

ニワトリ卵黄抗体の志賀毒素中和活性についての検討

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

○ 小林 亮¹、ネリ パオラ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

Shiga toxin neutralization activity of chicken yolk antibody

Gifu Pharmaceutical University¹, Chiba University², Fujita Health University³, Ghen Corporation⁴

Ryo Kobayashi¹, Paola Neri¹, Tsuyoshi Sugiyama¹, Takeshi Shimizu², Kouji Umeda⁴,
 Yoshikatsu Kodama⁴, Takao Tsuji³, and Hiroshi Mori¹

【緒言】腸管出血性大腸菌 (EHEC) は志賀毒素 (Stx) を産生して出血性の下痢や腸炎を引き起こし、溶血性尿毒症症候群や脳症を併発し、重症化に至る (1)。EHEC は大腸に定着して増殖し、増殖局所で主要な病原因子である Stx を産生・分泌し、Stx は血中に移行する。Stx は宿主細胞に発現する globotriaosyl (Gb₃)-ceramide などの糖脂質受容体に結合し (2)、細胞内に取り込まれて細胞傷害を引き起こす。治療には感染初期に抗生物質が使用されるが、抗生物質は Stx の遊離を促進して重症化を招く場合のあることが知られており、その使用は必ずしも適切ではない。近年、免疫した鶏の卵黄から得られる抗体 (IgY) を腸管内感染症の治療に応用しようとする試みが行われつつある (3)。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 で免疫して得た IgY 抗体について検討した。IgY は免疫鶏卵黄から長期間にわたり多量に入手・精製できるため、単独または抗生物質と併用して経口投与することによる臨床応用の可能性が期待できる。

【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、10 μ g/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全くみられなかった。

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。

そこで、これらの抗体が in vivo でも中和活性を示すか否かを検討した。Y1 および Y2 をマウスの腹腔内に投与し、10 分後に致死量の Stx を腹腔内投与してその後の生存率を観察した。その結果、Y1 および Y2 は Stx-1 および Stx-2 による致死をそれぞれ特異的に抑制した。

さらに、これらの抗体が EHEC O157:H7 の腸管内感染によるマウスの死亡を抑制するか否かについて検討した。5mg/ml のストレプトマイシン (SM) を給水中に添加してマウスを飼育し、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) を腹腔内投与して、その後の死亡を観察した (4)。このモデルでは MMC の投与によって Stx-2 の産生が促進して死亡することを確認しており、ここでは MMC 処置時期に Stx-2 に対する抗体である Y2 の 100mg/kg を 4 回経口投与した。その結果、Y2 の経口投与は EHEC O157:H7 の腸管内感染によるマウスの致死を明らかに抑制した。以上のように、Y1 および Y2 は in vivo においても Stx の中和・除去に有効であることが示唆された。

【参考文献】

1. Karmali MA et al. 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151: 775-782.
2. Lingwood CA et al. 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Bio. Chem.* 262: 8834-8839.
3. Mine Y and Kovacs-Nolan J. 2002. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J. Med. Food* 5: 159-169.
4. Shimizu, K et al. 2003. Development of a lethal Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infection mouse model using multiple mitomycin C treatment. *Microb. Pathog.* 35: 1-9.