

機関番号：32701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580315

研究課題名 (和文) ウシ初乳免疫抗体の動物腸管内におけるペロ毒素中和作用と蛋白分解酵素抵抗性の研究

研究課題名 (英文) Investigation on neutralizing efficacy against verotoxin and resistance to protease of bovine immune colostrum antibody in mice and beagle dogs

研究代表者

山本 静雄 (YAMAMOTO SHIZUO)

麻布大学・環境保健学部・教授

研究者番号：40130900

研究成果の概要 (和文)：ビーグル犬へ免疫初乳抗体あるいは免疫したウシから採取した血清抗体を経口投与した結果、腸管内における免疫初乳抗体の活性は投与 2 時間後まで変化しなかったが、血清抗体の活性は投与 1.5 時間後までに投与前の 15% に低下した。また、免疫初乳抗体を経口投与したビーグル犬の腸管内から採取した免疫初乳抗体の活性を各クラス別に比較した結果、投与 2 時間後では S-IgA は変化を認められなかったが、IgG あるいは IgM の活性は低下した。さらに、*Escherichia coli* O157:H7 を接種したビーグル犬へ初乳乳清あるいは免疫初乳抗体を投与した後の糞便中の VT2 量は、初乳乳清を投与したビーグル犬では徐々に減少したが接種 5 日後に再び上昇した。しかし、免疫初乳抗体を投与したときの糞便中の VT2 量は免疫初乳抗体投与前に比べ有意に減少した。VT2 を投与したマウスへ免疫初乳抗体より分離した各免疫グロブリンクラス、血清抗体、免疫初乳抗体を経口投与した。その結果、対照群として生理食塩水を経口投与したマウスは全例が死亡した。しかし、S-IgA、IgM、免疫初乳抗体を経口投与したときの生存率はいずれも 93.3% であり、IgG あるいは血清抗体を経口投与した群での生存率はそれぞれ 80% あるいは 60% であった。これらの結果から、VT に対する免疫初乳抗体は、動物腸管内において蛋白分解酵素に抵抗性を示し、VT の活性を中和することが可能であることが明らかにされた。

研究成果の概要 (英文)：The bovine colostrum antibody against verotoxin2 (VT2) was not inactivated after 2 hours after oral administration. However, the activity of serum antibody reduced 15% of prior administration in the small intestine of beagle dogs. Furthermore, the antibody activity of S-IgA did not change; however, the activity of IgG and IgM antibodies decreased after 2 hours of oral administration. With oral administration of bovine colostrum whey without antibody in beagle dogs inoculated *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 producing VT2, the amount of VT2 in feces decreased gradually after administration and increased again at 5 days after inoculation, while bovine colostrum antibody significantly reduced the amount of VT2 in feces the day after oral administration of bovine colostrum antibody. Mice were administered orally each immunoglobulin class antibody isolated from bovine colostrum whey obtained from cows immunized with VT2, serum antibody or bovine colostrum antibody at 1 h after administration of VT2. All mice died after administration of sterilized saline as control. The survival rate was 93.3% after administration of S-IgA or IgM class antibody, or bovine colostrum antibody. The survival rates for IgG class antibody and serum antibody were 80% and 60%, respectively. These results suggest that bovine colostrum antibody against VT neutralized the activity of in small intestine by resistance to protease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：機能性物質、受動免疫

1. 研究開始当初の背景

Escherichia coli O157:H7(以下、O157と略記)感染症の治療に応用することを目的として、ペロ毒素の毒素活性を中和させようとする試みとしてペロ毒素の受容体であるグロボード3 (Gb3) 糖脂質の糖鎖部分を珪藻土に結合させて作製したペロ毒素の吸着剤などやペロ毒素の放出量の少ない抗菌剤の選択などが国内外で検討されている。しかし、いずれも実用化には至っていない。このように未だ有効なペロ毒素への対応策がないために、O157感染症で抗菌剤を用いる積極的な治療ができないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、O157 が産生するペロ毒素 (VT2) で免疫した乳牛の初乳抗体が、動物の腸管内でペロ毒素の中和あるいは吸収阻止に応用が可能であることを動物実験で証明し、将来的に O157 感染症患者の治療時に抗菌剤と共に初乳抗体を併用することが有効であるとの基礎的知見を得ることである。さらに、未だ検討されていない *in vivo* での初乳抗体の蛋白分解酵素抵抗性について検討することにある。さらに、動物腸管内において初乳抗体の蛋白分解酵素に対する抵抗性を免疫グロブリン (Ig) クラス別に明らかにし、どの Ig クラスが動物腸管内でペロ毒素の中和抗体として有効に作用するのかを動物実験で明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、ペロ毒素 (VT2) に対する中和抗体を含む初乳抗体と血清抗体の作製し、ウシの初乳抗体が動物の腸管内で蛋白分解酵素に抵抗性を示し、*in vivo*でVT2の中和活性が発揮できることをビーグル犬を用いた検討した。さらに、初乳抗体由来各Igクラス (S-IgA, IgG, IgM) の *in vivo*における蛋白分解酵素抵抗性とVT2中和能についてビーグル犬とマウスにて検討した。

4. 研究成果

O157 (VT2産生株) に対する初乳抗体をビーグル犬へ経口投与した後の腸管内における抗体活性について検討した。この実験において対照として用いた血清抗体は、ウサギへVT2を免疫し作製したものを用いた。抗体の活性は、初乳抗体が投与2時間後まで変化しなかったのに対して、ウサギの血清抗体は投与1.5時間で10%まで低下した。初乳抗体のIgクラス別では、分泌型IgAの活

性は投与2時間後まで変化が認められなかったが、IgGおよびIgMはそれぞれ60%および40%まで低下した。一方、血清抗体の活性は、投与1.5時間後で既にIgAは20%、IgGおよびIgMは10%まで低下した。さらに、ビーグル犬へ O157 (VT2産生株) を経口接種した後にVT2に対する初乳抗体あるいはVT2に対する抗体を含まない初乳乳清を投与した後の糞便中のVT2量を検討した。その結果、初乳抗体投与後における糞便中のVT2量は有意に減少したが、初乳乳清投与後の糞便中のVT2量は徐々に減少した後、接種5日後に再び増加した。さらに、O157を経口接種した後、初乳抗体、初乳抗体を得たウシの血清抗体あるいは生理食塩水 (対照群) を投与した後における糞便中のVT2量について検討した。初乳抗体投与後における糞便中のVT2量は有意に減少した。一方、血清抗体および対照群における糞便中VT2量は徐々に減少したが、投与前と有意な差は認められなかった。以上のことから、マウスに比べて腸管内に蛋白質分解酵素が多く分泌されると考えられるビーグル犬においても初乳抗体はVT2に対して高い中和能を有することが確認された。

次に、VT2 をマウスへ経口投与した後、免疫初乳抗体より分離した各免疫グロブリンクラス (Ig) あるいはウシの血清抗体を経口投与してマウスの生存率を検討した結果、VT2 と生理食塩水を経口投与した対照マウスでは、投与後 96 時間以内に全てのマウスが死亡した。一方、VT2 と初乳 S-IgA 抗体、VT2 と初乳 IgM 抗体を投与したマウスの生存率は、いずれも 93.3% (14/15) であった。VT2 と初乳 IgG 抗体を経口投与したマウスでは生存率が 80% (12/15) で、VT2 とウシの血清抗体を経口投与したマウスの生存率は 60% (9/15) であった。これらの結果から、初乳の S-IgA および IgM 抗体が単独でも腸管内で VT2 の中和に作用できると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kuribayashi, T., Seita, T., Matsumoto, M., Furuhata, K., Tagata, K. and Yamamoto, S.: Bovine immune colostral antibody against verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7:

Resistance to proteases and effects on verotoxin 2 in small intestine of beagle dogs. *Comp. Med.*, 査読有, 2009, 59, 163~167.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kuribayashi, T. and Yamamoto, S.: Neutralizing activity of bovine colostrum antibody against verotoxin derived from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice. The 21st International ICFMH Symposium, 1-4, Sep., 2008, Aberdeen, UK
- ② Kuribayashi, T. and Yamamoto, S.: The bovine colostrum antibody neutralized activity of verotoxin derived from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年, 京都.
- ③ Kuribayashi, T. and Yamamoto, S.: Resistance to proteases of bovine immune colostrum antibody against verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7 in small intestine of beagle dogs. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 大阪.
- ④ Yamamoto, S., Kuribayashi, T., Seita, T., Furuhata, K. and Tagata, K.: Bovine immune colostrum antibody against verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7 - Resistance to proteases and effects on verotoxin 2 in small intestine of beagle dogs -, 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, USA, 2009.
- ⑤ Yamamoto, S., Kuribayashi, T., Seita, T., Sakurai, Y., Kawaguchi, Y. and Matsuda M: Neutralizing efficacy and resistance to intestinal proteases of bovine immune colostrum antibody against verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7, The Society for Applied microbiology Summer Conference, Brighton, UK.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :

権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 静雄 (YAMAMOTO SHIZUO)
麻布大学・環境保健学部・教授
研究者番号 : 40130900

(2) 研究分担者

福山 正文 (FUKUYAMA MASAFUMI)
麻布大学・環境保健学部・教授
研究者番号 : 40075932
古畑 勝則 (FURUHATA KATSUNORI)
麻布大学・環境保健学部・准教授
研究者番号 : 00308305
栗林 尚志 (KURIBAYASHI TAKASHI)
麻布大学・環境保健学部・講師
研究者番号 : 00386799

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :