

# ビフィズス菌のロタウイルス感染に対する予防効果の検討

帝京大学医学部臨床病理学教室<sup>1)</sup>, 春日部東部クリニック<sup>2)</sup>, 聖オデリアホーム乳児院<sup>3)</sup>

荒木 和子<sup>1)</sup> 篠崎 立彦<sup>2)</sup> 入江 嘉子<sup>3)</sup> 宮澤 幸久<sup>1)</sup>

(平成 10 年 11 月 12 日受付)

(平成 11 年 1 月 8 日受理)

Key words : *Bifidobacterium breve* YIT4064, rotavirus, anti-rotavirus IgA, prevention

## 要 旨

*Bifidobacterium breve* YIT4064 (*B. breve* YIT4064) はマウスにおいて抗ロタウイルス IgA 産生を増強し、ロタウイルス感染を防御することがすでに報告されている。今回は乳幼児にみられるロタウイルス感染に対する同菌体の防御効果の可能性について検討した。

某乳児院内の乳幼児 10 例を投与群として、1 日 1 回、50mg (菌数:  $5 \times 10^{10}$ ) の *B. breve* YIT4064 を 28 日間連続投与し、同室に在室していた乳幼児 9 例を対照群とした。試験期間中、対照群の 9 例中 2 例からロタウイルスの排出が認められたが、10 例のビフィズス菌投与群からはロタウイルスの排出は認められなかった。試験期間を 7 日間ごとに 4 分割し、両群のウイルス排出頻度とロタウイルス特異的 IgA 抗体陽性比率を比較した。その結果、days 8~14 において、対照群のウイルス排出検体数は 32 検体中 4 検体であるのに比べ、菌体投与群は 38 検体中 0 検体であった。ビフィズス菌投与群では days 8~14 において抗ロタウイルス IgA 陽性例が増加しているのに対し、対象群では調査期間を通じて IgA 陽性数の有意な増加はみられなかった。

以上のことから *B. breve* YIT4064 の投与により IgA 抗体産生が増強され、ロタウイルスの排出頻度が有意に減少したと考えられた。

## 序 文

ロタウイルスは冬期乳幼児下痢症の最も重要な病因ウイルスである。ロタウイルス感染症は 6 カ月から 2 歳を中心とする乳幼児に多く、臨床症状は下痢症状に加えて嘔吐、発熱を伴うことが多い。発展途上国ではロタウイルス感染症による乳幼児の死亡率は極めて高い<sup>1)</sup>。本疾患の感染防御には主に腸管で産生され分泌される抗ロタウイルス IgA が関与する。また、妊娠中のウシにあらかじめロタウイルスを接種してロタウイルスに対する免疫グロブリン (抗ロタウイルス IgG) を含むウシ初乳を得た後、乳幼児に投与するとロタウイルス

感染が防御されることが報告されている<sup>2)~4)</sup>。

ビフィズス菌属中の *Bifidobacterium breve* YIT4064 (*B. breve* YIT4064) (以下ビフィズス菌) は腸管免疫系を活性化し<sup>5)</sup>、同時に経口投与された抗原に対する IgA 産生を増強することがマウスをもちいた実験で明らかにされている。同菌体は経口投与されたコレラ毒素に対する抗体産生を増強し、腸管内 IgA 量を増加させた<sup>6)7)</sup>。また、同菌体は経口投与されたロタウイルスに対する抗体産生も増強し、糞便のみならず母乳中の抗ロタウイルス IgA 量が増加する。この母乳を授乳した乳飲みマウスは下痢を発症しなかった<sup>8)</sup>。

今回われわれは、都内の某乳児院の 6 カ月から 24 カ月の乳幼児にビフィズス菌を経口投与して、ヒトロタウイルスに対する予防効果を検討する機

別刷請求先: (〒173-8605) 東京都板橋区加賀 2-11-1  
帝京大学医学部臨床病理学教室

荒木 和子

会を得たので報告する。

### 対象と方法

#### 1. ビフィズス菌試験物質

ビフィズス菌は加熱処理した凍結乾燥死菌体 50mg(菌数:  $5 \times 10^{10}$ )に乳児用粉ミルクを加えて、1g/包で包装されたものである。すべて(株)ヤクルト本社より提供された。

#### 2. 対象者

都内の某乳児院に在院している6カ月から24カ月の19例を対象者とした。これらを2群に分け、10名をビフィズス菌投与群、9名を非投与(対照)群とした。本試験はヘルシンキ宣言に従い実施した。

#### 3. 投与スケジュール

1995年3月4日～3月31日の4週間、投与群には、ビフィズス菌1包を毎日1回、ミルクに混合して投与した。

#### 4. 糞便採取

0日目の採取は投与前に行い、1日目から試験物質の投与を開始し、2日目から1日おきに対象者全員(19名)から糞便を採取した。全糞便試料が揃う間、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 5. 糞便試料の調製

採取糞便0.3gに10倍量(w/v)のリン酸緩衝液(PBS)を加えて、ガラスビーズの存在下で十分に懸濁した。この懸濁液をウイルス定量用試料とした。抗体測定用試料は糞便懸濁液1mlに、10μlのAprotinin(1mg/ml, Sigma), 12.5μlの2%(w/v)牛血清アルブミン(BSA), および12.5μlのGentamicin(3.2mg/ml, Wako)を添加した後、10,000rpm, 5分間遠心し、遠心上清を使用時まで $-40^{\circ}\text{C}$ に保存した<sup>9)</sup>。

#### 6. ウイルスの検出および定量

ロタウイルス抗原の検出は市販のキット\* (ロタクロン\*, トーレ・フジ・バイオニクス)を用いた。使用方法および判定はキットに添付されているマニュアルに従った。

ウイルスの定量はサル由来のロタウイルス SA-11 株の plaque-forming unit (pfu) と ELISA の吸光度より作成した検量線から算出した。

#### 7. ウイルスの同定

糞便中のロタウイルスの亜群および VP7 血清型の同定は ELISA 法で行った。亜群 I, II および血清型 1~4 各々に特異的なモノクローナル抗体\* (ロター MA\*, セロテック)を用いた<sup>10)</sup>。

#### 8. 抗ロタウイルス IgA 価の測定

SA11 株を  $\text{CsCl}_2$  にて精製し、これを抗原として用いて、常法の ELISA 法により測定した。マイクロプレートに精製ウイルス抗原を 4μg protein/ml (100μl/well) 添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ , 3 時間で固相化を行った。0.05% Triton X-100 添加 PBS(以下洗浄液と略記)を用いてプレートを洗浄後、抗原未吸着部分を 1% BSA 溶液 (120μl/well) にて被覆し、 $37^{\circ}\text{C}$ , 1 時間保持した。プレート洗浄後、糞便試料 (1:50 希釈) を 90μl/well 加えて、 $5^{\circ}\text{C}$ , 一晚反応させた。プレート洗浄後、至適濃度のペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgA (Cappel) を 100μl/well で添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ , 1.5 時間反応させた。プレートを洗浄後、基質溶液を 100μl/well 加えて、 $37^{\circ}\text{C}$ , 10 分間放置し、2.5N 硫酸を 50μl/well 加えて反応を停止させた。各 well の 492nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Titertek Multiskan PLUS MKII, Flow) を用いて測定した。抗体価は  $\text{OD}_{492}$  の吸光度値で表した。

#### 9. 総 IgA 量の測定

ELISA サンドイッチ法で測定した。マイクロプレートに至適濃度の抗ヒト IgA (Cappel) を 100 μl/well で添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ , 3 時間で固相化を行った。被覆処理後、糞便試料 (1:  $10^3$ ~1:  $10^4$  希釈) を 90μl/well 加えて、 $5^{\circ}\text{C}$ , 一晚反応させた。プレートを洗浄後、至適濃度のペルオキシダーゼ標識抗ヒト secretory component (Dako) を 100μl/well で添加し  $37^{\circ}\text{C}$ , 1.5 時間反応させた。以降の操作、および使用した緩衝液類はすべて前記の抗ロタウイルス IgA 価の測定方法と同様に行った。糞便試料中の総 IgA 量は、標準抗体(ヒト分泌型 IgA, Chemicon)を用いて作成した検量線から算出し、糞便 1g あたりの IgA 量に換算して求めた。

#### 10. 統計処理

菌体投与群(試験群)と非投与群(対照群)との間の違いを  $\chi^2$  検定により検定した。

# 成 績

## 1. ロタウイルス排出に及ぼすビフィズス菌投与の影響

ロタウイルスの排出は対照群の2例に認められたが、ビフィズス菌投与群からは検出されなかった(Fig. 1). 排出総検体数は、対照群では112検体中5検体、菌体投与群では133検体中0検体であった。

ビフィズス菌をマウスパイエル板細胞に添加した際、IgA産生細胞への分化・成熟を経て、7日目にIgA産生量が最大になる事から<sup>11)</sup>、ビフィズス菌の抗体産生増強作用は経口投与開始7日目以降に認められると思われる。そこで、試験期間を7日間ごとに4分割しビフィズス菌投与の効果を検討した。ビフィズス菌与群ではいずれの期間においても排出がみられなかった。対照群においては、

Days 0~7では1/33検体、days 8~14では4/32検体であった。また、下痢が発症した検体は各群とも1検体あったが、両検体からロタウイルスは検出されなかった(Fig. 1)。さらに、ウイルス排出量をOD値より換算した。対照群の5検体から排出されたロタウイルス量は糞便1gあたり、0日目は $2 \times 10^6$  pfu (No. 4), 12日目は $9 \times 10^6$  pfu (No. 2) および $6 \times 10^6$  pfu (No. 4), 13日目はいずれも $1.6 \times 10^7$  pfu (No. 2, No. 4) 相当であった。また、検出されたロタウイルスは、すべてA群の垂群II, 血清型1であった。

## 2. IgA産生に及ぼすビフィズス菌投与の影響

### a) 抗ロタウイルスIgA

全糞便検体について抗ロタウイルスIgA価を測定した。抗体は28日間の間に、対照群の9例中8例に、ビフィズス菌投与群の10例中10例に検

Fig. 1 Detection of rotavirus in stool samples. A : *B. breve* YIT4064 group ; B : control group. Day 0 : before the administration of *B. breve* YIT4064, day 2 : the second day of the administration of *B. breve* YIT4064 to *B. breve* YIT4064 group, ○ : rotavirus-negative, ● : rotavirus-positive, [ ] : diarrhea

case No.	Days after starting of test														
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
9	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
10	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

case No.	Days after starting of test														
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
9	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Fig. 2 Detection of anti-rotavirus IgA in stool samples from *B. breve* YIT 4064 group and control group. ◎ : antibody-positive (OD<sub>492</sub> titer = >0.100), ○ : antibody-negative (OD<sub>492</sub> titer = <0.100).

case No.	<i>B. breve</i> YIT4064				Control			
	Periods of administration (days)				Periods of administration (days)			
	0-7	8-14	15-21	22-28	0-7	8-14	15-21	22-28
1	○	◎	○	◎	○	○	○	○
2	◎	○	◎	○	○	○	○	◎
3	○	◎	◎	○	◎	◎	◎	ND
4	◎	◎	○	○	○	◎	○	○
5	◎	◎	◎	○	◎	○	◎	◎
6	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
7	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
8	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
9	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	○
10	◎	◎	○	○				

Table 1 Difference of anti-rotavirus IgA in stool sample between *B. breve* YIT4064 group and control group

Group	No. of infants with anti-rotavirus IgA (positive/tested)			
	Periods of administration (days)			
	0-7	8-14	15-21	22-28
<i>B. breve</i> YIT4064	6/10	9/10	7/10	5/10
Control	6/9	5/9	5/9	5/8

出されたが、その抗体価は個体間および同一個体においても採便日間でかなりのばらつきが認められた。そこで、各例の7日間毎の抗体価の平均値を算出し、 $OD_{492}$  値 $>0.10$ であるものを陽性、 $<0.10$ を陰性としてFig. 2に示した。また陽性頻度をTable 1に示した。対照群では、4分割期間における抗ロタウイルスIgA抗体陽性例率は56%から63%と変化は認められなかった。しかし、ビフィズス菌投与群の陽性例率はdays 0~7において60%と対照群とほぼ同率であったが、days 8~14において90%に増加した。Days 15~21では70%、Days 22~28では50%に減少した。Days 8~14における投与群の抗ロタウイルスIgA抗体陽性頻度は、対照群に較べ有意差は見られなかったものの増加が認められた( $p=0.086$ )。

#### b) 総IgA量

ビフィズス菌投与群の総IgA量は $1.08 \pm 0.88$  mg/g、対象群は $0.71 \pm 0.77$  mg/mlと投与群において高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった。また、各検体において抗ロタウイルス抗体価と総IgA量との間に相関は認められなかった。総IgA量は抗ロタウイルスIgA価と同様に個体間および同一個体の検体間で大きな違い(約1,000倍)が認められた。

### 考 察

ビフィズス菌の投与2週目においてロタウイルス特異的IgA抗体保有例数に増加傾向がみられた。また投与群においてロタウイルスの排出がみられなかった。これらのことからビフィズス菌がヒトにおいても抗ロタウイルスIgA産生を増強し、ウイルスの排出を阻止または減少させることが推測された。

今回、試験を実施した某乳児院では、1994年2月と11月、および1995年2月にロタウイルス下痢症の流行があった。今回の対象者は全例この期間在院しており、これらの流行期において19例中、計15例の糞便からロタウイルスが検出されている。今回の調査期中、ロタウイルスの排出があったのは対照群の2例(No. 2, No. 4)のみであった。これら2例からは、この乳児院における過去3回のロタウイルス流行期間中にウイルスが検出され

ていなかった。しかし、同様に過去にウイルスが検出されていないビフィズス菌投与群の2例(No. 6, No. 9)からはウイルス排出は認められなかった。同施設においてこれまでに3回ものロタウイルスの流行があったこと、また、これまでにウイルス排出が見られなかった乳幼児4例のうち1例ではDay 0~7において、すでに糞便中に抗ロタウイルスIgAが検出されていることなどから、今回対象とした19例すべての乳児がこれまでにロタウイルス感染をうけている可能性は高い。2週目以降にロタウイルス特異的IgA抗体が検出されたのは、投与群で10例全例(100%)、対象群では9例中7例(78%)であった。以前に、13例の乳児を対象とし、ロタウイルス感染とロタウイルス特異的局所IgA抗体の産生を調べた結果では、13例中9例(70%)でロタウイルス特異的IgA抗体の上昇がみられた<sup>12)</sup>。今回の成績と比較すると、対照群での抗体上昇率は、以前の成績よりやや高いが、同等の上昇率であった。やや高いのは、今回の例が再感染であるためと考えられる。対照群および以前の成績に較べ、投与群で全例にロタウイルス特異的IgA抗体の上昇がみられたのは、ビフィズス菌による抗体産生の増強効果と考えられた。

ロタウイルス特異的IgA抗体排出例はビフィズス菌投与群では投与2週目(days 8~14)で増加する傾向が見られた。この結果は、マウスにおける実験でビフィズス菌が腸管免疫細胞に遭遇1週間後に抗体産生増強作用が認められることと一致している<sup>11)</sup>。以上のことから、今回の試験期間中にロタウイルスの再流行がおり、対照群でロタウイルスの増殖・排出が見られたが、ビフィズス菌投与群は感染初期に抗ロタウイルスIgA産生が増加し、ロタウイルスの増殖・排出が阻止されたことが推測された。

糞便中の総IgA抗体量の成績からは、ビフィズス菌投与による総IgA量の有意な増加は認められなかった。マウスに同菌体を投与した実験でも同様の結果が得られている。総IgA量も抗ロタウイルスIgA価と同様に大きなばらつきが見られた。しかし、総IgA量のばらつきと抗ロタウイ

ルス IgA 価のばらつきの間に相関は認められなかった。成人男子ボランティアを対象に行った同菌体投与試験では、得られた各糞便材料間の総 IgA 量のばらつきは 10 倍以内であった（データ未発表）。したがって、今回の乳幼児糞便における抗体価のばらつきは、乳幼児に特徴的なことである可能性も考えられたが理由は不明である。

今回の試験により、ビフィズス菌 (*B. breve* YIT 4064) は抗ロタウイルス IgA 産生を増強し、ウイルスの排出阻止効果があることが明らかとなった。今後、ロタウイルス初感染における、同ビフィズス菌の抗ロタウイルス IgA 増強効果を明らかにしたい。

# 文 献

- 1) Walsh JA, Warren KS : Selective primary health care : An interim strategy for disease control in developing countries. N Engl J Med 1979 ; 302 : 967-974.
- 2) Ebina T, Sato A, Umezu K *et al.* : Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihumanrotavirus antibody. Med Microbiol Immunol 1985 ; 174 : 177-185.
- 3) Hilpert H, Brussow H, Mietens C, Sidoti J, Lerner L, Werchau H : Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. J Infect Dis 1987 ; 156 : 158-166.
- 4) Brussow H, Hilpert H, Walther I, Sidoti J, Mietens C, Bachmann P : Bovine milk immunoglobulins for passive immunity of infantile rotavirus gastroenteritis. J Clin Microbiol 1987 ; 25 : 982-986.
- 5) Yasui H, Nagaoka N, Hayakawa K : Augmentation of anti-influenza virus hemagglutinin antibody production by Peyer's patch cells with *Bifidobacterium breve* YIT4064. Clin Diagn Lab Immunol 1994 ; 1 : 244-246.
- 6) Yasui H, Nagaoka N, Mike A, Hayakawa K, Ohwaki M : Detection of *Bifidobacterium* strains that induce large quantities of IgA. Microb Ecol Health Dis 1992 ; 5 : 155-162.
- 7) 保井久子 : ビフィズス菌の免疫賦活機能. 月刊フードケミカル 1993 ; 5 : 32-38.
- 8) Yasui H, Kiyoshima J, Ushijima H : Passive protection against rotavirus-induced diarrhea of mouse pups born to and nursed by dams fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. J Infect Dis 1995 ; 172 : 403-409.
- 9) Burns JW, Krishnaney AA, Vo PT, Rouse RV, Anderson LJ, Greenberg HB : Analysis of homologous rotavirus infection in the mouse model. Virology 1995 ; 207 : 143-153.
- 10) 荒木和子, 陳 再歴, 葵 長海, 他 : 乳児院におけるロタウイルス感染症—4 流行期の観察—. 臨床とウイルス 1993 ; 21 : 231-235.
- 11) Yasui H, Ohwaki M : IgA production and intestinal microflora : Augmentation of IgA production by *Bifidobacterium breve*. J Clin Electron Microscopy 1991 ; 24 : 5-6.
- 12) Shinozaki T, Araki K, Ushijima H *et al.* : Coproantibody response to rotavirus in an outbreak in a day-care nursery. Eur J pediatr 1986 ; 144 : 515-516.

Trial of Oral Administration of *Bifidobacterium breve* for the  
Prevention of Rotavirus Infections

Kazuko ARAKI<sup>1)</sup>, Tatsuhiko SHINOZAKI<sup>2)</sup>, Yoshiko IRIE<sup>3)</sup> & Yukihiisa MIYAZAWA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Laboratory Medicine, Teikyo University School of Medicine

<sup>2)</sup>Kasukabe East Clinic, <sup>3)</sup>St. Odelia Infant Home

It was investigated that *Bifidobacterium breve* YIT4064 (*B. breve* YIT4064), Which had augmented IgA production and prevented rotavirus-induced diarrhea in mice, prevented rotavirus infection in infants. The effect of *B. breve* YIT4064 was evaluated in ten infants from an infants home who received 50mg of the bacterium every day for 28 days (the *B. breve* group). Nine infants did not receive this (the control group). Though rotavirus shedding in the control group was detected from 2 (a total of 5 stool samples) of 9 infants (a total of 112 stool samples), it was not detected in any infants (a total of 133 stool samples) in the *B. breve* group during the administration period. From day 8 to day 14 of the test, rotavirus shedding was detected from 4 of 32 stool samples in the control group, but was not detected at all from 38 stool samples in the *B. breve* group. The frequency of rotavirus shedding in the *B. breve* group was significantly lower than that in the control group. Further, the frequency in appearances of anti-IgA in stool samples in the *B. breve* group showed a tendency to increase in comparison with the control group from day 8 to 14 of the test. The oral administration of *B. breve* YIT4064 significantly decreased rotavirus shedding in stool samples and prevented rotavirus infection.