

平成10年度 厚生科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

研究報告書

Vero毒素のトキソイドワクチンの開発と

O157感染症発症防止に関する研究

班長 高橋元秀

国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

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

平成10年度 研究組織

主任研究者 (班長)

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

分担研究者

荒川宜親 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部長
倉田 毅 国立感染症研究所 感染病理部長
小室勝利 国立感染症研究所 安全性研究部長
山田章雄 国立感染症研究所 つくば霊長類センター長
渡邊治雄 国立感染症研究所 細菌部長
網 康至 国立感染症研究所 動物管理室 主任研究官

協力研究者

小宮貴子 国立感染症研究所 細菌製剤第3室 研究官
福田 靖 国立感染症研究所 細菌製剤第3室 研究官
長岡芳昭 国立感染症研究所 細菌製剤第3室 研究官
永田典代 国立感染症研究所 安全性研究部 研究官
原嶋綾子 国立感染症研究所 安全性研究部 研究官
内田哲也 国立感染症研究所 安全性研究部 主任研究官
寺尾恵治 国立感染症研究所 つくば霊長類センター 室長
小野文子 (財) 予防衛生協会 研究官
高阪精夫 (財) 予防衛生協会 研究官
須崎百合子 国立感染症研究所 動物管理室 研究官
五十君静信 国立感染症研究所 食品衛生微生物部 主任研究官
杉山純一 (株) デンカ生研 部長
大隈邦夫 (財) 化学及血清療法研究所 次長

事務及び経理担当者

岡宮洋子

目 次

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要	主任研究者 高橋元秀	
2. 総括研究報告書	主任研究者 高橋元秀	1
3. 分担研究報告書		
(1) 菌の大量培養と Vero 毒素の精製に関する研究	荒川宜親	6
(2) 病原性大腸菌 O157 感染動物モデルの作成に関する研究		
2. 腸管からの毒素吸収におけるマウス系統差	網 康至	11
(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	倉田 毅	16
(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	山田章雄	20
(5) リポゾ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	小室勝利	28
(6) 腸管出血性大腸菌のペロ毒素遺伝子に関する研究	渡邊治雄	37
4. 関連研究の学会報告および論文掲載		46
5. その他		
研究班会議事録		47
タイ依託研究中間報告書		48

研究報告書概要

①研究費の名称=厚生科学研究費

②研究事業名=厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

③研究課題名 = Vero 毒素のトキソイドワクチンの開発と O157 感染症発症防止に関する研究

④国庫補助金精算所要額 = 22,000,000

⑤研究期間 (年度) = 1997-1999

⑥主任研究者名=高橋元秀 (国立感染症研究所)

⑦分担研究者名=荒川宜親 (国立感染症研究所 細菌・血液製剤部), 倉田 毅 (同, 感染病理部), 渡邊治雄 (同, 細菌部), 小室勝利 (同, 安全性研究部), 山田章雄 (同, つくば霊長類センター), 網 康至 (同, 動物管理室)

⑧研究目的 = EHEC 感染症の発症予防に、トキソイドワクチンによる予防効果とウマ抗毒素による治療の有効性を、本研究で確立した動物モデルを用い検討する。また、作製したウマ抗毒素血清を用い、ジフテリア等の治療に現在用いられている筋肉内又は静脈内投与方法の有効性を検討する。さらに、EHEC が腸管内で産生した毒素、または抗生物質療法で菌体より遊離した毒素を特異的に吸着除去する療法を合わせて検討する。一方、作製した抗毒素を標準化し、標準品として国内外に供給する。特に、抗 VT2 血清は WHO においても国際標準品が用意されていないため、精度管理された技術、測定法を用いて標準化を行い WHO に標準品として提供する。

⑨研究方法 = (1) 昨年度報告した精製方法について再検討し、毒素の純度を上げるために粗毒素を 60%硫酸塩析する前に、新たに低濃度の処理工程を加え、イオン交換カラムを用いた HPLC による精製方法を検討した。(2) EHEC : O157 感染動物モデルの作製 : マウス感染モデルにおける菌投与後の系統差を、感染に対する高い感受性を有する BALB/c、非感受性の ddy、C57BL/6 を用いて、毒素レセプターと考えられている GB3 の存在及び中性糖脂質の毒素との結合能を検討した。マウス小腸粘膜組織からの中性糖脂質の抽出は粘膜上皮を剥離、洗浄後、遠心沈査をクロロフォルム : メタノールに浮遊後、超音波処理して遠心した上清を回収した。中性糖脂質の毒素との結合性は抽出した糖脂質をプレートに展開し毒素を作用させた後、ウサギ免疫抗毒素血清を反応させ DAB で発色、測定した。(3) 病原性について各種動物の病理組織学的解析 : カニクイサルに VT1 をマウス 0.1、1.0、100LD50 /Kg 濃度で静脈内投与し、臨床的、血液学的、免疫学的変化について検査すると共に、解剖後各組織の病理組織

学的な検索をおこなった。血液学的な検査項目として毒素投与後、臨床生化学検査、血液凝固能試験及び主要リンパ球サブセットレベルの経時的变化を調査した。また、剖検所見及び採取組織を HE、PTAH、ベルリン染色等をおこない病理組織学的に検索した。(4) トキソイドワクチンの試作と評価：VT1、VT2 をグルタルアルデヒドと共にリポゾームに取り込んだワクチンをマウスに3回腹腔内投与した後、経時的に採血し血中抗体価を ELISA で測定すると共に、昨年確立したマウス感染モデルの方法で菌を投与して発症阻止効果を検討した。また、現行トキソイドの無毒化に用いられているホルマリンによるトキソイド化を安定剤としてアミノ酸を添加した条件で検討した。(5) 標準品及び治療用抗毒素用のウマ抗毒素血清の作製：ウマの免疫には、VT2 リポゾームワクチンを基礎免疫として皮下注射し、追加免疫として VT2 を静脈内注射した。経時的に採血して血中抗毒素価が十分に上昇したことを確認した後、頸動脈より1回約5Lずつ部分採血した。血中抗毒素価の測定は、昨年度確立した Vero 細胞を用いた細胞培養法とマウスの致死を指標とする方法で行った。(6) O157 に溶原化している stx-converting phage の多様性に関する研究：PFGE 型が判明している EHEC のうち国内単離 O15720 株と米国で単離された7株の解析を行った。精製したファージ DNA を stx 1 ファージは制限酵素 EcoRI で、stx2 ファージは SmaI で切断し、アガロースゲル電気泳動で切断パターンの比較し、さらに、ファージ DNA 及び染色体 DNA 間を比較するために stx1 又は stx2 遺伝子に特異的なプローブを用いてサザンブロッティングによる解析を行った。

結果と考察＝(1) 30%飽和の工程を組み入れることにより、最終毒素の純度を比活性で比べると約30倍上昇した。しかし、最終精製毒素の回収率は従来と比べ2.5分の1に低下した。(2) 菌感染マウスのモデルの系統差を検討するために、菌を経口的に投与後、経時的に糞便の菌数を測定した結果、マウスの系統による大きな差は認められなかった。また、感染・発症に感受性の違いが認められた数種の系統マウスの小腸粘膜組織中の G3 及び抽出した中性糖脂質との VT 結合能を試みたが、いずれも存在していないことが判明した。(3) 毒素を各種実験動物に静脈内投与して、臨床観察及び病理組織学的解析を行った結果、全ての動物で血管内皮、尿細管の病変が見られた。動物種の違いで特徴的に見られた臨床症状は、ラット、カニクイサルで下痢症状が観察されたが、他の動物では見られなかった。VT1 の投与ではカニクイサルとハムスターでは肺水腫が著明に見られた。VT1 を投与したカニクイサルは、投与後2日目に沈鬱、体温低下を示し死亡した。剖検所見では血液凝固時間の延長、フィブリノーゲン量の急増、血小板機能の低下等が認められた。なお、微量毒素を投与したサルは血液・生化学検査値と血液凝固能に慢性的な変化が認められ、ヒトの HUS のモデルとなり得ることが伺えた。(4) VT1 または VT2 リポゾームワクチンを注射して ELISA 価を測定した結果、抗 VT1 に対する IgG 価は1回注射後検出されたが、抗 VT2 は VT1 に比べて低い値であった。両者とも2回注射により高い応答を示した。3回注射後2週目に毒素を静脈内注射した結果、すべてのマウスは無症状で生存したが、

対照マウスは体重減少、尿量の増加等特異的な症状を観察しすべて死亡した。また、O157 生菌を経口投与した結果、全てのマウスは毒素特異的な症状は観察しなかったが、対照マウスではすべて死亡した。(5) ウマの免疫は基礎免疫で3回皮下注射、液状トキソイドを皮下及び静脈内に注射した。血中抗毒素価を測定した結果、血清希釈の64-100倍で毒素を中和する抗毒素価が証明された。免疫後、24週目にVT2を静脈注射した結果、1週後に8,200倍抗毒素価は上昇した。2-3週後には10,000倍以上となり、30週目より週3回頸静脈より5リッター採血した。血清中の抗毒素価をマウスを用いた中和抗毒素測定で試験した結果、血清希釈6,000倍した0.5mlはVT2 静脈内注射しても発症せず生存した。(6) PFGE型が判明している国内と米国の分離株のDNA構造をRFLP法で解析した結果、PFGEタイプIのO157株からされたstx2ファージ間ではきわめて高い相同性を有することが分かったが、PFGEタイプIIのO157株は多種多様な構造を持つstx2ファージが単離された。また、米国で単離されたO157株から精製したstx2ファージDNAは日本国内のPFGEタイプIのO157から単離されたファージときわめて高い相同性があることが判明した。

⑩結論=毒素の精製方法を再検討した結果、粗毒素を60%飽和の一段階工程より30%の工程を組み入れる方法は最終毒素の純度が上昇した。この結果、回収率が低下したが、比活性の上昇を考えたときに充分メリットが得られた。菌投与後の腸管内への菌の定着、増殖にはマウス系統による大きな差はなく、また、レセプターとして考えられているGb3と抽出した中性糖脂質とVTは結合しなかった。各種実験動物で観察された病態は、ヒトのO157感染患者の報告と同様な症状、病変であり、ヒトのO157解析に際して研究目的に応じたモデル動物が得られた。VT1をカニクイサルに静脈内投与した場合に脳、血管内皮、肺及び腎臓に病変が見られ、これはヒトのO157感染発症の報告と重なる成績となった。VT1、VT2をグルタルアルデヒド-リポゾームワクチンは、マウスの発症・感染モデルを用いた成績で十分な予防効果が認められ、世界に先駆け雑誌に報告した。VTにアミノ酸を添加してホルマリンで無毒化した場合は、比較的速やかに毒素活性が消失した。この条件で無毒化したトキソイドの免疫原性を試験中である。抗VT2ウマ免疫血清は、十分な抗毒素価を有する標品が得られた。現在、採血を継続中であるが、標準品(国内及び国際)とO157抗毒素作製のための必要量は得られると予想している。米国で単離されたO157株から精製したstx2ファージDNAと日本国内のPFGEタイプIのO157から単離されたファージときわめて高い相同性があることにより、距離的、時間的に関連性の少ない条件を考えると過去に両菌は共通のファージに感染している可能性が考えられる。

総括研究報告書

Vero毒素のトキソイドワクチンの開発とO157感染発症防止に関する研究

主任研究者 高橋元秀 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

研究要旨

腸管出血性大腸菌の感染発症を防止するために、菌の産生する毒素を特異的に中和する抗毒素抗体を誘導するトキソイドワクチンの開発を検討する。また、高度免疫したウマの抗毒素血清を作製し、感染患者に対する抗毒素療法の適応を確立する発症モデル動物を用いて検討する。さらに、ウマ抗毒素血清を用いて国内標準抗毒素を標準化し、抗VT2についてはWHOに標準品が用意されていないため国際標準品の候補品として提供する。昨年度得られた成績を元に、EHEC感染発症の動物モデルを用いトキソイドと抗毒素（ウサギ免疫血清）の効果を検討した。トキソイド免疫マウスに菌を経口投与すると菌の増殖は認められたが産生毒素による発症は阻止した。また、抗毒素をあらかじめ投与したマウスは発症阻止効果が認められ、臨床的及び組織病理学的に異常がないことが確認された。現在、免疫中のウマを部分採血し、標準品と治療用抗毒素の原料血清を採取中である。

分担研究者名

荒川宜親（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部）
倉田毅（国立感染症研究所 感染病理部）
渡邊治雄（国立感染症研究所 細菌部）
小室勝利（国立感染症研究所 安全性研究部）
山田章雄（国立感染症研究所 つくば霊長類センター）
網康至（国立感染症研究所 動物管理室）

等の治療法である筋肉内又は静脈内投与法の有効性を検討する。さらに、EHECが腸管内で産生した毒素、または抗生物質療法で菌体より遊離した毒素を特異的に吸着除去する療法を合わせて検討する。一方、作製したウマ抗毒素血清を標準化し、標準品として内外に供給する。特に、抗VT2血清はWHOにおいても国際標準品が用意されていないため、精度管理された技術、測定法を用いて標準化を行い、WHOに標準品として提供する。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌(EHEC) O157:H7の感染患者は出血性大腸炎を発症し、これに続発して、溶血性尿毒症症候群(HUS)や神経症状を呈し、死に至る例がある。EHECの病原機構については未解決の部分が多いが、菌の産生する毒素はEHECの感染・発症に主要な役割を演じていることは明らかである。この毒素は、赤痢菌の産生する志賀毒素と同一のVT1と、分子生物学的、免疫学的には異なるVT2に大別される。毒素は細胞のタンパク合成を阻害し、細胞障害を起こす。他の細菌毒素性疾患（ジフテリア、破傷風等）の予防にトキソイドワクチンをヒトに接種し、広く効果を挙げている。さらに、ワクチンおよび毒素をウマに注射し高度免疫して得られる抗毒素血清は、ジフテリア、ボツリヌス等の患者治療に用いられている。EHEC感染症の発症予防にも、トキソイドワクチンによる予防効果や有効性を、本研究で確立した動物モデルを用い検討する。また、作製したウマ抗毒素血清を用い、現在ジフテリア

B. 研究方法

(1) 菌の大量培養と毒素精製に関する検討

腸管出血性大腸菌 O157:H7の感染、発症に主要な役割を演じているVero毒素(VT1又はVT2)の遺伝子を組み込んだプラスミドを保有するE.coli株をLB培地に接種し37℃で18時間培養後、集菌した浮遊菌液を超音波処理して粗毒素を得た。今年度は、昨年度報告した精製方法について再検討し、毒素の純度を上げるために粗毒素を60%硫酸塩析する前に、新たに低濃度の処理工程を加え、以下、イオン交換カラムを用いたHPLCによる精製方法を検討した。

(荒川班員、高橋)

(2) EHEC: O157感染動物モデルの作製

感染動物モデルでの病態解析は、ヒトにおける病態を解き明かす手段として重要な検討課題と考える。昨年度は、実験動物(マウス、ラット、モルモット、カニクイザル等)に静脈内投与後、臨床症状を観察(体重減少、尿量、麻痺の発現等)

また、経時的に屠殺解剖した動物の臨床症状と主要な病変を中間報告した。今年度得られた病理組織学的解析の結果を追加報告する。

(倉田班員、網班員)

さらに、マウス感染モデルにおける菌投与後の系統差を詳細に調べた。いままで得られた成績により、感染に対する高い感受性を有する BALB/c、非感受性の ddy、C57BL/6 を用いて、毒素レセプターと考えられている GB3 の存在及び中性糖脂質の毒素との結合能を検討した。マウス小腸粘膜組織からの中性糖脂質の抽出は粘膜上皮を剥離、洗浄後、遠心沈査をクロロフォルム：メタノールに浮遊後、超音波処理して遠心した上清を回収した。さらにこの操作を繰り返し上清を回収、前者と混合した。中性糖脂質の毒素との結合性は抽出した糖脂質をプレートに展開し毒素を作用させた後、ウサギ免疫抗毒素血清を反応させ DAB で発色、測定した。

(網班員)

(3) 病原性について各種動物の病理組織学的解析

昨年度に引き続き各種実験動物の Vero 毒素投与後の発病機構に関する検討をおこなった。特に、今年度はカンクイサルに VT1 をマウス 0.1、1.0、100LD₅₀ /Kg 濃度で静脈内投与し、臨床的、血液学的、免疫学的変化について検査すると共に、解剖後各組織の病理組織学的な検索をおこなった。血液学的な検査項目として毒素投与後、EDTA 加血液 0.5ml、クエン酸加血液 4.5ml、血清用 4.5ml を採血した。これらを用いて臨床生化学検査、血液凝固能試験及び主要リンパ球サブセットレベルの経時的変化を調査した。また、臨床経過と共に外貌所見、剖検所見及び採取組織を 10%ホルマリン緩衝液に固定、パラフィン包埋切片を作製、HE、PTAH、ベルリン染色等をおこない病理組織学的に検索した。

(山田班員、倉田班員、網班員、高橋)

(4) トキソイドワクチンの試作と評価

昨年度の検討結果では VT1、VT2 をグルタールアルデヒドと共にリポゾームに取り込んだワクチンは、両者とも無毒化は速やかに完了した。しかし、VT2 攻撃による発症阻止は認められたが、VT1 攻撃マウスは発症、死亡した。今年度は VT-リポゾームワクチンをマウスに 3 回腹腔内投与した後、経時的に採血し血中抗体価を ELISA で測定すると共に、昨年確立したマウス感染モデルの方法で菌を投与して発症阻止効果を検討した。

また、現行トキソイドの無毒化に用いられているホルマリンによるトキソイド化をホルマリン濃

度、安定剤としてアミノ酸を添加した条件を検討した。

(小室班員、高橋)

(5) 標準品及び治療用抗毒素用のウマ抗毒素血清の作製

ウマの免疫には、昨年度マウス感染モデル動物を用いて有効性が確認された VT2 ーリポゾームワクチンを基礎免疫として皮下注射した(図1)。さらに追加免疫として VT2 を直接静脈内注射した。経時的に採血して血中抗毒素価が十分に上昇したことを確認した後、頸動脈より 1 回約 5 L ずつ部分採血した。血中抗毒素価の測定は、昨年度確立した Vero 細胞を用いた細胞培養法とマウスの致死を指標とする方法で行った。

(高橋、小室班員)

(6) O157 に溶原化している stx-converting phage の多様性に関する研究

腸管出血性大腸菌 O157 が産生する志賀様毒素遺伝子 (stx) を運ぶファージの構造的、機能的多様性を解析するために、PFGE 型が判明している EHEC のうち国内単離 O15720 株と米国で単離された 7 株の解析を行った。それぞれ分離株を UV またはマイトマイシン C による誘導でファージ粒子を単離・精製し、PCR による stx 遺伝子の確認した後、精製を行った。また、精製したファージ DNA を stx 1 ファージは制限酵素 EcoRI で、stx2 ファージは SmaI で切断し、アガロースゲル電気泳動で切断パターンの比較を行った。また、ファージ DNA 及び染色体 DNA 間を比較するために stx1 又は stx2 遺伝子に特異的なプローブを用いてサザンブロッティングによる解析を行った。

(渡邊班員)

C. 結果

(1) VT1 又は VT2 遺伝子を担う組み換えプラスミドを保有する大腸菌を大量に培養し、超音波処理して粗毒素を得た後、硫酸塩析(30%と 60%飽和)、イオン交換カラムによる HPLC を用いて毒素の精製条件を検討した。従来おこなっていた硫酸塩析は 60 %飽和の一段階だけであったが、30%飽和の工程を組み入れることにより、最終毒素の純度を比活性で比べると約 30 倍上昇した。しかし、最終精製毒素の回収率は従来と比べ 2.5 分の 1 に低下した。

本年度班研究のために VT1、VT2 の培養・精製をおこない、各種動物の毒素感受性試験、病態解析を行うために必要な量を供給し、また、トキソ

イド化の一部予備試験にも供給した。

(2) 菌感染マウスのモデルの系統差を検討するために、菌を経口的に投与後、経時的に糞便の菌数を測定した結果、マウスの系統による大きな差は認められなかった。また、感染・発症に感受性の違いが認められた数種の系統マウスの小腸粘膜組織中の G3 (VT のレセプターと考えられている) 及び抽出した中性糖脂質との VT 結合能を試みたが、いずれも存在していないことが判明した。

(3) 100 LD₅₀ の毒素を各種実験動物(マウス、ラット、モルモット、スナネズミ、マストミス、ハムスター及びカニクイザル)に静脈内投与して、臨床観察及び病理組織学的解析を行った結果、全ての動物で血管内皮、尿細管の病変が見られた。毒素感受性はモルモットが低く、ラット、ハムスター及びサルが高かった。体重減少が見られた後死亡した動物の病理組織像観察では、いずれも血管内皮の病変と著明な腎尿細管壊死が観察され、尿細管の機能障害による脱水症状がおこったものと推定された。動物種の違いで特徴的に見られた臨床症状としては、ラット、カニクイザルでは下痢症状が観察されたが、他の動物では見られなかった。さらに、VT1 の投与ではカニクイザルとハムスターでは肺水腫が著明に見られた。

特に VT1 を投与したカニクイザルは、投与後2日目に沈鬱、体温低下を示し死亡した。剖検所見では血液凝固時間の延長、フィブリノーゲン量の急増、血小板機能の低下等が認められた。なお、1.0 LD₅₀ を投与したサルは血液・生化学検査値と血液凝固能に慢性的な変化が認められ、ヒトの HUS のモデルとなり得ることが伺えた。

(4) VT1 または VT2 リポゾームワクチンをそれぞれ3回腹腔内注射して免疫応答を ELISA により調べた結果、抗 VT1 に対する IgG 価は1回注射後速やかに検出されたが、抗 VT2 は VT1 に比べて低い値であった。両者とも2回注射によりほど同様に高い応答を示した。3回注射後2週目にそれぞれ10 LD₅₀ の毒素を静脈内注射した結果、すべてのマウスは無症状で生存した。これに対して、対照マウスは体重減少、尿量の増加等の毒素による特異的な症状を観察した後4-6日ですべて死亡した。また、3回免疫3週後に O157 生菌を 1×10^9 CFU 経口投与した結果、全てのマウスは毒素特異的な症状は観察しなかったが、対照マウスでは毒素投与と同様な症状を観察した後5-7日にすべて死亡した。

毒素にアミノ酸を添加後、ホルマリンを変量し加え無毒化を試みた。ホルマリンの最終濃度が

1.0 %の条件では、ホルマリン添加後3日目に、Vero 細胞に対する細胞変性活性は消失した。現在、このトキシノイドをマウスに注射して免疫応答を試験中である。

(5) マウスで有効性の確認された VT2 リポゾームワクチンを用いて、基礎免疫として約 2mg 毒素タンパク換算量を1週間隔で3回皮下注射した(図1)。さらに、液状トキシノイドを毒素タンパク換算量 1mg を皮下及び静脈内に3回注射した。この期間の血中抗毒素価を Vero 細胞による中和抗毒素価測定法で定量した結果、血清希釈の 64-100 倍で16 MCD の毒素を中和する抗毒素価が証明された。免疫後、24週目に VT2 毒素を約 2 mg 静脈より注射した結果、1週後に血清希釈の 8,200 倍で抗毒素価は上昇した。2-3週後には

目的であった 10,000 倍以上の希釈で中和能を有することが確認できたので、免疫後30週目に頸静脈より5リッター採血し、さらに1週間隔で合計3回同様に採血した。採血後、血清を分離して3回分を混合した血清中の抗毒素価をマウスを用いた中和抗毒素測定で試験した結果、血清希釈 6000 倍した 0.5ml を静脈内注射した後、VT2 を 10 LD₅₀ 静脈内注射しても発症せず生存した。現在、毒素による追加免疫を2回継続中であるが、ほぼ同様な力価を有する血清が数リッター得られている。

(6) PFGE 型が判明している国内と米国の分離株の DNA 構造を RFLP 法で解析した結果、PFGE タイプ I の O157 株からされた stx2 フェージ間ではきわめて高い相同性を有することが分かったが、PFGE タイプ II の O157 株は多種多様な構造を持つ stx2 フェージが単離された。また、米国で単離された O157 株から精製した stx2 フェージ DNA は日本国内の PFGE タイプ I の O157 から単離されたフェージときわめて高い相同性があることが判明した。

D. 考察と結論

毒素の精製方法を再検討した結果、粗毒素を 60%飽和の一段階工程より 30%の工程を組み入れる方法は最終毒素の純度が上昇した。これは菌の産生した低分子のタンパクや培地成分をあらかじめ除去する事により、その後の工程において除去できない不純物と毒素タンパクとの結合を防止する効果が見られたと考える。この結果、回収率が低下したが、比活性の上昇を考えたときに充分メリットが得られたと判断するが、硫酸塩析の濃度の組み合わせは今後も検討の余地がある。

菌投与後の腸管内への菌の定着、増殖にはマウス系統による大きな差はないものと考えられ、また、レセプターとして考えられている Gb3 と抽出した中性糖脂質と VT は結合しなかったため、腸管からの毒素吸収にはそれらは関与せず、別の要因により毒素吸収の差が生じたためと考える。

動物種、系統差により毒素感受性が異なる成績が得られ、さらに病原性について各種動物の臨床的、病理組織学的な解析で、種特異的に異なる症状、病変が観察された。各種実験動物で観察された病態は、ヒトの O157 感染患者の報告に記載されている症状、病変である。従って、ヒトの O157 解析に際して研究目的に応じたモデル動物が得られたことは非常に意義のあることである。

マウス 100LD₅₀/Kg の VT1 をカニクイサルに静脈内投与した場合に脳、血管内皮、肺及び腎臓に病変が見られ、これはヒトの O157 感染発症の報告と重なる成績となった。本実験ではマウスで測定した致死活性を基準に計画したが、他の実験動物の感受性と比べるとカニクイサルは VT1 に対する感受性がきわめて高いことが判明した。今後、経口または脈内投与を考慮に入れ、HSU を発現する毒素投与を検討し、トキシノイド及び抗毒素の効果判定の最終動物モデルを確立したい。

VT1、VT2 をグルタルアルデヒドと共にリポゾームに取り込んだワクチンは、マウスの発症・感染モデルを用いた成績で十分な予防効果が認められた。トキシノイドワクチンの有効性が動物実験で得られた例として、世界に先駆け雑誌に報告した。今後、ヒトの免疫機構により近似なサルを用いて安全性と有効性の試験を計画中である。また、ある種のアミノ酸を添加してホルマリンで無毒化した場合は、比較的速やかに毒素活性が消失することが確認された。この条件で無毒化したトキシノイドの免疫原性を試験中である。

抗 VT2 ウマ免疫血清は、十分な抗毒素価を有する標品が得られた。これは基礎免疫における VT2 リポゾームワクチンが免疫記憶として優れていたこと、過去の経験による毒素免疫移行へのタイミングが適切であったこと、さらに VT2 にする感受性の高いウマに当たったことが成功の結果を導いたと考える。通常、ジフテリア、ボツリヌス等のトキシノイド、毒素免疫では数頭のウマを用い、今回のような免疫応答が得られる成績は少ない。現在、採血を継続中であるが、標準品（国内及び国際）と O157 流行の緊急時に対処する抗毒素作製のための必要量は、特にウマのけが等の問題が起きない限り得られると予想している。今後、本標品を製剤化して昨年確立した精度の高い試験法で標準品としての単位を決定する。さらに、サルを用いて抗毒素療法による治療効果を確認す

る予定である。

PFGE タイプ I の O157 株からされた stx2 ファージ間ではきわめて高い相同性を有することが分かったが、PFGE タイプ II では多種多様な構造を持つ stx2 ファージが単離されている。このことがファージ DNA の多様性が機能的なものに由来するかは今後の研究が必要である。また、米国で単離された O157 株から精製した stx2 ファージ DNA と日本国内の PFGE タイプ I の O157 から単離されたファージときわめて高い相同性があることにより、距離的、時間的に関連性の少ない条件を考えると過去に両菌は共通のファージに感染している可能性を指摘している。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) FUKUDA, Y., KOMIYA, T., TAKAHASHI, M., ARAKAWA, Y., AML, Y., SUZAKLY., NAITO, S., HORINO, A., NAGATA, N., SATOH, S., GONDAIRA, F., SUGIYAMA, J., NAKANO, Y., NISHINOHARA, S., KOMURO, K. and UCHIDA, T.

「Induction of protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in mice by shiga-like toxin-liposome conjugate.」

International archives of allergy and immunology. 116:313-317, 1998

2. 学会発表

(1) 小宮貴子、福田靖、長岡芳昭、大隈邦夫、杉山純一、荒川宜親、高橋元秀

「腸管出血性大腸菌が産生する毒素 SLT2 に対する標準抗毒素の試作—ウマの免疫応答—」

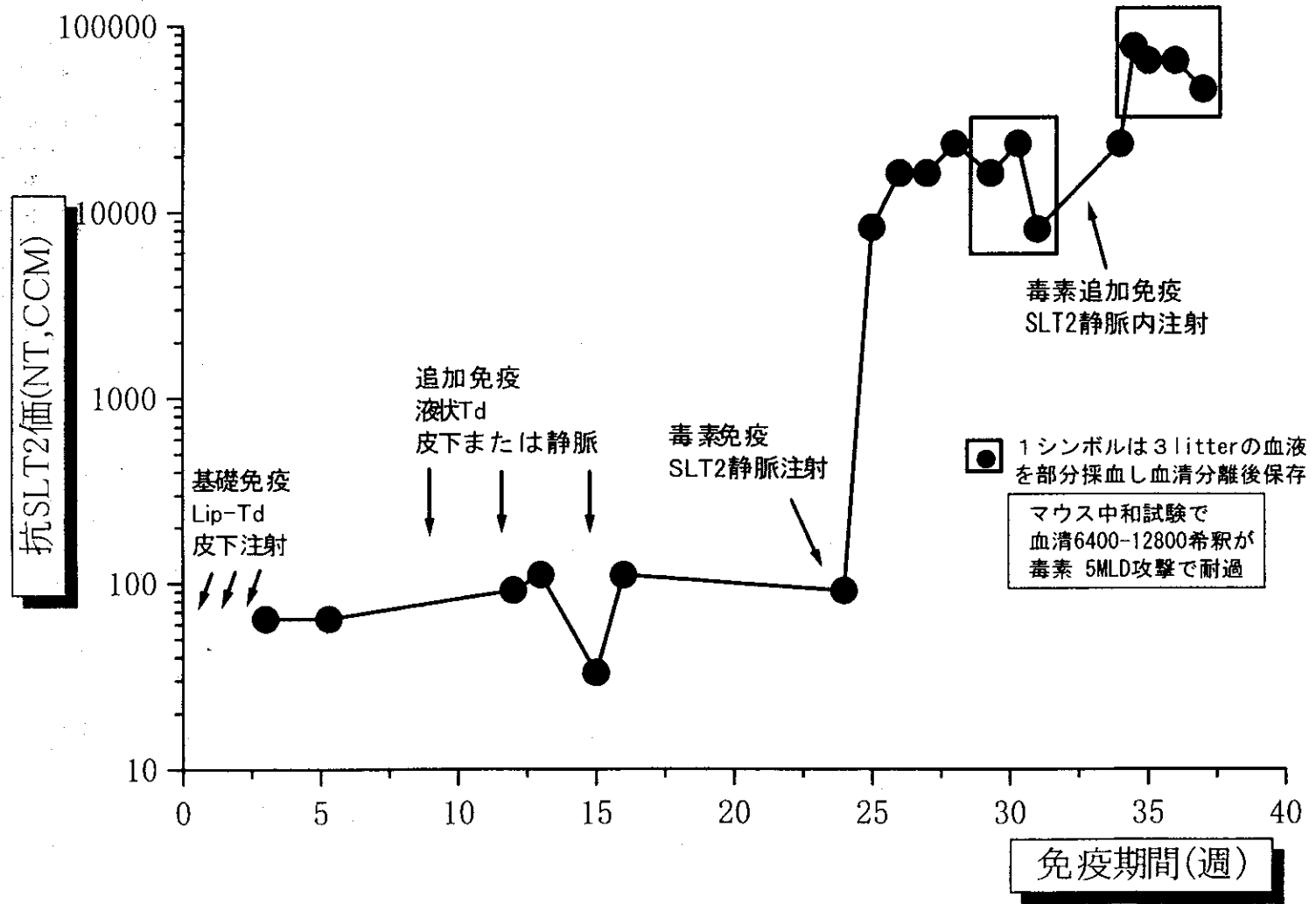
第 72 回日本細菌学会総会、日本細菌学雑誌 54.1.p235、東京（1999.3.24-3.26）

(2) 五十君静信、高橋元秀、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」

第 72 回日本細菌学会総会、日本細菌学雑誌 54.1.p302、東京（1999.3.24-3.26）

免疫ウマ血中抗毒素価（抗SLT2）の推移



分担研究報告書

菌の大量培養とベロ毒素の精製に関する研究

分担研究者 荒川 宜親 (国立感染症研究所 細菌・血液製剤部)
研究協力者 福田 靖 (同 上)

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (EHEC, STEC) O157:H7 (以下、O157) が産生するベロ毒素 (以下、VT) に対するトキソイドワクチンの試作検討には、原料となる VT が大量に必要である。しかも 時として副反応が発生するトキソイドワクチンの原料は、副反応の原因の一つと考えられている不純物を可能な限り原料から除去しておく事が望ましい。

平成 9 年度には遺伝子組換え VT 産生大腸菌を利用し、効率的な VT 精製法の確立を目指して精製方法の諸条件を検討した。その結果、約 10L の培養菌体から 10mg 前後の VT を得る事ができた。そこで 10 年度はさらに高純度な VT を得るために、混入筈雑タンパクを除く事を目的として検討を加えた。

A. 研究目的

O157 感染症の治療には現在も確固とした方法が確立されていない。しかし同じ細菌性毒素疾患であるジフテリアや破傷風はそのトキソイドワクチンの接種により、ほぼ 100% 発症予防が可能である。そこで O157 も VT に対するトキソイドワクチンを作製して、接種する事により発症を予防できると考えられる。トキソイドワクチンの試作には、無毒化の条件検討を含め多量の VT を必要とし、またその有効性や安全性評価にも精度管理された安定した性状を持つ VT が必要不可欠である。

しかし現行トキソイドワクチン製剤の接種は、時として発赤や腫張などの副反応を起こす事が知られている。その製剤中の抗原濃度は、副反応の起因物質と考えられている筈雑タンパクの混入により、60% 前後に留まっている。抗原濃度の向上は、トキソイドワクチンにとって大きな至上命題である。

そこで平成 9 年度は VT を効率良くしかも簡便に精製する条件を検討し、約 10L の培養菌体から 10mg 前後の VT を得る事ができた。10 年度はさらに高純度の VT 精製を目指した。今回は 30% 硫酸アンモニウム沈澱法を従来法に加え、精製過程の初期段階で予め筈雑タンパクを取り除き精製 VT の純度を高める事を目標とした。

B. 研究方法

VT 産生菌株は、*E. coli* MC1061 strain 87-27 (VT1 産生株) と *E. coli* MC1061

strain Tp8 (VT2 産生株) を用いた。2 菌株は共に *E. coli* MC1061 を宿主とし、前者は患者由来の *E. coli* O157:H7 83-1386 株から得られた VT1 の BamHI-Bg/II (2.1kb) 断片が pUC118 に組み込まれものを、後者は同じく患者由来の *E. coli* O157:H7 J-2 株から得られた VT2 の EcoRI (4.6kb) 断片が pCH283 (pBR322 derivative) に組み込まれたものをそれぞれプラスミドとして持つ。組換え菌はその親株の約 10 倍の毒素産生能を有している。これらの菌株は国立国際医療センターの竹田 美文 博士から分与を受けた。

菌の培養方法と VT の精製方法は、Yutsudo らによる原法(1)を参考にした。
-80℃ に凍結保存している菌液 (0.5mL) を速やかに 37℃ の温湯で融解して、strain 87-27 ではアンピシリン 100 μg/mL、strain Tp8 ではトリメトプリム 10 μg/mL を含む 10mL の LB 培地 (以下、AB-LB) で、37℃ 9 時間振盪培養した。その培養菌液 2mL を 1L の AB-LB に加え、37℃ 18 時間 振盪培養した (通常 1 回 : 1L × 5 本培養)。10⁹ CFU/mL 程度まで培養した菌液を 200 mL の滅菌したプラスチック製遠沈管に入れ 17,000 ×g 20 分間遠心した。培養菌液 1L あたり、トリス塩酸バッファー pH 8.4 (以下、バッファー) 20mL で、菌を再浮遊させて、-80℃ で数日間凍結保存した。

今回検討した精製工程は VT2 を例に下に示した。

200 mL の保存菌液を 37℃ の温湯で速やかに溶解して、超音波処理で菌を破碎

した (80 mL/回 流水で冷却しつつ連続 20 分 約 200W KUBOTA Insonator 201M)。この処理の後 17,000×g 20 分間遠心した。超音波処理遠心上清を 30% の硫酸アンモニウムで筈雑タンパクを沈澱させ、17,000×g 20 分間遠心し上清を回収した。その上清に硫酸アンモニウムを加え (60% 硫酸沈澱法) VT 成分を含むタンパク成分を沈澱させ、沈澱物をバッファーに溶解した。バッファーで透析した後 DEAE セファロース CL-6B、さらに再度透析した後ハイロード Q セファロースによる計 2 回のイオン交換クロマトグラフィーを経て、VT の精製をおこなった (表 1)。

タンパク量は BCA Protein Assay Reagent (Pierce)、もしくは吸光度法 (OD=280) で測定した。VT 活性の定量は、VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研 単位-LU: Latex Unit)、またはペロ細胞を用いた細胞培養法によった。

菌の培養から VT の精製過程は全て国立感染症研究所 村山分室の P2 レベル実験室において実施した。

C. 実験結果

1 回目のイオン交換クロマトグラフィー (DEAE セファロース CL-6B) の結果として、タンパク量と VT 活性を示した (図 1)。図 1 に示したようにタンパク 1mg/ml 以上の幅広い画分が得られ、VT 活性でも 10^6 LU/ml 以上の画分が認められた。VT 活性はタンパク画分の後方に重なって位置していた。また、2 回目のイオン交換クロマトグラフィー (ハイロード Q セファロース) の結果も同様に示した (図 2)。図 2 のように VT 活性画分は、複数認められたタンパクのピークの中で、31~35 番の画分と一致した。

超音波破碎遠心上清を 100 とすると、従来の方法では最終評品の総タンパク量で 0.7、総 VT 活性 17.4 であり、タンパク当たりの比活性では 24 倍に上昇していた (表 2)。一方 改良法で総タンパク量で 0.092、総 VT 活性で 7.0 であり、タンパク当たりの比活性では 764 倍になった (表 3)。

改良法では従来法に比較してタンパク当たりの比活性は 24 倍から 764 倍に格段に改善されたが、VT の回収率が約 1/2 となり、精製過程の中で失った VT も多か

った。

D. 考察

従来法の問題点としては、2 回目のイオン交換クロマトグラフィーの前後で、総 VT 活性が 1/4 になってしまう事が大きな問題であった。これは VT 活性画分と筈雑タンパク画分が明確に分離できず、高純度 VT の回収に主眼を置くと、VT 活性画分の多くを捨てる事が原因と思われる。

今回 30% 硫酸アンモニウム沈澱法を精製過程の初期段階に加え、筈雑タンパクを取り除き、精製 VT の純度の向上を目標とした。その結果精製 VT のタンパク当たりの比活性を飛躍的に改善させる事ができた (24 倍 → 764 倍)。さらに改良法は従来法と比較して最終評品で総タンパク量を 1/10 にする事ができた。

しかしその反面 VT の回収率は、最終評品では従来法の 1/2 となってしまった。これは新たに導入した 30% 硫酸アンモニウム沈澱の過程での 30% という濃度が高すぎて、VT が筈雑タンパクと共に沈澱した可能性がある事を示している。この段階での硫酸アンモニウムの濃度は再検討が必要であろう。

今後は 1 回目の硫酸アンモニウム沈澱法の濃度の再検討に加えて、従来法ではイオン交換クロマトグラフィーを 2 回使用しているが、同様な原理を利用する方法を 2 回実施するより、一方をゲル濾過クロマトグラフィーなどの別系統の精製方法を利用する方が、精製 VT の純度を高める可能性もある事から、ゲル濾過クロマトグラフィーの導入も検討していきたい。

さらに従来は培養上清には VT が含まれている事が確認されていたものの、上清が多量 (約 5L/回) であるため手技の簡便性から上清からの VT の回収は実施していなかった。しかし今後は、さらに VT のトキシド化の条件検討の本格化から大量に VT が必要になる事も予想されるので、上清の限外ろ過法などの濃縮行程を踏まえて、上清からの VT の回収も検討している。

E. 参考文献

1. Yutsudo T et al. : Cloning of a Vero toxin (VT2) gene from a VT2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microb. Lett.*, 48, 273-276 (1987)

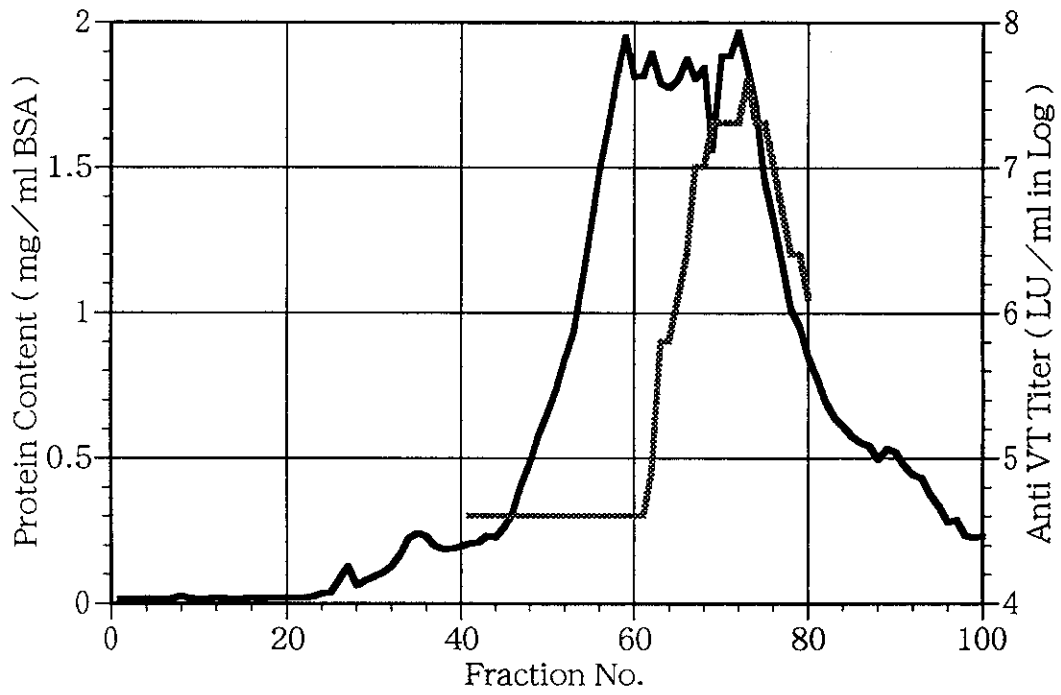
表 1

ベロ毒素の精製 (例 VT2)

	菌株 Tp8 (-80°C 保存)	
	↓	
	前培養 : TMP(10 μg/ml) -LB 培地 (TMP-LB)	10.0ml
	↓ 37°C 130rpm. 15hrs. ≦	
	本培養菌液	1000ml
	↓ 37°C 130rpm. 15hrs.	
	↓ 遠心分離 4°C 10000rpm. 30min.	
	10mM Tris-HCl pH8.5 (Tris) で再浮遊	
	↓ 凍結・融解	
	菌体の超音波破碎 (Kubota Insonator 201M)	
	↓ 遠心分離 4°C 10000rpm. 30min.	
※ {	上清を30%硫酸アンモニウム沈殿	
	↓ 遠心分離 4°C 10000rpm. 30min.	
	上清を回収	
	↓	
	上清を60%硫酸アンモニウム沈殿	
	↓ 遠心分離 4°C 10000rpm. 30min.	
	沈殿をTris 30ml前後で融解	
	↓	
	DEAE CL-6B (180ml 2.8cm × 25cm)	
	Tris ⇒ ⇒ ⇒ 600mM NaCl-Tris	
↓	→ RPLA-VTEC・BCA Protein Assay	
試料をプールしてTris 1.5l × 2回で透析		
↓		
Hiload Q-Sepharose 26/10	FPLC : Pharmacia Biotech	
Tris ⇒ ⇒ ⇒ 400mM NaCl-Tris		
↓	→ RPLA-VTEC・SDS-PAGE	
画分をプール		
↓	→ BCA Protein Assay・SDS-PAGE	
最終評品としてストック		

※ 改良法における変更点

☒ 1 DEAE CL-6B



☒ 2 Hiload Q-Sepharose

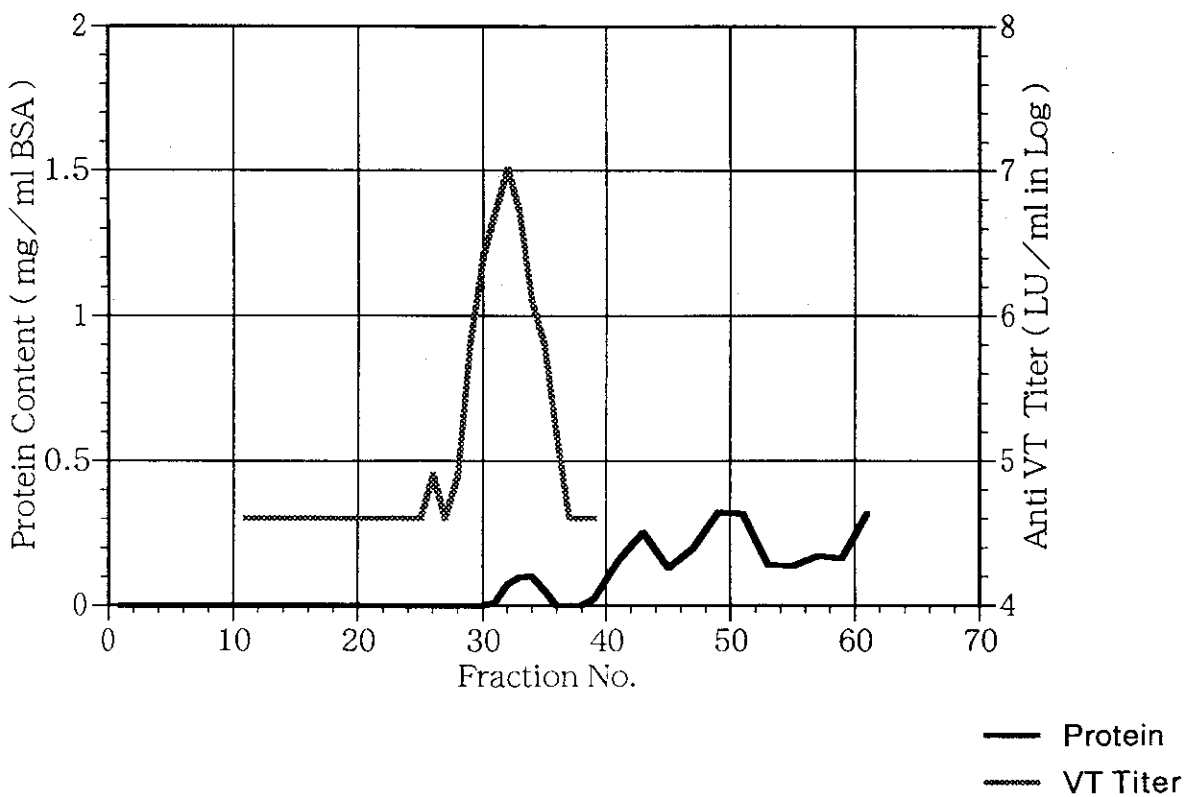


表 2

従来法

		総タンパク量 (mg)	回収率 (%)	総VT活性 (LU)	回収率 (%)	比活性 (LU/ml)	容量 (ml)
		(mg/ml BSA)	(%)	(LU/ml)	(%)	超音波破碎と比較	
超音波 破碎	(遠心分離後)	2.4×10^3	100	1.1×10^9	100	4.4×10^5	200
10L 培養		12.17		5.3×10^6		1	
DEAE	活性画分プール	1.6×10^2	6.7	6.5×10^8	61.1	4.0×10^6	36
CL-6B		4.54		1.8×10^7		9.104	
Hiload	活性画分プール	1.7×10	0.700	1.8×10^8	17.4	1.1×10^7	20
Q-Sepharose	(最終評品)	0.87		9.2×10^6		24.282	
	Side (※)	1.1×10	0.400	2.4×10^7	2.3	2.2×10^6	20
		0.54		1.2×10^6		5.103	

表 3

改良法

		総タンパク量 (mg)	回収率 (%)	総VT活性 (LU)	回収率 (%)	比活性 (LU/ml)	容量 (ml)
		(mg/ml BSA)	(%)	(LU/ml)	(%)	超音波破碎と比較	
超音波 破碎	(遠心分離後)	1.0×10^3	100	9.1×10^8	100	8.9×10^5	89
5L 培養		11.526		1.0×10^7		1	
30% 硫酸沈澱	上清	6.9×10^2	66.9	5.7×10^8	62.5	8.3×10^5	89
		7.706		6.4×10^6		9.390	
60% 硫酸沈澱	上清	4.4×10^2	43.2	2.4×10^8	0.258	5.3×10^3	92
		4.814		2.6×10^4		0.060	
	沈澱トリス溶解	3.8×10^2	36.8	2.2×10^8	24.4	5.9×10^5	8.7
		43.431		2.7×10^7		6.668	
DEAE	活性画分プール	5.6×10	5.5	1.5×10^8	16.5	2.7×10^6	47
CL-6B		1.194		3.2×10^6		30.3	
Hiload	活性画分プール	9.5×10^{-1}	0.092	6.4×10^7	7.0	6.8×10^7	10
Q-Sepharose	(最終評品)	0.095		6.4×10^6		764	
	Side (※)	6.2×10^{-1}	0.060	8.0×10^6	0.878	1.3×10^7	10
		0.062		8.0×10^5		146	

※ Sideは 最終評品の前後の画分をプールしたもの

病原性大腸菌0157感染動物モデルの作成に関する研究
2、腸管からの毒素吸収におけるマウス系統差

分担研究者 網 康至 国立感染症研究所 動物管理室
協力研究者 須崎 百合子 滝本一広 国立感染症研究所 動物管理室
高橋元秀、福田 靖 国立感染症研究所 細菌血液製剤部
永田典代 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 大腸菌0157感染マウスモデルでの発症致死における系統差は、菌の腸管内での増殖あるいは体内動態に関与しないことを昨年度報告した。VT1およびVT2毒素を静脈内投与あるいは経口投与したときの致死を指標としたマウス系統差を検討したところ、静脈内投与では系統差はなく、経口投与で系統間に差が見られた。以上より、菌感染マウスモデルでの系統差は、腸管からの毒素吸収の差によるものと考えられた。感受性のBALB/c, 非感受性のddy, C57BL/6の小腸粘膜組織におけるVTのreceptorと考えられているGb3の存在および抽出した中性糖脂質のVT結合性を検討したところ、いずれも存在せず、腸管からの毒素吸収にそれらは関与していないことが示唆された。

A.研究目的

大腸菌0157は、ヒトにおける出血性大腸炎を引き起こす食中毒菌として、又その産生する毒素によると考えられている溶血性尿毒症症候群(HUS)に代表される腎疾患、神経症状の起原菌として知られている。しかしながら、無症状保菌者、HUS発症率の不確定性などを考えると、その発症要因、病理発生は不明な点が多く、発症予防、治療における混乱の原因となっていると考えられる。

感染動物モデルでの病態解析は、ヒトにおける病態の理解と解明に少なからず有用であり、その重要な手段となっている。streptomycin投与による大腸菌0157接種マウスモデルでは、ヒトと同様の感染経路により、腎障害を引き起こす点での類似性で、感染動物モデルの一つと考えられる。マウスモデルにおける発症致死の要因は、腸管内での菌増殖が重要な要因ではある。われわれは、昨年度、このモデルにおけるマウス系統差を報告し、感受性のBALB/c, 非感受性のddyとの差は、菌の増殖あるいは体内動態に関与しないことを示した。このような系統差の解析は、ヒトにおける発症要因の解明となると考えられ、本年度は、本モデルにおける毒素の動態の系統差の解析を行った。

B.研究方法

マウス: 4 から 6 週齢のSPFマウス、BALB/c, ddy, C57BL/6 (SLC, Japan)を用いた。

Vero毒素および投与方法: マウス静脈内投与には、デンカ生研より分与されたVT1およびVT2を用

いた。蛋白量を測定後、マウスの体重に関わらず、一定量を一個体に尾静脈から投与した。経口投与には、本年度報告書荒川らの報告にあるように組み換え大腸菌により産生されたVero毒素を精製したものをを用い、投与量はマウスLD50で、マウスの体重に関わらず、一定量を一個体に3日間連続的に投与した。それぞれの方法で投与後、マウスの臨床症状および生死の観察を行った。

マウス小腸粘膜組織の中性糖脂質の抽出と精製: 各strainのマウス2匹の小腸を摘出、腸内容物を生理食塩水で洗浄し、粘膜上皮をsurgical bladeで剥離、生理食塩水に浮遊させた。pipettingで分散させた後、1500rpm 5min 生理食塩水にて3回遠心洗浄を行い、沈渣をクロロフォルム:メタノール(2:1)溶液に浮遊させ、超音波処理を行い、1時間静置後3,000rpm 15min 遠心して液層を回収した。固層は再び、DW:クロロフォルム:メタノール(0.8:2:1)溶液で同様に抽出、回収し、最初の抽出液と合わせて、常法に従って中性糖脂質を精製した。

マウス腸粘膜中性糖脂質のVT結合性: 抽出精製した、糖脂質をTLC plateに展開の後、1%ゼラチン溶液で、37C over night の条件でblockingを行った。十分に洗浄した後、VT1あるいはVT2 (0,5 ug/ml)を室温30分間反応させた。VT反応後のTLC plateは、anti-VT1あるいはanti-VT2 rabbit serum (1/1,000希釈)と室温30分間反応後、peroxidase標識anti-rabbit IgG goat serum (MBL, Japan. 1/1,000希釈)を反応させ、DABで発色、検出を行った。毒素、抗体の希釈、洗浄には、10%block ace, 0.1%Tween20、

PBS(-)を用いた。糖脂質の検出にはorcinolを用いた。

C. 研究結果

VT静脈内投与におけるマウス感受性

VT1あるいはVT2をそれぞれ28ngあるいは4ngから2倍階段希釈し、BALB/cおよびddyに静脈内投与し、生死を10日間観察した。VT1あるいはVT2投与で、BALB/cとddyとの間に10日間での生存率に差は認められなかった(図1)。

VT経口投与におけるマウス感受性

VT2(100,000 mouseLD50/ml)を10倍、100倍、1000倍に希釈し、1匹あたり0.5mlを各希釈5匹のBALB/c, ddyに連続して3日間経口カテーテルを用いて投与し、10日間その生死を観察した。10倍希釈では、両系統とも観察期間内にすべて死亡したが、100倍希釈投与群ではBALB/cでは、全例が死亡したのに対して、ddyでは1/5の死亡にとどまった(図2)。

同様に、VT1(50,000 mouseLD50/ml)をBALB/cおよびC57BL/6に経口投与すると、10倍希釈群ではBALB/cで致死が観察されたのに対して、C57BL/6では観察されず、系統間に差が認められた(図3)。

各系統マウス小腸粘膜の中性糖脂質とVT結合性

上記結果から、VT経口投与における感受性のマウス系統差は、腸管からの毒素吸収が能動的でかつマウス系統間で差があることが予想される。また、VTの受容体は、中性糖脂質であるGb3あるいはGb4であることが報告されている。系統差へのこれら中性糖脂質の関与を調べる目的で、マウス腸管粘膜における中性糖脂質とそれらとVTとの結合性について検索を行った。それぞれの系統マウスの腸管粘膜における中性糖脂質は図4に示すように主体となるのは、glucosylceramide(Glu-Cer), globoside(Gb4), asialo GM1(GA1), fucosyl asialo GM1(FGA1)の4種でGlobotriaosylceramide(Gb3)を認めなかった。VT2がGb4を受容体とする報告もあるため、VTとの結合性について調べたところ、standardのGb3のみで結合が見られた以外、マウス小腸粘膜由来の中性糖脂質にVT1およびVT2と結合するものは認められなかった。

D. 考察

昨年度報告したように、大腸菌0157感染マウスモデルにおいては、菌の経口感染により致死するが、マウス系統間で感受性の差が見られた。この感受性差は、菌の腸管内における増殖あるいは体内動態に関与しなかったが、結果に示したように、静脈内投与された毒素に対する感受性にも関与しなかった。すなわち、腸管における毒素吸

収、腸管から血中への毒素移行の過程で、感受性差を決定する要因があると考えられた。このような推論は、毒素経口投与でも同様の感受性差が認められたことから裏付けられると考えられる。

腸管粘膜上皮細胞による蛋白質の吸収については、蛋白消化酵素により比較的low molecular weightのpeptide、あるいはアミノ酸の形で能動的あるいは受動的に吸収されていると考えられるが、VTのように40,000から70,000のような大きい分子量の蛋白質の吸収については不明な点が多い。腸管粘膜上皮のVT吸収過程も同様に不明であるが、系統間で差が認められることから、何らかの能動的な吸収が関与するものと考えられる。つまりその初期過程は、粘膜上皮細胞との結合である。しかしながら、VTの受容体と考えられているGb3はマウス小腸粘膜に存在せず、また、VTと結合性を有する中性糖脂質も存在しないことが結果より明らかとなった。VTの腸管吸収には、別の分子が関与するものと考えられる。

マウス腸管粘膜にGb3が存在しないことは、大腸菌0157感染マウスモデルで、腸管の病変が認められないというマウスモデルの限界の理由の一つと考えられる。ヒトの小腸においては、絨毛先端の上皮細胞にGb3が存在するとの報告がある。本研究班倉田らの報告では、VT静脈内投与で腸管に病変形成の認められる動物モデルは、サルおよびラットあり、それらの腸管におけるGb3の局在については今後の検討課題と言える。

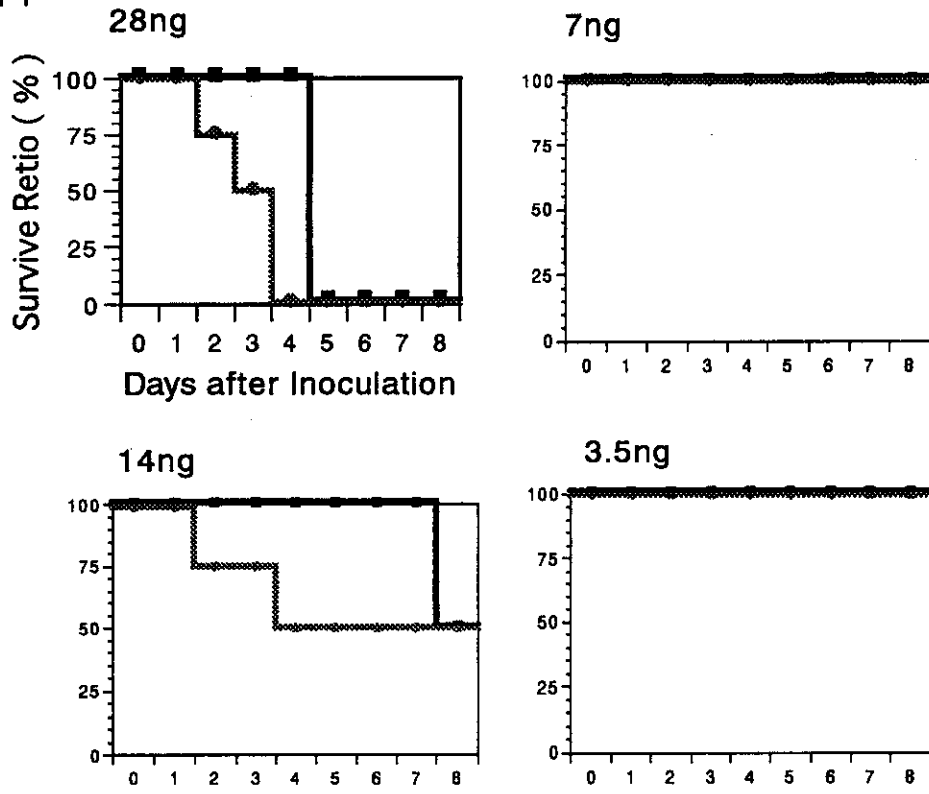
E. 結論

大腸菌0157感染マウスモデルに認められるマウス系統差は、毒素経口投与でも同様の系統差が未だ目られることから、腸管からの毒素吸収の差であると考えられる。腸管の毒素吸収には、VTの受容体であるGb3を含む中性糖脂質は関与しないものと考えられる。

F. 研究発表

なし

VT1



VT2

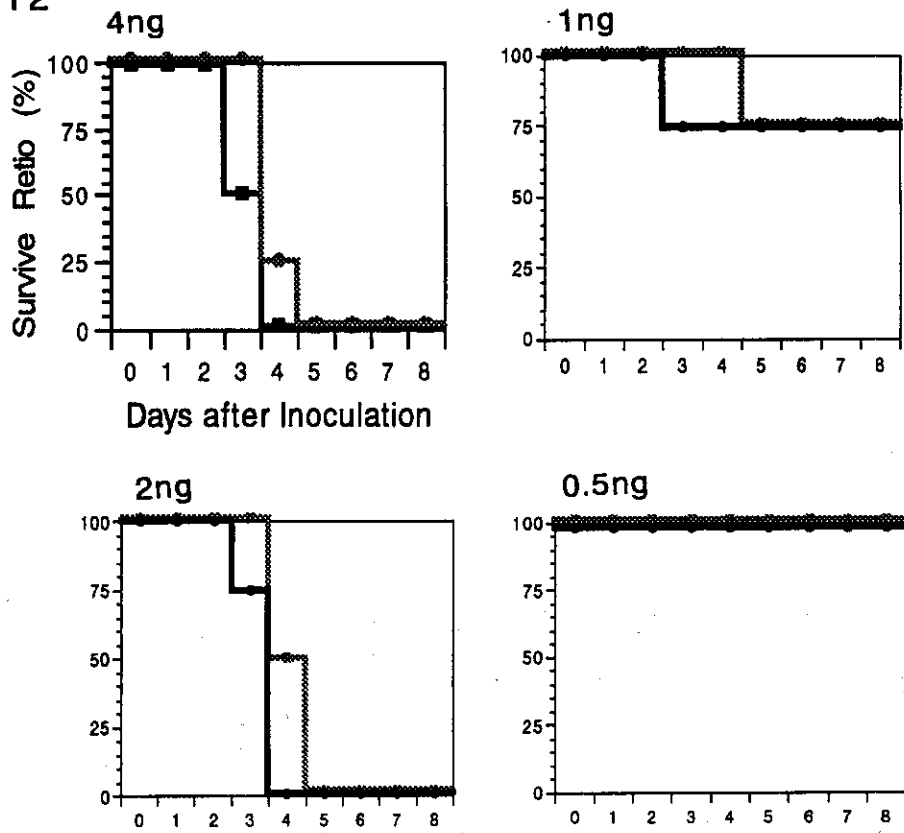
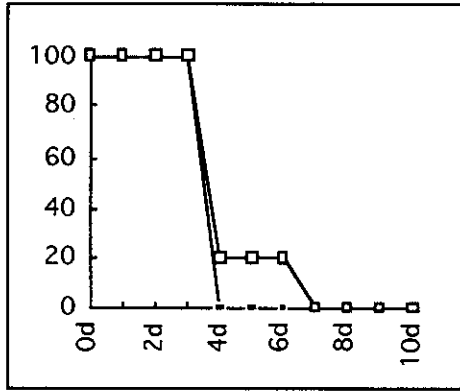


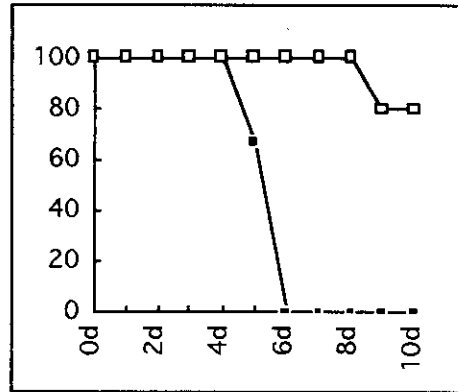
図1. VT静脈内投与における感受性の系統差

—■— ddy

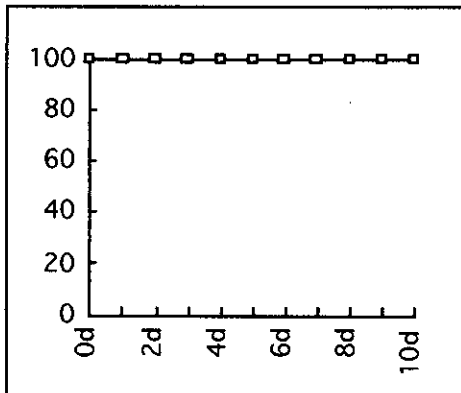
—●— BALB/c



VT2 1/10



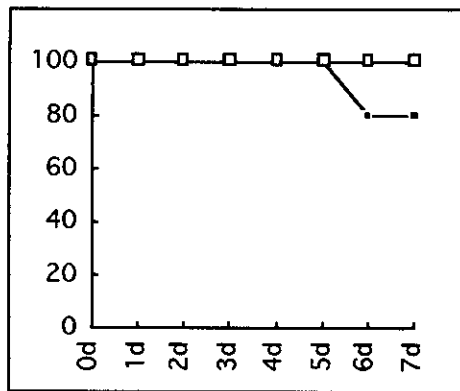
VT2 1/100



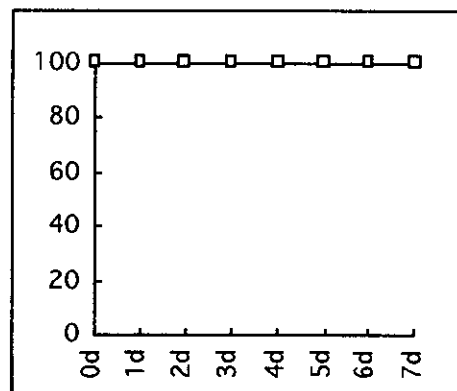
VT2 1/1000

(黒: BALB/c、白: ddy)

図2 VT2経口投与における感受性のマウス系統差(生存率)



VT1 1/10



VT1 1/100

(黒: BALB/c、白: C57BL/6)

図3 VT1経口投与における感受性のマウス系統差(生存率)