

第26回麻布環境科学研究会 一般講演9

マウスを用いた腸管出血性大腸菌 O157 : H7 由来 ベロ毒素 (VT1, VT2) のウシ初乳抗体による 中和に関する基礎的検討

栗林 尚志¹, 清田 哲郎¹, 古畑 勝則², 福山 正文², 山本 静雄¹

麻布大・環境・¹免疫学, ²微生物学

1. はじめに

ヒトの溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症 (5~10%) の原因となることがある腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染症は, 抵抗力の弱い小児や高齢者が標的となりやすく, 先進国においてもしばしば報告されている。我が国では, 1996年7月に大阪府堺市の小学校で腸管出血性大腸菌 O157:H7 に起因する食中毒の大流行がみられ, その年の全国の本菌感染者は 17,877 名にのぼった。本感染症の治療に際して抗生物質投与による積極的な治療を行うと菌体が破壊されて多量のベロ毒素が放出され, それが血液中に吸収され, ベロ毒素の作用が発現するために抗生物質の投与は制限されているのが現状である。現在, ベロ毒素の血液中への吸収を阻止する目的で, ベロ毒素の受容体であるグロボド Gb3 糖脂質の糖鎖の部分を珪藻土に結合させたベロ毒素の吸着剤の開発および血液中に吸収されたベロ毒素を中和する目的で, マウスモノクローナル抗体とヒト免疫グロブリンのキメラ抗体の開発などが行われている。しかし, 本症の有効な治療法は未だ確立されていない。

そこで, 演者らはベロ毒素を乳牛へ免疫し, その初乳中にタンパク分解酵素に抵抗性を有する高力価の中和抗体を得て, その抗体によるベロ毒素の中和効果をマウスを用いて検討した。

2. 材料および方法

菌株: ヒトから分離された VT1 産生株, VT2 産生

株, VT1 と VT2 産生株の 3 株の *E.coli* O157:H7 を供試した。

マウス: 3 週齢の雌の ICR (SPF) マウス (チャールズリバー) 約 210 匹を用いた。

ウシ初乳抗体の作成: 3 頭の妊娠中の乳牛へベロ毒素とフロインドの完全アジュバントを混和したエマルジョン 1 ml を皮下へ 14 回免疫し, 分娩後に初乳を採取した。遠心による脱脂後, 脱脂乳 1L にレンネット (ICN Biochemicals Inc., Ohio, USA) を 100 mg の割合に加えて 22℃ に 1 晩静置し, 初乳抗体を含む乳清を分離した。

ベロ毒素の測定: ベロ毒素は抗ベロ毒素抗体感作ラテックス粒子を用いたマイクロタイター法による逆受身ラテックス凝集反応で測定した。

中和抗体価の測定: 濾過滅菌した乳清 (初乳抗体) 40 μ l を 2~2048 倍に希釈し, 等量のベロ毒素を含む培養液と混和後, 100 μ l のベロ細胞を加えて 2 日間培養した。中和抗体価はベロ細胞を生存させた乳清 (初乳抗体) の最高希釈倍数で表した。

マウスへのベロ毒素の投与: VT1 は 50 匹のマウスへ, VT2 は 43 匹のマウスへゾンデを用いてそれぞれ 0.5 ml ずつ経口投与した。その 1~3 時間後に, 同様の方法で, 0.5 ml の初乳抗体あるいは滅菌生理食塩水 (対照群) を投与した。

VT1 あるいは VT2 産生菌の接種: 42 匹のマウスへ 1×10^8 CFU/ml の VT1 産生菌を 0.3 ml, 24 匹のマウスへ 1×10^8 CFU/ml の VT2 産生菌を 0.3 ml ずつ

ンデを用いてそれぞれ経口接種した。その1時間後に初乳抗体と Fosfomycin (FOM ; 和光純薬) あるいは市販の脱脂粉乳と FOM (対照群) を 0.3 ml ずつ投与した。FOM の用量は体重 1 g あたり 800 μ g とした。初乳抗体投与群には 0.3 ml の初乳抗体と FOM を、対象群へは 0.3 ml の脱脂粉乳と FOM をそれぞれ 1 日 3 回、5 日間投与した。さらに 17 匹のマウスへ上記 VT2 産生菌を 0.3 ml ずつ接種し、未処置群として生死を観察した。

3. 結果および考察

初乳の中和抗体価：分娩 1 日後に乳牛から採取した初乳の中和抗体価は、VT1 と VT2 で免疫したウシ (# 1) では VT1 に対して 1:512, VT2 に対して 1:256 であった。精製 VT2 で免疫したウシの初乳では # 2 が 1:32, # 3 が 1:64 であった。

VT1 投与マウスの生存率：VT1 投与マウスの 14 日後の生存率は、VT1 投与 1 時間後に 1 回のみウシ抗 VT1 初乳抗体を投与した群では 100 % (16/16), 1, 2, 3 時間後に 3 回ウシ抗 VT1 初乳抗体を投与した群では 90 % (18/20) であった。初乳抗体の代わりに滅菌生理食塩水を投与した対照群の生存率は 78.6 % (11/14) であった。VT1 は VT2 に比較して毒性が弱いために、顕著な差が認められなかったが、初乳抗体投与群の生存率が明らかに高い結果が得られた。

VT2 投与マウスの生存率：VT2 マウスの生存率は、ウシ抗 VT2 初乳抗体の 1 回投与群では 75 % (9/12), 3 回投与群では 100 % (14/14) であった。滅菌生理食塩水を投与した対照群では 0 % (0/17) であった。VT2 は毒性が強いために、初乳抗体の投

与を 3 回行わなければ初乳抗体による完全な中和効果が得られないことが明らかになった。

E.coli O157:H7 接種マウスの生存率：VT1, VT2 産生菌接種後の生存率は、14 日後に判定した。菌接種後の生存率は、VT1 産生菌接種マウスに FOM と初乳抗体を投与した群では 80.0 % (16/20), FOM と市販の脱脂粉乳を投与した対照群では 63.6 % (14/22) であった。VT2 産生菌接種マウスに FOM と初乳抗体を投与した群では、83.3 % (10/12), FOM と脱脂粉乳を投与した対照群では 20.0 % (2/10) であった。本実験から FOM が腸管内で *E.coli* O157:H7 を死滅させた結果、菌体から放出されたペロ毒素によってマウスが死亡したものと考えられた。

VT2 産生菌を接種したマウスの未処置群は 88.2 % (15/17) であった。これはマウスに抗生物質を投与しなかったために VT2 の放出量が少なく生存率が高かったものと考えられた。

なお、ウシの初乳抗体が腸管内でタンパク分解酵素に抵抗性を示すか否かについてはビーグル犬を用いて検討中であるが、ウシの初乳抗体は血清抗体に比較して腸管内で抗体活性が長時間持続する結果を得ている。また、ペロ毒素を免疫していない 5 頭の乳牛の初乳にはペロ毒素に対する中和抗体が含有されておらず、それらの中和抗体を含有しないウシの初乳にはペロ毒素の中和作用がないことがビーグル犬を用いた実験で確認されている。ウシの初乳抗体の腸管内への反復投与は、血清療法とは異なり、血清病の原因となる抗体が産生される恐れもないことから、この方法はヒトの本菌感染症の治療に応用が可能となるかもしれない。