

ニワトリ卵黄抗体の志賀毒素中和活性

¹岐阜薬大・微生物, ²千葉大院・病原分子制御学,
³藤田保衛大・医・微生物, ⁴ゲン・コーポレーション
 ○ネリ パオラ¹, 小林 亮¹, 杉山剛志¹, 清水 健²,
 梅田浩二⁴, 兒玉義勝⁴, 辻 孝雄³, 森 裕志¹

【緒言】鳥類のIgGは血中から卵黄中に移行し、卵黄抗体(IgY)として濃縮されることが知られている。鶏は大量飼育が容易であり、IgYは卵黄から安価に長期間にわたり多量に入手することが可能であることから、近年、免疫した鶏から得られるIgYを腸管内感染症の治療に応用しようとする試みがなされつつある。本研究では、腸管内からのStxの中和・除去を目的とし、鶏をStxで免疫し、抗体が得られるか否か、また、得られたIgY抗体の志賀毒素中和活性の特徴について検討した。

【方法】Stx-1およびStx-2のそれぞれをホルマリンで不活化し、Freund complete adjuvantと共に母鶏を初回免疫し、ついでincomplete adjuvantと共に二次免疫した。卵黄を蒸留水で懸濁、硫酸アンモニウムで塩析後、透析、凍結乾燥して粗精製抗体とし、それぞれを抗Stx-1(Y1)および抗Stx-2(Y2)抗体とした。

【結果と考察】Stxは毒素としての酵素活性を示すA subunitと標的細胞表面レセプターへの結合活性を示すB subunit 5量体から成る。そこで、Stx-1およびStx-2のホロトキシン、ならびに、His-tag付加リコンビナントStx-1B subunit (His-tag Stx-1B) およびStx-2B subunit (His-tag Stx-2B)をPVDF膜にプロットし、Y1およびY2で免疫染色すると、ホロトキシンおよびB subunitのいずれについてもY1およびY2はそれぞれの毒素に特異的な結合活性を示し、交差反応性はほとんどみられなかった。

In vitroにおけるY1およびY2のStx中和活性を検討するため、培養したHeLa細胞にStx-1またはStx-2を添加し、48時間後に10%Alamar Blueを添加して蛍光強度を測定することにより生細胞数を測定し、細胞傷害活性を評価した。Y1およびY2を対応するStxと混合してHeLa細胞に添加した場合、10μg/mlのY1およびY2は細胞傷害活性を完全に抑制し、中和活性を示した。また、HeLa細胞にあらかじめ抗体を加え、ついでStxを加えた場合にも同様にそれぞれ強い中和活性を示した。しかし、この中和活性に交差反応性はみられなかった。

氷冷下のHeLa細胞にStx-1またはStx-2を添加して30分間incubateして標的細胞にStxを結合させた後、Stxを洗浄除去し、ついでY1またはY2を添加した場合、Y1およびY2は中和活性を示さなかった。この成績は、これらの抗体が細胞に結合した後のStxには中和活性を示さないことを示唆する。また、Y1またはY2にHis-tag Stx-1BまたはHis-tag Stx-2Bをあらかじめ混合してincubateし、ついで中和活性を検討した結果、中和活性は消失した。これらの成績はB subunitに対する抗体が細胞への結合を阻害して中和活性を示すことを示唆する。

次に、Stx-1またはStx-2の腹腔内注射によるマウスの死亡をこれらの抗体が抑制するか否かについて検討した。Stx-1(50μg/kg)またはStx-2(1μg/kg)の腹腔内注射によってマウスはほぼ全例が死亡し、これに対してStx腹腔内注射10分前にY1またはY2(100mg/kg)を静脈内注射した場合、死亡はみられなくなった。しかし、Stx-1による死亡はY2によって、また、Stx-2による死亡はY1によって抑制されなかった。また、5mg/mlのストレプトマイシン(SM)を給水中に添加して飼育したマウスにSM耐性EHEC O157:H7を経口接種し、18, 21, および24時間後にマイトマイシンC(MMC)を腹腔内投与するとマウスはほぼ全例が10日以内に死亡する。これに対してMMC処置時期にY2の100mg/kgを4回経口投与した場合、Y2の経口投与はマウスの致死を有意に抑制した。これらの成績は、Y1およびY2がin vivoにおいてもStxの中和・除去に有効であることを示唆する。また、その活性は、Stx-1およびStx-2にそれぞれ交差性を示さないと考えられる。