

## 第29回麻布環境科学研究会 一般演題8

## *In vivo*におけるウシの免疫初乳抗体による 腸管出血性大腸菌 O157:H7 由来 ベロ毒素の中和に関する研究

清田 哲郎<sup>1</sup>, 川口優紀子<sup>1</sup>, 栗林 尚志<sup>1</sup>, 福山 正文<sup>2</sup>, 山本 静雄<sup>1</sup>

麻布大学 生命・環境科学部 <sup>1</sup>免疫学研究室, <sup>2</sup>微生物学研究室

### 1. はじめに

1982年に重篤な出血性大腸炎を起こす *Escherichia coli* O157:H7 (以下, O157) の感染症例がアメリカ合衆国で初めて報告され, わが国では, 1985年に本菌感染者が初めて確認された。その後, わが国においては, 1996年に18,000名近い本菌感染者が発生し, 12名が死亡した。わが国では, 昨年にも3,000数百名の本菌感染症例が発生しており, 現在でも軽視できない新興感染症である。本菌感染症では抗生物質による積極的な治療を行うと殺菌されたO157から放出されるベロ毒素 (Verotoxin: VT) が溶血性尿毒症症候群や脳症などの合併症を引き起こす恐れがあるため, 抗生物質による積極的な治療が躊躇されるという問題がある。

我々は, 既にO157由来のVTに対するウシの免疫初乳抗体 (免疫初乳抗体) がVTを投与あるいはO157を接種したマウスにおいてVTに対して強い中和作用を示し, マウスの生存率を著しく高めることを報告した。

本研究では, 免疫初乳抗体の *in vivo* での蛋白質分解酵素に対する抵抗性を検討する目的で, 免疫初乳抗体及びウシとウサギで作製した免疫血清抗体をそれぞれビーグル犬へ経口投与した後に, 経時的に採取した小腸内容液に含まれる抗体のVT2に対する活性を測定した。さらに, 免疫初乳抗体から分離した免疫グロブリン (Ig) の各クラス (IgG, IgM, S-IgA) を致死量のVT2を経口投与したマウスへ投与し, それらの *in vivo* におけるVT2中和能を検討した。

### 2. 材料と方法:

- 1) 供試菌株: ヒトから分離されたO157のVT2産生株を用いた。この菌株をBrain heart infusion培地を用いて培養し, その培養液をVT2溶液として用いた。
- 2) 免疫初乳抗体とそのIgクラスの濃度測定: 免疫初乳抗体は分娩前の乳牛へVT2を15回免疫して作製し, そのIgクラスの濃度は, 市販のウシ免疫グロブリン濃度測定用のSRIDキットを用いて測定した。
- 3) 免疫初乳抗体からのIgクラスの分離: 免疫初乳抗体 (乳清) からProtein Gカラムを用いてIgG抗体を分離した。さらに, この未吸着分画からSephacryl S-300を用いたゲル濾過法によって, IgM及びS-IgA分画を採取し, この分画から市販の抗ウシIgM ( $\mu$ ) 抗体または抗ウシIgA ( $\alpha$ ) 抗体を吸着させたSepharose 4Bカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー法によってIgMとS-IgA抗体をそれぞれ分離した。
- 4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による抗体活性の測定: ビーグル犬への投与に用いた免疫初乳抗体及びウシの免疫血清抗体とそれらの各Igクラス, ウシとウサギの免疫血清抗体及びビーグル犬の腸管から回収した小腸内容液中の免疫初乳抗体及びウシとウサギの免疫血清抗体の活性はELISAで測定した。

### 5) 動物実験

#### ①抗体の *in vivo* における蛋白質分解酵素に対する抵抗性の確認

VT2に対する免疫初乳抗体及びウシとウサギの免疫血清抗体各50 mlをそれぞれ4頭のビーグル犬の胃内へカテーテルを用いて投与し、1.5～4時間後に麻酔下で安楽死させて抗体を含む小腸内容液を採取した。得られた小腸内容液は、2000×g、20分間で遠心した後、0.20 μmのフィルターを用いて濾過し、測定時まで-80℃で保存した。

#### ②マウスの腸管内における各抗体によるVT2の中和作用の検討

前日の夜から絶食させた95匹のICR系マウス(3週齢)へ致死量のVT2 0.3ml/匹をゾンデを用いて経口投与し、その1時間後に、同様の条件で、対照マウスへ滅菌生理食塩水、抗体投与マウスへ免疫初乳抗体、初乳の各Igクラス及びウシの免疫血清抗体をそれぞれ0.3 ml/匹ずつ経口投与して2週間後まで生死を観察した。

### 3. 結果及び考察:

免疫初乳抗体をビーグル犬へ経口投与して *in vivo* における各Igクラスの活性の推移を調べた結果、投与2時間後にS-IgA抗体は免疫初乳抗体と同じ抗体活性を維持したが、IgGならびにIgM抗体の活性は約半分程度まで低下した。3時間後に、S-IgA、IgG及びIgM抗体の活性はそれぞれ1/2、1/6、1/8まで低

下した。これに対して、ウシ及びウサギの免疫血清抗体の活性は、1.5時間後に1/4～1/10と著しく低下した。これらの結果から、免疫初乳抗体、とくにS-IgA抗体が蛋白質分解酵素に対して強い抵抗性を有していることを初めて *in vivo* で確認することができた。

VT2を投与した対照マウスは96時間以内に全てが死亡したが、免疫初乳抗体を投与したマウスならびに免疫初乳抗体から分離したS-IgA及びIgM抗体を投与したマウスの生存率はいずれも93.3%であった。腸管内でIgM抗体よりも高い活性を維持したIgG抗体を投与したマウスの生存率は80%であったが、生存率が低かった理由は不明である。ウシの免疫血清抗体を投与したマウスの生存率は60%であった。

以上のように、免疫初乳抗体はビーグル犬の腸管内で蛋白質分解酵素に抵抗性を示し、しかも免疫初乳抗体から分離した各Igクラスは、いずれもマウスの腸管内でVT2の毒素活性を中和することが確認された。免疫初乳抗体はVTの毒素活性を中和し腸管障害の発現を防止することのできる有用な抗体であり、受動免疫に利用できると考えられた。

なお、本実験にはVT2に感受性を有する離乳直後(3週齢)の小さなマウスを用いたことから、ゾンデの挿入が原因で死亡するマウスの存在も考慮する必要がある。