冷凍保存し「供試抗原とした。また同様に洗浄し、超音波破碎しない「胞子のみ」も供試抗原とした。

「胞子のみ」「胞子のみ破碎」「胞子のみ可溶性抗原」「胞子・菌糸破碎」「胞子・菌糸可溶性抗原」の5種類の供試抗原を産

卵鶏に免疫する直前に解凍し、フロイントのインコンプリートアジュバント(FIA)を等量混合して抗原乳化液とした。

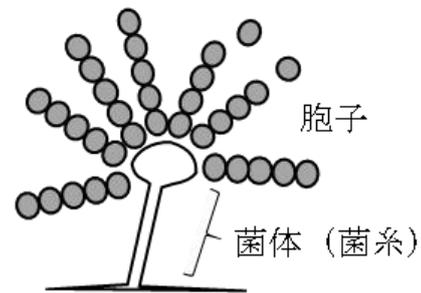


図1 糸状菌の簡易図

イ 黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)

黄色ブドウ球菌(NBRC 102143)をBHI寒天培地で増菌培養後、50ml 遠沈管に入れた生理食塩水 5ml に 10¹⁰~10¹¹ cfu/ml になるよう菌量を調整。この菌液にホルマリン液を 0.5%添加後冷蔵保存し菌の不活化処理をおこなった。

産卵鶏に接種する直前に、菌液を生理食塩水で3回洗浄し抗原濃度を 10⁹cfu/0.5ml に調整し供試抗原とした。供試抗原は、フロイントのインコンプリートアジュバント(FIA)を等量混合して抗原乳化液とした。

(2) 産卵鶏への抗原接種

産卵鶏(ボリスブラウン)を接種する抗原ごとに分けし、皮膚糸状菌は各区2羽、黄色ブドウ球菌は各区4羽とした。

(1)で調整した抗原乳化液を、産卵鶏の浅胸筋に3~4か所に分けて1ml/回接種した。なお、抗原乳化液は2週間に1回(図3、4内の矢印)合計4回接種を実施した。

(3) 採卵とIgYの精製及び卵黄粉末作製

抗原接種初回目から12週目までの期間、産卵した鶏卵はすべて採卵し、5°Cで保存した。また、抗原接種初回日の1週間前から毎日採卵した鶏卵を非特異的IgY含有卵とした。

卵黄の回収は、鶏卵を割卵し、卵黄と卵白を卵セパレーターとピンセットを用い分離した後、紙ワイパーで卵白を完全に除去した。

ア 抗体価測定用卵黄

鶏卵を割卵し、約4mlの卵黄をピペットで分注し、同量の0.05%Na₂S₂O₃を加えてボルテックスミキサーで均質化し、特異的抗体価分析まで冷蔵保存した。

イ IgY 精製用卵黄

卵黄のIgY分離と精製については、λ-

カラギナン法⁹⁾で行った。卵黄を一旦凍結し、解凍後に卵黄に 0.4%カラギナン水溶液を加えて攪拌し、静置後遠心分離(7,500ppm、20°C、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(7,500ppm、20°C、20 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。透析内液は真空凍結乾燥機で乾燥粉末にした。

ウ 卵黄粉末用卵黄

卵黄重量の 10%蒸留水を混和後、ミキサーで十分に泡立てたのち、液体窒素で急速冷凍後、真空凍結乾燥機で乾燥粉末にした。

(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) のアを TBS-Tween で、皮膚糸状菌は 20,000 倍、黄色ブドウ球菌は 2000 倍に希釈し、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 の実験室内静菌効果調査

(1) 抗皮膚糸状菌 IgY

- ア 材料(1. (3) のウで調製)
- (ア) 非特異的 IgY 含有卵黄粉末
- (イ) 抗皮膚糸状菌 IgY 含有卵黄粉末
- 各卵黄粉末を、卵黄粉末：ワセリンを 1：2 の割合で混合したものを使用

イ 試験区分

- 塗布無し区：全く塗布なし
- 非特異的 IgY 区：アの(ア)
- 抗皮膚糸状菌 IgY 区：アの(イ)
- 対照区：ワセリンを塗布

ウ 試験方法

実験室内で皮膚糸状菌に対する静菌効果判定は、その生態^{5,6)}から細菌と同様の方法では判定できない。皮膚糸状菌は接種 6 時間後に胞子の一部が発芽し、12 時間後は皮膚に菌糸が侵入する¹⁰⁾、そこで、下記の方法で接触試験を実施した。

サブロー寒天培地に検体を 1g ずつ塗布。対照はワセリン 1g を塗布。菌液は BHI 培地で 2 週間培養の皮膚糸状菌の胞子を 0.01%ポリソルベート 80 添加液に混和し菌液を $n \times 10^2$ CFU/ml に調整。菌液 500 μ

l を直径 55mm の濾紙に滴下し、含浸させた。

菌液を含浸させた濾紙を滴下した面が接触するよう培地にピンセットで設置。培地との間に空気が入らないようにした。

設置してから 4 時間、8 時間、24 時間、32 時間後濾紙を回収。各区とも濾紙を設置したままの状態のものを置いておき 56 時間後にコロニー数を確認。

濾紙を設置したままの状態のものと比較し、コロニー数が少ない場合、皮膚糸状菌の培地への侵入が抑えられていると判定した。

(2) 抗黄色ブドウ球菌 IgY

ア 材料

- 精製 IgY(1. (3) のイで精製)
- 精製非特異的 IgY(京都女子大学提供)

イ 試験方法

IgY を蛋白質濃度 10mg/ml になるよう PBS で希釈し、シリンジフィルター(孔径 0.45 μ m)でフィルトレーションした。PBS を 500 μ l と菌液 500 μ l を 2ml マイクロチューブに入れボルテックスで混和。20 分間、5 分ごとにボルテックスで混和し、反応させた。

食塩卵平板培地に 100 μ l ずつ塗布し、コロニー数を計測した。

3. 特異的抗体の分析

(1) 精製した IgY の特異的抗体含有量の測定

ア 材料

- (ア) 抗体
- 抗黄色ブドウ球菌 IgY
- 抗皮膚糸状菌 IgY
- 非特異的 IgY
- (イ) 抗原
- 黄色ブドウ球菌
- 牛由来の菌株 9×10^8 CFU/ml
- 皮膚糸状菌
- 1×10^9 CFU/ml 超音波破碎
- 10 回後遠心上澄み
- 胞子(蛋白濃度 0.530mg/ml)
- 胞子・菌糸(蛋白濃度 0.891mg/ml)

イ 試験方法

各 IgY 液(蛋白質濃度 2mg/ml) と抗原菌液を 0.2ml ずつ 5ml ラウンドチューブに入れ、37°C・120rpm で 1 晩反応後、遠心分離(5,000rpm、4°C、10 分間)し、上清をシリンジフィルター(孔径 0.45 μ m)でフィルトレーションした液を検体とした。各 IgY 液と検体を高速液体クロ

マトグラフ(HPLC) に入れ、AREA 値の比から、特異的抗体含有量(静菌効果)を %で算出した。

4. 添加する展着剤の選定

(1) 牛の皮膚を用い添加する展着剤の残存時間の調査

- ア 材料
 - 流動パラフィン
 - ワセリン
 - グリセリン
 - ヒマシ油
- イ 試験方法

4 頭群飼の育成牛に食紅で着色した展着剤をそれぞれ 15 箇所ずつ塗布し、経時的に展着剤の残存状況を 3 日目まで調査。

(2) 展着剤と卵黄粉末の混合状態の調査

- ア 材料
 - 展着剤は(1) において牛の皮膚で残存時間が長かった順に 3 種類を調査した。
- イ 試験方法
 - 各材料と卵黄粉末を 1:1 または 2:1 で混和。混和後の形状と、24 時間、48 時間後の状態を確認した。

5. IgY の牛の皮膚への影響調査

(1) 皮膚糸状菌症り患牛の皮膚への塗布試験

- ア 材料
 - 卵黄粉末(1. (3) のイで精製)
 - 展着剤: ワセリン
- イ 試験区分
 - 試験区: 卵黄粉末
 - 対照区: ナナフロシン(液体)

ウ 試験方法
皮膚糸状菌症り患牛 2 頭で行い、個体差を避けるため、病患部毎に区分けを行った¹¹⁾。試験開始前日に痂皮をとり、ナナフロシンを塗布。

IgY 含有卵黄とナナフロシンを、2~3 日に 1 回塗布し、病変部とその周囲の状態を約 1 週間毎に記録。3 週間観察した。

結 果

1. IgY の調製

(1) 抗皮膚糸状菌 IgY

皮膚糸状菌に対する抗体価は、接種した抗原のうち、胞子のみ接種が最も高い力価を示した(図 2)。胞子のみ接種した鶏の週ごとの抗体価を測定したところ、抗体価は、抗原接種後 6 週目で最も高くなり、それ以降高い

抗体価を維持した(図 3)。そこで、胞子のみを接種した鶏の 6 週目以降 10 週目までの卵の卵黄から IgY の精製と、卵黄粉末を作製した。

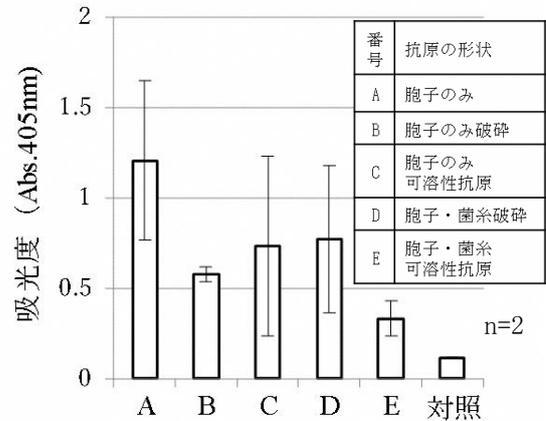


図 2 各抗原に対する接種 6 週目の抗体価

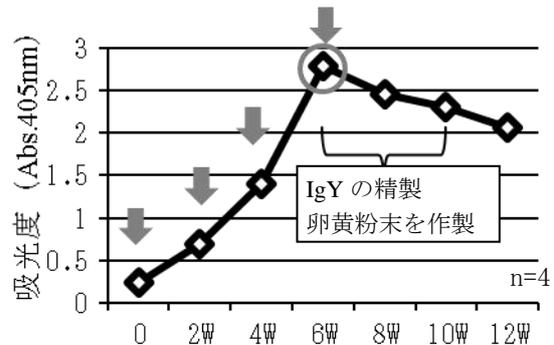


図 3 皮膚糸状菌を抗原とした 2 週間ごとの抗体価の推移(胞子のみ)

(2) 抗ブドウ球菌 IgY

黄色ブドウ球菌に対する抗体価は、鶏への抗原接種後 4 週目で最も高くなり、それ以降高い抗体価を維持した(図 4)。そこで、抗体価の高い 4 週目以降 10 週目までの卵の卵黄から IgY を精製した。また、卵黄粉末を作製した。

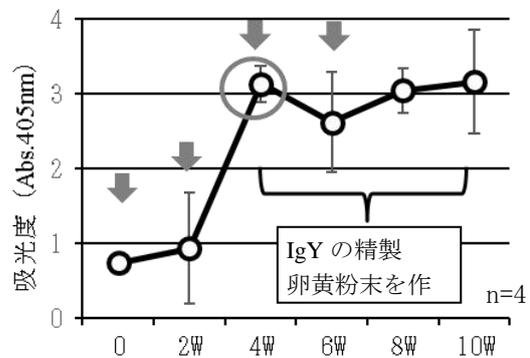


図 4 黄色ブドウ球菌を抗原とした 2 週間ごとの抗体価の推移

2. IgY の実験室内静菌効果調査

(1) 抗皮膚糸状菌 IgY

抗皮膚糸状菌 IgY は 1. (1) の結果より胞子のみ接種した鶏 6 週目以降 10 週目までの卵より作製した卵黄粉末を使用した。

抗皮膚糸状菌 IgY 区と非特異的 IgY 区は塗布無し区より、24 時間までコロニー数が少なく、皮膚糸状菌の培地への侵入が抑えられていると考えられた。しかし、96 時間後は対照区が最も皮膚糸状菌の培地への侵入が抑えられており、また、抗皮膚糸状菌 IgY 区と非特異的 IgY 区に差は確認されなかった(図 5)。

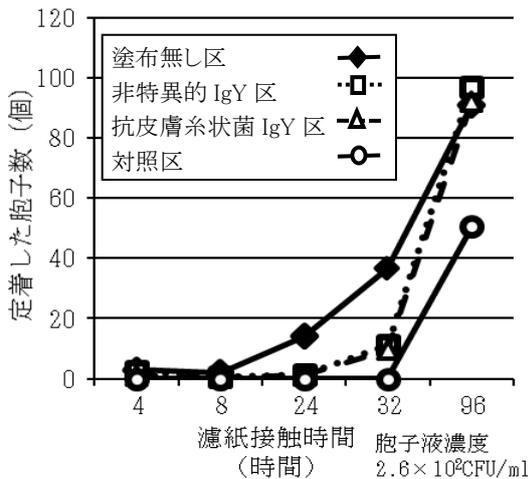


図 5 皮膚糸状菌症原因菌に対する静菌効果

(2) 抗黄色ブドウ球菌 IgY

抗黄色ブドウ球菌 IgY、非特異的 IgY ととも対照と比較し生菌数の差は見られなかった(表 1)。

表 1 抗黄色ブドウ球菌に対する静菌効果

検体名	生菌数(cfu/ml)
抗黄色ブドウ球菌 IgY	6.8×10 ³
非特異的 IgY	8.1×10 ³
対照(抗体なし)	6.8×10 ³

3. 特異的抗体の分析

(1) 精製した特異的抗体の抗原との結合調査

抗黄色ブドウ球菌 IgY 抗体は、HPLC での AREA 値の比から、静菌効果 18%以上が実際に実証試験で静菌効果が確認されたとの報告がある¹²⁾。しかし、今回、1. (3) のイで精製した特異抗体の分析では抗黄色ブドウ球菌 IgY は静菌作用が認められなかつ

た。抗皮膚糸状菌 IgY も非特異的抗体との差が確認されなかった(表 2)。

表 2 特異的抗体の抗原との結合調査

抗体	抗原	静菌効果 (%)
抗黄色ブドウ球菌 IgY	黄色ブドウ球菌	-17.714
抗皮膚糸状菌 IgY	皮膚糸状菌 (胞子)	12.597
抗皮膚糸状菌 IgY	皮膚糸状菌 (孢子菌糸)	8.913
非特異的抗体	皮膚糸状菌 (胞子)	17.772

4. 添加する展着剤の選定

(1) 牛の皮膚で展着剤の残存時間の調査

牛の皮膚上に流動パラフィン、ワセリン、ヒマシ油、グリセリンの順に牛の皮膚に長く残存した(図 6)。

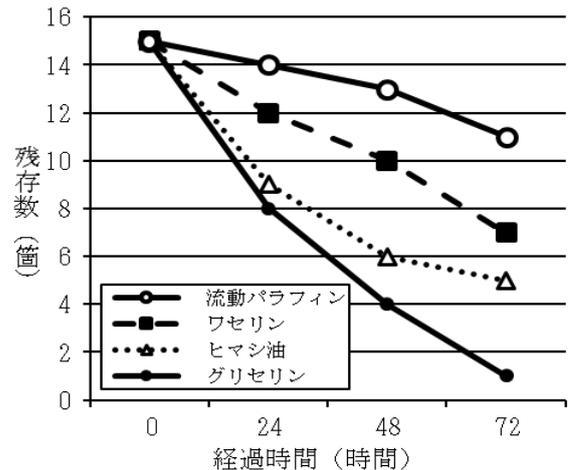


図 6 展着剤の残存数の推移

(2) 展着剤と卵黄粉末の混合状態の調査

材料は 4.(1)の結果より、残存時間が長かった流動パラフィン、ワセリン、ヒマシ油で実施した。流動パラフィン混合しても卵黄粉末が分離し、混ざらず沈澱した。ワセリンは、混合直後は全体的に堅いが、常温静置 48 時間程で軟膏状になった。ヒマシ油は卵黄粉末と混合できた。牛の皮膚への残存状況と卵黄との混和しやすさ等を総合的に判断し、展着剤はワセリンを選択した。

5. IgY の牛の皮膚治癒過程の影響調査

(1) 牛の皮膚への塗布試験

展着剤をワセリン治療部位(対照区) と比

較して差は確認されなかった。また、塗布部位に腐敗や病患部の悪化は確認されなかった(図7)。

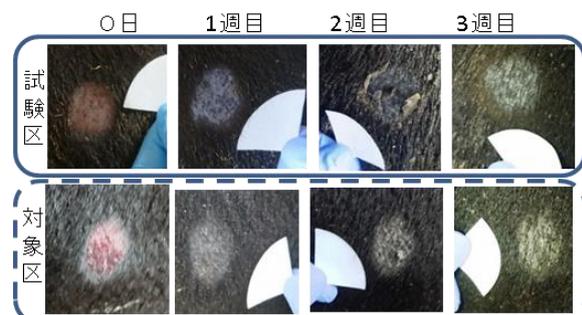


図7 鶏 IgY 抗体塗布後の皮膚病変部の推移

考 察

皮膚糸状菌を牛から分離し、IgY を調製。抗原(「孢子のみ」、「孢子・菌糸」)を鶏に接種し調製した IgY は、「孢子のみ」で ELISA 法では最も高い抗体価を示した。

実験室内で皮膚糸状菌に対する IgY の静菌効果判定を実施したが、静菌効果は確認できなかった。

黄色ブドウ球菌に対する IgY を調製し、実験室内での静菌効果を調査したが、明確な効果は認められなかった。

牛の体表への展着剤の塗布試験では、流動パラフィン、ワセリン、ヒマシ油、グリセリンの順に長く残存し、卵黄と混合しやすいワセリンを選択。皮膚糸状菌症病患部に展着材と混合した抗体含有卵黄を塗布したところ、塗布部位に腐敗や病患部の悪化は確認されず、薬剤治療部位と比較して差は見られなかった。

真菌を用いた IgY の調製や静菌効果の検証方法が十分確立していなかったため、実験室内で期待した静菌効果が確認できなかった。また、黄色ブドウ球菌でも同様であった。その結果、有効な特異抗体量が十分でなく、今回は具体的な野外での IgY 応用方法が提案できなかった。

IgY を用いた人や家畜用の静菌資材はすでに実用化されているものもあり、今回の試験の結果や工程をシーズとして次に生かしたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、IgY の調製法について御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 の結合調査に御協力いただいた八田研究室の久保七彩氏、並びに接種抗原調整に御協力、御指導いただきましたニュ

ートリションジャパンの研究員の皆様に深謝いたします。

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 : p 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 eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. *Journal of fish disease*, 16: 113-122. 1993.
- 5) 原文男, 岩田 明敏, 岩崎 邦夫, ほか: 牛に発生した皮膚糸状菌症について. *日本獣医師会雑誌* 21 (2) : p. 69-72, 1968
- 6) 矢久保 義哉: 牛の皮膚糸状菌症について. *真菌と真菌症* 14 (2) : p 76-79, 1973
- 7) 農林水産省消費・安全局: 病性鑑定マニュアル 第4版, 2016
- 8) 藤田 繁, 松山 東平, 佐藤 良夫: 白癬菌の分節孢子のみを簡便、確実に得る培養法について. *真菌と真菌症* 27 (3) : p 175-181, 1986
- 9) 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.
- 10) 藤田 繁, 松山 東平, 佐藤 良夫: 皮膚糸状菌症-実験的モルモット足白癬. *真菌と真菌症* 29(3) : p 163-168, 1988
- 11) 小笠原 悠, 谷本 朱紀: 病変スコアを用いた牛の皮膚糸状菌症における各種薬剤の効果比較. *栃木県家畜保健衛生業績発表会集録* 59: p30-33, 2017
- 12) 久保七彩: 特異的 IgY 抗体の調製における免疫源およびアジュバントの検討. 京都女子大学 博士論文: 2022