卵黄から anti-*E. coli*, IgY の分離方法と *E. coli* に対する特異性について

谷元 孝*・徳満健二*・新村浩二*・藤本滋生*

Separation of anti-*E. coli* IgY, Water-Soluble Proteins from Egg Yolk, and its Specificity against *E. coli*

Takashi TANIMOTO*, Kenji TOKUMITSU*, Kouji SHINMURA*
and Shigeo FUJIMOTO*

* Food Research Institute, Kagoshima Prefectural Economic
Federation of Agricultural Co-operatives,
2-2295-236, Yojiro, Kagoshima 890

The first step of isolation of egg yolk immunoglobulin, IgG, a livetin protein, is to separate the water-soluble proteins from lipoprotein. A method for isolation of egg yolk immunoglobulin was investigated. Sodium casein was found to be effective for removal of yolk lipoprotein as a precipitate. Lipoprotein and water-soluble proteins were separated from egg yolk with sodium casein. More than ninety-nine percent of the lipids were precipitated by this treatment. After purification by ion-exchange chromatography, SDS-PAGE showed the presence of livetin protein in the supernatant. The lipopolysaccharide (LPS) was isolated from *E. coli* cells and used as an antigen for an ELISA. The LPS gave high sensitivity. The anti-*E. coli* IgY aggregated the bacterial cells and inhibited their growth *in vitro*.
(Received Feb. 16, 1994)

近年、卵黄に含まれる成分の研究が進み、ホスビチン、 α -リベチン、 β -リベチン、 γ -リベチン、ビオチン結合性蛋白質などの存在が明らかにされてきた。特に γ -リベチンは親鳥血清由来の免疫グロブリンと一致することから¹⁾その有効利用が検討されている²⁾。

従来、免疫グロブリンとしての抗体は、哺乳動物の免疫機能を利用し、その血液より調製されてきたが、鳥類の場合は血液の中にできた抗体が卵黄中に移行して蓄えられる。この移行抗体を利用することによって、経済的にしかも大量生産される可能性がたかまってきた。

卵黄中のリン脂質の大部分はリポ蛋白質の構成成分として含まれているので、鶏卵の水溶性蛋白質である移行抗体を分離精製するには、まず卵黄からリポ蛋白質を分離・除去することが必要である。

これまで超遠心による分離³⁾、有機溶媒による分離⁴⁾、

ポリエチレングリコールやデキストラン硫酸ナトリウムによる分離などの方法が提案されているが^{5), 6)}、いずれも経済性や安全性の点で実用的ではなかった。

八田ら⁷⁾はアルギン酸や天然ガム質によってリポ蛋白質を分離することを提案しているが、著者らは、カゼインナトリウムにより卵黄水溶性蛋白質とリポ蛋白質が容易に分離できることを見だし、免疫グロブリン蛋白質であるIgYの抽出方法に応用した。また、大腸菌を使って抗*E. coli* IgYの凝集抗体価の推移の様子や大腸菌の増殖阻止試験を行ったので報告する。

実験材料および方法

1. 抗原の調製および採卵鶏への免疫

病原性大腸菌 *E. coli* K-88 を TSB 培地で 37°C, 48 時間培養し、培養液に 0.5% (V/V) になるようにホルマリ

* 鹿児島県経済連食品総合研究所 (〒890 鹿児島市与次郎 2-2295-236)

ンを加え、菌体の不活化処理を行った。菌体を5000g×10分間の遠心分離で集め、リン酸緩衝液(0.12 M phosphate, 0.04 M NaCl, pH 7.2: 以下PBS)で3回洗浄した後 Freund's の不完全アジュバントと共に抗原エマルジョン液を作成した。採卵鶏への免疫は鹿児島県市来町の経済連実験農場において、1羽当たり1mlの抗原エマルジョン液を筋肉注射することによって免疫を行った。免疫注射は1週間に1回、合計6回実施し、採卵は毎日行った。

2. 脂質と蛋白質の測定

総脂質の定量方法は、クロロホルム-メタノール(2:1 V/V)で抽出後、減圧下で有機溶媒を留去し、残留物の重量を測定した。蛋白質の定量方法はローリー法を用いた。

3. ゲルろ過

ゲルろ過担体に Sephacryl S-200 HR (Pharmacia 社 カラムφ2.5×75 cm)を使用し、溶出液は50 mM リン酸バッファー(pH 8.0)、流速25 ml/分で行い、280 nmで検出した。標準蛋白質には BioRad 社の Gel Filtration Standards Components を用いた。

4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、10% アクリルアミド含量でスラブ型の垂直ゲルを用いる LAEMMLI の方法⁸⁾で行った。泳動後クーマシーブリリアントブルー G 250 で蛋白質を染色した。分子量マーカーには bovine-IgG、および chicken serum IgG (BioRad 社)を使用した。

5. 大腸菌 Lipopolysaccharide (LPS) の調製

LPS の調製は AYMAN ら⁹⁾の方法に準じて次のように行った。600 ml の TSB 培地に *E. coli* K-88 を接種し、37°C、48 時間培養した。8000 g×10 分で菌体を捕集し蒸留水で3回洗浄した。菌体を40 ml の TEA バッファーに懸濁し、80 ml のアルカリ溶液(3 g SDS, 0.6 g Trizma base, 6.4 ml NaOH, in 100 ml)を加えた。60°C、70 分インキュベート後に、あらかじめ60°Cに加温しておいたフェノール-クロロホルム溶液(1:1, V/V)を添加してさらに15分間インキュベートした。16000 g×10 分間遠心分離し、上澄みに24 mg のプロティナーゼ K (和光純薬製, *Tritirachium album* 由来)を添加して60°C、60 分インキュベートした。80 ml の蒸留水と20 ml の3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加えた後に2倍容のエタノールを添加してLPSを沈殿させた。沈殿を抗原被覆用緩衝液に懸濁して抗原液とした。

6. IgY の抗体価の活性測定 (ELISA)

IgY の抗体価の活性の測定は次のように行った。ポリスチレン製96穴マイクロプレートに100 μl の LPS 抗原液を入れ4°Cで1晩放置した。プレートを0.05% ツーイン 20 を含む PBS (PBS-Tw) で洗浄し、ウシ胎児血清を添加して37°C 1 時間インキュベートした。プレートを PBS-Tw で洗浄後、希釈した IgY サンプルを添加し37°C で2時間インキュベートした。再度プレートを PBS-Tw で洗浄後、100 μl の標識抗体(alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-chicken IgG)を添加して37°C で2時間インキュベートした。プレートを PBS-Tw で洗浄後100 μl の基質溶液(p-nitrophenyl phosphate, 1mg/ml diethanolamine-HCl buffer, pH 9.8)を添加して発色させた。2 N 水酸化ナトリウムで反応を停止し、吸光度を415 nm で測定した。

7. 凝集反応

上澄液を卵黄6倍希釈相当の水性蛋白質画分とし、PBSで2°倍希釈列を調製し、それぞれの50 μl と抗原液(*E. coli* whole cell suspension)をマイクロプレートに混合し、凝集の有無を調べた。凝集抗体価は凝集の見られるサンプルの最大希釈倍率の逆数で示した。

8. 上澄液(水溶性蛋白質画分)からIgYの精製

卵黄水溶性蛋白質への濃度が20 mM となるようにリン酸二水素ナトリウムを添加し、10% 塩酸でpH 8.0 とした。あらかじめ20 mM リン酸バッファー(pH 8.0)で平衡化した DEAE-Sephacel カラム(φ5.0×10 cm BioRad 社)を用い、同じバッファーでカラムを洗浄した後に0.2 M リン酸バッファー(pH 8.0)、流速5 ml/分で蛋白を溶出させ、280 nm でモニターしながらピークを分画採取した。得られた溶出液に終濃度15% になるように無水硫酸ナトリウムを加え、攪拌した後に10000 g×15 分、遠心分離した。得られた沈殿を100 ml の0.1 M リン酸バッファーに溶解した。塩析を2回繰り返し、得られた沈殿を100 ml の10 mM リン酸バッファーに溶解し、同バッファーで透析した。

結果および考察

1. 卵黄から脂質画分の分離

血清中のリポ蛋白質の凝集には種々の凝集剤の濃度、塩化カルシウムや塩化ナトリウムの添加量、pH などいろいろな因子が影響を与えると報告されている¹⁰⁾。そこで Fig. 1 に示した方法でカゼインナトリウムの濃度、塩化ナトリウムの添加量、pH を変化させて上澄中の脂質の量を最小にする条件を検討した。Table 1 に示すよう

Table 1 Optimization experiments on separation of egg yolk into lipoprotein and water-soluble protein fractions

No.	Na-Casein (%, W/V)	pH	NaCl (M)	Supernatant	
				Protein (mg)	Lipids (mg)
Egg yolk	(10 ml)			1 162	1 266
1	0.2	4.88	0.10	402	461
2	0.2	4.88	0.12	455	540
3	0.2	4.88	0.15	537	828
4	0.2	4.88	0.20	628	886
5	0.5	4.29	0	631	613
6	0.5	4.84	0	255	11
7	0.5	5.58	0	247	10
8	0.5	6.24	0	260	9
9	0.5	6.34	0	265	12
10	0.5	7.31	0	696	733
11	0.6	6.24	0	227	10
12	0.7	6.24	0	273	11

Fig. 1 The procedure of separation of water soluble protein fraction of egg yolk

に、12のベルテックス条件を設定し実験を行った。結果は卵黄から脂質を除去する最も適した条件は、塩化ナトリウムは添加せず、カゼインナトリウム濃度0.5%以上、pH 4.84~6.34であり、脂質の99%以上が沈澱分離できた。このことは、食品添加物として使用されているカゼインナトリウムを利用することによって卵黄から脂質を

除去することができるので安全でしかも低コストで大量に鶏卵抗体が利用できることを意味するものである。

2. 凝集反応試験

Fig. 1に示す方法(表1のベルテックス12の条件)で各卵より水溶性画分を分離し、上澄溶液の*E. coli* K-88に対する凝集抗体価を測定した。結果はTable 2に示したように、凝集抗体価は毎週1回の免疫注射により5週め頃からピークになり、380に達した。またこの上澄溶液を入口温度150℃、出口温度80℃の条件でスプレードライすることによって凝集抗体価は約8倍濃縮された。これらの結果からニワトリの血清中にできた抗体が卵の卵黄に移行し、蓄積されたことが推察される。

3. 上澄溶液(水溶性蛋白質画分)からIgYの精製

上澄溶液をゲルろ過にかけたパターンをFig. 2に示した。免疫グロブリン蛋白質の分子量は約180KDであることから、フラクションNo. 30前後の中に目的とする蛋白質が存在することが推察される。実験方法8で述べた手順で水溶性蛋白質画分を精製し、DEAE-Sephacelカラムに溶出させた状態をFig. 3に示した。このようにして得られたIgYを0.4μmのメンブレンフィルターでろ過した後に凍結乾燥した。SDS-PAGEによる電気泳動を行った結果、Fig. 4に示したように、bovine IgG、および chicken serum IgGと同じようにH鎖、L鎖からなる2本のバンドが検出された。また、このIgYサンプルをゲルろ過にかけた結果シングル

Table 2 Changes of agglutinating antibody activity

Week	Dilution diameters								Antibody activity
	6	12	24	48	96	192	384	768	
0	—	—	—	—	—	—	—	—	
1	+	+	—	—	—	—	—	—	12
2	++	++	+	+	—	—	—	—	48
3	+++	+++	++	++	+	—	—	—	96
4	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	192
5	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	384
6	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	384
7	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	384
8	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	384

Fig. 2 The MW distribution of WSF on Sephacel S-200 column

Column : 2.5×60 cm ; flow rate, 25 ml/min. ; sample volume, 2 ml ; column was equilibrated with 50 mM PB, pH 8.0 containing 150 mM NaCl.

Fig. 3 Purification of WSF by DEAE-Sephacel anion exchange

Column : 5.0×10 cm ; flow rate, 5 ml/min ; Protein solution was applied and washed with 20 mM PB, pH 8.0, IgY was eluted with 200 mM PB, pH 8.0.

ピークであった。ニワトリには哺乳類の IgG, IgA, IgM に相当する抗体をもっているといわれているが、このうち IgG に相当する IgY だけが卵黄に移行、蓄積されていることが推察できる。

4. ELISA value

調製した *E. coli* K-88 LPS を抗原として、各卵より抽出精製した IgY と反応させたところ、Fig. 5 に示したように強い感受性を示し、活性値と週の数との間に強い相関がみられた。このことから免疫注射を開始した時点か

ら血清中に抗体の生産が開始され、卵黄に移行していく様子がうかがわれる。

5. 細菌の増殖抑制試験

in vitro における IgY の *E. coli* K-88 に対する増殖抑制力を調べるため、IgY を種々の濃度に調製した TSB 培地に 10^4 個/ml の *E. coli* K-88 を添加して、生細胞の経時的变化を調べた。その結果は Fig. 6 のとおりで IgY の添加によって *E. coli* K-88 のあきらかな増殖抑制がみられた。これらの結果から抗 *E. coli* IgY の特異性を

Fig. 4 SDS-PAGE patterns of IgY, chicken IgG and bovine IgG

Fig. 5 Changes of antibody levels in egg yolk during the immunization period

Fig. 6 Effects on the anti-*E. coli* antibody IgY on the growth of *E. coli*

確認することができた。一般に、免疫応答機構を活用した病気の予防には2つの方法があり、1つは病原体を不活化して生体に投与するワクチネーションであり、もう1つは特異的抗体を他の個体で作製し、これを生体に与えることによって病原体の感染を防ぐという受動免疫の考えである。この細菌の増殖抑制試験の結果から、特異的IgYを調製することによって、特定の細菌に対する感染予防効果が期待され、IgYを含む機能性食品の開発の可能性を示唆するものである。

要 約

- (1) 食品添加物として安全でしかも経済的なカゼインナトリウムの使用によって、卵黄の中に存在する免疫グロブリン蛋白質IgYを分離できた。
- (2) リポ蛋白質を凝集沈澱させる要因としてpH、およびカゼインナトリウムの濃度が重要であった。
- (3) 上記のようにして得られた卵黄水溶性蛋白質画分を精製した結果、ニワトリ血清IgGと同一のものが分離できた。
- (4) 大腸菌 *E. coli* K-88 を抗原にしてニワトリに免疫注射を行ったところ、5週目頃から凝集抗体価はピークに達し、*E. coli* K-88 のLPSに対して免疫グロブリン蛋白質のIgYは高い感受性を示した。
- (5) *in vitro* における試験においても *E. coli* K-88 の増殖はIgYの存在によって抑制された。

文 献

- 1) WILLIAMS, J.: *Biochim. J.*, **83**, 346 (1962).
- 2) POLSON, A., WECHMAR, M.B. Von and FAZAKERLY, G.: *Immunol. Commun.*, **9**, 495 (1980).
- 3) MCBEE, L.F. and COTTERILL O.J.: *J. Food Sci.*, **44**, 656 (1979).
- 4) BADE, H. and STEGEMANN, H.: *J. Immunol. Methods.*, **72**, 421 (1984).
- 5) POLSON, A. and WECHMAR, M.B. Von: *Immunol. Commun.*, **9**, 475 (1980).
- 6) JENSENIUS, J.C., ANDERSON, I., HAU, J., CRONE, M. and KOCH C.: *J. Immunol. Methods.*, **46**, 63 (1981).
- 7) HATTA, H., KIM, M. and YAMAMOTO, T.: *Biol. Chem.*, **54**, 10 (1990).
- 8) LAEMMLI, U.K.: *Nature* **227**, 680 (1970).
- 9) AL-HENDY, A., TOIVANEN, P. and SKURNIK, M.: *Microbiol. Immunol.* **35**, 331 (1991).
- 10) HATTA, H., SIM, J.S. and NAKAI, S.: *J. Food Sci.*, **53**, 425 (1988).

(平成6年2月16日受理)