

## 分子牧場之應用與開發 I

# 以母雞為生物工廠生產 抗腸病毒71型IgY抗體

撰文/劉瑞珍、劉振發、張致維、黎煥耀、戴謙、陳立人

### 一、前言

腸病毒是一群為數約共有六十餘種病毒的總稱，而腸病毒 71 型是當中毒性最強的一種，其致病力特別高，尤其好發神經系統的併發症。這種病毒是 1969 年至 1973 年在美國加州的一次大流行時首先被分離出來，當時就發現有很多病毒性腦膜炎與腦炎的病例。目前侵害人體的 60 幾種腸病毒中，除了小兒麻痺病毒以外，其餘多沒有疫苗可以預防。1998 年腸病毒 71 型在台灣引起大流行，造成 78 名兒童死亡，該疾病因會引起腦炎、腦膜炎與類似小兒麻痺之症狀等併發症而受到重視。1998 年之後台灣雖沒有再度大規模流行的現象，但每年仍有零星感染發病的案例。由於其高致病力與不可復的神經系統損害，因此針對腸病毒 71 型高度的預防及治療是刻不容緩的。惟目前包括一些治療藥物或疫苗仍處研發階段 (Lin *et al.*, 2002)。

在多數利用禽蛋針對病原微生物生產抗體的研究，皆可獲得具有特異性的抗體並可減輕病原之影響。近幾年亦有不少研究開始針對感染人類病原菌的 IgY 之生產與應用，例如同樣在家畜亦會感染而產生中毒性休克症候群 (lethal toxic shock syndrome) 的葡萄球菌 (*Staphylococcus*) (LeClaire *et al.*, 2002)、對 4 個月到 2 歲小孩造成下痢的輪狀病

毒 (*Rotavirus*) (Sarker *et al.*, 2001)，均直接以人體食用的實驗證明有效性。此外，研究證實 IgY 甚至也能抑制蛀牙細菌而對人類的牙齒產生保護 (Hatta *et al.*, 1997)。對於導致人類胃潰瘍的主要元兇之幽門氏菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)，有研究發現 anti-Hp IgY 可以有效中和 Hp 而減輕胃痛的效果 (Shin *et al.*, 2002; 2003)。台灣每年都會出現腸病毒感染的案例，而 4~6 月則是腸病毒感染的高峰期，其中腸病毒 71 型對 6 歲以下嬰幼兒感染力強且容易引起嚴重的併發症。因此，畜產試驗所與成功大學醫學院合作，利用禽蛋生產對抗腸病毒之免疫球蛋白 (IgY)，並探討其應用於預防及治療之效果。

### 二、家禽雞蛋免疫球蛋白 (IgY) 簡介

#### (一) IgY 的來源

雞蛋中的免疫球蛋白包含有 IgA、IgM 及 IgY 三種，它的來源是在產卵過程中由母雞的血液中轉移而來，IgA、IgM 會存在蛋白中，而 IgY 則會移行到蛋黃 (yolk) 部分。以雞蛋為例，蛋黃佔整顆雞蛋重量約 31%，其主要的組成份為水分 (51%)、蛋白質 (16%) 與脂質和其他次要組成物則佔 30.5%。蛋黃中的蛋白質主要分佈在卵黃顆粒 (yolk granule) 和卵黃漿 (yolk plasma)。在卵黃顆粒中的蛋白質包含卵黃磷醣蛋白 (phosvitin)、

脂卵磷蛋白 (lipovitellins) 和低密度脂蛋白 (low-density lipoproteins)；而存在於卵黃漿中的蛋白質則包含  $\alpha$ -、 $\beta$ - 與  $\gamma$ - 卵黃球蛋白 (livetin) 等三種水溶性脂蛋白，其中  $\gamma$ -livetin 經分析後發現是一種類似哺乳動物的 IgG 之免疫球蛋白 (Polson *et al.*, 1980)，因為從蛋黃 (yolk) 中發現，因而目前多被稱為 IgY。

蛋黃中的 IgY 和哺乳動物血液中 IgG 的來源和免疫功能相似。IgY 是從鳥類 (包括家禽) 血液中的 IgG 運輸到蛋中並累積在蛋黃部分，這個過程作用就如同在哺乳動物上胎盤的 IgG 轉移目的一樣，主要為由母親透過胎盤提供胎兒被動免疫，使其有基本的病菌防衛系統 (Klemperer, 1893)。因此，如同目前生產抗體的實驗動物一樣，當給予家禽特定抗原感染時，可產生特異性抗體儲存於蛋黃中 (Leslie *et al.*, 1969)。

## (二) IgY和IgG的異同

蛋黃中的免疫球蛋白 IgY 和哺乳動物血液中 IgG 的一般結構相同，都含有 2 條重鏈 (heavy chain) 和 2 條輕鏈 (light chain)，主要不同處在於兩個部分：

### 1. 分子量

IgY 的輕鏈為 21 kDa  $\times$  2，重鏈為 70 kDa  $\times$  2，

整體分子量為 180 kDa，IgG 的輕鏈為 22 kDa  $\times$  2，重鏈為 50 kDa  $\times$  2，整體分子量為 150 kDa。如圖一所示，兩者差別在於重鏈的部分，一般 IgG 的重鏈中間有免疫球蛋白關節 (hinge region)，此部分為使其重鏈成為具有彈性的結構，然而 IgY 缺少此部分而另有潛在轉換區域 (potential switch region)，且在重鏈尾端又多接了 C<sub>v4</sub> 的基因區，使其分子量大於 IgG 的重鏈 (Warr *et al.*, 1995; Narat, 2003; Zhang, 2003)。

### 2. 生化彈性和疏水性

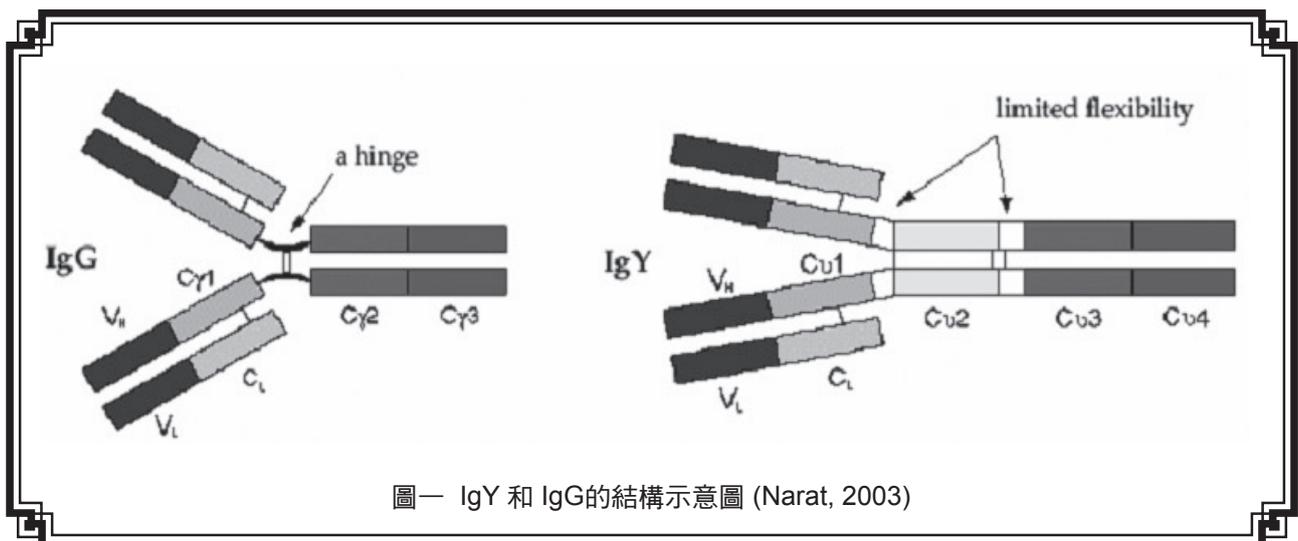
IgY 缺少免疫球蛋白關節，因此在生化彈性 (flexibility) 上不如 IgG (Warr *et al.*, 1995)。此外，存在於蛋黃內的 IgY 其等電點為 pH 5.7-7.6，因此對比於血液中的 IgG 而言，IgY 擁有較佳的疏水性 (Davalos *et al.*, 2000)。

### 3. pH及溫度耐受範圍

IgG 在生物酸鹼性 pH 3-10 及 70°C 以下呈現穩定狀態 (Shimizu *et al.*, 1992)，IgY 的穩定範圍在 pH 4-9 及 65°C 以下，但是 IgY 可以在 4°C 下維持長時間穩定性 (Jensenius *et al.*, 1981)，而這個特性是 IgG 所沒有的。

### 4. 酵素分解性

IgY 對比 IgG 來說，對胰蛋白酵素 (trypsin) 和



圖一 IgY 和 IgG 的結構示意圖 (Narat, 2003)

胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) 有更大耐受性不被分解，但對於胃液的消化分解 (peptic digestion) 則比 IgG 更敏感 (Otani *et al.*, 1991)。

### (三) IgY作為抗體來源的優點

#### 1. 免疫分析應用之優勢

IgY 不同於 IgG，不會和哺乳動物細胞或細菌表面的 Fc 受體結合，主要原因在於其 Fc 片段的不同 (Kronvall, 1974; Schmidt *et al.*, 1993)。IgG 會和類風濕因子 (rheumatoid factor, RF, 對人體 IgG 的 Fc 部分產生的自體抗體) 結合，但 IgY 不會。RF 是一種在發生自體免疫的病患血液中可測得之抗體 (anti-immunoglobulin autoantibody)，但在正常人中一般不存在。通常在風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis) 病人血中發現 RF 會和 IgG 結合 (cross-reactivity)，因此 RF 可做為該疾病的檢測試劑。但也因為 IgG 的此項特性，因此在免疫分析時，有很大機率會產生偽陽性 (false positive) 現象，IgY 則可以克服這項困難 (Larsson *et al.*, 1991; Davalos-Pantoja *et al.*, 2000)。此外 IgY 不會活化免疫系統的補體反應 (Larsson *et al.*, 1992)，也不會和哺乳類的抗體有交互反應，因此在哺乳動物血清樣品的免疫檢測上可大大降低似 IgG 的偽陽性結果所造成的干擾。

#### 2. 對抗哺乳類抗原的免疫反應高

家禽和人類的演化距離 (phylogenetic distance) 比其他哺乳類實驗動物 (如老鼠、兔子) 差距較遠，可以避開人類和其他哺乳動物的同源性蛋白質 (conserved protein) 等之免疫反應誘起性差的問題。因此以哺乳類抗原免疫家禽後，其生產特定抗疾病的抗體時免疫反應較強，更容易生產相對其抗原具高度專一性的抗體 (Gassmann *et al.*, 1990)。

#### 3. 非侵入性抗體生產方式

目前欲由動物獲得特定抗體來源時，須先免疫實驗鼠或兔子，再以抽血方式獲得其血清以分離抗體。這種侵入性的抗體生產方式，對於動物

容易造成痛苦、緊迫或甚至死亡。然而，IgY 的取得只需於免疫家禽後，每天收取雞蛋，再從蛋黃中分離出抗體即可。另外，相對於哺乳動物血液中有 5 種抗體 (IgA、IgM、IgE、IgG、IgD)，蛋黃中只含有 IgY 一種，在抗體分離上較為簡單。又因為蛋長期為人類的主要食品，其蛋黃成分純化方法已被研究多年，有多種 IgY 純化方法可供參考。

#### 4. 抗體產量佳

兔子是常用來生產抗體的實驗動物，通常約兩星期抽取血液一次，能抽取的量約為 40 ml，從中平均可分離得到的總 IgG 為 200 mg。而每顆雞蛋含有 100-200 mg 總 IgY，一隻母雞年產 250-300 個蛋。以每年每隻動物所能生產的抗體量計算，兔子的 IgG 年產量約為 5200 mg，其中只有 5% (260 mg) 為具有抗原專一性的抗體 (Gottstein *et al.*, 1985)；而雞的總 IgY 年產量則可高達 40,000 mg，且家禽的專一性抗體含量介於 2%-10% 間 (Schade *et al.*, 1994)，因此從雞蛋中一年可獲得抗原專一性抗體約為 800-4000 mg。因此，在考量抗原專一性抗體的產量上，利用 IgY 作為生產針對特定抗原的專一性抗體是更好的選擇，也由於這項特性使 IgY 在醫療和基礎研究上具有更廣大的應用潛力。

#### 5. 整體生產成本低

家禽的飼養成本比兔子、小鼠等其他哺乳類實驗動物低，此外在抗體獲得方式和產量的差異，使 IgY 可取代傳統 IgG，成為新一代抗體主要來源。綜合以上比較分析，利用 IgY 作為特定抗體來源是更好的選擇。

### 三、利用母雞生產抗腸病毒71型IgY

由於對於禽類給予特定抗原的刺激時，可誘發產生特異性抗體儲存於蛋黃中 (Leslie *et al.*, 1969)，因此利用 71 型腸病毒不活化之抗原，以來亨雞母雞進行雞胸內的免疫注射，可用來生產抗腸病毒 71 型 IgY (如圖二)。自免疫後第二

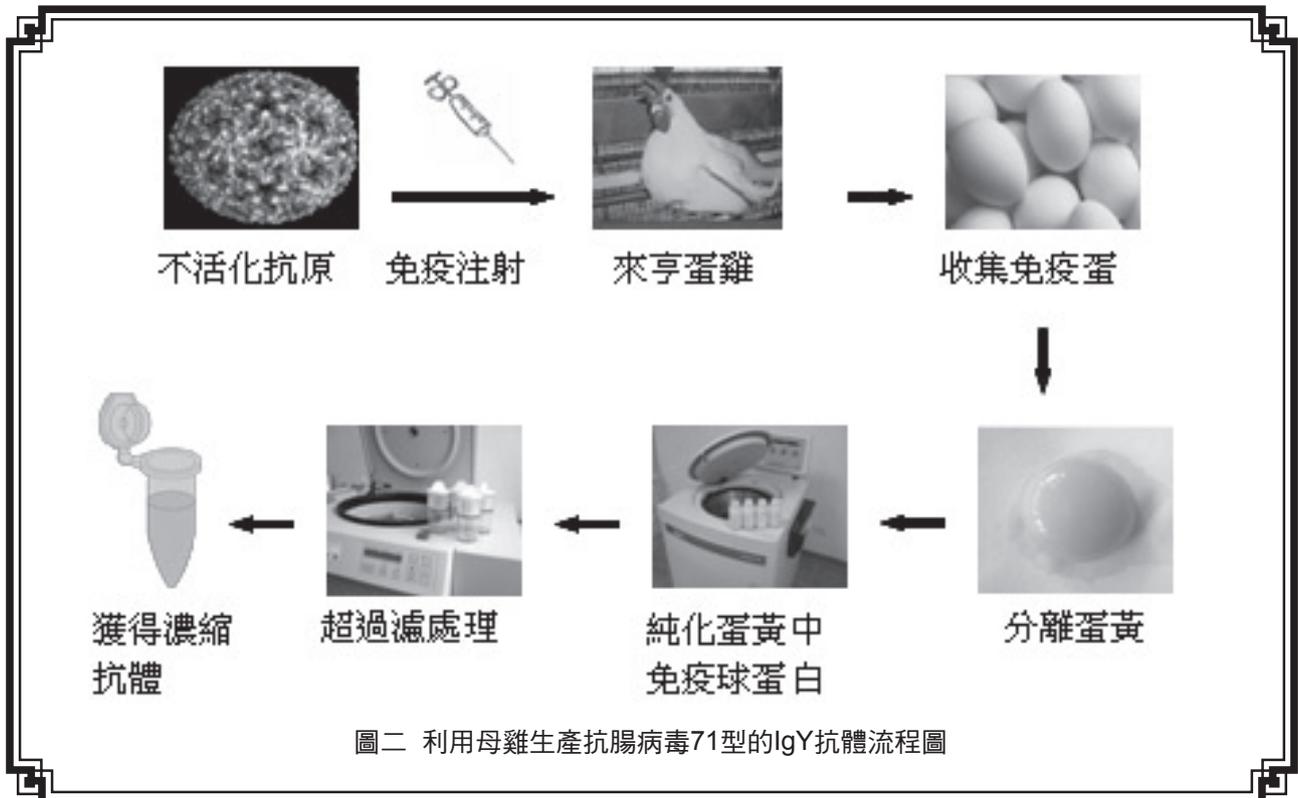
天起收集每隻母雞所產的蛋，每週將同一隻雞的蛋黃混合後萃取 IgY 並經簡易純化方法 (Akita and Nakai, 1992)，針對水溶性含 IgY 部分 (water soluble fraction, WSF)，以酵素免疫反應 (ELISA) 測定抗腸病毒 71 型 IgY 之濃度。結果顯示，IgY 中抗腸病毒之抗體力價在第 3 週後逐漸升高。免疫處理後 3-18 週每個蛋平均特異性抗體為 6-7mg，大約佔總抗體含量的 3-4%。

之後以人類橫紋肌瘤細胞 (rhabdomyosarcoma cell line, RD) 進行抗腸病毒 71 型抗體對於腸病毒 71 型病毒之中和測試 (virus neutralization test)。先以 100 TCID<sub>50</sub> 的腸病毒 71 型感染 RD 細胞，觀察有加入特異性 IgY 和對照組細胞有無產生細胞病變效應現象 (cytopathic effects, CPE)。結果顯示含特異性抗體之 IgY，具有保護人類細胞不被 71 型腸病毒感染的作用 (圖三)。

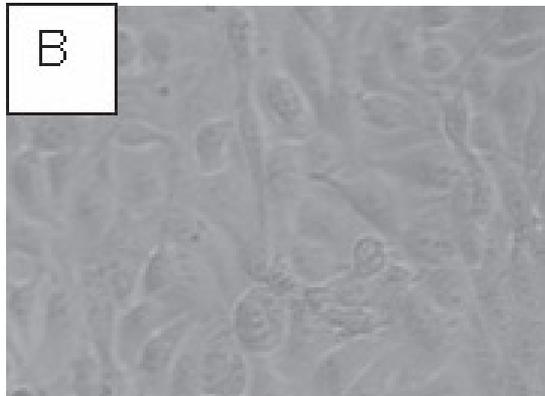
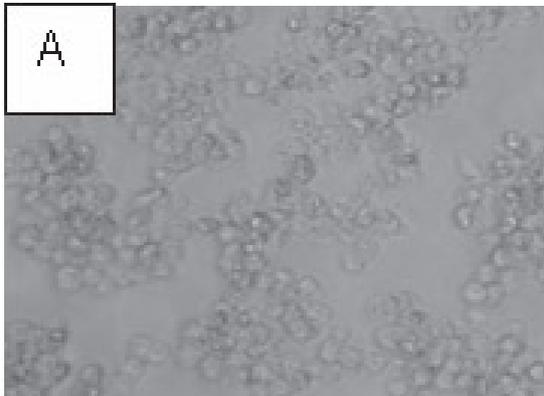
小鼠以腸病毒 71 型的病毒使用 10<sup>5</sup> PFU (溶菌斑形成單位) 攻毒劑量予以腹腔注射感染時，發

病率為 85-100%，其發病徵候為後肢麻痺增重緩慢 (如圖四)。而在攻毒後給予 IgY 腹腔注射處理的小鼠，則隨著給予 IgY 之力價不同 (64-512) 有不同的治療效果，力價愈高則治癒率愈高，當力價 512 以上則 100% 有效，發病率降為 0。而腹腔注射 IgY 的日期亦有影響，顯示在腹腔注射攻毒後 1-3 天進行 IgY 腹腔注射可以完全抑制病毒之侵襲，若延長至 2-4 天或 3-5 天則存活率分別降為 79% 及 37%，而對照組則在 10<sup>5</sup> PFU 之腹腔注射攻毒下，其平均存活率低於 20% (圖五)。

若病毒感染的方式改用口服給予，IgY 之給予亦改口服餵飼時，可發現若在小鼠 4-5 日齡時給予腸病毒 71 型病毒 (3×10<sup>6</sup> PFU)，則不論是先餵飼 IgY 再餵病毒或先餵病毒再餵 IgY，和對照組相比其存活率皆明顯提升，使存活率由 38% 及 27% 提升為 80% 及 69% (如圖六)。由上述結果顯示，利用母雞為生物工廠來生產抗腸病毒 71 型 IgY 是一種可行的方式，且所生產的 IgY 可以有效地抑制

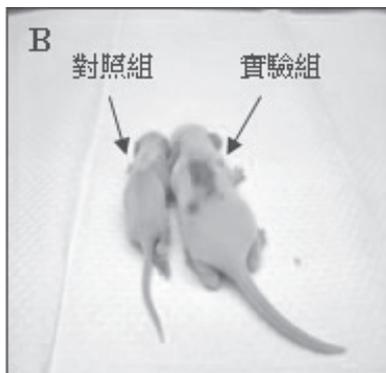
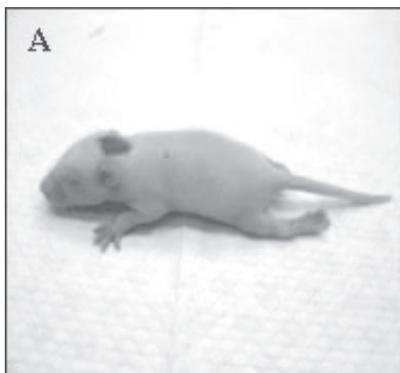


圖二 利用母雞生產抗腸病毒71型的IgY抗體流程圖



A 圖：細胞培養基中沒有加入抗 71 型腸病毒的 IgY(細胞有 CPE 的現象)。  
B 圖：細胞培養基中加入抗 71 型腸病毒的 IgY(細胞正常生長)。

圖三 病毒中和測試



A 圖：發病小鼠後肢麻痺  
B 圖：發病小鼠增重緩慢(出生後第 9 天)

圖四 初生小鼠攻毒後(感染腸病毒 71 型)發病情形

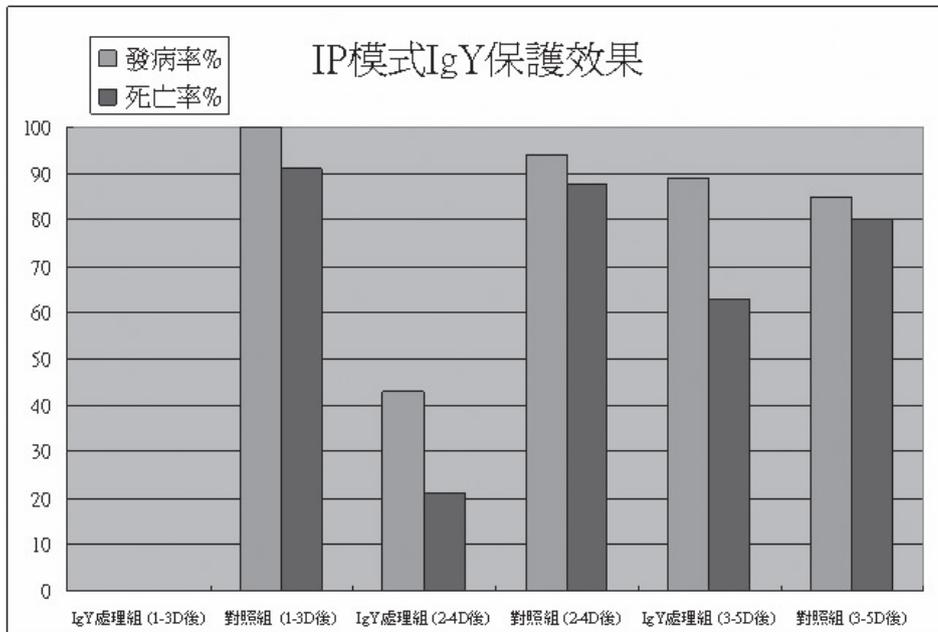
腸病毒 71 型之感染。

#### 四、結語

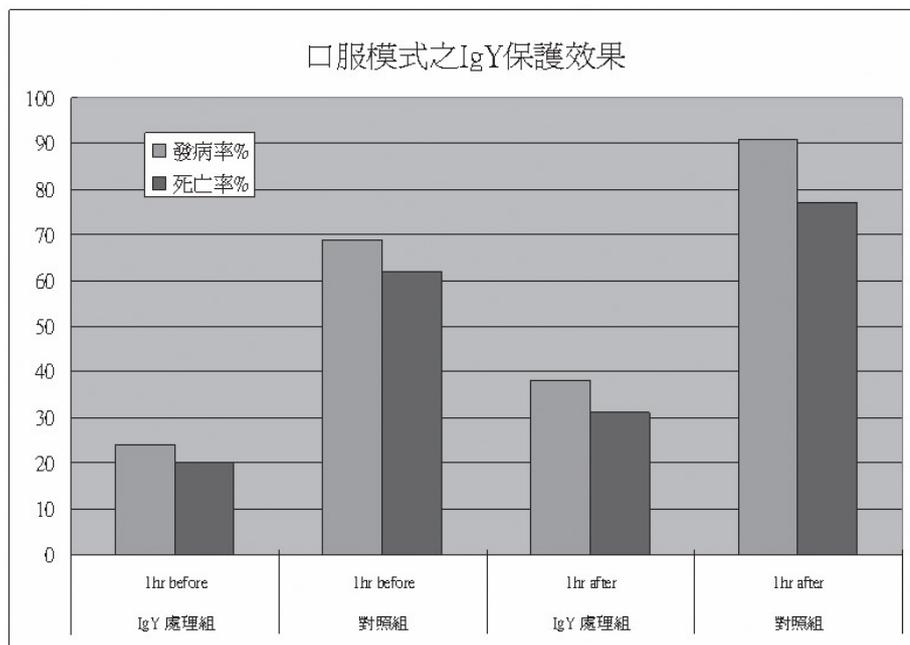
近年來抗體被廣泛應用於被動免疫治療，利用其和抗原專一性螯合(chelating)方式去結合專一的病原菌，阻止其和宿主細胞接觸進而發生感染。這種方式不會誘發病原突變而產生抗藥性，抗體也不會攻擊宿主體內其他細胞或細菌造成傷害。因此，可預期抗體將逐漸取代抗生素成爲主

流的治療方式之一(Calander *et al.*, 2000)。

抗體除可利用基因轉殖方式生產治療疾病用抗體外，另外也能利用傳統免疫方法來生產。動物分子牧場之應用與開發爲生物技術發展領域中的重要項目之一。目前動物分子牧場開發過程中較常被選用作爲生物工廠的動物包括：牛、羊、豬、雞等家畜禽。而利用母雞爲生物工廠相對的較牛、羊、豬等具有成本低及產製效率高等優勢，惟家禽基因轉殖技術之研發則是落後於牛、



圖五 IP 注射含有抗腸病毒 71 型抗體之 IgY 的療效測試 (抗體力價為 512)，分別在攻毒後 1-3 天、2-4 天、3-5 天給予抗體。



圖六 口服含有抗腸病毒 71 型抗體之 IgY 的療效測試 (攻毒前 1 小時及後 1 小時餵食抗體) (抗體力價為 512)。

羊、豬。然而，利用傳統的免疫方式生產抗體已行之有年，在技術層面上比利用基因轉殖技術的方式更為簡便且容易執行。故利用傳統的免疫方式以特定抗原免疫母雞，來生產特定的 IgY 抗體，在現階段而言乃是種不涉及基因改造議題，可以

逕行開發且具有相當潛力的分子牧場發展項目。

AgBIO

劉瑞珍	行政院農委會畜產試驗所	副研究員(已退休)
劉振發	行政院農委會畜產試驗所	助理研究員
張致維	成功大學	研究生
黎煥耀	成功大學	教授
戴謙	行政院國家科學委員會	副主任委員
陳立人	行政院農委會畜產試驗所	副研究員兼組長

## 參考文獻

1. Akita, E.M and Nakai, S. (1992). Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Science*. 57: 6292.
2. Carlander, D., H. Kollberg, *et al.* (2000). "Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections." *Immunol Res* 21(1): 1-6.
3. Gassmann, M., P. Thommes, *et al.* (1990). "Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein." *Faseb J* 4(8): 2528-32.
4. Gottstein B and Hemmeler E. (1985). Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Z. Parasitenkd.* 71: 273-276.
5. Jensenius, J. C., I. Andersen, *et al.* (1981). "Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG." *J Immunol Methods* 46(1): 63-8.
6. Klempner, F., (1893). XV. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. In: Naunyn, B., Schmiedeberg, O. (Eds.).
7. Kronvall, G., U. S. Seal, *et al.* (1974). "Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive serum globulins in birds and mammals." *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 82(1): 12-8.
8. Larsson, A., A. Karlsson-Parra, *et al.* (1991). "Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors." *Clin Chem* 37(3): 411-4.
9. Larsson, A., P. E. Wejaker, *et al.* (1992). "Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA." *J Immunol Methods* 156(1): 79-83.
10. Leslie, G. A. and L. W. Clem (1969). "Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken." *J Exp Med* 130(6): 1337-52. Lin, Y. C., C. N. Wu, *et al.* (2002). "Characterization of a Vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate." *Vaccine* 20(19-20): 2485-93.
11. LeClaire, R. D., R. E. Hunt, *et al.* (2002). "Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination." *Infect Immun* 70(5): 2278-81.
12. Leslie, G. A. and A. A. Benedict (1969). "Structural and antigenic relationships between avian immunoglobulins. I. The immune responses of pheasants and quail and reductive dissociation of their immunoglobulins." *J Immunol* 103(6): 1356-65.
13. Narat, M. (2003). Production of antibodies in chickens. *Food Technol. Biotechnol.* 41(3): 259-267
14. Otani, H., Matsumoto, K., Saeki, A. and Hosono, A. (1991). Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lebensm. Wiss. Technol.* 24:152
15. Polson, A., M. B. von Wechmar, *et al.* (1980). "Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens." *Immunol Commun* 9(5): 475-93.
16. Sarker, S. A., T. H. Casswall, *et al.* (2001). "Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 32(1): 19-25.
17. Shin, J. H., M. Yang, *et al.* (2002). "Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection." *Clin Diagn Lab Immunol* 9(5): 1061-6.

#### 參考文獻

18. Shimizu, M., H. Nagashima, et al. (1992). "Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G." *Biosci Biotechnol Biochem* 56(2): 270-4.
  19. Shin, J. H., S. W. Nam, et al. (2003). "Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin." *J Med Microbiol* 52(Pt 3): 217-22.
  20. Schmidt, P., M. H. Erhard, et al. (1993). "Chicken egg antibodies for immunohistochemical labeling of growth hormone and prolactin in bovine pituitary gland." *J Histochem Cytochem* 41(9): 1441-6.
  21. Schade, R., W. Burger, et al. (1994). "Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies." *Altex* 11(2): 75-84.
  22. Warr, G. W., K. E. Magor, et al. (1995). "IgY: clues to the origins of modern antibodies." *Immunol Today* 16(8): 392-8.
  23. Zhang, W. W. (2003). "The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery." *Drug Discov Today* 8(8): 364-71.
- Davalos-Pantoja, L., J. L. Ortega-Vinuesa, et al. (2000). "A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles." *J Biomater Sci Polym Ed* 11(6): 657-73.

