

ニワトリ抗体を用いた感染症の予防法と治療法の開発

小熊恵二¹・森 裕志²・児玉義勝³

¹ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・病原細菌学

² 岐阜薬科大学・微生物学

³ (株) ゲン・コーポレーション

虫歯（う蝕）形成、胃・十二指腸疾患、出血性大腸炎にそれぞれ関係があるStreptococcus mutans, Helicobacter pylori, Eshelichia coli (O157など)の重要な病原因子であるグルコシルトランスフェラーゼ(GTase)、ウレアーゼ、志賀毒素様毒素(Stx)に対して、また、下痢を起こすrotavirusに対してニワトリ抗体(IgY)を作製し、動物実験やボランティアによりその効果を解析したところ、局所の菌数や毒性を低下させ発症の予防効果があることが判明した。東南アジアでのコレラ、病原性大腸菌、ロタウイルスなどによる下痢症対策として、これらの微生物や病原因子に対するIgYを作製し利用する計画(通称:津波対策)を説明する。

Key Words : *IgY, Diarrhea, Toxin, Tsunami, Prevention, Treatment*

はじめに

近年、感染症の予防・治療に、あるいはへび毒の治療などに、従来の馬で作製した抗血清の代わりにニワトリで作製した抗体が注目されている。ニワトリへの免疫が簡単のみならず、卵黄中に産生される抗体量は多く、また、その精製も容易である。抗体の性状もこれまでのIgGと比較して、抗原結合力(アフィニティー)は約10倍高いと報告されている¹⁾。精製したIgYを希釈して用いる、あるいは、経口投与するとアナフィラキシーを起こしにくい。東南アジアではコレラ、病原性大腸菌、ロタウイルスなどによる下痢症が蔓延している。本研究ではIgYを乳製品や飲料水に混ぜ、経口投与することによりこれらを予防、治療しようというものであるが、特に医療状況の悪い津波などの災害時にも、乳児から老人までに簡単に投与できる製品を開発する予定である。

本シンポジウムでは、まずIgYの有効性を示すため、虫歯（う蝕）形成と胃・十二指腸疾患にそれぞれ関係があるStreptococcus mutans(ミュータンス菌)とHelicobacter pylori(ピロリ菌)の重要な病原因子であるグルコシルトランスフェラーゼ(GTase)とウレアーゼに対するIgYを作製し、ボランティアによりその効果を解析したデータを紹介した後、志賀毒素様毒素(Stx)やロタウイルスに対する効果も示し、上記の計画について説明する。

I. Streptococcus mutansとHelicobacter pyloriに対する効果

1. Streptococcus mutans(ミュータンス菌)

S. mutansはGTaseにより蔗糖よりグルカンを形成する。これにより菌は歯に固着し虫歯を形成する。GTaseに対する抗体を作製し、餌に混ぜ、ラットを用いてその効果を検討したところ、プラックおよび虫歯の形成に対し優位の阻害が認められた。次いで計99名のボランティアを用いて実験を行った。ボランティアを1) IgY, 2)その製品(錠剤), 3)プラセボの投与群、および、4)未処置(コントロール)の4グループに分けた。1日5回(毎食後と昼夕食間、就寝前)、計400mg/日、5日間投与した後、総嫌気性細菌数(BHI培地)、歯に付着しているS. mutans数(ミューカウント)や唾液中のS. mutans数(MSB培地)を測定した²⁾。総嫌気性細菌数は変化がなかったが、付着性S. mutans数や総S. mutans数は、IgYおよびその製品(錠剤)を投与したグループでは優位に低下した(図1)。

2. Helicobacter pylori(ピロリ菌)

H. pyloriが胃内で生息するためには胃液を中和しなければならない。菌はウレアーゼによりこれを行っている。従って、ウレアーゼに対する抗体を作製し、その効果を検討した。まず、IgYが胃粘膜のムチン層にも浸透することを認めた。次いで、マウスを用いて、餌に抗体を混ぜ投与すると、菌数を低下させることを認めた。同様に、16名のボランティア(Helicobacter pylori感染者)に、抗ウレアーゼ抗体を2g含むヨーグルトを1日2個づつ摂食させ、3ヶ月後にウレアーゼ呼吸試験(UBT)と便中の抗原(菌)の測定を行い、感染菌を減少させたかを検討したところ、全ての摂食者において優位な効果が認められた³⁾(図2)。

II. 下痢症対策

1. Enterohemorrhagic Eshelichia coli (EHEC, 出血性大腸菌)

出血性大腸菌の重要な病原因子はStx(ベロ毒素)である。StxにはStx-1, -2の2種類が存在するが、今回は両毒素を部分精製し、ホルマリンで不活化した後、それぞれのIgYを作製し、これら

抗体の効果をHeLa細胞およびマウスを用いて検討した。

1) 細胞を用いた実験

Stx-1, -2毒素と抗体を反応させた後、HeLa細胞に作用させ、細胞毒性の中和効果を検討した。St-1およびStx-2の細胞毒性はそれぞれの抗体により中和されたが、互いにクロス中和は認められなかった。

2) 5週令のマウスを用いた実験

i) 抗体をi.v投与した後、毒素をi.pでチャレンジ

抗体投与後10分で毒素をチャレンジしたところ、St-1およびStx-2による致死作用は、それぞれの抗体により中和された。

ii) 毒素をi.p投与した後、各抗体をi.v投与

毒素投与と同時、および10, 20, 30分、1, 2, 6時間後に抗体を投与したところ、同時に投与したマウスのみが生存した。

iii) 生菌を経口投与した後、16, 19, 22, 40時間後に抗ST-2抗体を経口投与

ストレプトマイシン投与マウスに生菌を経口投与した。その後、マイトマイシンC処理を行うと共に抗体を経口投与したところ、抗Stx-2抗体は腸管の中で菌より放出されるStx-2毒素の致死作用を中和した(図3)。

2. Rota virus (ロタウイルス)

ウシ、特に生後まもなくのウシ (neonatal calves) はロタウイルス感染により重症の下痢を発症し、時に斃死する。Group Aの2種類のウイルスであるShimane (serotype G6) とKK-3 (serotype G10) を、NA-104細胞 (rhesus monkey kidney cells) で増殖させた後、ホルマリンで不活化し、抗体を作製した。これら抗体の効果を、培養細胞およびsuckling mice と neonatal calves を用いて検討した(4-6)。

1) 培養細胞を用いた実験

ウイルス量を細胞変性効果 (cytopathic effect) を起こす値 (tissue culture infective dose; TCID₅₀) として求めた。得られた精製抗体の力価を、200TCID₅₀のウイルス量の中和値 (neutralizing antibody titer; NAT) として測定した。抗shimane, 抗KK-3抗体ともそれぞれ8x10⁵ NATを示したが、互いのクロス中和は1280 NATであった(表1)。

2) suckling mice (7 day old) を用いた実験

25 μlのshimaneおよびKK-3ウイルスを経口投与した後、4日以内に下痢を発症する量 (diarrheogenic dose, DD₅₀) は106.9および106.4 TCID₅₀であったので、それらの4倍量程を確実に下痢を起こさせる量として用いた。このウイルス量を投与する3hr前に640, 160 NATなどの抗体25 μlを経口投与し、下痢発症の有無を観察した。また同様に、抗体、ウイルス投与後、8, 14, 24, 48, 72, 96 hrにマウスを斃死させ、腸管内でのウイルス量を検討した。抗体を3hr前に投与した場合は80%以上のマウスが下痢を発症しなかった(表2)。またこの時、腸管内のウイルス量は減少していた(但し、抗体量が少ない時には、その効果は24hr以降に認められた)。

3) neonatal calves を用いた実験

i) 隔離された飼育小屋で

生後すぐ(0日目)のウシを4頭づつのグループに分け、5mlのミルクに加えた抗Shimaneおよび抗KK-3抗体を一日3回投与し(9 a.m., 1 p.m., 5 p.m.; 1日の合計抗体量は3200, 6400, 12800 NAT)、これを9日間続けた。最初の抗体投与後2時間目に約1 x 10¹⁰TCID₅₀のShimaneおよびKK-3ウイルスを、それぞれの抗体を投与したウシに経口投与し、その後10日目まで、下痢の発症、糞便の性状、糞便中のウイルス数、体重の変化を観察した。抗体を多く投与されたウシではウイルス数は少なく、体重減少や下痢の発症は抑えられた(表3)。

ii) Field trial

北海道のある牧場で生まれたてのウシを用いてフィールド実験を1) 2月2日-3月29日、2) 4月2日-5月12日、3) 5月1日-5月29日の計3回行った。ウシを10頭づつ2グループに分け、1グループには抗Shimaneと抗KK-3抗体を混合したもの2gを50mlの蒸留水に溶解し、これを1日3回、day0から2週間経口投与した。抗体投与したグループとしないグループを各期間中隔離せずに飼育し、糞便の性状、糞便中のウイルス数、体重の変化を観察した。3回の実験中最初のトライアルのみで抗体投与群と非投与群との間に差が認められた。投与群では10頭中2頭で104以上のウイルスが認められ斃死したが、それ以外のウシではウイルスは認められず、体重減少もなかった。これに対し非投与群では、9頭で104以上のウイルスが認められ、体重減少も著名であった。この内の2頭と、ウイルスが認められなかった1頭が斃死した。最後の1頭の死亡原因は不明であるが、抗体投与はウシ間での感染を阻止したことが結論された。

III. 津波対策

以上、病原因子や微生物に対するIgYの(経口)投与が微生物数や毒素を減少させ、予防や治療効果が期待できることを示した。同じ考えから、東南アジアなどで流行しているコレラ、病原性大腸菌、ロタウイルスなどによる下痢症や、破傷風毒素、ヘビ毒素などの毒素性疾患の予防、治

療を考えている。病原体の場合はホルマリンや加熱により不活化する。コレラ毒素、Stx(ペロ)毒素、破傷風毒素、ヘビ毒素の場合は、今回のStx毒素のように毒素全体を不活化してもよいが、その安全性と量の確保を考え、各毒素の重要な部分のみをリコンビナント蛋白質として作製することを考えており、既にコレラ毒素とボツリヌス毒素で成功している。ニワトリへの免疫は、トリインフルエンザの問題もあることから、厳重に管理された飼育および実験場を持ち、既に本方法を熟知している株式会社ゲン・コーポレーションに依頼する。各抗原に対する抗体をそれぞれ作製し、抗体の力価はそれぞれの抗原を用いたELISAおよび毒素の中和試験などで測定する。卵黄あるいは粗精製した抗体をヨーグルト、ミルクなどの飲・食料品に加え、その効果を動物実験等で確認する。また、いくつかの抗体を必要に応じて混合し、数種類の疾病に効果を発揮するようにする。皮下や筋肉内、静脈に直接注射する抗破傷風毒素やヘビ毒素の抗体の場合には、特に良く精製する(図4)。

これらの抗体は凍結乾燥しておくともいつでも使用可能である。ヨーグルト、ミルクなどの飲食物品に加えた製品は医療状況の悪い津波などの災害時にも、乳児から老人まで簡単に投与できるばかりでなく、水分や栄養も補給できる。さらに、注射器なども必要としないので、医療廃棄物の面からも期待されるものであると考えている。

文献

- 1) Yokoyama H., et al. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Escherichia coli infection in neonatal piglets. *Infect Immun.* 60:998-1007, 1992.)
- 2) Krüger C., et al. The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats, *Caries Res.*, 38: 9-14, 2004.
- 3) 山根哲郎ら. H. pylori感染者への抗H. pylori urease IgYの効果. 第47回日本農芸化学学会大会, 2003. および第11回日本ヘリコバクター学会, 2005.
- 4) Kuroki m., et al. Passive protection against bovine rotavirus induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Vet. Microbiol.* 37: 135-146, 1993.
- 5) Kuroki m., et al. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Arch. Virol.* 138: 143-148, 1994.
- 6) Kuroki m., et al. Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves. *Arch. Virol.* 142: 843-851, 1997.

図 1

付着性*S.mutans*菌数

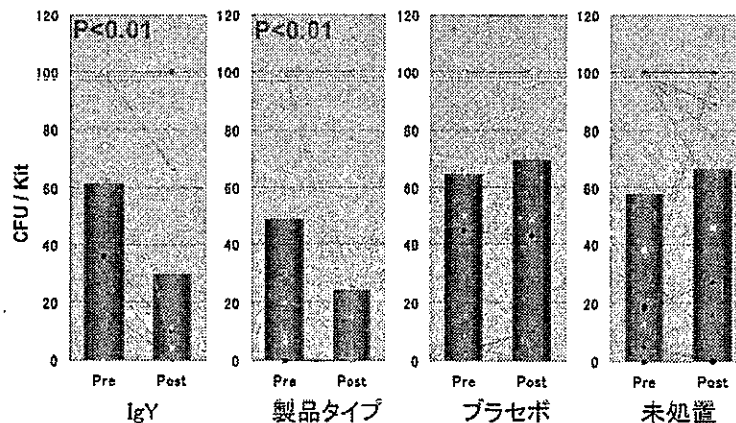


図 2

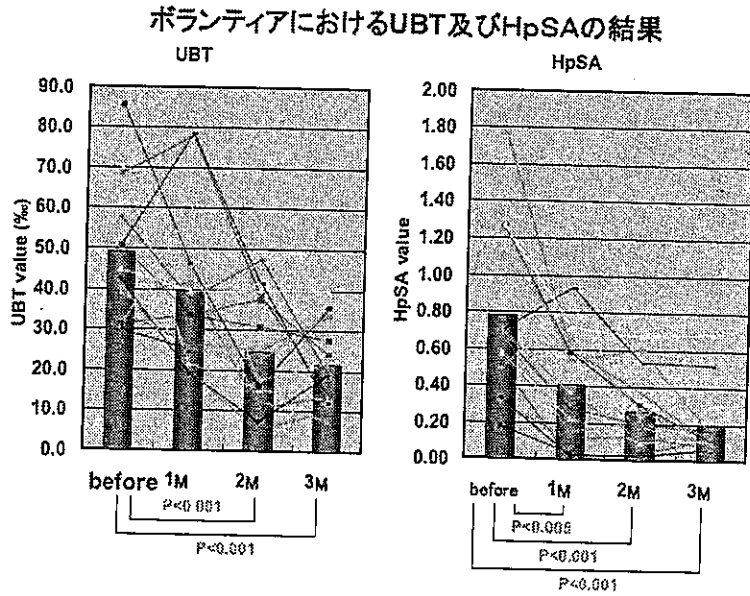


図 3

Effect of anti Stx-2 IgY on mortality in mice infected intestinally with EHEC O157:H7

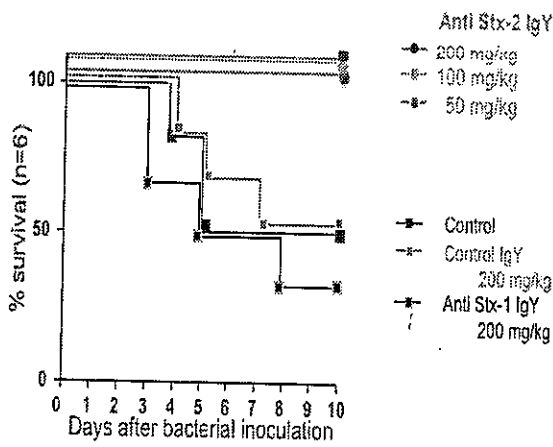
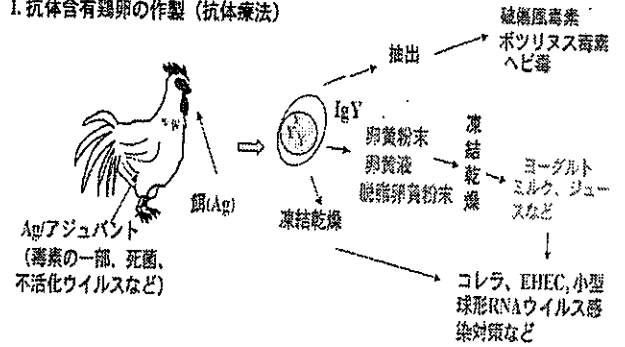


図 4

新しい感染症予防と治療の方法 (案) / つなみ対策

I. 抗体含有鶏卵の作製 (抗体療法)



II. 非病原菌を利用したワクチンの作製 (能動免疫)

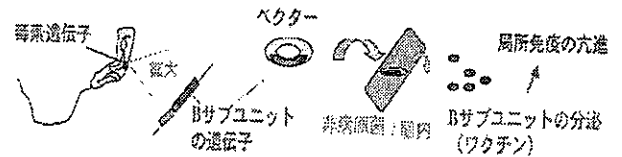


表1 Cross-reactivity between Shimane and KK-3 strains

BRV strain ^a	(serotype)	IgY NAT ^b / 0.1ml		
		anti-Shimane	anti-KK3	Control IgY
KK-3	(10)	1280	81920	<10
Shimane	(6)	81920	1280	<10
NCDV-Lincoln	(6)	40960	640	<10

a, Bovine Rota virus b, neutralizing Ab titer

表2 Protection of suckling mice from BRV-induced diarrhea with homotypic or heterotypic IgY treatment

Challenge virus (dose) ^a	added IgY	IgY NAT ^b /mouse		No. of mice with diarrhea / total no. of mice (%)	
		Shimane	KK-3		
Shimane (7.5)	anti-Shimane	640		0 / 12 ^{**}	(0)
		160		0 / 12 ^{**}	(8.3)
		40		7 / 12	(58.3)
	control	<10	<10	11 / 12	(91.7)
KK-3 (7.0)	anti-KK-3		2560	1 / 12 ^{**}	(8.3)
			640	2 / 12 ^{**}	(16.7)
			160	5 / 12 [*]	(41.7)
			40	9 / 12	(75.0)
	control	<10	<10	11 / 12	(91.7)

a, Log₁₀ TCID₅₀ / mouse.

b, IgY NAT level against in vitro indicator virus.

^{**}P<0.01 (Fisher exact test).

^{*}P<0.05 (Fisher exact test).

表3 Effect of antibodies in neonatal calves

Group ^a	added IgY ^b (NAT)	No. of calves with diarrhea	Cumulative fecal score ^d	Body weight gain ^e kg
1 control		4/4 ^c	12.8 ± 4.8	-3.3 ± 1.6
2 } anti Shimane	3200 x 3	4/4	12.0 ± 3.6	-0.4 ± 1.2 ^b
	6400 x 3	0/4	0.0 ± 0.0 ^b	+1.3 ± 0.4 ^c
<hr/>				
4 control		4/4	14.5 ± 3.7	-4.2 ± 0.7
5 } anti KK-3	6400 x 3	3/4	6.3 ± 4.9 ^b	+0.7 ± 0.8 ^c
	12800 x 3	2/4	2.3 ± 4.5 ^c	+1.1 ± 0.8 ^c

a, 4calves / group; b, neutralizing Ab titer;
c, No. of calves with diarrhea / total no. of calves;
Virus/p.o./~10¹⁰TCID₅₀ / calf
birth ————— 2 hr —————→
(0 day) ↑ IgY/5ml milk/p.o.
(3 times/day x 9 d)
^dFecal score/every day
0, normal
1, mild diarrhea
2, severe diarrhea
^ebody weight
Day10/day0

表4 Infection of neonatal calves at the first field trial

Group	Survived or died (n)	No. of calf	Sex	Cumulative Fecal score ^a	BRV detection	virus titer (TCID ₅₀ /gram of feces)
IgY-treated	Survived (8)	113	♀	12	-	<10 ²
		115	♂	11	-	<10 ²
		117	♂	16	-	<10 ²
		121	♂	11	-	<10 ²
		123	♂	2	-	<10 ²
		127	♂	10	-	<10 ²
		129	♂	5	-	<10 ²
		131	♀	5	-	<10 ²
	Died (2)	119	♀	5 (8d) ^b	+	>10 ⁴
		125	♂	5 (17d)	+	>10 ⁴
Control	Survived (7)	114	♂	13	+	>10 ⁴
		118	♀	2	+	>10 ⁴
		120	♂	10	+	>10 ⁴
		124	♂	3	+	>10 ⁴
		128	♀	13	+	>10 ⁴
		130	♂	13	+	>10 ⁴
		132	♂	5	+	>10 ⁴
	Died (3)	116	♀	14 (11d) ^b	+	>10 ⁴
		122	♀	3 (7d)	+	>10 ⁴
		126	♀	12 (10d)	-	<10 ²

a, 0=normal, 1=soft feces, 2=mild diarrhea, 3=severe diarrhea;
b, time(day) of death