

クリプトスポリジウム P23 糖タンパク抗原に対する 機能性リベチン(Immunoglobulin Yolk : IgY)を 用いた経口受動免疫の野外応用

▼(株)イーダブルニュートリション・ジャパン 岐阜免疫研究所

児玉義勝, ラハマン・シオフィクル, 梅田浩二, ヌグエン・バン・サー

▼大阪市立大学大学院 医学研究科 寄生虫学研究室

寺本 勲

▼金沢大学 医薬保健研究域・寄生虫感染症制御学研究室

所 正治

はじめに

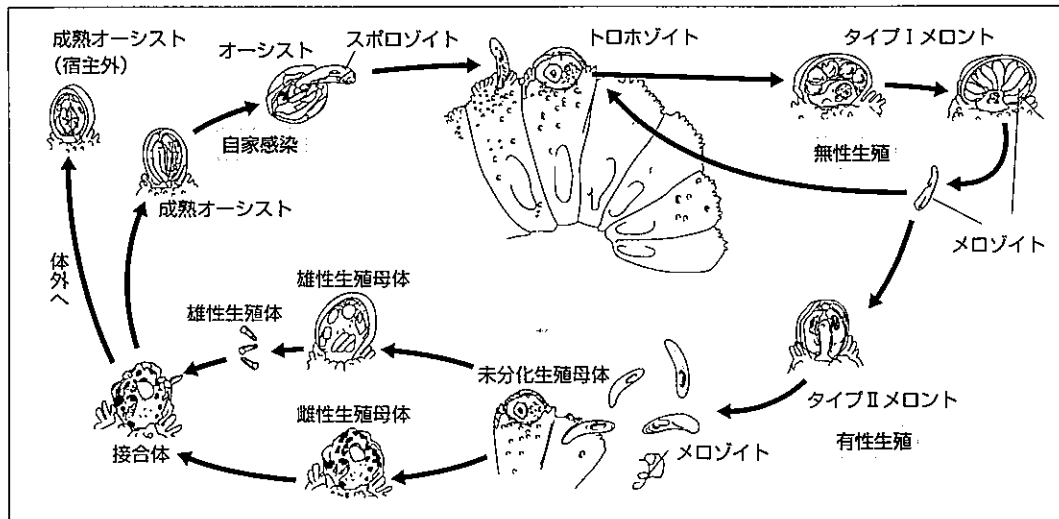
リベチンとは、卵黄タンパク質に約 30% 含まれる水溶性タンパク質のことであり、 α -、 β -および γ -リベチンの 3 種類に区分され、各々の存在比は 2 : 3 : 5 である。 α -リベチンは親トリの血清のアルブミン、 β -リベチンは血清 α 2-グロブリン、 γ -リベチンは血清 γ グロブリンで、卵黄内への輸送機能によって卵黄に移行した物質である。 γ -リベチンは卵黄中に含まれる 7S タイプの IgG であり、機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) と呼ばれる。

この鳥類の生物学的な仕組みを利用すると、トりに感作する抗原の種類を変えるだけで特異性の異なる色々な IgY が生産できる。筆者らは、これまでに子牛の消化・吸収機能に障害を及ぼして生産性を阻害する腸管毒素原性大腸菌 K99、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium* および *S. Dublin*)、ロタウイルス (G6 型および G10 型) ならびにコロナウイルスに対する IgY を開発してきた。本稿では、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) に対する IgY について紹介する。

クリプトスポリジウムは下痢症の子牛糞便から頻繁に検出されるが、本原虫による下痢症状は比較的軽度である。しかしながら、ロタウイルスやコロナウイルスが混合感染すると下痢症状は重篤化し、発育が停滞する。予防対策は

確立していないため、感染子牛には電解質溶液の点滴を施行して脱水症を改善すること以外にない。本感染症は子牛から子牛にオーシストを含む糞便を介して感染が拡大する。このオーシストは、糞便排出時に胞子形成が完了していて、感染性があり、しかも環境に対して抵抗力がある。つまり、オーシストの厚い 2 層の壁が破壊されない限り、オーシストはほとんどの薬剤に対して抵抗力があり、感染性が保持されている。通常の水道水の塩素濃度ではオーシストに対する消毒効果は期待できず、実際、過去に、オーシストに汚染された上水道を介した大規模なヒトの集団発生が起きている。本原虫疾患はウシ以外にヒトにも感染する人獣共通感染症であり、世界中で感染が認められる。1997 年にまとめられた文献調査によると、健康者の下痢症については、発展途上国では 6.1%、先進国では 2.1% が本原虫の感染に起因していた。

本原虫の life cycle を図-1 に示す。本原虫は、オーシストが動物に経口摂取されると、宿主の消化管内で増殖をはじめ。オーシスト内から感染体であるスポロゾイトが放出されるが、これを脱囊という。脱囊したスポロゾイトは消化管の粘膜上皮細胞の微絨毛に付着して侵入する。スポロゾイトは微絨毛内で寄生胞をつくり、無性生殖を行い感染体であるメロゾイトを 8 個形成する。メロゾイトは寄生胞から放出され、別の微絨毛内に付着・侵入して寄生し、感染増殖を繰り返す。このとき、一部のメロゾイトが有性生殖に移行し、オーシストを形成する。オーシストは寄生



【図-1】 クリプトスポリジウムの life cycle 模式図

胞内で成熟し、オーシスト内にスポロゾイトを4個形成する。成熟オーシストは糞便とともに体外に排出され、環境を汚染するとともに同居感染などにより感染を拡大させる。また、一部のオーシストは排泄されずに消化管内で自家感染も起こす。

筆者らは、消化管腔内に放出されたスポロゾイトおよびメロゾイトの腸管粘膜微絨毛への付着と侵入を阻止することによる本症の予防法を開発し、スポロゾイトおよびメロゾイト表面に特異的に結合するIgYの作製と評価を行った。

基礎研究段階では、本原虫感染免疫不全 *scid* マウス糞便から回収したオーシストを脱囊し、パーコールグレジェント法で精製したスポロゾイトを免疫抗原として抗スポロゾイトIgYを作製した。本IgYは、スポロゾイトの腸管粘膜付着性を低下させ、またスポロゾイトの細胞変性を促進することが分かった。さらに、本原虫感染免疫不全 *scid* マウスを用いて本IgYのクリアランス効果を検討したところ、コントロールIgY^{※1}投与群のオーシスト数(Log 10/g)に対し、本IgY投与群のオーシスト数は有意に減少することも確認された¹⁾。

本IgYは、前述のスポロゾイト抗原を産卵鶏に複数回接種して作製するが、スポロゾイト抗原の回収率は低く、大量生産に適さない。そこで、筆者らは、スポロゾイトおよびメロゾイトによる腸粘膜細胞への付着・侵入に関与するとされている、共通糖タンパク抗原P15²⁾ならびにP23³⁾に着目した。これら2種類の共通糖タンパク抗原の組換えタンパク発現システムを活用して、高力価のIgYを大量生産するシステムを確立した。今回、この新たな2種類のIgY

の細胞侵入阻害効果と、感染子牛での経済効果について検討したので、ここに報告する。

※1 = コントロールIgY：非免疫卵より作製したIgY

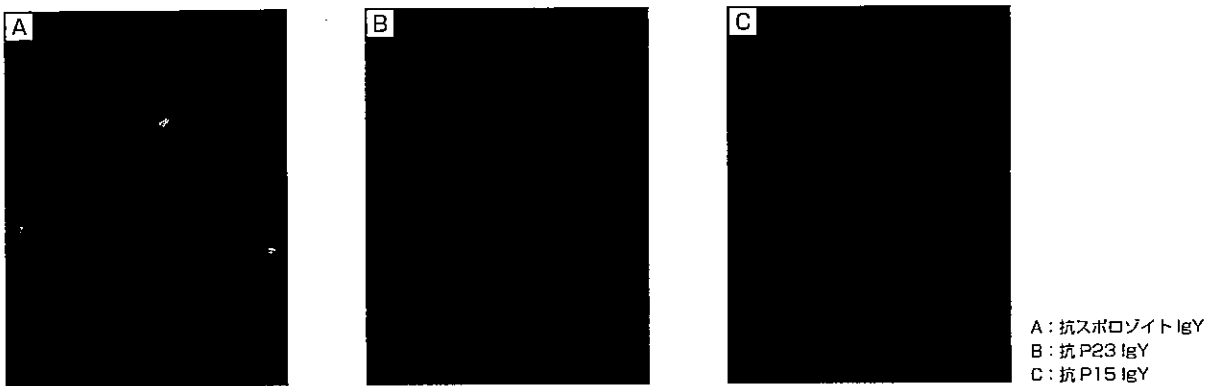
抗糖タンパクP23およびP15-IgYのliveスポロゾイトへの結合反応

クリプトスポリジウムのスポロゾイトは、体表を脱ぎ捨てながらガラス面を滑るような運動をする性質(gliding motility)が特徴的である(写真：A, B)。

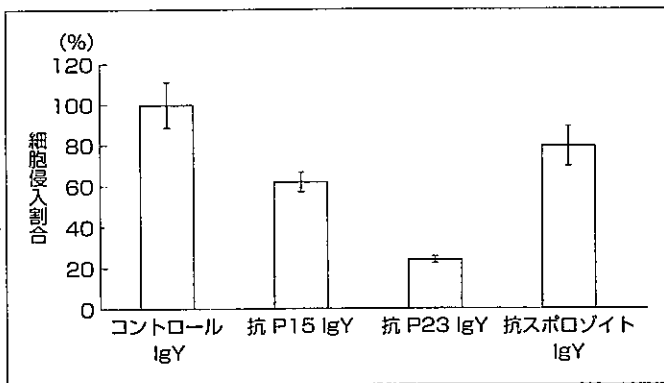
筆者らが作製した抗P23 IgYならびに抗P15 IgYをlive スポロゾイト^{※2}に反応させ、抗IgY 蛍光標識抗体によってlive スポロゾイトに対するIgYの結合状態を観察した。抗P23 IgYを反応させた写真：Bでは、スポロゾイドの輪郭が鮮明であり、さらにガラス面を運動した跡の体表物質も染色されている。このことから、抗P23 IgYは体表に発現している糖タンパクを認識していると考えられる。一方、抗P15 IgYを反応させた写真：Cでは、スポロゾイド全体が染色されており、運動した跡の体表物質は染色されていないことから、内部糖タンパクを認識していると思われる。

スポロゾイト体表に発現しているP23糖タンパク分子は、付着・細胞侵入に関与していることが明らかにされており、感染予防の最も重要な標的分子といえる。本試験でも、抗P23IgYがlive スポロゾイト体表に結合することが確認された。

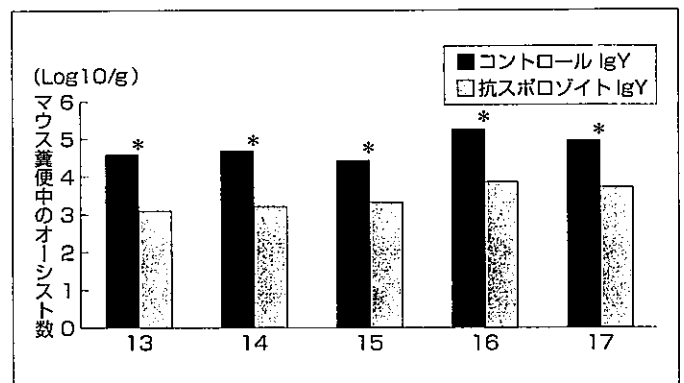
※2 = live スポロゾイト：生きたスポロゾイト



【写真】 抗糖タンパク P23 または P15 IgY の live スポロゾイトへの結合反応



【図-2】 IgY によるクリプトスポリジウムの細胞侵入阻害効果



【図-3】 IgY によるクリプトスポリジウムのオーシストクリアランス効果

P15 または P23 糖タンパク抗原に 対する IgY による細胞侵入阻害効果

本実験では、宿主細胞としてヒト回腸腺がん(HCT-8)細胞を使用した。オーシスト(HNJ-1株)を50 mM 塩酸で37℃ 30分処理後遠心洗浄を行い、*in vitro* 試験に用いた。胆汁および、各々コントロール IgY、抗スポロゾイト IgY、抗 P15 IgY、または抗 P23 IgY を含む培養液を HCT-8 細胞培養プレートに加えて、さらに精製・酸による前処理したオーシストを添加した。氷上に30分置き、その後、37℃ 2時間のインキュベーションにより、脱嚢して放出されたスポロゾイドが HCT-8 細胞に付着・侵入する。HCT-8 細胞に侵入していないスポロゾイドなどを洗浄除去してから、HCT-8 細胞を破碎して DNA 抽出した試料をリアルタイム PCR 法によって細胞侵入スポロゾイトの DNA を定量した。

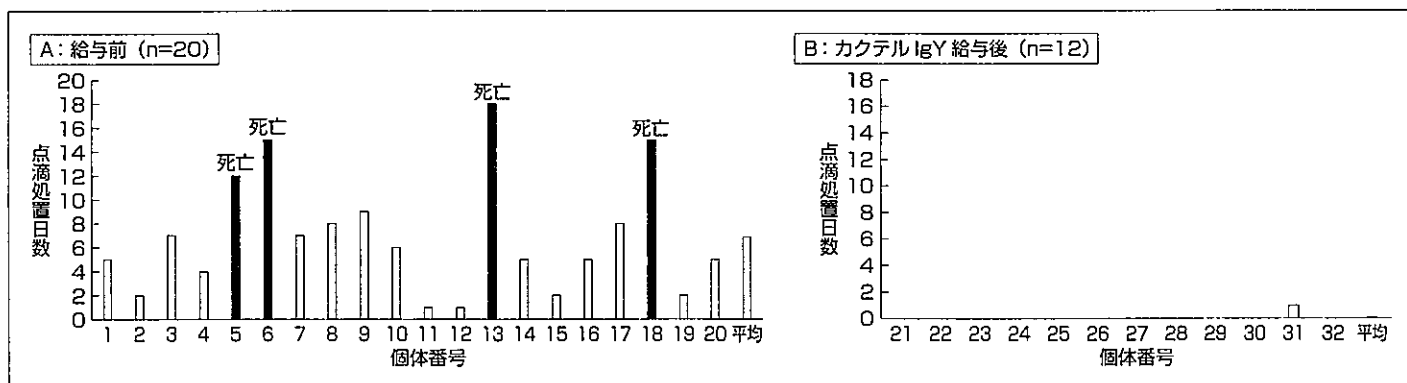
その結果、コントロール IgY 添加群の細胞侵入率が 100%とした時の抗 P23 IgY 添加群の細胞侵入率は最も低

く、23.9%であった(図-2)。これに対して、抗スポロゾイト IgY 添加群または抗 P15 IgY 添加群の細胞侵入率は、各々 79.4%および 62.0%であった(図-2)。

以上の結果から、スポロゾイドに IgY が結合することにより細胞侵入阻害が認められ、特に、スポロゾイト体表に発現している P23 糖タンパク抗原がクリプトスポリジウム症に対する最も重要な標的分子と推定された。

実験的クリプトスポリジウム感染マウスを用いた 抗スポロゾイト IgY のオーシストに対するクリアランス効果

本試験には、抗スポロゾイト IgY 投与群(n=6)とコントロール IgY 投与群(n=6)を設定し、感染2時間前から感染後17日目まで両群のマウスに各々の IgY 粉末 25%含有飼料(W/W)ならびに IgY 粉末 20%含有飲水を与えた。クリアランス効果は、感染後13~17日までの糞便中のオーシスト数とした。その結果、図-3に示したように、抗スポロゾイト IgY 投与群のオーシスト数は、コントロール IgY 投与群に対して感染後13~17日まで有意に減少し



【図-4】 点滴施行日数に及ぼす野外評価

た ($P > 0.05$, t 検定)¹⁾。

クリプトスポリジウムが検出された哺育農場でのカクテルIgYの給与適合試験

クリプトスポリジウム、ロタウイルス、コロナウイルスなどの混合感染による下痢症状が蔓延しているD農場にて、和牛子牛0~1日齢の、導入から導入後30日までの点滴処置日数を評価軸とした野外応用試験を実施した。給与試験を開始する前に導入された子牛20頭の状況は、全頭が下痢症による点滴処置を行っており、平均点滴処置日数は6.9日であった(図-4:A)。さらに重篤症状を示した4頭は、点滴処置を12~18日行ったが回復せず死亡した。死亡子牛からは、クリプトスポリジウム、ロタウイルスおよびウシコロナウイルスが検出された。

新たに導入された子牛12頭を用いて、実際の現場で給与適合試験を実施した。試験サンプルは、クリプトスポリジウムP23抗原、ロタウイルスGタイプ6およびGタイプ10、コロナウイルス、K99線毛産生大腸菌およびサルモネラダブリンに対するカクテルIgYを含有する鶏卵粉末を用いた。なお、前項のクリプトスポリジウム感染マウスを用いた実験にはコントロールIgYが比較対照として用いられたが、実際の現場での評価試験のため、本試験にはコントロールIgYは使用しなかった。点滴回数改善効果を期待して、導入子牛全頭に本カクテルIgY含有鶏卵粉末を、1日1頭当たり10gを朝夕の2回、導入直後から4週間、ミルクリプレーサーに混合して給与した。

その結果、12頭のうち11頭は点滴処置日数が0日で、1頭のみ点滴を1日実施した(図-4:B)。本IgY給与前の平均点滴回数が 6.9 ± 4.9 日であったのに対し、給与後に

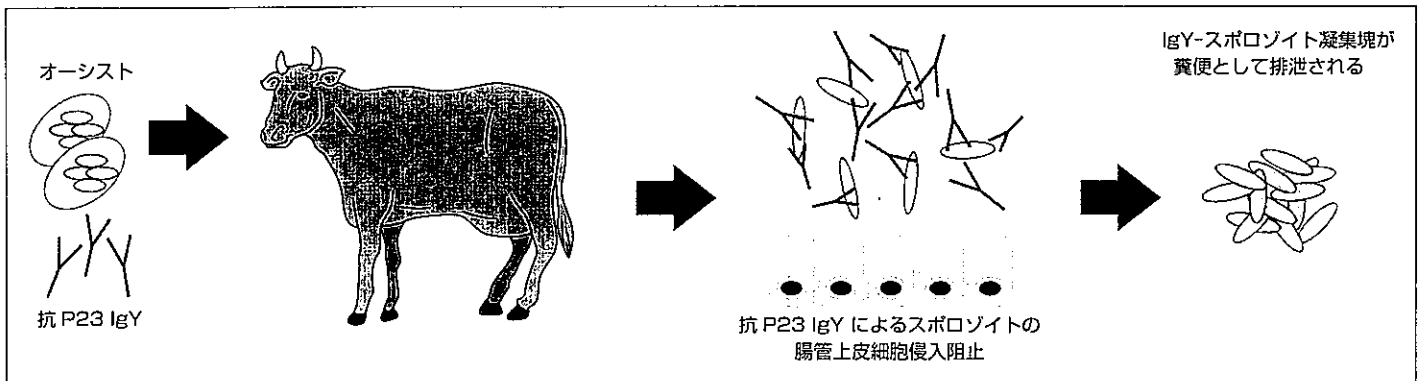
0.1 ± 0.3 日と点滴回数は有意に改善された(図-4:B)。また、給与後の糞便検査では、1頭よりクリプトスポリジウムのみが検出されたが、残りの11頭からはクリプトスポリジウム、ロタウイルスおよびコロナウイルスは検出されなかった。この効果は、本カクテルIgYがクリプトスポリジウムの腸粘膜への付着・細胞侵入を抑制し、同時に腸粘膜に感染しているロタウイルスあるいはコロナウイルスが中和され、感染が阻止された結果と考えられる¹⁾。

抗糖タンパクP23 IgYの想定される作用メカニズム

前項で示したように、オーシストが導入子牛の消化管内に入ると腸管粘膜でスポロゾイトさらにメロゾイトの感染体が放出される。スポロゾイト・メロゾイトの表面に共通に発現しているP23糖タンパク分子は、腸粘膜細胞への付着・侵入機能に大きく関与している。感染子牛に飼料やサプリメントとして給与された抗P23 IgYは、腸管腔内に放出されたスポロゾイト・メロゾイト表面に発現しているP23糖タンパク分子と特異的に反応して、大小のスポロゾイト・メロゾイト凝集塊を形成する。また、抗P23 IgYは感染体表面に結合して腸粘膜上皮細胞の微絨毛への付着と侵入をブロックし、スポロゾイト・メロゾイトは糞便とともに排泄されるものと考えられる(図-5)。

まとめ

①通常、スポロゾイト抗原の調製は、免疫不全scidマウスにオーシストを感染させ、糞便を採取してオーシストを回収する。次いで、オーシスト浮遊液から胆汁を用いて脱糞



【図-5】 抗糖タンパク P23 IgY の作用メカニズム

させ放出したスポロゾイトを集めてパーコールグレジエント法で精製して抗原とするため、本法での大量精製はきわめて困難であった。筆者らは、クリプトスポリジウム感染に関与する共通糖タンパク分子を組換えタンパク発現システムを利用して作製することにより、高力価の IgY 製造システムを確立した。

② P23 糖タンパク抗原に対する IgY は、スポロゾイトの腸管粘膜細胞への侵入抑制率が最も高いことを検証することにより、本病の重要な標的分子であることを確認した。

③ 本原虫感染子牛を用いた給与適合試験では、本カクテル IgY を含むサンプルの給与により電解質溶液の点滴回数が顕著に減少したことから、感染子牛への本カクテル IgY の応用は農場経営の安定化につながることを期待される。

また、本カクテル IgY を子牛に給与することにより畜舎環境のオーシスト数も減少し、ひいては河川水など水道原水の汚染度が低下しヒトへの感染リスクが低減する可能性がある。

引用文献

- 1) Kobayashi C., Yokoyama H., Sa Van Nguyen, et al. : Effect of Egg Yolk Antibody on Experimental *Cryptosporidium parvum* Infection in scid Mice, *Vaccine* 23, 232 ~ 235 (2004)
- 2) Ana Maria Cevallos, Xiaoping Zhang, Matthew K. Waldor, et al. : Molecular Cloning and Expression of a Gene Encoding *Cryptosporidium parvum* Glycoproteins gp40 and gp15, *Infect Immun*, 68, 4108 ~ 4116 (2000)
- 3) F. Javier Enriquez, Michael W. Riggs : Role of Immunoglobulin A Monoclonal Antibodies against P23 in Controlling Murine *Cryptosporidium parvum* Infection, *Infect Immun*, 66, 4469 ~ 4473 (1998)
- 4) 児玉義勝 : 機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) を用いた経口受動免疫の野外応用, *臨床獣医*, 29 (8), 45 ~ 50 (2011)

参考文献

- ・ Hamada S., Kodama Y. : Passive Immunity for Protection against Mucosal Infections and Vaccination for Dental Caries, 187 ~ 197, In *Mucosal Vaccines*. Kiyono H. et al. eds., Academic Press, CA (1996)
- ・ 児玉義勝, 並木秀男, 小澤 智 : 新機能抗体開発ハンドブック, (株) エヌ・ティー・エス出版, 591 ~ 603 (2012)
- ・ Rahman S., Nguyen V.S., Icatlo F.C., et al. : Oral passive IgY-based immunotherapeutics, A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9 (5), 1039 ~ 1048 (2013)