

氏 名（本籍）	清 田 哲 郎（神奈川県）
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	甲第 31 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	The effects of colostral antibodies from immunized dairy cows on inhibition of absorption into the blood of Verotoxin 2 derived from enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and on eradication of <i>Helicobacter pylori</i> in experimental animals (実験動物での腸管出血性大腸菌 O157:H7 由来ベロ毒素 2 の吸収抑制ならびに <i>Helicobacter pylori</i> の除菌におけるウシ免疫初乳抗体の効果)
論文審査委員	(主査) 山 本 静 雄 (副査) 岩 橋 和 彦 古 畑 勝 則

論 文 内 容 の 要 旨

腸管出血性大腸菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) は、死者の発生を伴う食中毒の原因菌として、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は、胃潰瘍、胃がんなどを誘発する細菌としてよく知られており、これらの消化器感染症に対する有効な対応策の確立が待たれている。

そこで、乳牛で作製した免疫初乳抗体を用いてこれらの消化器感染症における受動免疫の有効性を動物モデルで明らかにした。腸管感染症モデルでは、*E. coli* O157:H7 の産生するベロ毒素 2 (VT2) に対する免疫初乳抗体を用いてマウスにおける VT2 の吸収阻止効果を明らかにした。胃感染症モデルでは、*H. pylori* に対する免疫初乳抗体及びその抗体と補体（新鮮ウシ血清）とを用いてスナネズミにおける除菌効果を実証した。これらの蛋白質分解酵素に強い抵抗性を有する免疫初乳抗体は、乳牛でそれぞれ作製した。

I. 可溶性 VT2 に対する抗体測定が可能な間接蛍光抗体 (IFA) の開発

IFA 用の VT2 感作ラテックスの調製及び乳牛への免疫原に用いた VT2 は、マウス抗 VT2 モノクローナル抗体感作 Sepharose4B カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって *E. coli* O157:H7 VT2 産生株の培養液から分離した。

VT2 に対する免疫初乳抗体は、分娩 4 ヶ月前の乳牛へ毎週 1 回 VT2 を免疫して作製した。分娩 3 日後までの初乳を採取し、低速遠心による脱脂及びレンネットによる脱カゼインを行って乳清を分離

した。これを免疫初乳抗体として供試した。

VT2 感作ラテックスは、粒径 6 μm の 2.5 %ラテックス粒子 0.5 ml へ 30 $\mu\text{g/ml}$ の VT2 1.0ml を感作して調製した。それを 20 %グリセリン、1 % 卵白アルブミン (OVA) を含む食塩加リン酸緩衝液 (PBS) に分散させ、この 5 μl を IFA 用スライドガラスの well に塗抹して IFA スライドガラスを作製した。これに 1:2~1:512 に希釈した免疫初乳抗体 (10 μl / well) を加えて室温で 1 時間反応させた。次に、至適濃度の FITC 標識抗ウシ γ グロブリン、IgG、IgA あるいは IgM 抗体をそれぞれ 10 μl / well 反応させた。反応終了後、スライドガラスを 3.0M の塩化ナトリウムを含む PBS で洗浄することによって、非特異反応を完全に排除することができた。なお、ラテックス粒子に自家蛍光は認めなかった。一般的な VT2 に対する抗体測定法であるペロ細胞を用いた中和試験では、免疫グロブリンクラス別の抗体測定が不可能であったが、この IFA によってその問題が解決された。この IFA で測定した免疫初乳抗体の抗体価は、免疫に用いた乳牛の血清抗体価の約 4 倍高力価であった。免疫初乳抗体の IFA 価は、分娩直後に採取した初乳が最も高い 1:512 を示し、分娩 3 日後までの初乳も 1:128~1:256 と比較的高力価を示した。

II. マウスにおける免疫初乳抗体による VT2 の血中への吸収阻止作用

マウスの血中に吸収された VT2 の濃度は、0.2 ng/ml まで測定可能な蛍光 ELISA によって測定した。マウス (146 匹) を用いて免疫初乳抗体による VT2 の血中への吸収阻止効果を検討した。

吸収に至適な 477.8 ng/ml の VT2 0.3ml をゾンデを用いて投与し、その 1 時間後から VT2 に対する免疫初乳抗体 0.3ml を 1 時間間隔で計 3 回投与したところ、血中への VT2 の吸収は、わずか 0.3~2.6 ng/ml と微量であった。それに対して、免疫初乳抗体の代わりに VT2 に対する抗体を含まない初乳乳清を投与した対照群では、VT2 投与 12 時間後に 15.4 \pm 5.04 ng/ml、16 時間後に 4.3 \pm 1.61 ng/ml まで上昇した。免疫初乳抗体を投与したマウスの VT2 濃度は、対照群に比べて有意に低値を示した。これは、腸管内において免疫初乳抗体が VT2 と結合して VT2 の毒素活性部位をブロックするとともに大きな免疫複合体を形成して糞便中へ排泄されたために吸収量が少なかったと推察された。

多量 (955.6 ng/ml) の VT2 を投与した場合には、16 時間後にマウスの血中へわずか 8.2 ng/ml しか吸収されなかった。これは多量の VT2 によって腸管粘膜が強く傷害され、吸収機能が低下したためと考えられた。

III. スナネズミにおける免疫初乳抗体による *H. pylori* の除菌効果

H. pylori に対する免疫初乳抗体は、分娩 3 ヶ月前の乳牛へ毎週 1 回 *H. pylori* を免疫して作製した。分娩後 3 日分の初乳を採取し、VT2 に対する免疫初乳抗体と同様の方法で、乳清を分離した。この免疫初乳抗体は、*H. pylori* の菌体及び鞭毛の両方に対する抗体活性を有していることを IFA で確認した上で、本実験に供試した。

H. pylori の除菌に関する実験には、5~10 週齢のスナネズミ (101 匹) を用いた。スナネズミへの *H. pylori* の接種は、ゾンデを用いて 0.1%重曹 0.3ml を投与後、 5×10^7 CFU の *H. pylori* を 1 日に 1

回、2 日間接種し、2 週間後に ELISA によって *H. pylori* に対する血中の IgM 及び IgG 抗体価の上昇から感染の成立を確認して本実験に用いた。なお、この ELISA での抗体価の上昇が、*H. pylori* 感染成立の指標となることは、別な実験で確認済みである。

除菌処置を施したスナネズミは、除菌処置終了 1 ヶ月後に安楽死させ、胃のホモジネート 10 µl をウマ血清加 BHI 培地に塗抹して 37℃、微好気環境下で 7 日間培養した後に、*H. pylori* のコロニー形成の有無によって除菌効果を判定した。

H. pylori を感染させたスナネズミへヒトの治療で最も一般的に用いられているオメプラゾール、クラリスロマイシン及びアモキシシリンをヒトにおける用量の約 1.3 倍量に相当する 10mg/kg 及び約 2 倍量に相当する 20mg/kg を 1 日 2 回、7 日間経口投与した。その結果、*H. pylori* の除菌率は 10mg/kg 投与群で 92% (11/12 例)、20 mg/kg 投与群では 100% (12/12 例) であった。

免疫初乳抗体による除菌実験では、スナネズミへ 0.1 %重曹 0.3ml を投与して胃内の pH を中性付近に調整した後に、0.5 ml の免疫初乳抗体を 1 日 2 回、1 ヶ月間または 2 ヶ月間経口投与した。対照群へは、免疫初乳抗体の代わりに、*H. pylori* に対する抗体を含まない初乳乳清を同量投与した。その結果、*H. pylori* の除菌率は、免疫初乳抗体 1 ヶ月間投与群で 83% (10/12 例)、2 ヶ月間投与群では、薬剤 10 mg/kg 投与群と同じ、92% (11/12 例) であった。これらの対照群の除菌率はいずれも 0% (0/6 例) であった。本実験に用いた免疫初乳抗体は、*H. pylori* の菌体と鞭毛の両方に対する抗体活性を有していることから、抗体分子が *H. pylori* の菌体や鞭毛へ結合することによって *H. pylori* の運動性や定着の阻害に加えて *H. pylori* との免疫複合体が形成されて排泄が促進され、除菌効果が発現されたものと考えられた。

免疫初乳抗体と補体とによる除菌実験では、スナネズミへ 0.1 %重曹 0.3 ml 投与後、免疫初乳抗体及び補体をそれぞれ 0.5 ml、1 日 2 回、2~3 日間経口投与した。対照群のスナネズミへは免疫初乳抗体と 56℃、30 分間の加熱によって不活化した補体を実験群と同じ条件で投与した。その結果、免疫初乳抗体の 2 日間投与群では 83 % (10/12 例)、3 日間投与群では 100 % (12/12 例) の除菌効果が認められた。*in vitro* で、*H. pylori* へ免疫初乳抗体と補体とを作用させた場合に、*H. pylori* が強く傷害（溶菌）される現象が確認されたことから、胃内においても、*in vitro* と同様に、活性化された補体によって *H. pylori* の菌体が傷害された結果、短期間で強い除菌効果が発現したと考えられた。これらの対照群では、いずれも 8% (1/12 例) の除菌率を示した。これは各除菌処置日における初回投与前に不活化した補体の機能が時間の経過に伴って復活し、2 回目の抗体・不活化補体投与時に補体が活性化されて *H. pylori* を傷害したためと考えられた。

ヒトの *H. pylori* の除菌治療においては、薬剤耐性菌の出現及び薬剤に対する過敏症患者への投与が問題となっている。それに対して、免疫初乳抗体あるいは免疫初乳抗体と補体とを用いる方法は、牛乳アレルギーを有するヒト以外の患者へ、耐性菌の問題が全くなく、反復投与ができる有用な *H. pylori* の感染予防法あるいは除菌法として応用が可能と考えられた。ことに、胃内で補体を活性化させる方法は、きわめて短期間で除菌が可能な画期的な手法になりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

腸管出血性大腸菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) は、死者の発生を伴う食中毒の原因菌として、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は、胃潰瘍、胃がんなどを誘発する細菌としてよく知られており、これらの消化器感染症に対する有効な対応策の確立が待たれている。

著者は、乳牛で作製した免疫初乳抗体を用いてこれらの消化器感染症における受動免疫の有効性を動物モデルで明らかにした。腸管感染症モデルでは、*E. coli* O157:H7 の産生するベロ毒素 2 (VT2) に対する免疫初乳抗体を用いてマウスにおける VT2 の吸収阻止効果を明らかにした。胃感染症モデルでは、*H. pylori* に対する免疫初乳抗体及びその抗体と補体（新鮮ウシ血清）とを用いてスナネズミにおける除菌効果を実証した。これらの蛋白質分解酵素に強い抵抗性を有する免疫初乳抗体は、乳牛でそれぞれ作製した。

本研究の概要は次のとおりである。

I. 可溶性 VT2 に対する抗体測定が可能な間接蛍光抗体法 (IFA) の開発

IFA 用の VT2 感作ラテックスの調製及び乳牛への免疫原に用いた VT2 は、マウス抗 VT2 モノクローナル抗体感作 Sepharose4B カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって *E. coli* O157:H7 VT2 産生株の培養液から分離した。

VT2 に対する免疫初乳抗体は、分娩 4 ヶ月前の乳牛へ毎週 1 回 VT2 を免疫して作製した。分娩 3 日後までの初乳を採取し、低速遠心による脱脂及びレンネットによる脱カゼインを行って乳清を分離した。これを免疫初乳抗体として供試した。

VT2 感作ラテックスは、粒径 6 μm の 2.5 %ラテックス粒子 0.5ml へ 30 $\mu\text{g/ml}$ の VT2 1.0ml を感作して調製した。それを 20 %グリセリン、1 % 卵白アルブミン (OVA) を含む食塩加リン酸緩衝液 (PBS) に分散させ、この 5 μl を IFA 用スライドガラスの well に塗抹して IFA スライドガラスを作製した。これに 1:2~1:512 に希釈した免疫初乳抗体 (10 $\mu\text{l/well}$) を加えて室温で 1 時間反応させた。次に、至適濃度の FITC 標識抗ウシ γ グロブリン、IgG、IgA あるいは IgM 抗体をそれぞれ 10 $\mu\text{l/well}$ 反応させた。反応終了後、スライドガラスを 3.0M の塩化ナトリウムを含む PBS で洗浄することによって、非特異反応を完全に排除することができた。なお、ラテックス粒子に自家蛍光は認めなかった。一般的な VT2 に対する抗体測定法であるベロ細胞を用いた中和試験では、免疫グロブリンクラス別の抗体測定が不可能であったが、この IFA によってその問題が解決された。この IFA で測定した免疫初乳抗体の抗体価は、免疫に用いた乳牛の血清抗体価の約 4 倍高力価であった。免疫初乳抗体の IFA 価は、分娩直後に採取した初乳が最も高い 1:512 を示し、分娩 3 日後までの初乳も 1:128~1:256 と比較的高力価を示した。

II. マウスにおける免疫初乳抗体による VT2 の血中への吸収阻止作用

マウスの血中に吸収された VT2 の濃度は、0.2 ng/ml まで測定可能な蛍光 ELISA によって測定した。

マウス（146 匹）を用いて免疫初乳抗体による VT2 の血中への吸収阻止効果を検討した。

吸収に至適な 477.8 ng/ml の VT2 0.3ml をゾンデを用いて投与し、その 1 時間後から VT2 に対する免疫初乳抗体 0.3ml を 1 時間間隔で計 3 回投与したところ、血中への VT2 の吸収は、わずか 0.3～2.6 ng/ml と微量であった。それに対して、免疫初乳抗体の代わりに VT2 に対する抗体を含まない初乳乳清を投与した対照群では、VT2 投与 12 時間後に 15.40 ± 5.04 ng/ml、16 時間後に 4.30 ± 1.61 ng/ml まで上昇した。免疫初乳抗体を投与したマウスの VT2 濃度は、対照群に比べて有意に低値を示した。これは、腸管内において免疫初乳抗体が VT2 と結合して VT2 の毒素活性部位をブロックするとともに大きな免疫複合体を形成して糞便中へ排泄されたために吸収量が少なかったと推察された。

多量（955.6 ng/ml）の VT2 を投与した場合には、16 時間後にマウスの血中へわずか 8.2 ng/ml しか吸収されなかった。これは多量の VT2 によって腸管粘膜が強く傷害され、吸収機能が低下したためと考えられた。

Ⅲ. スナネズミにおける免疫初乳抗体による *H. pylori* の除菌効果

H. pylori に対する免疫初乳抗体は、分娩 3 ヶ月前の乳牛へ毎週 1 回 *H. pylori* を免疫して作製した。分娩後 3 日分の初乳を採取し、VT2 に対する免疫初乳抗体と同様の方法で、乳清を分離した。この免疫初乳抗体は、*H. pylori* の菌体及び鞭毛の両方に対する抗体活性を有していることを IFA で確認した上で、本実験に供試した。

H. pylori の除菌に関する実験には、5～10 週齢のスナネズミ（101 匹）を用いた。スナネズミへの *H. pylori* の接種は、ゾンデを用いて 0.1% 重曹 0.3ml を投与後、 5×10^7 CFU の *H. pylori* を 1 日に 1 回、2 日間接種し、2 週間後に ELISA によって *H. pylori* に対する血中の IgM 及び IgG 抗体価の上昇から感染の成立を確認して本実験に用いた。なお、この ELISA での抗体価の上昇が、*H. pylori* 感染成立の指標となることは、別な実験で確認済みである。

除菌処置を施したスナネズミは、除菌処置終了 1 ヶ月後に安楽死させ、胃のホモジネート 10 µl をウマ血清加 BHI 培地に塗抹して 37℃、微好気環境下で 7 日間培養した後に、*H. pylori* のコロニー形成の有無によって除菌効果を判定した。

H. pylori を感染させたスナネズミへヒトの治療で最も一般的に用いられているオメプラゾール、クラリスロマイシン及びアモキシシリンをヒトにおける用量の約 1.3 倍量に相当する 10mg/kg 及び約 2 倍量に相当する 20mg/kg を 1 日 2 回、7 日間経口投与した。その結果、*H. pylori* の除菌率は 10mg/kg 投与群で 92%（11/12 例）、20 mg/kg 投与群では 100%（12/12 例）であった。

免疫初乳抗体による除菌実験では、スナネズミへ 0.1 % 重曹 0.3ml を投与して胃内の pH を中性付近に調整した後に、0.5 ml の免疫初乳抗体を 1 日 2 回、1 ヶ月間または 2 ヶ月間経口投与した。対照群へは、免疫初乳抗体の代わりに、*H. pylori* に対する抗体を含まない初乳乳清を同量投与した。その結果、*H. pylori* の除菌率は、免疫初乳抗体 1 ヶ月間投与群で 83%（10/12 例）、2 ヶ月間投与群では、薬剤 10 mg/kg 投与群と同じ、92%（11/12 例）であった。これらの対照群の除菌率はいずれも 0%（0/6

例)であった。本実験に用いた免疫初乳抗体は、*H. pylori*の菌体と鞭毛の両方に対する抗体活性を有していることから、抗体分子が *H. pylori*の菌体や鞭毛へ結合することによって *H. pylori*の運動性や定着の阻害に加えて *H. pylori*との免疫複合体が形成されて排泄が促進され、除菌効果が発現されたものと考えられた。

免疫初乳抗体と補体とによる除菌実験では、スナネズミへ0.1%重曹0.3 ml投与後、免疫初乳抗体及び補体をそれぞれ0.5 ml、1日2回、2～3日間経口投与した。対照群のスナネズミへは免疫初乳抗体と56℃、30分間の加熱によって不活化した補体を実験群と同じ条件で投与した。その結果、免疫初乳抗体の2日間投与群では83% (10/12例)、3日間投与群では100% (12/12例)の除菌効果が認められた。*in vitro*で、*H. pylori*へ免疫初乳抗体と補体とを作用させた場合に、*H. pylori*が強く傷害(溶菌)される現象が確認されたことから、胃内においても、*in vitro*と同様に、活性化された補体によって *H. pylori*の菌体が傷害された結果、短期間で強い除菌効果が発現したと考えられた。これらの対照群では、いずれも8% (1/12例)の除菌率を示した。これは各除菌処置日における初回投与前に不活化した補体の機能が時間の経過に伴って復活し、2回目の抗体・不活化補体投与時に補体が活性化されて *H. pylori*を傷害したためと考えられた。

ヒトの *H. pylori*の除菌治療においては、薬剤耐性菌の出現及び薬剤に対する過敏症患者への投与が問題となっている。それに対して、免疫初乳抗体あるいは免疫初乳抗体と補体とを用いる方法は、牛乳アレルギーを有するヒト以外の患者へ、耐性菌の問題が全くなく、反復投与ができる有用な *H. pylori*の感染予防法あるいは除菌法として応用が可能と考えられた。ことに、胃内で補体を活性化させる方法は、きわめて短期間で除菌が可能な画期的な手法になりうると考えられた。

上述のように、著者はVT2に対する免疫初乳抗体がマウスの腸管内においてVT2の吸収をほぼ完全に阻止できることを明らかにし、さらに *H. pylori*を感染させたスナネズミにおいて *H. pylori*に対する免疫初乳抗体の1ヶ月間投与で83%、2ヶ月間投与で92%の除菌効果を認め、免疫初乳抗体と補体の投与では2日間投与で83%、3日間投与で100%の除菌効果があることを初めて証明した。

本研究の成果は、消化器感染症における受動免疫の研究の進展に寄与するところが大きく、博士(学術)の学位を授与するにふさわしい業績であると本博士論文審査員全員が高く評価した。