

令和元年6月24日現在

機関番号：34305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12712

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎予防卵の調製とその機能性評価

研究課題名(英文)Preparation of IgY antibody for prevention of atopic dermatitis.

研究代表者

八田 一(Hatta, Hajime)

京都女子大学・家政学部・教授

研究者番号：00309056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌はアトピー性皮膚炎の一因である。産卵鶏をS.aureus菌体抗原で過免疫し、その鶏卵卵黄から抗S.aureus(SA)IgY抗体を精製した。そして、抗SA IgY抗体のSA菌に対する生育抑制効果を検討した。Control IgYまたは抗SA IgYを濃度0-10mg/mlに調整し、SA菌液を容積比1:1で37°Cで0,4,6,8,12,24時間培養し、SA菌の増殖経過を観察した。Control Igと比較し、抗SA IgYはSA菌増殖の誘導期を遅延させる生育抑制効果を有することが分かった。その生育抑制効果は抗SA IgY濃度10mg/mlで約4時間であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー体質の皮膚常在細菌は表皮ブドウ球菌(SE)より黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus: SA)が優勢であり、それが産生する毒素が皮膚の炎症を誘発する。本研究では産卵鶏をSA菌体抗原で過免疫し、その鶏卵卵黄から精製した抗SA IgY抗体(濃度10mg/ml)がSA菌の増殖誘導期を約4時間遅延させることを示した。このことから、さらに研究が必要であるが、抗SA IgY抗体を配合したクリームを皮膚に4時間毎に塗布することで、SA菌の増殖を抑制しアトピー性皮膚炎の予防に利用できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：S. aureus (SA) has been considered one of causative bacteria of atopic dermatitis. The purpose of this study is to evaluate the growth inhibitory effect of anti-SA IgY against S. aureus. This study might lead to a novel application of an anti-SA IgY for prevention of atopic dermatitis using a skin care cream containing an anti-SA IgY antibody. Control IgY or anti-SA IgY was adjusted to a concentration of 0-10 mg/ml, and each was mixed with SA solution at a volume ratio of 1: 1. Bacterial growth was monitored by absorbance at 600 nm or by ATP chemiluminescence assay at 0, 4, 6, 8, 12 and 24 hours incubation at 37 ° C. It was found that the growth inhibitory effect of anti-SA IgY showed delaying the lag phase of SA growth curve for 4 hours compared to that of Control IgY. Four hours of bacteriostatic on SA growth could be a prevention measure against atopic dermatitis in using a skin care cream containing an anti-SA IgY antibody.

研究分野：食品科学

キーワード：IgY 黄色ぶどう球菌 アトピー性皮膚炎 増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

(1) アトピー性皮膚炎は、アレルギー(アトピー)体質の人に生じる痒い炎症性の湿疹で、掻くと炎症がひどくなり慢性化し易く、治りにくい皮膚疾患である。従来は乳幼児期特有の病気で20歳までにほとんど完治した。近年、若者の生活環境や生活習慣などの変化により、20歳以下の約10%がアトピー性皮膚炎であると推測されている。そして患者数は毎年増加し、現在約40万人にも達している。アトピー体質は皮膚表面のバリアー機能が弱く、表皮細菌やダニ、ハウスダストなどのアレルゲン(抗原)が表皮から侵入し、皮膚局所で炎症が起こりやすい。炎症の原因となるアレルゲンは多く存在するが、特にアトピー体質の皮膚常在細菌は表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*: SE菌)より黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus Aureus*: SA菌)が優勢であり、それが産生する毒素などが炎症の増悪因子となる(Lacour M and Corad H: Cline. Rev. in Allergy, 11, 491, 1993)。

(2) 抗体は免疫反応の中心的な役割を担う Immunogloblins (Igs) と呼ばれる一群の糖タンパク質で、魚類以上の動物の体液(血液・唾液・鼻腔液・乳汁等)および卵中に存在する。動物は体内に侵入してきた細菌・ウイルス・異種タンパク質等の非自己物質(抗原)に反応して、それらと結合する免疫タンパク質(特異的抗体)を血液中に産生する。特異的抗体は対応する抗原に対して特異的に結合し、抗原の感染力や毒性を消去して生体を防御する役割を有する。

通常、特異的抗体の産生は、マウス・ウサギ・モルモットなどの哺乳動物に抗原を注射(免疫)し、その血液から IgG 抗体として得られる。こうして調製された IgG 抗体は、臨床検査薬や研究用試薬として抗原物質の検出や定量に応用されている。一方、鳥類は子孫に獲得免疫を与えるために、血液中の IgG 抗体を卵黄へ移行して蓄積する。卵黄中の抗体は、哺乳類の血液中に存在する IgG 抗体に相当するもので、卵黄抗体(IgY)と呼ばれている。

(3) 免疫動物として哺乳動物の代わりに産卵鶏を用いて、鶏卵から特異的抗体 IgY を調製することは可能である。従来の哺乳動物を免疫動物として用いる手法と比較すると、比較的安価で大量の抗体を得られ、免疫動物の命を奪う採血の必要がない、といった利点が挙げられる。また、鳥類の母子免疫の過程で IgY が選択的に卵黄中に移行するため抗体精製が容易である。これらの点から、卵黄抗体(IgY)が特異的抗体を調製する方法として注目されている。近年、特異的抗体の利用法として、食品である鶏卵を用いて感染症の病原菌に対する IgY 抗体を経口投与し、口腔内あるいは消化管内の病原体付着感染を予防あるいは抑制する経口受動免疫への応用が実用化されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、アトピー性皮膚炎の原因因子として *S. aureus* に着目し、まずは現状調査を目的として、*S. aureus* が皮膚や鼻腔からどの程度検出されるのかアトピー体質の学生を含むボランティア5名の協力を得て調べた。

(2) 次に、*S. aureus* に対する高力価特異的 IgY 抗体の大量調製を目的として、産卵率を落とさずに鶏を過免疫(慢性炎症)状態にする免疫注射方法を検討した。すなわち、菌体抗原単独の免疫注射法と菌体抗原にアジュバンドを併用した免疫注射法を比較した。なお、アジュバンドとしては、フロイトの完全アジュバンド(FCA)、不完全アジュバンド(FIA)および起炎剤として知られるカラギナン(食品用増粘多糖類)を検討した。

(3) 抗 *S. aureus* 卵黄抗体(IgY)の特異性や抗菌性を調べることを目的とし、過免疫状態の産卵鶏が卵黄に移行した IgY を精製し、皮膚常在細菌の *S. epidermidis* やアトピー性皮膚炎の原因因子 *S. aureus* に対する抗菌効果を評価した。

(4) すなわち本研究は、*S. aureus* 菌(抗原)とカラギナン(起炎剤)を産卵鶏に筋肉注射して、慢性炎症(過免疫)状態とし、その鶏卵卵黄中に抗 *S. aureus* IgY 抗体を移行蓄積させる。そして、その卵黄 IgY を精製し、その特異性や抗菌性を調べ、アトピー性皮膚炎予防効果を有する卵黄抗体(IgY)配合保湿クリームの製剤化可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 人の皮膚・鼻腔内にはどのような常在菌がいるのかを検出することを目的とし、その予備試験として、女子大学生5名のボランティア(内2名はアトピー体質)を対象に皮膚・鼻腔内に存在する細菌を採取した。なお、5名の対象者には、実験方法・目的を伝え、同意書で承諾を得た。皮膚上の細菌は、手首から肘までの全面を滅菌生理食塩水に浸けた滅菌脱脂綿を用いて、10秒程度こすり、皮膚の常在細菌を採取した。鼻腔内の細菌は、出来る限り鼻腔内の奥ま

で滅菌生理食塩水に浸けた滅菌綿棒を入れ、10秒程度こすり、鼻腔内の常在細菌を採取した。それぞれ採取した細菌は10mlの滅菌生食水とよく混和しできる限り細菌を回収した。各試料を滅菌生理食塩水で適宜希釈し、その1mlを標準寒天培地で混釈し、さらに同培地を重層後、37°Cで4日間培養し、コロニー数を測定した。また、得られた代表的なコロニーを分離し、コロニー形状、グラム染色・カタラーゼ試験・16-S r DNAをPCR法で増幅し、その塩基配列から菌種の同定を行った。

(2) 抗原として黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) のホルマリン不活性化死菌(4.2×10^9 /ml)を用い、産卵鶏15羽(276日齢のポリスブラウン種、各群3羽ずつ)の内、1群コントロール(免疫注射なし)を除く2-4群の12羽に、右翼下筋の4カ所へ、隔週間隔で合計4回の免疫注射を行った。なお、抗原液0.5mlに対して、2群は生食混合、3群はFIAと乳化、4群はFCA(初回)+FIA、5群は2% λ -カラギナン液を等量混合し、その1mlを1羽あたりの免疫注射に用いた。初回免疫から12週までの卵黄試料について、ELISA法で特異的抗体価の変動を測定した。次いで、抗体価の上昇した卵黄から λ -カラギナン法でIgY抗体を精製した。

(3) λ -カラギナン法で精製したControl IgYまたは抗*S. aureus* IgYを濃度0-10mg/mlに調整し、各IgY液と*S. aureus*菌液を容積比1:1で培養した。37°Cで0, 4, 6, 8, 12, 24時間ごとにコロニーの大きさ、波長600nmにおける吸光度、ケミルミネッセンス法によるATPアクセシビリティで経過を観察した。また、試料IgYの表皮ブドウ球菌に対する生育抑制効果、HPLCゲル濾過分析IgY定量法でIgYタンパク質中の*S. aureus*に特異的に結合するIgY量を測定した。

4. 研究成果

(1) 女子大学生5名のボランティア(内2名はアトピー体質)を対象に皮膚・鼻腔に存在する細菌を採取し、コロニー数を測定した結果、皮膚(手首から肘までの全面)は32~75cfu、鼻腔内は980~12,300cfuであった。皮膚および鼻腔内ともに、アトピー体質の2名の菌数が顕著に多かった。また、それぞれの代表的なコロニーを分離して同定した結果、皮膚からは1株、鼻腔からは2株の球状コロニーでグラム染色陽性、カタラーゼ試験陽性の*S. aureus*の特徴を示す細菌が分離され、16-S r DNA塩基配列結果からも99-100%一致で*S. aureus*として同定された。今回、5名中の2名(アトピー体質)の皮膚および鼻腔から*S. aureus*が分離検出されたことから、アトピー体質と*S. aureus*保菌の関係が強く示唆された。

(2) 菌体抗原のみの免疫(2群)では、卵黄中の*S. aureus*菌に対する特異的抗体価(ELISA値)の上昇がほとんどなく、アジュバンドを併用した菌体抗原(3-5群)では、2回目の免疫注射後に特異的抗体価(ELISA値)が上昇した。そして3回目の免疫後に抗体価は顕著に上昇し、それぞれの群で6-8週目にELISA値が最大となった。抗体価はその後、緩やかに下降した。アジュバンドの効果としては、3群FIA抗原で最も高力価のIgY抗体が得られたが、4群FCA(2回目からFIA)や5群の λ -カラギナン抗原でも顕著な抗体価上昇が見られた。しかし、3群FIAと4群FCA(2回目からFIA)は産卵率が顕著に低下し、1群の無免疫の3羽平均産卵率(8週間)97.6%に対して、3群FIAが78.5%、4群FCA79.8%と低下したが、5群の λ -カラギナンは86.7%と2群の生食の86.3%と大差なかった。なお、菌体抗原と λ -カラギナンの混合液の粘度は低く、免疫鶏の鶏卵卵黄に高力価抗体が産生されたことから、大量の産卵鶏への連続免疫注射が可能であると示された。以上の結果より、免疫動物として産卵鶏を用い、黄色ブドウ球菌に対する高力価IgY抗体を鶏卵卵黄中に調製すること、また大量の産卵鶏にも免疫可能な水溶性アジュバンドとしてカラギナン利用の検討ができたと言える。

(3) 最も抗体価が上昇した3群FIA併用菌体抗原免疫鶏の6週目の鶏卵卵黄を用いて、 λ -カラギナン法によるIgY精製を行った。その結果、卵黄100gから純度99.8%の抗*S. aureus* IgY抗体を461mgを精製し、IgYの回収率は46.1%であった。また、HPLCゲル濾過分析で、精製IgYタンパク質中の*S. aureus*に結合する特異的IgY抗体量を測定した結果、プリクロナルIgY抗体中の18.1%のIgYが*S. aureus*特異的なのに対して、表皮ブドウ球菌に結合するIgY抗体は9.4%と、その特異的抗体量は約2倍多かった。また、Control IgY存在下の*S. aureus*の増殖に対して、抗*S. aureus* IgY存在下では、*S. aureus*菌増殖曲線の誘導期を遅延させる生育抑制効果を有することが分かった。その生育抑制効果は抗*S. aureus* IgY濃度10mg/mlで約4時間であったが、表皮ブドウ球菌の増殖には遅延効果がなかった。このことから、さらに研究が必要であるが、抗*S. aureus* IgY抗体を配合したクリームを皮膚に4時間毎に塗布することで、SA菌の増殖を抑制しアトピー性皮膚炎の予防に利用できる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

特になし

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

1) 15th European Poultry Conference (Dubrovnik 2018)(国際学会) でポスター発表

発表標題: Application of IgY antibody for prevention of atopic dermatitis(Suppression effect of anti-S. aureusureus IgY on S. aureusureus growth)

発表者: Hajime HATTA¹, Hiromi YOSHIKA¹, and Mayuko OKA²

1 Kyoto Women's University, Kyoto, Japan, 2 Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況（計 0 件）

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。