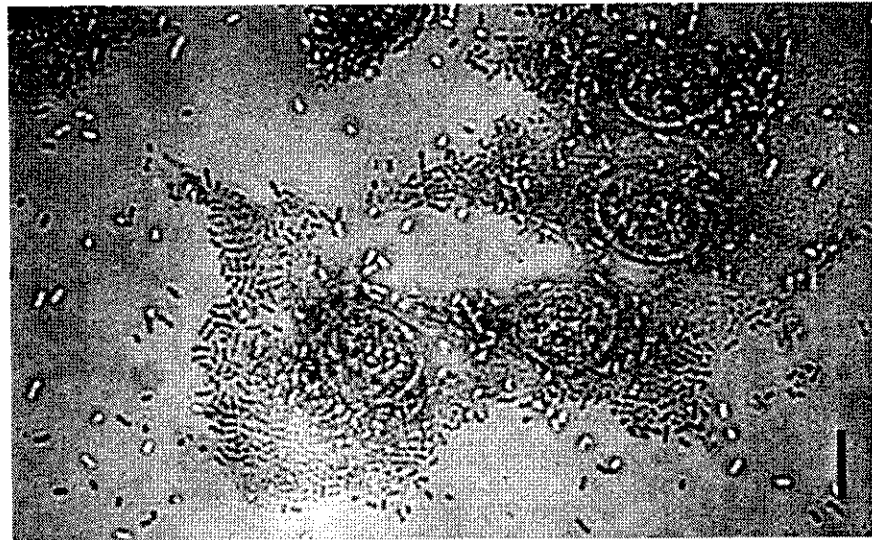
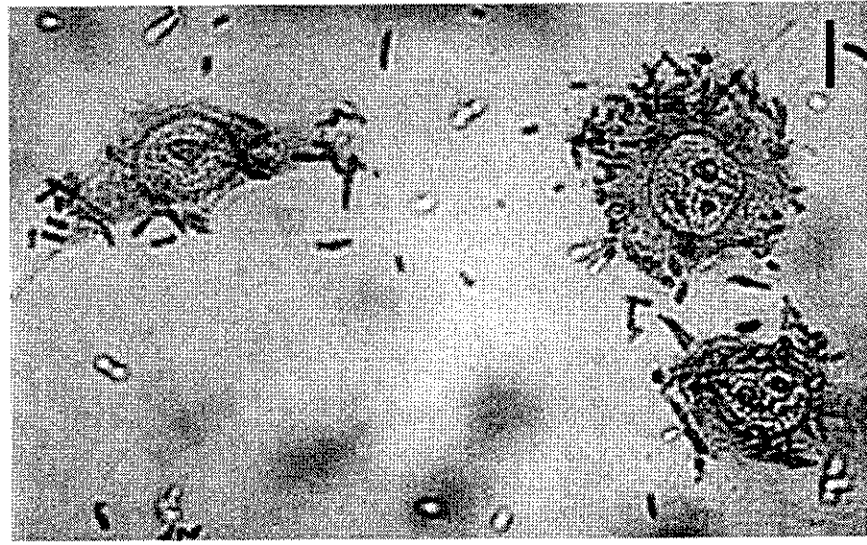


Fig. 1

A: # 990599

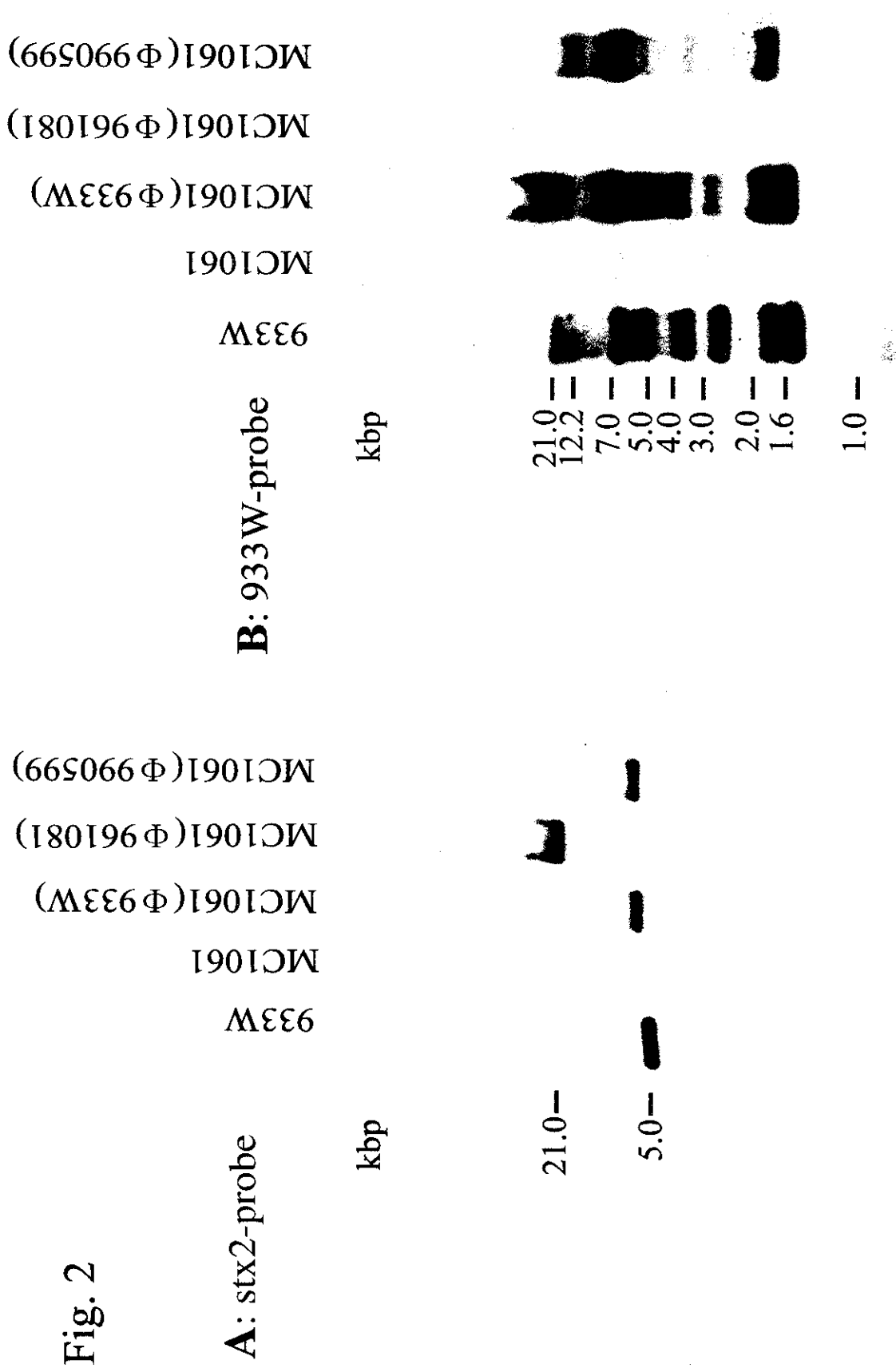


B: # 961081



bar: 10µm

Fig. 2



19990455

p.84-87 は雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

**Evaluation of AFLP, a high-resolution DNA fingerprinting
method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic
Escherichia coli O157:H7 isolates**

Iyoda S, Wada A, Weller J, Flood SJ, Schreiber E, Tucker B,
Watanabe H

Microbiol Immunol. 1999;43(8):803-806

協力研究報告書

非病原菌を抗原運搬体とする出血性大腸菌に対するワクチンの開発

国立感染症研究所 食品衛生微生物部 主任研究官 五十君 静信

研究要旨

出血性大腸菌 O157:H7 の産生する VT1 毒素のエピトープを大腸菌 JM109 株に組み込み、C57BL/6 マウスに経口投与し、ワクチンとしての効果を検討した。免疫したマウスの血液と十二指腸から抽出した試料、盲腸便において、VT1 毒素に対する特異的 I g G または I g A 抗体価の一方または両方の上昇を認めた。

A. 研究目的

出血性大腸菌 O157:H7 のワクチンとして、遺伝子レベルで無毒化した A2B 型ベロトキシン 1 のエピトープとしての妥当性と、非病原菌を抗原運搬体とするワクチンの可能性について検討を行う。

B. 研究方法

毒素活性部位の遺伝子を全く含まないベロ毒素遺伝子すなわち、Verotoxin 1 の細胞への結合に関与する B サブユニットの遺伝子と、B サブユニットの立体構造を安定化する A2 サブユニットをコードする遺伝子を PCR により合成 (図 1 参照) し、プラスミド pGEM-T に組み込み、大腸菌 JM109 株を形質転換する。これにより得られた JM109 (pGEM-T:VT1-A2B)#43 株を、1 週間毎 3 回 C57BL/6 マウスに胃内投与し、免疫を行う。投与前日より、免疫を行った 3 週間にわたって飲水中に組換え体のマーカーであるアンピシリン (100 μ g/ml) を加え、マウス腸管内での JM109 株の定着をサポートする (図 2 参照)。最終投与の 2 週間後に、マウスの血中、十二指腸、糞便中の VT1

および菌体に特異的抗体価を E L I S A 法により調べた。

マウスは 1 群 4 頭で #43 投与、#43+コレラトキシン (CT)10 μ g 投与、JM109(pGEM-T)投与群の 3 群について実験を行い、2 回の免疫実験の結果から JM109(pGEM-T)のタイターを 0 と補正し、抗体価を決定した。

C. 研究結果

大腸菌 JM109 株に組み込んだ VT1-A2B 遺伝子は、逆受け身ラテックス凝集試験およびウェスタンブロッティングにより、VT1 抗原の発現が示された。B サブユニットのペンタマー構造を認識するモノクローナル抗体 13C4 によるネーティブ PAGE-ウェスタンブロットにより、産生された無毒化 VT1 毒素の B サブユニットはペンタマー構造が形成されていることが確認できた。産生された VT1-A2B は、Vero 細胞に対する毒性、マウスに対する毒性は認められず、病原大腸菌 O157 の経口ワクチンとして用いるエピトープとして有望であることが示された。マウスを用いた免疫効果の検討では、VT1 特異的的血中抗体価の上昇が認めら

れた(図3参照)。粘膜免疫のアジュバントとして用いたコレラトキシン CT 添加群では、菌体表面に対する十二指腸中の IgA 抗体価を顕著に上げた(図3B)が、VT1 特異的な抗体価上昇は観察されなかった(図3A)。

D. 考察

マウスに対する経口免疫では、VT1 に特異的な IgG および IgA 抗体価の上昇が確認された。血清について産生された VT1 特異的な抗体が、中和抗体として働くかどうかをペロ細胞に対する VT1 の毒性の中和により検討を行ったところ、一部の血清で中和活性を観察できた。もともと血中抗体価のタイターは低かったため、すべての個体で認められたわけでは無かったが、一部であれ中和活性が認められたことから、VT1-A2B は、エピトープとして有効に機能していることが確認できた。ワクチンとしての有効性については、今後動物個体を用いた感染防御実験が必要と思われる。いずれにせよ、非病原菌に組み込んだエピトープが、経口投与により、マウスに対し、特異的な抗体価を上げることを実証したことは、現在平行して検討している乳酸菌を抗原運搬体とする組換えワクチンの効果が期待できることを示した。

E. 結論

大腸菌に組み込んだ A2B 型 VT1 遺伝子産物は、ペロ細胞やマウスに対する毒性は認められず、マウスに VT1 毒素の中和活性を持つ抗体の産生を刺激した。JM109 株に組み込んだ VT1 エピトープは、マウスの実験で VT1 特異的な抗体価を上昇させ、ワクチン

として機能する可能性を示した。今回の実験により得られた抗体価は、実際の感染防御に有効な抗体価に比べると低く、ワクチンとしての実用には、何らかの工夫が必要と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) S.Igimi. 1999. Lactic acid bacteria as antigens delivery vehicles for mucosal immunization. In Lactic Acid Bacteria: New Frontier Studies. Proceedings of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry symposium. p1-8.
- (2) Izumikawa K, Hirakata Y, Yamaguchi T, Takemura H, Maesaki S, Tomono K, Igimi S, Kaku M, Yamada Y, Kohno S and Kamihira S. 1998. Escherichia coli O157 interactions with human intestinal Caco-2 cells and the influence of fosfomycin. J. Antimicrobial Chemotherapy. 42:341-347.
- (3) 五十君静信. 1999. 粘膜免疫の抗原運搬体としての乳酸菌. 日本乳酸菌学会誌. 10:49.
- (4) 五十君静信. 1998. 乳酸菌を抗原運搬体とする経口ワクチンの開発. 日本乳酸菌学会誌. 8:101-105.

2. 学会発表

- (1) 五十君静信、高橋元秀、網康至、田村慎一。VT1 エピトープの大腸菌および乳酸菌 *Lactococcus lactis* での発現とその免疫効果。第3回日本ワクチン学会。

平成 11 年 11 月 20 日。名古屋。

(2) Shizunobu Igimi. Lactic acid bacteria as antigens delivery vehicles for mucosal immunization. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry symposium Lactic Acid Bacteria: New Frontier Studies. 1999.4. Fukuoka.

(3) 五十君 静信、高橋 元秀、網康至、小西良子、熊谷 進。腸管出血性大腸菌 VERO 毒素無毒化遺伝子の乳酸菌

Lactococcus lactis での発現とその評価。日本細菌学会総会。平成 11 年 3 月。東京。

(4) 五十君 静信、高橋 元秀、網康至、小西良子、熊谷 進。腸管出血性大腸菌ワクチンのエピトープとして用いる VT1 無毒化遺伝子の評価。日本細菌学会総会。平成 10 年 4 月。松本。

図 1. VT1-A2B 遺伝子

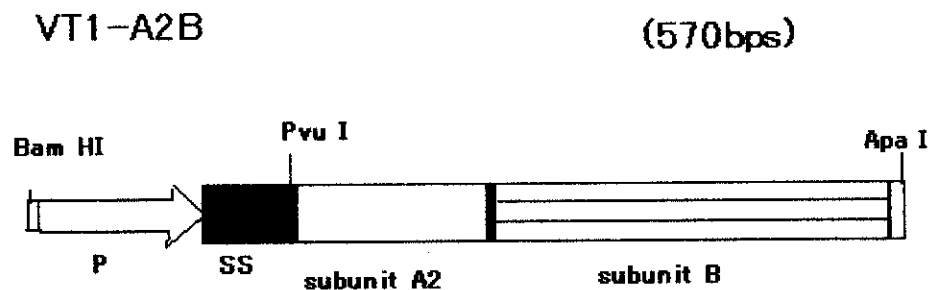


図 2. 免疫日程

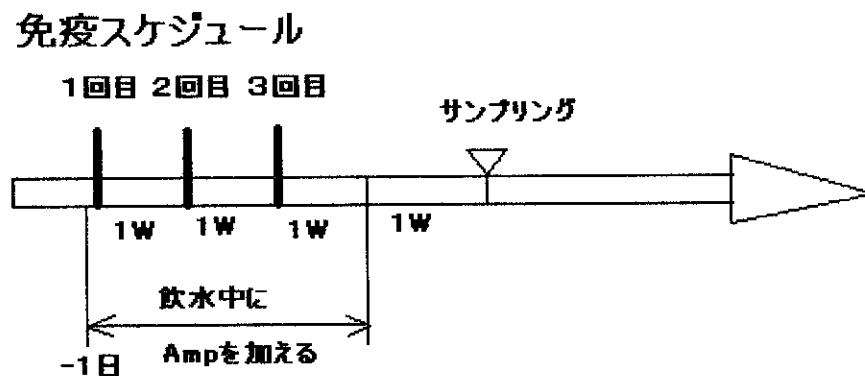
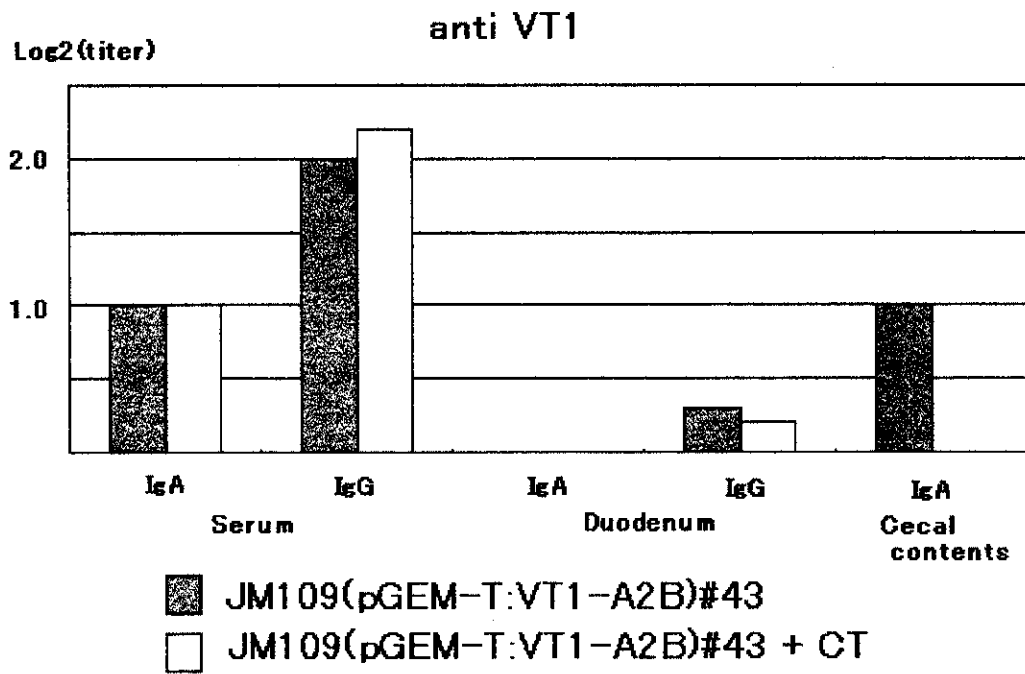
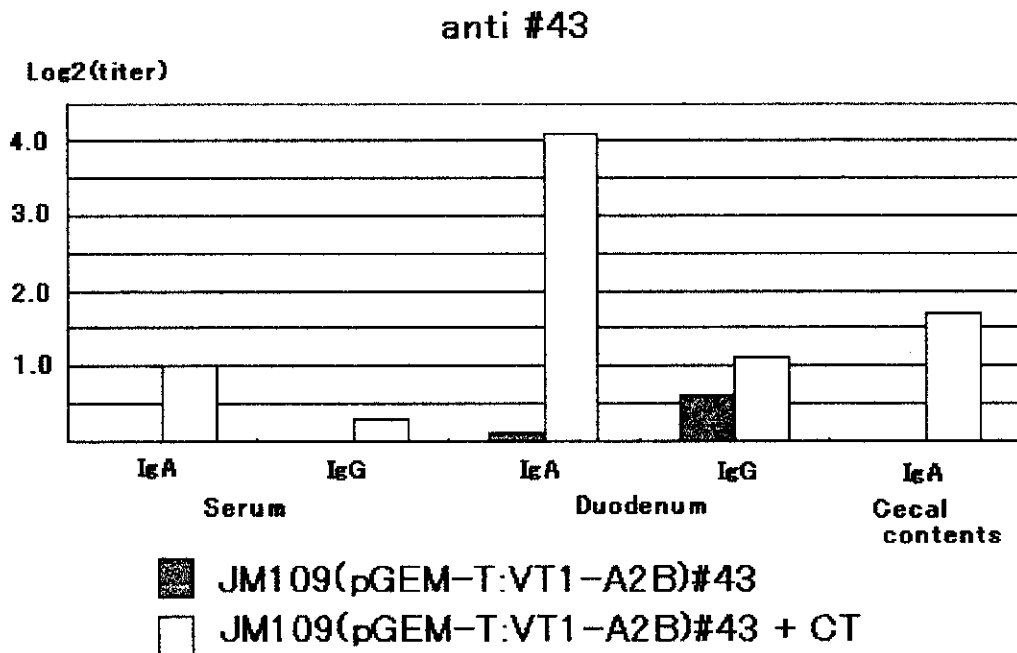


図3. 大腸菌を抗原運搬体とするワクチンの免疫結果

A :



B :



厚生科学研究 厚生科学特別研究事業

“Vero 毒素のトキシイドワクチンの開発と O157 感染発症防止に関する研究”

平成 11 年度 第 1 回研究会議

日時：平成 12 年 2 月 24 日（木） 15:00-17:00

場所：国立感染症研究所 村山分室 第 1 会議室

議 事

1. 班長 挨拶

2. 研究概要報告

(1) リポソーム結合ペロトキシン投与マウスにおけるペロトキシン抵抗性の誘導

内田哲也協力研究員 国立感染症研究所 安全性研究部

(2) 腸管出血性大腸菌のペロ毒素遺伝子に関する研究

伊豫田淳協力研究員 国立感染症研究所 細菌部

(3) O157 の病原性について各種実験動物を用いた病理組織学的解析

永田典代協力研究員 国立感染症研究所 安全性研究部

(4) 実験用サル類における Vero 毒素産生性大腸菌の発病機構に関する研究

寺尾恵治協力研究員 つくば霊長類センター

(5) 病原性大腸菌 O157 感染動物モデルの作成に関する研究

網 康至研究員 国立感染症研究所 動物管理室

(6) 菌の大量培養と Vero 毒素の精製に関する研究

福田 靖協力研究員 国立感染症研究所 細菌製剤第 3 室

(6) 抗 VT2 ウマ免疫血清の作製と使用方法について

高橋元秀班員 国立感染症研究所 細菌製剤第 3 室

3. 総合討論及び事務連絡

本年度分研究報告書の提出 (motohide@nih.go.jp) MS-DOSfile: word、一太郎

総合研究報告書：3 年間の要約 (400 字程度)、書籍、論文、学会報告のまとめ、

投稿論文の別刷、知的所有権、実用新案登録等、経理報告書 3 月 3 日までに