

Neutralizing activity of bovine colostrum antibody against verotoxin derived
from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice

2003. 10

15 15 15 15

Neutralizing activity of bovine colostrum antibody against verotoxin derived from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice

2008. 10

栗林 尚志

目 次

目 次	1
要 旨	2
Neutralizing activity of bovine colostrum antibody against verotoxin derived from enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in mice	5
謝 辞	11

要 旨

腸管出血性大腸菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) に起因する食中毒は、1982 年にアメリカ合衆国でハンバーガーによる集団食中毒として初めて報告された(Riley, L.W. *et al.*, N. Engl. J. Med., 308, 681, 1983)。一方、わが国では 1996 年に大阪府堺市の小学校において世界で類を見ないほど大規模な *E. coli* O157:H7 に起因した学校給食による集団食中毒が発生した。その年には、全国で 17,877 名の *E. coli* O157:H7 感染者が発生し、8 名が死亡した。*E. coli* O157:H7 はベロ毒素 (Verotoxin : VT) を産生し、これがヒトの溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症の原因となる。*E. coli* O157:H7 による感染症の治療に抗生物質を用いると殺菌された死菌体から VT が多量に放出され、合併症を惹起させる恐れがあることから抗生物質による積極的な治療が敬遠されている。

そこで、腸管内で VT の中和に用いることを目的に VT を乳牛へ免疫して抗 VT 初乳抗体 (免疫初乳抗体) を作製し、それによる VT の毒素中和作用をマウスで評価したところ、免疫初乳抗体が VT の中和に有効に作用する結果を得た。

本研究の概要は以下の通りである。

供試菌株とベロ毒素

本実験には、動物から分離された VT1 と VT2 の両毒素を産生する *E. coli* O157:H7、ヒトから分離された VT1 あるいは VT2 を産生する *E. coli* O157:H7 の 3 株を用いた。VT1 及び VT2 の量は市販の逆受身ラテックス凝集反応用キット (デンカ生研株式会社) を用いて測定した。

ウシの免疫初乳抗体の作製とその中和抗体価

VT1 と VT2 の両毒素を産生する *E. coli* O157:H7 の培養上清あるいは精製した VT2 の約 300 μ g を分娩 3~4 ヶ月前の乳牛へ 7 日間隔で 12~14 回免疫を行い、免疫初乳抗体を調製した。分娩 1~5 日後までの初乳を採取し、脱脂、脱カゼインを行って免疫初乳抗体を含有している乳清を得た。これをウシの免疫初乳抗体として供試した。免疫初乳抗体の VT に対する中和抗体価は、ベロ細胞を用いた中和試験で測定した。

VT1 と VT2 で免疫したウシの免疫初乳抗体の中和抗体価は、分娩 1 日後に VT1

に対して 1:512、VT2 に対しては 1:256 と最も高く、以後経日的に低下して 5 日後にはそれぞれ 1:8、1:4 となった。また、精製した VT2 で免疫したウシの免疫初乳抗体の中和抗体価は、分娩 1 日後に 1:64 であった。本実験には、分娩 1 日後に採取した最も中和抗体価が高い免疫初乳抗体を用いた。

VT を経口投与したマウスへの免疫初乳抗体の投与及びその効果

動物実験には、VT に感受性を有する離乳直後の ICR 系マウス（雄、3 週齢、日本チャールス・リバー株式会社）を用いた。

最初に、VT を経口投与したマウスへ *in vitro* で VT の中和活性を示す免疫初乳抗体を投与してその効果を検討した。投与実験の 18 時間前から絶食させたマウスへゾンドを用いて 0.5ml/匹の VT1 あるいは VT2 を含有する培養上清（以下、単に VT1、VT2 と略記）を経口投与した後、対照群と免疫初乳抗体の単回投与群では 1 時間後に同量の滅菌生理食塩水あるいは免疫初乳抗体を、免疫初乳抗体の反復投与群では 1、2、3 時間後にいずれも 0.5ml/匹の免疫初乳抗体を経口投与し、その効果をマウスの生存率で評価した。その結果、VT1 投与群の生存率は、対照群が 78.6% (11/14) であったのに対して、免疫初乳抗体の単回投与群が 100% (16/16)、免疫初乳抗体の反復投与群が 90.0% (18/20) であった。他方、VT2 投与群の生存率は、対照群が全例死亡して 0% (0/17) であったのに対して、免疫初乳抗体の単回投与群が 75.0% (9/12)、免疫初乳抗体の反復投与群が 100% (14/14) であった。

マウスへ VT1 あるいは VT2 を投与した後に、これらに対する免疫初乳抗体を投与することによってマウスの生存率が、対照群に比べて、高い結果が得られた。とくに、毒素活性の強い VT2 を投与したマウスでその効果が顕著に認められた。これらの結果は、ウシの免疫初乳抗体が蛋白質分解酵素が分泌されるマウスの腸管内においても VT1 あるいは VT2 に対して有効に毒素中和作用あるいは毒素吸収阻止作用を示したためと考えられた。

E. coli O157:H7 を経口接種したマウスへの fosfomycin 投与の影響と免疫初乳抗体投与の効果

E. coli O157:H7 を経口接種したマウスにおける抗生物質投与の影響及び免疫初乳抗体投与の効果を検討するため、投与実験の 18 時間前から絶食させたマウスへ 1×10^8 CFU/ml に調製した VT2 産生性 *E. coli* O157:H7 を 0.3ml/匹経口接種し、無処置で 14 日間生死を観察した。その結果、生存率は 88.2% (15/17) であった。さらに、投与実験の 18 時間前から絶食させたマウスへ 1×10^8 CFU/ml の VT1 あるいは VT2

産生性 *E. coli* O157:H7 をそれぞれ 0.3ml/匹経口接種し、その 2 時間後に、fosfomycin(和光純薬株式会社) 500 μ g/g 体重及び免疫初乳抗体を 0.3ml/匹ずつ 1 日 3 回 5 日間経口投与してマウスの生存率を確認した。対照群へは免疫初乳抗体の代わりに同量のスキムミルクを投与した。その結果、マウスの生存率は、VT1 産生性 *E. coli* O157:H7 接種群では、対照群が 63.6% (14/22)、VT1 に対する免疫初乳抗体投与群が 80.0% (16/20) で、VT2 産生性 *E. coli* O157:H7 接種群では、対照群が 20.0% (2/10)、VT2 に対する免疫初乳抗体投与群が 83.3% (10/12) であった。

VT1 あるいは VT2 産生性の *E. coli* O157:H7 の生菌を経口接種したマウスへ fosfomycin を経口投与することによってマウスの死亡率が高くなった原因は、fosfomycin 投与によって *E. coli* O157:H7 が殺菌され、死菌体から VT1 あるいは VT2 の放出量が増加したことを示唆している。また、この場合にも免疫初乳抗体の効果が顕著に認められており、抗生物質による治療に免疫初乳抗体を併用することが有用であると考えられた。

以上のように、ウシの免疫初乳抗体が VT あるいは *E. coli* O157:H7 を投与したマウスの腸管内において VT を中和あるいは吸収阻止することによってマウスの生存率を高めることを明らかにした。また、*in vivo* で抗生物質を経口投与することによって *E. coli* O157:H7 の死菌体から VT の放出量が増加する可能性を示唆する結果を得た。蛋白質分解酵素が分泌されているマウスの腸管内で VT を中和あるいは吸収阻止する機能を有するウシの免疫初乳抗体は、牛乳にアレルギーを有するヒトを除いた *E. coli* O157:H7 感染症患者の受動免疫に応用できる可能性が高いと考えられた。

謝 辞

本論文を作成するにあたり、御指導、御高閲を賜りました麻布大学大学院環境保健学研究科 山本静雄教授に深甚なる謝意を表します。また、適切かつ有益な御助言を賜りました同研究科の福山正文教授及び本田政幸教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、腸管出血性大腸菌 O157:H7 の培養を快く引き受けてくださいました麻布大学生命・環境科学部微生物学研究室の福山正文教授及び古畑勝則准教授に深謝いたします。