

総説

CTB 発現組換えイネ (MucoRice-CTB) 経口免疫による受動免疫の成立

竹山夏実^{1,2)} *、堤 信幸¹⁾、笹川千尋¹⁾、清野 宏²⁾、幸 義和²⁾

¹⁾ 一般財団法人 日本生物科学研究所 ²⁾ 東京大学医科学研究所

*連絡担当：竹山夏実

〒198-0024 東京都青梅市新町 9-2221-1

Tel: 0428-33-1001、Fax: 0428-31-6166

E-mail: n-takeyama@nibs.or.jp

【要約】

腸管毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*: ETEC) は、早期および離乳期の豚に罹患し、毒素を原因とする水溶性下痢を引き起こす。大腸菌の産生する易熱性毒素である heat labile toxin (LT) に相同性の高い毒素であるコレラ毒素 B サブユニット (CTB) を発現させた組換え米 (MucoRice-CTB) が、肥育豚および妊娠豚の粘膜免疫を誘導するかについて調べた。2ヶ月齢ミニブタへの4回経口投与することで筋肉内投与方法と比較して高い血中 CTB 特異的 IgA の産生を認めた。次に、母豚からの移行抗体により新生豚を早発性下痢から防御するワクチネーションプログラムに即し、妊娠豚に妊娠前に3回、分娩後5日で1回 MucoRice-CTB の経口免疫を行った。免疫した母豚の初乳および経過2週間の常乳に CTB 特異的 IgG および IgA の分泌が認められ、乳汁抗体は CT 毒素に対して中和効果を示した。また、産生された抗体の LT への交差性も確認された。以上のことから、MucoRice-CTB 経口ワクチンによる受動免疫が、豚 ETEC による早発性下痢の防御に有効である可能性が示された。

キーワード：豚、大腸菌症、経口免疫、受動免疫

【緒言】

腸管毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*: ETEC) は、易熱性毒素 (Heat Labile toxin: LT) および耐熱性毒素 (Heat Stable toxin: ST) を産生し、豚に感染すると死亡率は高くないが軟便や水溶性下痢を引き起こす [5, 9]。農場などではロタウイルスやコクシジウム症との複合感染症によって症状が深刻化、持続することもある [3]。ETEC の発症は哺乳期から離乳直後の仔豚に見られ、下痢による発育初期の体重増加率低下は肉養豚の生産

性に影響を及ぼすため、農場の衛生管理に加えてワクチンによる予防が有効となる。ETEC は宿主体内に侵入して増殖するのではなく、腸管腔上皮に定着して増殖し、毒素を産生する。新生豚は十分な抗体産生能力を持たず、獲得免疫が機能を始めるのは生後3-4週以降であるため、生後早期に感染する病原体に対する理想的な防御方法は、母豚の乳汁から供給される抗体による受動免疫となる。

抗体の胎盤移行システムを持たない豚では、初乳中に含まれる抗体は仔豚小腸上皮に発現する Fc レセプターを介して仔豚の血流 / 体内に移行するが、このシステムは生後36時間程度しか持続しない [10]。以降は常乳中に含まれ

受理：2015年11月6日

る抗体が持続的に仔豚腸管腔に直接的に供給されることで、病原体や毒素の中和に働く。初乳に含まれる抗体量は、サブクラス別に IgG が 61.8mg/mL、IgA が 11.3mg/mL である一方、常乳中には、IgG が 1.6mg/mL、IgA が 4.1mg/mL との報告がある [4]。図 1 に示すように、IgG は仔豚の生後約 1 日で、母乳中の相対含有量が急激に低下することに対し、IgA や IgM は哺乳期間中は比較的安定して供給される [4]。また、分泌型 IgA (Secretory IgA: SIgA) は抗体が 2 量体を形成しており、かつ Secretory component が 2 量体に結合することで消化酵素に対して耐性を示すため、効率良く仔豚の腸管に到達する。そのため、SIgA 産生を促す母豚免疫が有効であると考えられる。

コレラ毒素 B サブユニット (Cholera toxin B subunit: CTB) を発現させた組換えイネ (MucoRice-CTB) は東京大学医科学研究所、清野教授らのグループにより開発されたものである [6-8] (図 2)。イネ種子に目的抗原が発現、蓄積する技術によるもので、得られたイネ種子には経口ワクチンとしての応用が期待され、先駆けたマウスやサルの子口免疫試験では血清中の CTB 特異的 IgA を誘導することが確かめられている。豚 ETEC の産生する LT の B サブ

ユニット (LTB) は CTB と高い相同性があるため、本研究では MucoRice-CTB を豚へ子口投与した際の抗体産生誘導能および LTB との交差性を調べ、更に妊娠豚を用いて受動免疫に関わる乳汁への抗体誘導について測定した。

【材料と方法】

免疫動物：肥育豚は 2 ヶ月齢、妊娠豚は 12 ヶ月齢の NIBS ミニブタ (メス) を使用した。また、組換え CTB 筋肉内投与試験には野分 SPF 農場より搬入した 2 ヶ月齢の肥育豚を用いた。

抗原：MucoRice-CTB/N (アミノ酸非改変型) は [12] 植物グロースチャンパー (Panasonic) 内で 12 時間明期 (27°C) / 12 時間暗期 (22°C) の周期で育成し、収穫乾燥した種子はマルチビーズショッカー (安井器械) で微粉末に破碎した。陰性対照群には MucoRice-CTB 作出時の野生米である日本晴 (非組換え体) の種子を同様の条件で破碎して調整した。また筋肉内投与試験には枯草菌発現精製 CTB を使用した。

免疫方法：2 ヶ月齢ミニブタへの MucoRice-CTB/日本晴子口投与は、0.67mg の粉末を PBS 10 mL に懸濁させてカテーテルによる胃

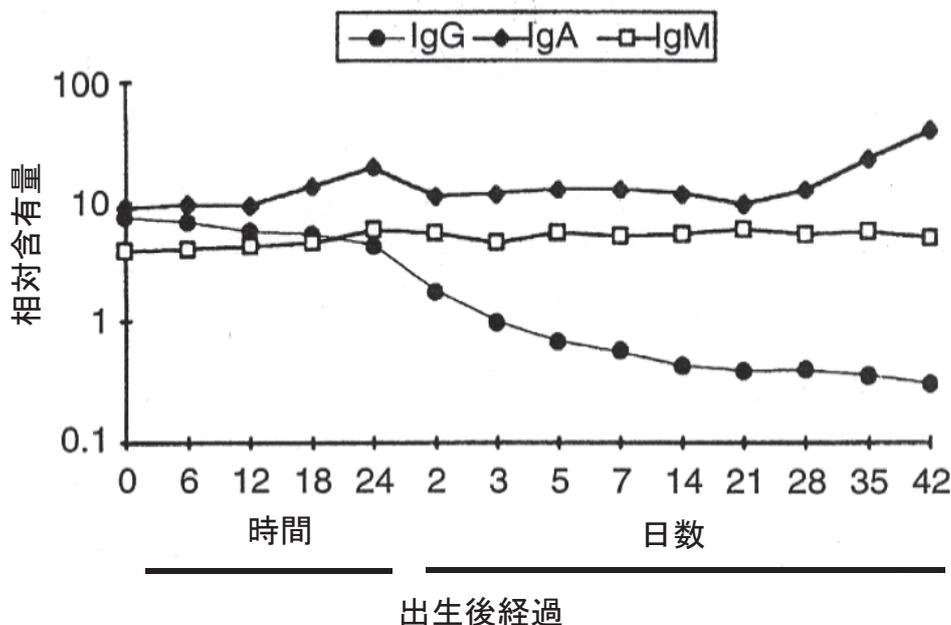
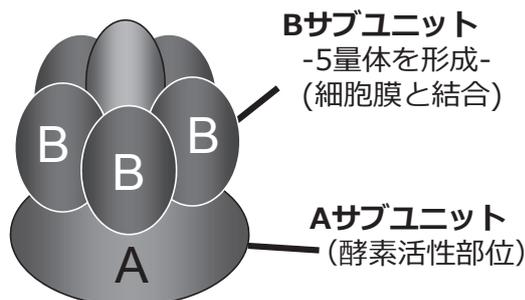


図 1：豚乳汁に含まれる抗体各サブクラスの相対量 (参考文献 4 より引用)
分娩後 1 日を過ぎると IgG 量は低下していくが、IgM や IgA は安定して分泌される。

コレラトキシン



MucoRice-CTB作出過程

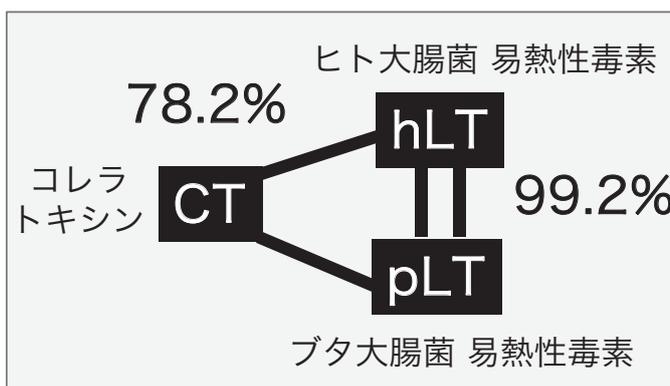


図2：本研究に用いた MucoRice-CTB に発現させたコレラトキシン B サブユニットの構造、ETEC 毒素 LTB との交差性および MucoRice-CTB の作出法

内投与、あるいは粉末を餌に混合して与える混餌投与とし、2週間隔で4回の経口投与を実施した。妊娠豚では0.67mgのMucoRice-CTB粉末を出産予定日の約6週前に混餌投与により初回免疫し、出産予定日4,2週前に2,3回目の免疫を行った。また、分娩後5日目に4回目の追加免疫を行った。枯草菌発現精製CTBの筋肉内投与は1回100 μ g/0.5 mLとし、これを等量の Freund's complete (初回) /incomplete (2,3回目) adjuvant と混合して脚部筋肉内に投与した。実験動物からは経時的に採血および搾乳を行い、血清および乳清を分離して抗体測定材料とした。

抗体測定：ELISA 抗原には D-Galactose カラムで精製した組換え CTB および LTB を使用した。1 μ g/mL (PBS) で一晩 4 $^{\circ}$ C の条件で固相化した後、3% skim-milk/PBS にてブロッキングを行った。血清は 3% skim-milk/PBS-0.1% Tween 20 にて希釈し、血清中 IgG、IgA 測定はそれぞれ 1:200、1:40 倍希釈して使用した。乳清中抗体測定には IgG、IgA それぞれサンプルを 1:200、1:50 に希釈した。標識抗体はサブクラス特異的抗体 HRP-conjugated

anti pig IgG Fc (Nordic Immunology, The Netherlands) および HRP-conjugated anti pig IgA (ACRIS Antibodies GmbH, Germany) を用い、TMB による発色反応を行った。

Monosialotetrahexosylganglioside (GM1) 結合阻害アッセイ：毒素に対する中和能を調べるため血清、乳清サンプルを GM1-CT 結合阻害により調べた。サンプルおよび 50ng/mL の CT を混合して 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、5 μ g/mL (PBS) で一晩 4 $^{\circ}$ C の条件で GM1 を固相化した 96 ウェルプレートに分注した。標識抗体として HRP-Rabbit anti CTB 抗体を使用し、TMB による発色反応を行った。

【結果】

肥育豚に対する MucoRice-CTB 有効性試験

5頭の2ヶ月齢 NIBS ミニブタに2週間隔で4回のMucoRice-CTB経口投与を行った。No. 1-3は強制胃内投与、No. 4, 5は混餌投与を実施した。No. 6-8は対照群として、日本晴(野生米)の粉末を経口投与した。初回免疫より経時的に採血を行い、血中CTB特異的抗体価を測定したところ、少なくとも3回以上の免

疫により MucoRice-CTB 免疫を行った全ての個体で CTB 特異的な IgG および IgA の産生、上昇を認めた (図 3 上)。混餌投与にて免疫を行った No. 4, 5 については強制胃内投与群と比較して CTB-IgA の上昇が高い傾向が認められた。組換え CTB を筋肉内投与した豚 (図 3 下、No. S1-3; 免疫群、No. S4, S5; PBS 投与対照群) では高い CTB-IgG の応答があったにも関わらず、血清中 CTB-IgA の上昇を伴わなかった。MucoRice-CTB を豚 ETEC 経口ワクチンとしての使用することを目的としたため、MucoRice-CTB 免疫で得られたミニブタの血清 (最終免疫後 1 週目) について、ETEC 由来 LTB 抗原に対して交差性が認められるかを

ELISA で検証した (図 4)。その結果、個体間およびサブクラスにより多少のばらつきは認められたが、全ての免疫個体の CTB-IgG および IgA は LTB 抗原に対して交差性を示すことが確かめられた。

妊娠豚に対する MucoRice-CTB 有効性試験

次に、妊娠期のミニブタを用いて肥育豚と同様に MucoRice-CTB の経口免疫試験を実施した。2 匹の妊娠豚に、それぞれ出産予定日 6 週前より 670mg の MucoRice-CTB 粉末 (CTB 抗原含有量 1.9mg に相当) を餌と混合して与えた。肥育豚を用いた試験の傾向に相関して、No. 1 および 2 の妊娠豚で免疫 2 回後 1 週のポ

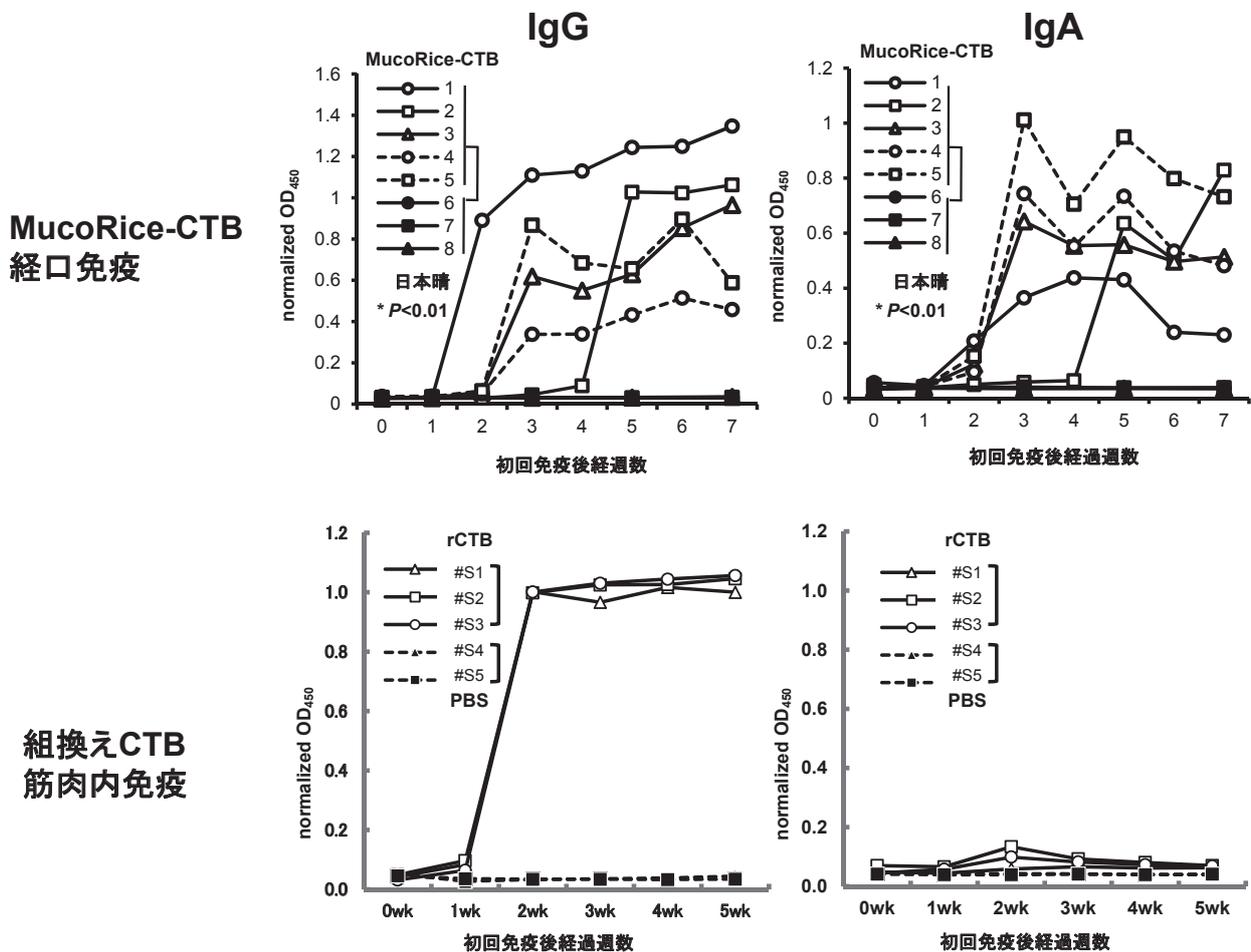


図 3: 肥育豚における CTB 経口投与 (MucoRice-CTB) および筋肉内投与による血中抗体価の比較。A, B; MucoRice-CTB を経口投与したミニブタの CTB 特異的 IgG および IgA。No.1-3; MucoRice-CTB 強制胃内投与、No. 4, 5; MucoRice-CTB 混餌投与、No. 6-8; 日本晴強制胃内投与。免疫は 0, 2, 4, 6 週で実施。初回免疫後 5 および 7 週目において免疫群の抗体価が対照群と比較して優位に高い ($P < 0.01$; student's t test) C, D; 組換え CTB を筋肉内投与 (Freund's Adjuvant 混合使用) した豚の CTB 特異的 IgG および IgA。No. S1-S3; 免疫群、No. S4, S5; 対照群。

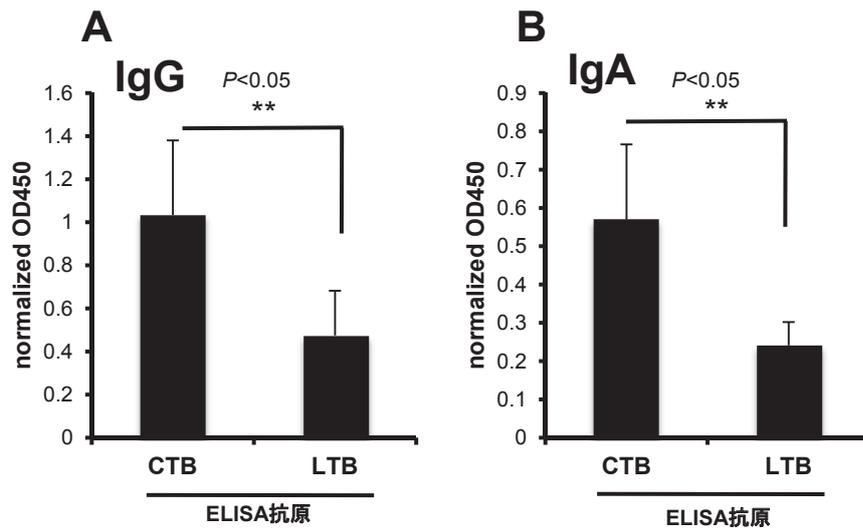


図4: MucoRice-CTB 免疫ミニブタ最終免疫後1週目の血清を用いたLTBに対する交差性確認ELISA。

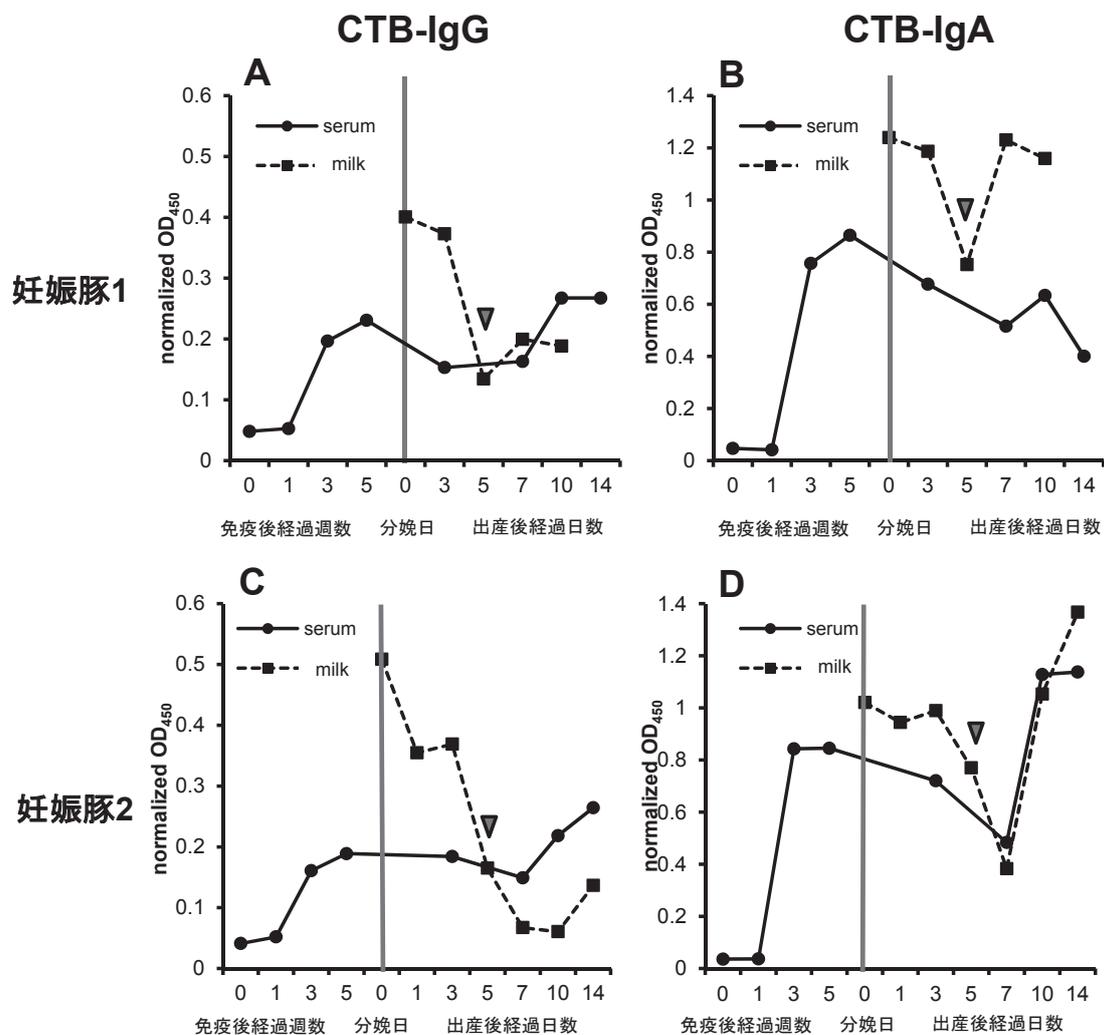


図5: 妊娠豚におけるMucoRice-CTB経口投与による血清中、乳汁中CTB特異的抗体応答。A, B; 母豚No. 1, C, D; 妊娠豚No. 2。A, C; CTB特異的IgG, B, D; CTB特異的IgA。

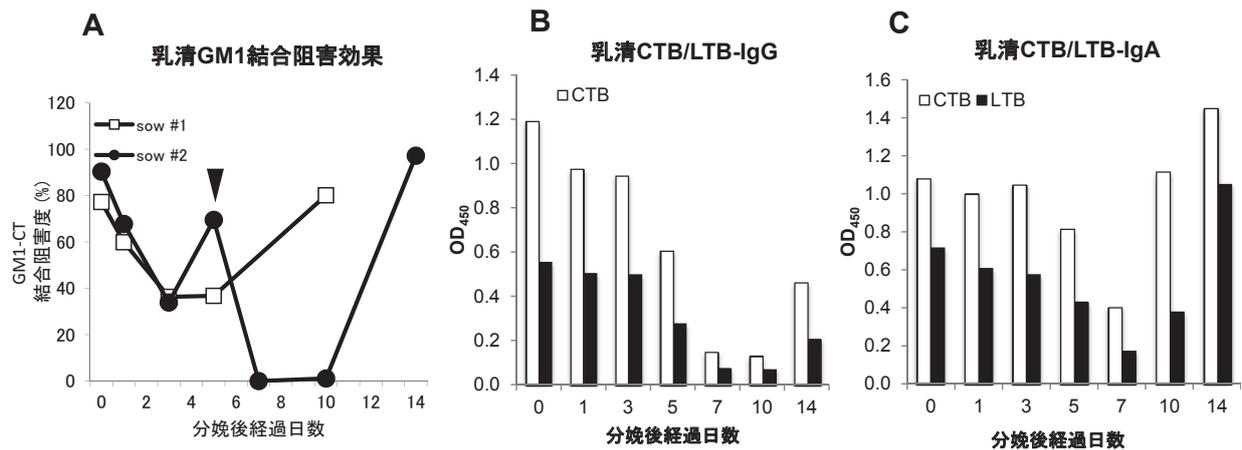


図6：A；妊娠豚乳清のCT阻害効果とLTBへの交差性。分娩後5日目（矢頭）に追加免疫を実施。CTB非免疫母豚乳清のGM1結合阻害アッセイのOD値を0%としてCT結合阻害土(%)を算出。B, C；母豚No. 2乳清のLTBに対する交差性確認ELISA。IgG (B) およびIgA (C) サブクラスを各々測定。

イントよりCTB特異的な血清中IgGおよびIgAの上昇が認められた(図5)。分娩日より免疫母豚から経時的に搾乳を行い、乳清中の抗体を調べた。分娩当日に採取された初乳中には血清中よりも高いCTB-IgG、IgAが認められることが分かった。分娩後2週までの母豚抗体推移を追ったところ、CTB-IgGの血清中抗体価は安定して推移するが(図5AおよびC)、乳清中IgGは分娩後5日目に向けて急激に低下した。母豚No. 2では10日目まで継続してCTB-IgG量が低下した。一方、IgAサブクラスはIgGに比べて異なる傾向が認められた。分娩後経過に伴う抗体価の減少は比較的ゆるやかであり、ほぼ全ての測定ポイントで血清中よりも高い値を持続した。分娩後5日目のMucoRice-CTB追加免疫後、血清および乳清ともにIgG価に若干の上昇傾向が認められた。追加免疫によるIgAの応答はIgGより顕著であり、母豚No. 1では7日目に、母豚No. 2では10日目に、初乳と同程度までCTB-IgA量が回復することが分かった。GM1結合阻害アッセイにより乳清のCT毒素中和能を調べた(図6A)。初乳中の抗体にはいずれの母豚でも80-90%の毒素中和効果が認められた。ELISAにて測定された抗体価推移と相関し、中和能は5-10日まで低下するが、追加免疫によって10, 14日目に初乳と同程度まで回復しており、特にELISAによるCTB-IgAの推移と近い傾

向が認められた。また、母豚No. 2の経過乳清についてLTB交差性を確認するためにCTB/LTB-ELISAを実施したところ、IgG、IgAサブクラス共にLTBに対する応答が確認された(図6B、C)。

[考察]

仔豚のEPEC感染による哺乳期、離乳期の下痢は農場でしばしば死亡率や生産性に悪影響を与える[5, 9]。EPECの対策には、腸管腔に定着し増殖する細菌および産生される毒素に対して有効な粘膜免疫を誘導できるワクチン開発が望まれる。現在市販されている豚大腸菌症ワクチンは、妊娠豚に対して不活化された大腸菌の菌体を筋肉内投与するものが大多数である。筋肉内注射によって誘導されるIgGは母豚の初乳より仔豚小腸Fcレセプターを介して血流に取り込まれ、仔豚体内にEPECに対する抗体を付与する。しかしながら、EPECが腸管腔に分泌する毒素を中和するためには乳汁からの抗体の安定供給が望ましいと考えられる。これまで別報告において大腸菌を経口投与で腸管に定着させ、局所粘膜免疫を誘導する効果が知られているが[2]、大腸菌、ロタウイルスなどの腸管感染症の病原体を不活化させて投与してもこのような効果は認められない[1, 11]。

本研究ではイネにCTBを発現させた種子を粉碎して抗原とし、経口投与方法により豚に粘膜

免疫を誘導できるかを検証した。肥育豚に対して経口免疫および筋肉内免疫法を比較したところ、経口免疫により筋肉内注射では誘導できなかったIgAの誘導が認められた。誌面には示していないが、このとき腸管粘膜においてもCTB特異的IgAの誘導が認められたことから、MucoRice-CTBの経口免疫は優位に粘膜免疫、IgAの分泌を促すことが示された。また今回使用した抗原による経口免疫は大腸菌毒素LTBに対しても交差性を示すことを確認し、MucoRice-CTBを豚大腸菌症に対する粘膜ワクチンとして利用できる可能性を確かめた。哺乳期の豚をETECの感染から防御するためには乳汁からの抗体供給が必要不可欠であるため、実際に妊娠豚を用いた試験で乳汁中の抗体を調べたところ、妊娠期間中に3回、分娩後5日目に母豚へMucoRice-CTBを経口投与することで、2週間継続して乳汁中に毒素中和活性を持つ抗体産生を促すことができたことから、MucoRice-CTBは母子移行免疫に有効な乳汁中への抗体誘導も可能と示された。

世界的に農場からはF4あるいはF18線毛抗原を保有する株が多く分離され、また菌のうち約60%がLT遺伝子を持つ株であることが知られている [13]。大腸菌症の予防に線毛抗原が利用される例もあるが、下痢の直接的原因である毒素を中和する免疫は線毛の血清型に影響を受けずに、幅広い大腸菌株に有効であると考えられる。

タバコやシロイヌナズナ等、植物を応用したワクチンや治療用抗体は現在動物用にも応用されてきているが、家畜用ワクチンとして実用化するためには安価に製造できるシステムが望ましい。MucoRice-CTBは、可食できる植物であるイネ種子に抗原を発現することで、精製工程を経ずにワクチンとして調整でき、またシリジ等の医療用機器を用いず餌との混合のみで投与ができることから、安価かつ動物にやさしいストレスフリーのワクチンを実現できる可能性が高い。更に、MucoRiceのシステムは、他の動物用ワクチンへの経口ワクチンへ発展させる技術として期待できる。

【引用文献】

- [1] Bianchi, A. T., Scholten, J. W., van Zijderveld, A. M., van Zijderveld, F. G. and Bokhout, B. A. 1996 Parenteral vaccination of mice and piglets with F4+ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vaccine* 14 : 199–206.
- [2] Hur, J. and Lee, J. H. 2012. Development of a novel live vaccine delivering enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens to prevent post-weaning diarrhea in piglets. *Vet. Immunol. Immunopath.* 146 : 283–288.
- [3] Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K. and Tsunemitsu, H. 2006. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest* 18 : 350–354.
- [4] Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J. R. and Mayer, L. *Mucosal Immunology*. Third ed. Elsevier Academic Press.
- [5] Moxley, R. A. and Duhamel, G. E. 1999. Comparative pathology of bacterial enteric diseases of swine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473 : 83–101.
- [6] Nochi, T., Takagi, H., Yuki, Y., Yang, L., Masumura, T., Mejima, M., Nakanishi, U., Matsumura, A., Uozumi, A., Hiroi, T., Morita, S., Tanaka, K., Takaiwa, F. and Kiyono, H. 2007. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 10986–10991.
- [7] Nochi, T., Yuki, Y., Katakai, Y., Shibata, H., Tokuhara, D., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nakanishi, F., Ono, G., Mimuro, H., Sasakawa, C., Takaiwa, F., Terao, K. and Kiyono, H. 2009. A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing antibodies but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J. Immunol.* 183 : 6538–6544.
- [8] Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., Kodama, T., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nanno, M., Nakanishi, U., Takaiwa, F., Honda, T. and Kiyono, H. 2010. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 : 8794–8799.

- [9] Van den Broeck, W., Cox, E. and Goddeeris, B. M. 1999. Seroprevalence of F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in regions with different pig farm densities. *Vet. Microbiol.* 69: 207-216.
- [10] Van de Perre, P. 2003 Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* 21 : 3374-3376.
- [11] Yuan, L., Kang, S. Y., Ward, L. A., To, T. L. and Saif, L. J. 1998. Antibody-secreting cell responses and protective immunity assessed in gnotobiotic pigs inoculated orally or intramuscularly with inactivated human rotavirus. *J. Virol.* 72 : 330-338.
- [12] Yuki, Y., Mejima, M., Kurokawa, S., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Tokuhara, D., Nochi, T., Katakai, Y., Kuroda, M., Takeyama, N., Kashima, K., Abe, M., Chen, Y., Nakanishi, U., Masumura, T., Takeuchi, Y., Kozuka-Hata, H., Shibata, H., Oyama, M., Tanaka, K. and Kiyono, H. 2013. Induction of toxin-specific neutralizing immunity by molecularly uniform rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine without plant-associated sugar modification. *Plant Biotechnol. J.* 11 : 799-808.
- [13] Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A. and Francis, D. 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet. Microbiol.* 123 : 145-152.

Oral rice-based vaccine induces passive immunity against enterotoxigenic *E. coli*-mediated diarrhea in pigs

Natsumi Takeyama^{1,2)}, Nobuyuki Tsutsumi¹⁾, Chihiro Sasakawa¹⁾, Hiroshi Kiyono²⁾, Yoshikazu Yuki²⁾

1) Research Department, Nippon Institute for Biological Science.

2) Division of Mucosal Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo.
9-2221-1 Shin-machi, Ome, Tokyo 198-0024, Japan

[Abstract]

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) causes severe diarrhea in both neonatal and weaned pigs. Because the cholera toxin B subunit (CTB) has a high level of amino acid identity to the ETEC heat-labile toxin (LT) B-subunit (LTB), we selected MucoRice-CTB as a vaccine candidate to induce maternal antibody against ETEC-induced neonatal pig diarrhea. Two-month-old minipigs were orally immunized with MucoRice-CTB, and both CTB-specific IgG and IgA antibodies were successfully induced, as well as CTB-specific intestinal SIgA. LTB-specific ELISA confirmed that the induced antibodies by oral immunization of MucoRice-CTB crossreacted with LTB. When pregnant sows were orally immunized with MucoRice-CTB, increased amounts of antigen-specific IgG and IgA were produced in their sera. IgA antibodies in the colostrum and milk remained high with a booster dose after farrowing. MucoRice-CTB could be a candidate oral vaccine for inducing passive immunity to protect suckling piglets from ETEC diarrhea.

Key words: *E. coli*, oral immunization, passive immunity, pig