

研究テーマ  
即効性液性免疫と細菌叢を連携した新規感染症治療法

山口大学大学院 医学研究科  
ゲノム・機能分子解析学  
坂本 啓

### 研究の背景

薬剤耐性菌は急速に発生・拡散しており、病原性大腸菌やサルモネラのような市中感染型の強毒の細菌でも報告されている。今後、薬剤耐性菌による死者は大幅に増加し、癌による死者を上回ると見積もられている（WHO報告）。特に、抗生物質の濫用が著しい発展途上国では、薬剤耐性菌による消化管感染症が蔓延している。そのような危険な細菌が今、国境を越えて広がっている。薬剤耐性菌の発生・拡散への対策は、今や日本国内の医療施設を対象としたものでは不十分である。この世界的な危機に対処するために、抗生物質とは全く別の視点の治療法の開発が切望される。抗菌薬以外の治療法が開発されることで、抗菌薬に頼るほか無かった細菌感染治療に新たな選択肢が出来ると同時に、抗菌薬への依存度が減ることで、細菌が抗菌薬への耐性を獲得する機会を減らすことが出来、既存の抗菌薬を温存することにもつながる。

現在、世界の乳幼児の死亡原因の2位に下痢症があり、特に開発途上国では大腸菌は乳児下痢症の原因として重要な細菌である。その中でも腸管病原性大腸菌（Enteropathogenic Escherichia coli : EPEC）はLocus of enterocyte effacement (LEE) 遺伝子を保有し、腸管粘膜上皮細胞の細胞骨格を利用してA/E病変を形成することで宿主の腸管内に定着する。また、先進国においてしばしばoutbreakを起こす腸管出血性大腸菌のO-157やO-111等も同様の遺伝子を利用して感染することが知られている。

大腸菌等による細菌性下痢の治療法は、中等度以上では抗菌薬の投与が行われる。しかし、近年これらの高病原性の大腸菌に薬剤耐性株が見られるようになり、抗菌薬以外の治療法を構築する必要がある。

本研究ではヒトの腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌に類似したマウスの腸管病原細菌である *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) を用いて、免疫グロブリン経口投与による制御を試みた。また、*C. rodentium* や病原性大腸菌が最終的に腸管内から駆逐されるには常在細菌叢の作用が不可欠であるため、腸管内の菌数を低レベルに抑える細菌叢の採取も試みた。

### 病原菌に対する抗体の誘導と特異性

*C. rodentium* の野生型株と病原因子欠損株をそれぞれ野生型マウスに感染させて誘導される抗体の病原因子に対する反応性を観察した。感染法は経口感染と経静脈感染の二通りを行った。抗体の評価は免疫ブロット法により行った（図1）。

経口感染、経静脈感染共に病原因子に特異的に結合する抗体が産生された（赤矢印および黄矢印）。

図 1

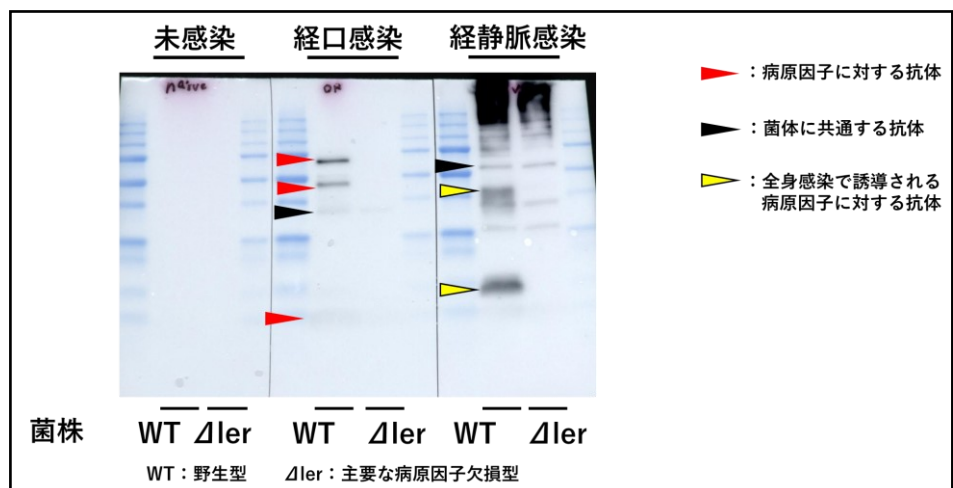


図 2

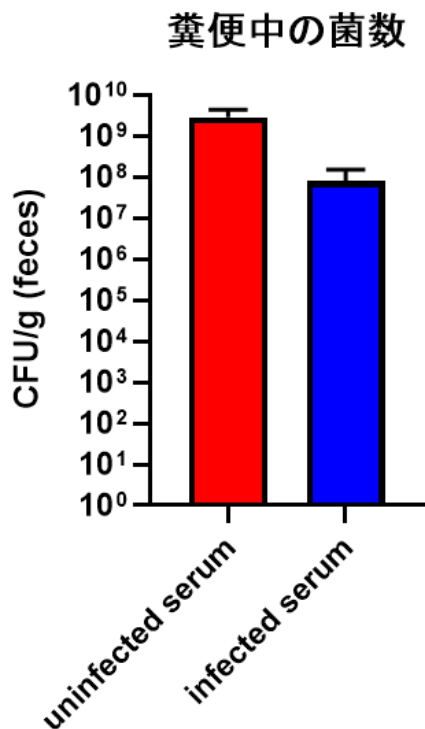
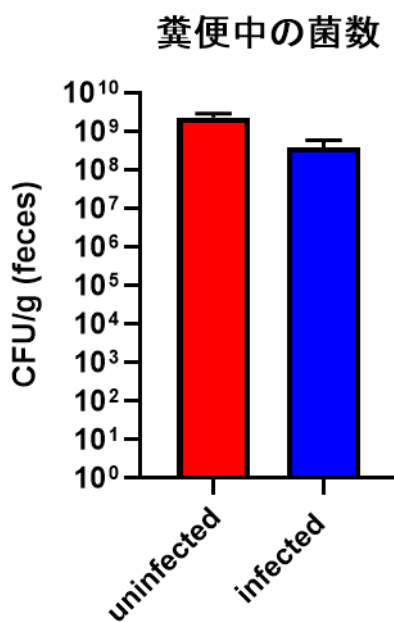


図 3

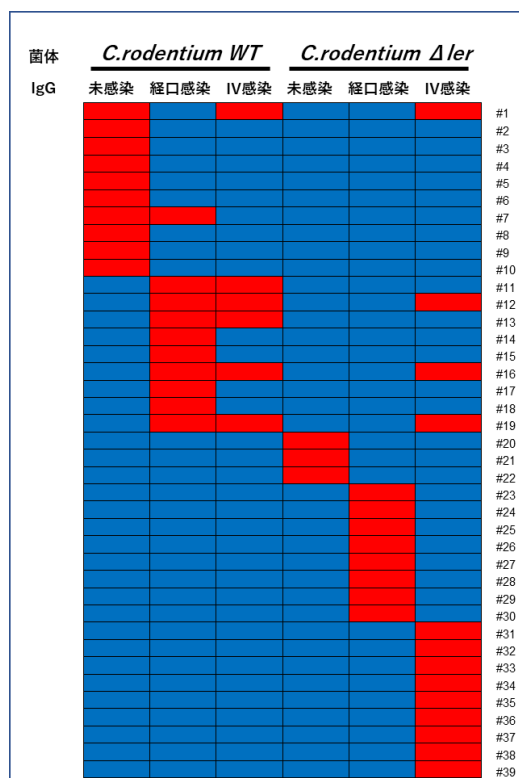


次に、誘導された抗体の有効性を確認するために、*C. rodentium*の野生型株感染後5日目のマウスに、*C. rodentium*野生型株感染後のマウスの血清を経口投与した（図2）。既感染血清の経口投与により糞便中で検出される*C. rodentium*の菌数は最大100分の1程度にまで低下した。

更に、*C. rodentium*の菌数の抑制作用がIgGによるものであることを確認するために血清のIgGを精製し、*C. rodentium*の野生型株感染後5日目のマウスに経口投与した。すると、血清を経口投与した場合と同様に、糞便中に排出される*C. rodentium*の菌数は既感染マウスの血清由来のIgGを経口投与したマウスにおいて有意な低下が見られた（図3）。

病原因子に対して産生された抗体の経口投与が、腸管感染型の病原体に対する治療に有効である可能性が示唆されたことから、病原因子に対する、より純化された抗体の制作に取り掛かった。*C. rodentium*の既感染マウス血清中のIgGを精製しビーズに固定後、*C. rodentium*の野生型株と病原因子欠損株から抽出したタンパクをそれぞれ免疫沈降によりpull downした。抗体に結合したタンパクを質量分析により同定した。検出した。その結果、病原因子に関連するタンパクが複数検出された（図4、矢印）。現在それらを標的とした抗体を作成中。

図 4



### 細菌叢を利用した腸管内病原体の制御

B細胞が欠損する遺伝子改変マウス (*JH*<sup>-/-</sup>等) は*C. rodentium*の感染後、3週間から4週間で死滅することが知られている。本研究中、*JH*<sup>-/-</sup>マウスに*C. rodentium*を感染させたところ、既報通り4週間程度で死亡する個体がほとんどであったが、6週を超えて生存する個体が少数ながら観察された（図5、Long survivor）。

そこで、糞便中の*C. rodentium*の菌数を測定したところ、長期生存個体では通常の生存期間であった個体に比べて菌数が50分の1から100分の1程度に抑制されていることが判明した（図6）。遺伝的背景が全く同じマウスに同時期に感染させたマウスにおいて見られた差であることから、腸内細菌叢の違いがこの菌数の差の原因であると推測された。

そこで、通常の腸内細菌叢とLong survivorの腸内細菌叢について、構成する菌種、代謝産物についての違いを解析中。また、Long survivorの腸内細菌叢を移植することで、被移植個体の糞便中の*C. rodentium*が低下するか否かについても検証を行う予定。

最後になりましたが、本研究に多大なるご支援を頂きましたことを心より感謝申し上げます。本研究で得られました貴重なデータをもとに、今後更に研究に邁進致す所存です。

図 5

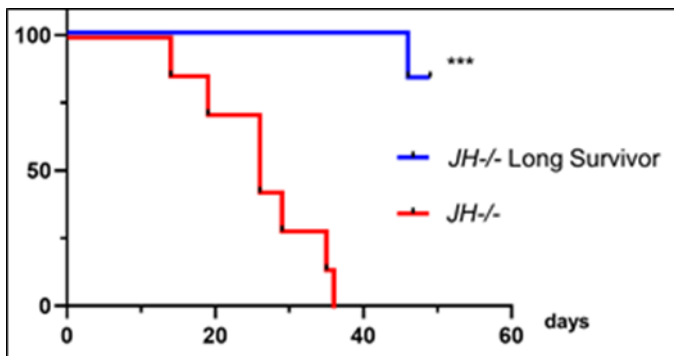


図 6

