

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 栗林尚志(東京都) |
| 学位の種類 | 博士(学術) |
| 学位記番号 | 乙第18号 |
| 学位授与年月日 | 平成20年10月8日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第3条第3項該当 |
| 学位論文題名 | Neutralizing activity of bovine colostrum antibody against verotoxin derived from enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in mice (マウスにおける腸管出血性大腸菌 O157:H7 由来ベロ毒素に対するウシ初乳抗体の中和作用に関する研究) |
| 論文審査委員 | (主査) 山本静雄 (副査) 福山正文 本田政幸 |

論文内容の要旨

はじめに

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ヵ月前の乳牛へ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、ペ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デを用いて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。

論文審査の結果の要旨

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、わが国では1996年に大阪府堺市の小学校で発生した大規模な学校給食による集団食中毒として認められた。その年には、堺市の小学校を含め全国で約18,000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。そのため、*E. coli* O157:H7による感染症の治療に抗生物質を使用すると殺菌された死菌体から多量のVTが放出されて合併症を惹起させる恐れがあることから、医療現場では抗生物質による積極的な治療が敬遠されているのが現状である。

著者は、腸管内におけるVTの中和に用いるための基礎実験として、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、その免疫初乳抗体がVTの中和に有効であることをマウスを用いた動物実験で明らかにした。

本研究の概要は次のとおりである。

菌株、ベロ毒素及び実験動物

本研究には、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を用いて測定した。

免疫初乳抗体の効果を評価する動物実験には、VTに感受性を有する離乳直後のICR系マウス（雄、3週齢、チャールス・リバー社）を用いた。

ウシの免疫初乳抗体

免疫初乳抗体は、VT1とVT2の両毒素を含有している *E. coli* O157:H7の培養上清あるいは精製したVT2の約300 μ gを分娩前の乳牛へ7日間隔で12～14回免疫して作製した。分娩後、初乳を採取し、脱脂及び脱カゼインを行って免疫初乳抗体を含む乳清を得た。この乳清をウシの免疫初乳抗体として本研究に用いた。免疫初乳抗体のVTに対する中和抗体価は、ペロ細胞を用いた中和試験で測定した。

VT1とVT2の両毒素で免疫して作製した免疫初乳抗体の中和抗体価は、分娩1日後に最も高く、VT1に対して1:512、VT2に対しては1:256で、以後経日的に低下した。また、精製VT2で免疫して作製した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。マウスを用いた本実験には、最も高い中和抗体価を示した分娩1日後の免疫初乳抗体を用いた。

VTを経口投与したマウスにおける免疫初乳抗体の効果

*In vitro*でVTの中和活性を示す免疫初乳抗体が、*in vivo*でも同様の効果を示すか否かをマウスを用いて検討した。

18時間前から絶食させたマウスへゾンデを用いて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、その1時間後に、対照群へは滅菌生理食塩水を、免疫初乳抗体の単回投与群へは免疫初乳抗体を1回いずれも同量投与した。免疫初乳抗体の反復投与群では、VT投与の1、2及び3時間後にいずれも免疫初乳抗体を0.5ml/匹経口投与した。免疫初乳抗体の効果はマウスの生存率で評価した。その結果、次の成績を得た。

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、毒性の強い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。

VT1あるいはVT2を経口投与したマウスへVT1あるいはVT2の中和作用を有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を経口投与したマウスで免疫初乳抗体の効果が顕著に認められた。これらの結果から、ウシの免疫初乳抗体が蛋白質分解酵素が存在するマウスの腸管内において、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ことが考えられた。

E. coli O157:H7 を経口接種したマウスにおける fosfomycin の作用と免疫初乳抗体の効果

E. coli O157:H7 の生菌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、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、同様に絶食させたマウスへ 1×10^8 CFU/ml の VT1 あるいは VT2 を産生する *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) で、VT1 に対する免疫初乳抗体投与群が 80.0% (16/20) であり、VT2 産生性 *E. coli* O157:H7 接種群では、対照群が 20.0% (2/10) で、VT2 に対する免疫初乳抗体投与群が 83.3% (10/12) であった。これらの結果は、*E. coli* O157:H7 を経口接種したマウスへ抗生物質を投与することによって *E. coli* O157:H7 が殺菌され、死菌体から放出される VT 量が増加してマウスの死亡率を高めたことを示唆するものであり、それに対しても免疫初乳抗体が有効に作用して生存率を高めたことを裏づけるものである。

以上述べたように、本論文はウシの免疫初乳抗体が VT あるいは *E. coli* O157:H7 を経口投与したマウスの腸管内において、蛋白質分解酵素が存在するにもかかわらず、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、さらに *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についても論究したものである。

本研究の成果は、ヒトの *E. coli* O157:H7 感染症のみならず腸管感染症における受動免疫の基礎的研究に大いに寄与するものと考えられ、博士 (学術) の学位を授与するにふさわしい業績であると審査員全員が高く評価した。