

図4 マウス小腸粘膜の中性糖脂質とVT結合性

O157 の病原性についての各種実験動物を用いた病理組織学的解析

分担研究者 倉田 毅 国立感染症研究所 感染病理部
永田典代、波多野いく持、原嶋綾子 同 同部
高橋元秀、福田 靖、小宮貴子 同 細菌・血液製剤部
網 康至、須崎百合子 同 動物管理室

研究要旨

腸管出血性大腸菌感染症を引き起こす、O157 が産生する Vero 毒素 (VT1) を用い、カニクイザルでの VT1 の病原性について病理組織学的解析を行った。カニクイザルに VT1 を 100 mouseLD₅₀/kg 静脈内投与し、臨床経過を観察した。動物は毒素投与後 2 日目に死亡し、剖検後の組織検索の結果、肺水腫、副腎皮質出血性壊死、くも膜下出血、腎臓の点状出血などが認められた。今回は、大量毒素の静脈内投与による急性病変を組織所見としてとらえることができたが、その他、尿細管の病変、糸球体病変もみられたことから、毒素の投与量、回数を考慮することにより、ヒトの HUS と同様の病変を引き起こすことが可能と考えられた。カニクイザルは現在開発中のワクチンや抗毒素の有効性、安全性の評価法に使用するための有用なモデル動物であることが期待される。

A. 研究目的

多様な腸管出血性大腸菌感染症の病態について対応するために病理組織学的検索によりヒトの病態・病変に類似するモデル動物を確立し、現在開発中のワクチンや抗毒素の有効性、安全性の評価法に使用することを目的とした。

今年度は O157 が産生する Vero 毒素を静脈内投与したカニクイザルについて病理組織学的解析を行い、溶血性尿毒症症候群 (HUS) モデル動物としての有用性を検討した。

B. 研究方法

動物 カニクイザル (16 歳、雌、2.77kg)

毒素 VT1 (デンカ生研)

投与方法 i.v.、単回投与 100mouseLD₅₀/kg

病理組織学的検索

動物の死亡後、剖検を行い、諸臓器を採取した。材料は直ちに 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、ベルリン青染色等を行い、病理組織学的に検索した。

Vero 毒素抗原の解析

ホルマリンパラフィン切片上で、抗 VT1 ウサギ血清を用い、ABC-peroxidase (基質は DAB) 法により、免疫組織化学的に各毒素抗原を検出し、methylgreen で対染色を行った。

C. 研究結果

臨床経過

毒素投与後 2 日目に状態が急変し死亡。死亡後、

約 3 時間後に剖検を行った。臨床経過については本年度の他報告書を参照のこと。

外貌所見

鼻口腔、肛門などからの出血なし。また、下痢、嘔吐はみられない。

剖検所見

頭部：脳幹脳底部においてくも膜下出血。脳脊髄液は血性。脳全体に鬱血が著明。

胸腔：胸水貯留約 20mL、血漿様、不透明 (左側)、透明血清様 (右側)

肺：全体に水腫様および浮腫を呈す。全葉にわたり赤色が強い。特に左下葉は暗赤色調。

心臓：心嚢水貯留約 2mL、透明。

腹腔

肝：肝小葉明瞭

脾：暗赤色

副腎：表面、断面ともに赤色調

腎：実質表面全体に針頭大の点状出血。

消化管：腸管内容物はほとんどなく、水様性泥状物を容れる。盲腸から結腸上部にかけ粘膜面赤色調。

その他 チョコレート嚢胞がみられる。

剖検時診断：

肺水腫、脳幹部のくも膜下出血、腎皮質の点状出血、副腎の出血。

病理組織学的所見

副腎：副腎皮質に広範な出血性壊死 (Fig.1) がみられる。細胞構築はくずれ、一部好中球の浸潤がみられる。ヘモジデリンは証明されなかった (ベルリン青陰性)。

脳：脳幹脳底部には広範なくも膜下出血がみとめられ (Fig.2a)、一部血栓を形成している (Fig.2b)。また、くも膜下の小静脈内にはフィブリンの析出がみられる (PTAH 染色により検出)。延髄、脊髄皮質において微小出血がみとめられる。

腎臓：外層の遠位尿細管内に尿円柱がみられ、拡張が著明である。集合管の拡張も認められる。皮、髄質全体に瀰漫性に点状出血が認められる (Fig.3a)。また、大部分の近位尿細管上皮の細胞質は膨化、変性している (Fig.3b)。ほとんどの糸球体において好中球が散見され、上皮細胞は腫大している (Fig.3c)。

肺：全体に高度な水腫であり、肺胞内には血漿成分と線維素の析出、および赤血球貪食マクロファージがみとめられる (ベルリン青は陰性)。静脈内には好中球が多く認められる。 (Fig.4)

脾：白脾髄の萎縮と赤脾髄の拡大がみられる (Fig.5)。胚中心の細胞の脱落と T 細胞領域の萎縮がみられ、同様の所見がリンパ節および腸管のリンパ装置においても認められた。

以上の病理組織所見をまとめると次のようになる。

1. 全身の小血管からの出血
 - ①副腎皮質の広範な帯状の出血性壊死
 - ②肺の出血
 - ③くも膜下出血
 - ④腎臓の点状出血
2. 肺水腫
3. その他：腎糸球体、腎尿細管の変性
リンパ系組織におけるリンパ球の減少

Vero 毒素抗原の解析結果

いずれの組織においても Vero 毒素抗原は検出されなかった。

D. 考察

病理組織学的検索結果から、VT1 静脈内投与によるカニクイザルの病態は以下のように考えられ

る。

1) 血管内皮への影響

全身の血管内皮が傷害されると、続いて血栓形成と小血管の破綻が起きる。その結果、以下の4点の病変が引き起こされたと考えられる。

- ・肺の出血と肺水腫、
- ・副腎皮質の出血性壊死
- ・くも膜下出血、
- ・腎の点状出血

このうち肺と副腎の病変は致命的と考えられる。副腎皮質の急性出血性壊死により、急性副腎皮質機能低下症がおこる。これを Waterhouse-Friderichsen Syndrome と呼び、患者はショック状態に陥るといふ。髄膜炎菌患者などで報告があるが、腸管出血性大腸炎患者の報告例、文献等は現在のところ確認できていない。

その他、致命的要因とはならなかったが、今回の組織所見から、以下のような毒素による組織への影響が考えられた。

2) 糸球体への影響

3) リンパ系への影響

これらのふたつについては毒素による直接的な影響をうけるのか、血管内皮の傷害による二次的な病変なのかは今回、確認できなかった。

4) 腎尿細管上皮への影響

これについては他の実験動物を用いた同様の実験結果から、毒素による直接的な影響であると考えられた。

今回の実験結果を腸管出血性大腸菌感染症患者の病態に当てはめる場合の問題点は、実際の患者では腸内に入った菌体が毒素を産生し、この毒素が生体内にはいるとき血管内へ徐々に入っていくのか、それとも急激に大量の毒素が入ることにより病変が引き起こされているのかということである。これまでの実験結果から毒素が血管内に入ったことにより種々の病変が引き起こされていると推測できる。ヒトにおいても大量の VT1 が一気に血管内に入った場合には血管内皮の傷害による種々の急性病変が引き起こされるのであろう。毒素を少量徐々に血管内にいれていけば、HUS 等の慢性病変を引き起こすことが可能と考えられる。そこで次回の実験では少量の毒素の連続投与を計画している。また、毒素がどのように血管内に入るのかが興味深く、これについては実験方法についてラットで検討中である。

毒素抗原の検出についてはタンパク量が検出限界以下であったと考えられた。さらに感度を上げて検出を試みる。

昨年度報告した、種々の実験動物での同様の実験結果とカニクイザルの実験結果を一覧表にまとめた (Table)。サルにもっとも近い組織病変がみとめられたのはラットであった。

E. 結論

カニクイザルを用いて VT1 毒素 (100mouse LD₅₀/kg) を静脈内投与し、生体への影響を病理組織学的に検索した。その結果、血管内皮細胞の傷害によると考えられる肺の出血と肺水腫、副腎皮質の出血性壊死、くも膜下出血、腎の点状出血等がみとめられ、その他に、腎尿細管上皮、糸球体、リンパ系において組織病変が観察された。少量の毒素を用いて、連続投与を行うことにより、ヒトの患者にみられる HUS と同様の病態を引き起こすことが病理組織学的にも期待できる。

Table: VT1 静脈内投与 (100LD₅₀/匹、サルは100LD₅₀/kg)による各種実験動物への影響

	マウス 12-16g	ラット 100g	モルモット 310-370g	スナネズミ 60-70g	マストミス 60-70g	ハムスター 100-120g	カニクイザル 約3000g
血管内皮病変	●	●	●	●	●	●	●
尿細管病変	●	●	●	●	●	●	●
脱水	●	●	●		●		
下痢		●					
副腎の出血		●					●
肺水腫						●	●
100LD ₅₀ /匹*で致死	●	●				●	●

*サルにおいては /kg

VT1 静脈内投与後 2 日目に死亡したカニクイザルの病理組織像

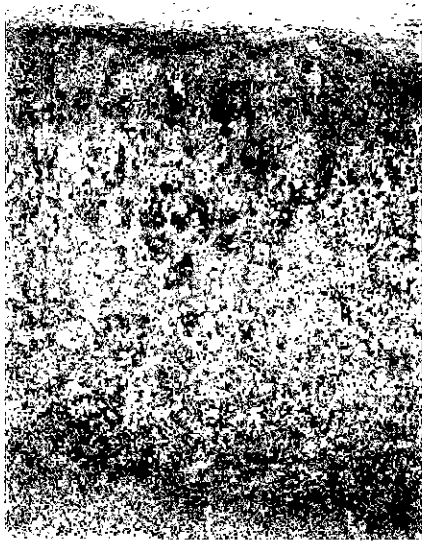


Fig.1 : 副腎皮質の出血 x25



Fig.2a : 脳幹部くも膜下出血 x10

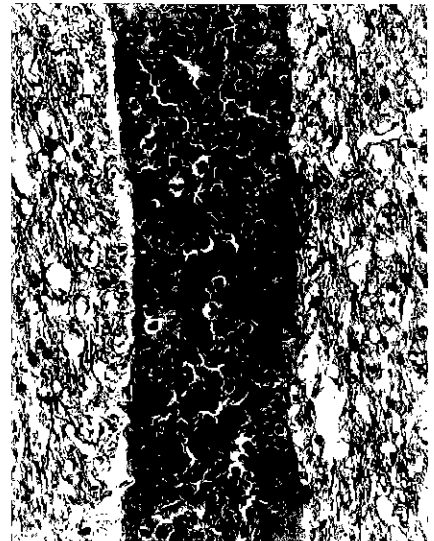


Fig.2b : 脳幹部の小血管内の血栓形成 x100



Fig.3a : 腎皮質尿細管の拡張と鬱血、出血 x10

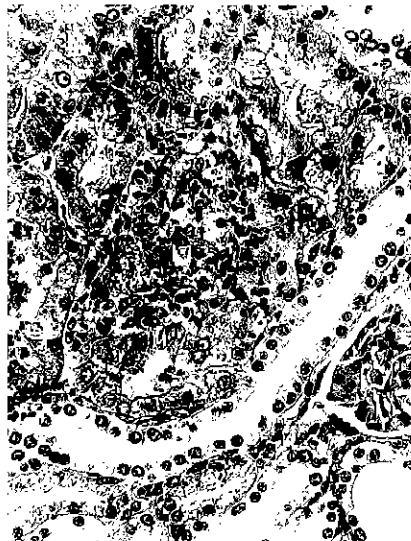


Fig.3b : 腎皮質の尿細管の変性、壊死と炎症性細胞の浸潤 x100

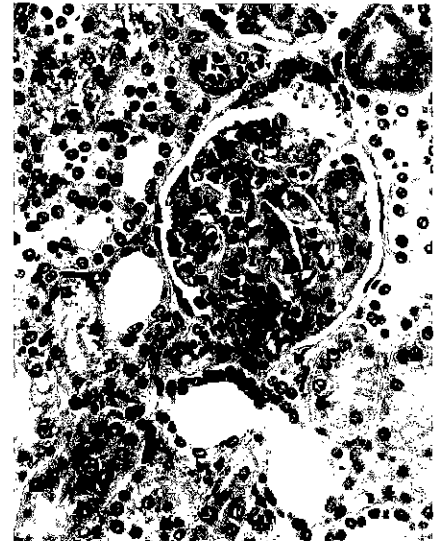


Fig.3c : 腎糸球体毛細血管内への好中球の浸潤 x100

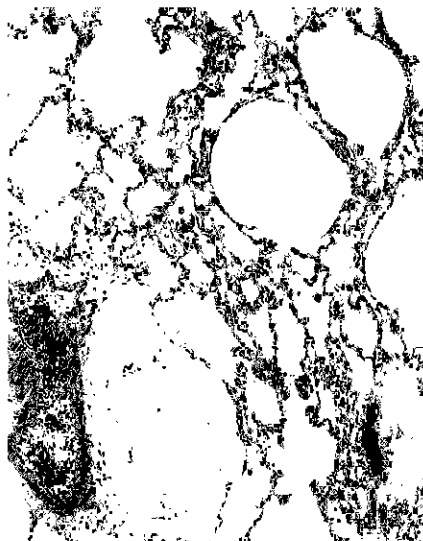


Fig.4 : 肺水腫 x10



Fig.5 : 白脾髄領域の縮少と胚中心の細胞の脱落 x25

分担研究報告書

実験用サル類における Vero 毒素産生性大腸菌の発症機構に関する研究

分担研究者 山田章雄 国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター
協力研究者 寺尾恵治 国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター
小野文子 社団法人・予防衛生協会
高阪精夫 社団法人・予防衛生協会

研究報告

カニクイザルを用いた HUS モデルを作出する目的で、100、1.0、0.1 マウス LD₅₀/Kg の濃度の Vero 毒素 (VT-1) を成体カニクイザルに投与し、Vero 毒素投与に伴う臨床的、血液学的、免疫学的変化について検討した。100 マウス LD₅₀/Kg を静脈内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。剖検時の所見では、腸管出血はほとんど見られず脳幹脳底部にくも膜下出血が見られた。死亡直前の検査結果では、血液凝固時間の延長、フィブリノーゲン量の急増、血小板凝集機能の低下、WBC、RBC、BUN、CPK、CRP、GOT、LDH の増加と血小板および TP の低下が著しかった。一方、1.0 および 0.1 マウス LD₅₀/Kg の VT-1 を静脈内投与したカニクイザルでは、血液、血清生化学検査値には著しい変化は認められなかった。主要リンパ球サブセットの変化では、100 および 1.0 マウス LD₅₀/Kg 投与ザルで、初期活性化マーカーである CD69 陽性の CD20、CD4、CD8 細胞が増加したことから、VT-1 投与によりリンパ系が活性化される可能性が示唆された。

A. 研究目的

Vero 毒素産生性大腸菌 O157 の感染者の一部に溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症し、死亡する例が認められるが、HUS 発症や脳症等の Vero 毒素の作用で生じると考えられている重篤な合併症の発症機序については十分に解明されていない。また、O157 感染に対する有効な治療法も確立されておらず、細菌感染に一般的に使用される抗生物質の投与は治療期間を短縮することができないばかりか、HUS を惹起する危険があるといわれている。O157 感染の有効な予防法および治療法を開発するためには、動物モデルの開発が必要である。本研究では、ヒトに近縁な実験用サル類での HUS モデルの作成を試み、モデル系を用いて、HUS の発症機構、脳症、網膜症などの合併症併発のメカニズムを明らかにするとともに、HUS の予防および治療法を開発を行うことを目的とする。昨年度の研究で精製 Vero 毒素は VT-1 および VT-2 のいずれも 0.5mg/Kg の静脈内投与でカニクイザルに腸管出血を伴う急性致死をもたらすことを明らかにしている。今年度はマウス致死量を指標とした Vero 毒素の生物活性を基にして、低濃度投与による HUS の発症モデルの開発を目的として実験を行った。

B. 研究方法

国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターで繁殖、育成された 16 歳 1 頭、6 歳 2 頭の雌カニクイザルに 100、1.0、0.1 マウス LD₅₀/Kg (以下 mLD₅₀ と略) 量の VT-1 をそれぞれ静脈内投与した。また、6 歳の雄カニクイザルに 100mLD₅₀ 量の VT-2 を静脈内投与した。

採血は投与前 2 日、投与直前、投与後 1、2、3、7、10、17、21 日目に行い、EDTA 加血 0.5ml、クエン酸加血 4.5ml、血清用 4.5ml を採取した。これらの血液を用いて、血球数、臨床生化学検査 (TP、ALB、BUN、GUL、TG、P、Ca、GOT、GPT、LDH、CPK、CRP)、血液凝固能試験 (血漿板数、血漿板凝集能、フィブリン濃度、プロトロンビン時間 (PT)、トロンボプラスチン時間 (PTT)、主要リンパ球サブセットレベル (CD4、CD8、CD20、CD16、CD69/CD4、CD69/CD8、CD69/CD20、DR/CD4、DR/CD8) の継時的変化を調査した。

C. 実験結果

1) 臨床経過：100mLD₅₀ の VT1 を静脈内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、採血直後に死亡した。剖検所見を他の分担研究者の項で詳述するが、病変が腸管ではなく脳に局限していた。そこで、神経症状を伴う HUS モデルの開発を目的として、1.0 および 0.1mLD₅₀ 量の投与を行った。これらのサルは外見上異常は見

られず、粘血便の排出もみられなかった。一方、100mLD₅₀量のVT-2を静脈内投与したサルでは、投与後1カ月の間臨床的な変化は見られなかった。

- 2) 血液凝固能および血小板機能に及ぼす影響：図1に100、1.0、0.1mLD₅₀の異なる濃度のVT1を投与した3頭のカニクイザルでの血液凝固時間、フィブリノーゲン量、30mMのADPで誘導される血小板凝集能の変化を示す。100mLD₅₀投与ザルで死亡直前に著しい変化が見られ、凝固時間の遅延、フィブリノーゲン量の増加、血小板凝集能の低下が認められた。1.0mLD₅₀投与ザルでは一過性のAPTT時間の短縮とフィブリノーゲン量の増加が認められた。
- 3) 血液成分におよぼす影響：図2に示すように100mLD₅₀投与ザルでは、調査したパラメータのすべてで著しい変化が認められ、WBC、RBC、HCT、HGBの急増と血小板(PLT)の減少が見られた。これに対し、1.0および0.1mLD₅₀を投与したサルでは1.0mLD₅₀投与個体でWBCおよびPLTの軽度な増加がみられた。
- 4) 血清生化学検査値に及ぼす影響：図3、図4に示すように、投与量に係わらず同様な変化が見られた項目は、TPの減少、LDHおよびGOTの上昇であった。100mLD₅₀投与ザルではいずれの項目でも著しい変化が認められているが、他の2頭の低濃度投与ザルでは、1.0mLD₅₀投与ザルでCPK、GPT、TGの上昇が見られたが、0.1mLD₅₀投与ザルでは大きな変化は認められなかった。
- 5) 主要リンパ球サブセットレベルに及ぼす影響：図5および図6に9種類のリンパ球サブセットの変化を示す。急性中毒死した100mLD₅₀投与ザルではいずれのサブセットレベルも著しく変化した。CD69陽性のCD20陽性B細胞およびCD4、CD8陽性T細胞のレベルはいずれの投与量でも顕著に増加した。

D. 考 察

昨年度は精製毒素のタンパク量を目安に投与実験を行ったが、0.5mg/Kgの投与量でVT-1、VT-2ともに投与後数日で死亡もしくは安楽殺する状態となった。マウスではタンパク量あたりの生物活性(致死量)はVT-2の方が高いとされていることから、今年度はマウスLD₅₀量を基準にして投与量を決定した。昨年度投与した毒素のマウス

致死量が不明であったが、0.5mg/Kgが500~1000マウスLD₅₀/Kgに相当すると考え、今年度は100、1.0、0.1マウスLD₅₀/Kgの毒素を投与し、低濃度での慢性的な経過に伴うHUSに類似した症状を惹起させることを試みた。その結果、VT-1、VT-2ともに100mLD₅₀を投与したにも関わらず、VT-1を投与したサルのみが投与後2日目に死亡した。VT-2投与ザルは投与後2カ月間の観察期間中に粘血便などの臨床症状は観察されなかった。このことから、サルではマウスと異なりVT-1に対する感受性が高いことが推測される。他の分担研究者の報告にあるように、VT-1投与後死亡したサルでは昨年の死亡例と異なり、腸管には著名な変化はみられず脳のくも膜下出血が認められた。このことから、低濃度のVT-1投与により脳症などの慢性経過を必要とするモデル確立の可能性が考えられ、VT-1の1.0および0.1マウスLD₅₀投与実験を開始した。なお、急性死したサルでの変化は、昨年報告した死亡例での変化とほぼ同様なものであった。すなわち、血液凝固能および血小板機能の低下、白血球数の増加、ヘモグロビン、血漿板、GOT、GPT、LDH、BUN、CRPの増加が観察された。これらの変化はHUS患者で報告されている変化とほぼ同様なものである。

一方、低濃度のVT-1を投与した個体では粘血便などのVero毒素に特徴的な臨床症状は観察されなかったが、1.0mLD₅₀投与ザルでは白血球および血小板の増加、TG、CPK、LDH、GOT、GPT、BUNの増加とTPの減少が認められ、慢性的経過をたどることが推測された。現在、脳波の測定を継続して行っており、これらの結果を総合的に判断して、サルでのHUSモデル作出の条件を決定する予定である。昨年のケースと同様に、VT-1投与後の末梢血リンパ球サブセットの変化では、投与量の多少に関わらず、初期活性化マーカーの一つであるCD69陽性またはDR陽性サブセットの増加が認められた。特に1.0mLD₅₀投与ザルでは活性化マーカーを発現したリンパ球の出現に続いてGOT、GPT、BUNの増加が観察されている。このことから、Vero毒素によりリンパ球、単球、組織球が非特異的に活性化され、活性化細胞から放出されたTNF α やFasLといったアポトーシス関連分子が肝臓および腎臓細胞に傷害を与えている可能性が考えられる。これらの機序については、末梢血中のTNF α およびFasLの定量を行い詳細に検討する予定である。

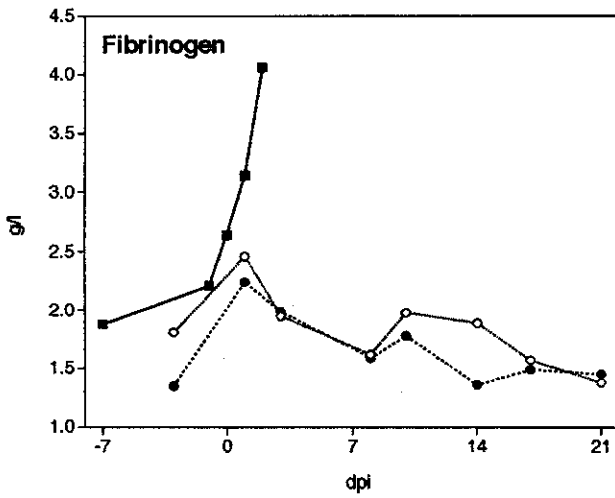
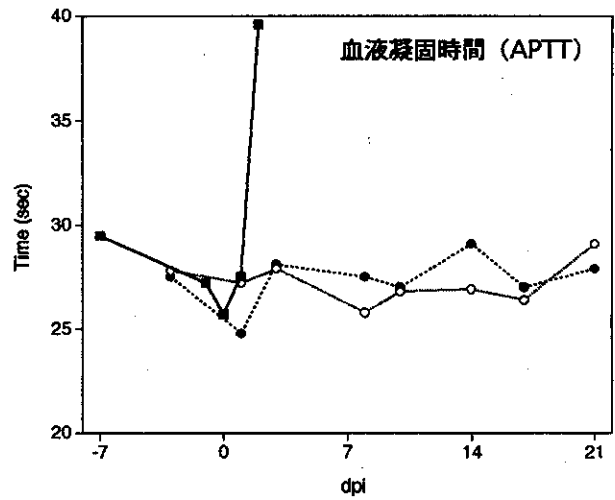
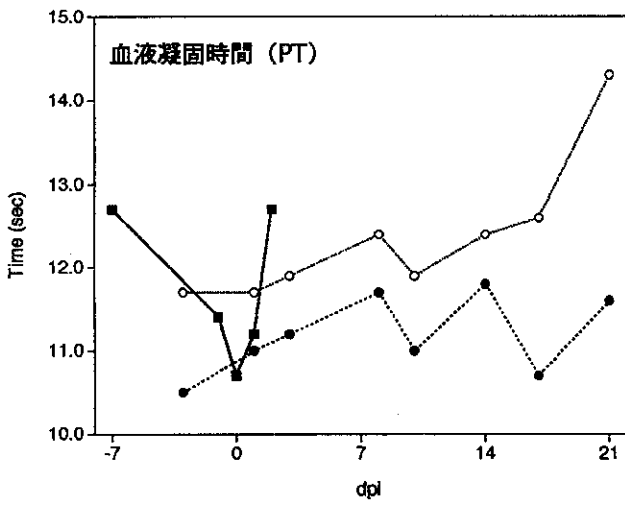
E. 結論

カニクイザルに VT-1 を 100、1.0、0.1 マウス LD₅₀/Kg 投与した結果、100mLD₅₀ 投与個体は、HUS 患者で報告されている変化と同様な臨床経過、血液・生化学検査値、血小板機能の変化を生じて死亡した。一方、1.0、0.1mLD₅₀ 量を投与した個体では、特に 1.0mLD₅₀ 投与個体で血液・生化学検査値および血液凝固能に慢性的な変化が認められ、Vero 毒素の投与量を考慮することによりカニクイザルを用いて HUS のモデルが作成できる可能性がある。

F. 研究発表

なし

図1：血液凝固系、血小板機能におよぼすVT-1投与の影響



VT-1投与量 (マウスLD50/Kg)

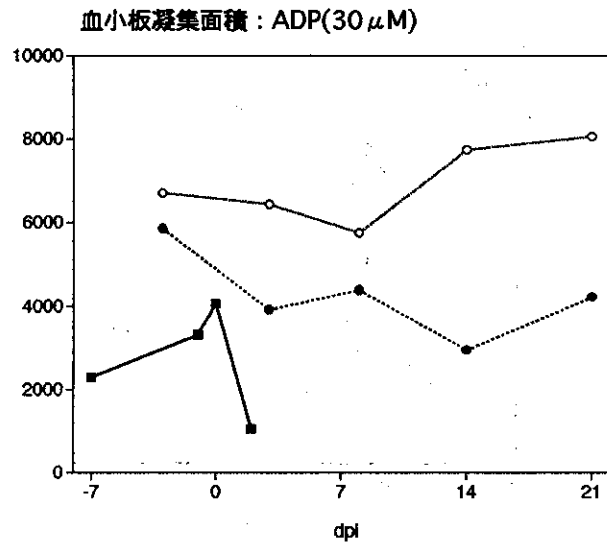
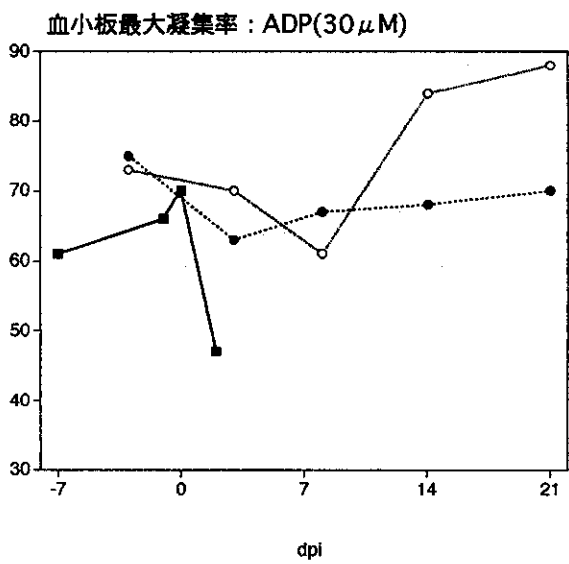
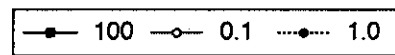


図2：血液系におよぼすVT-1投与の影響

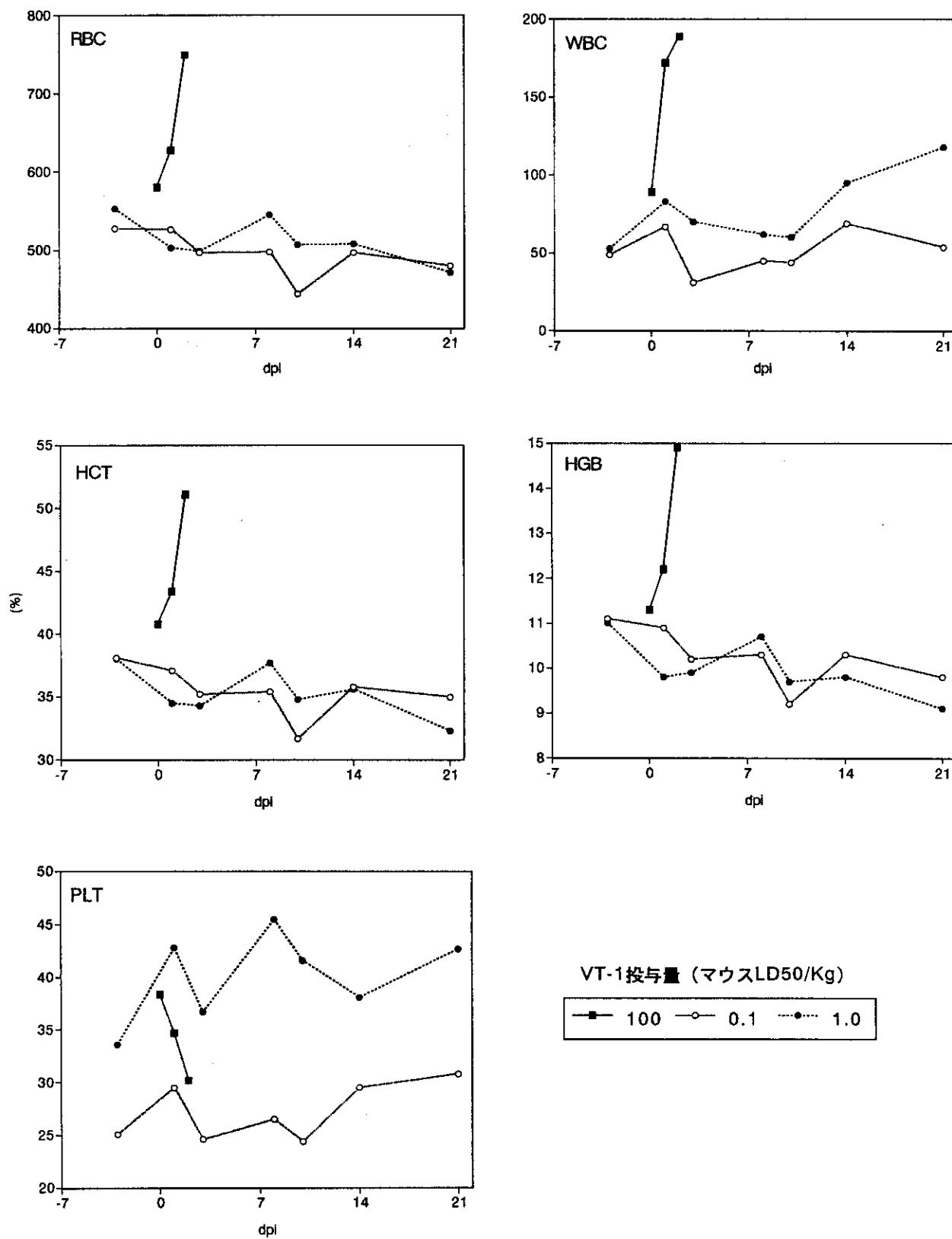


図3：血清生化学値におよぼすVT-1投与の影響-1

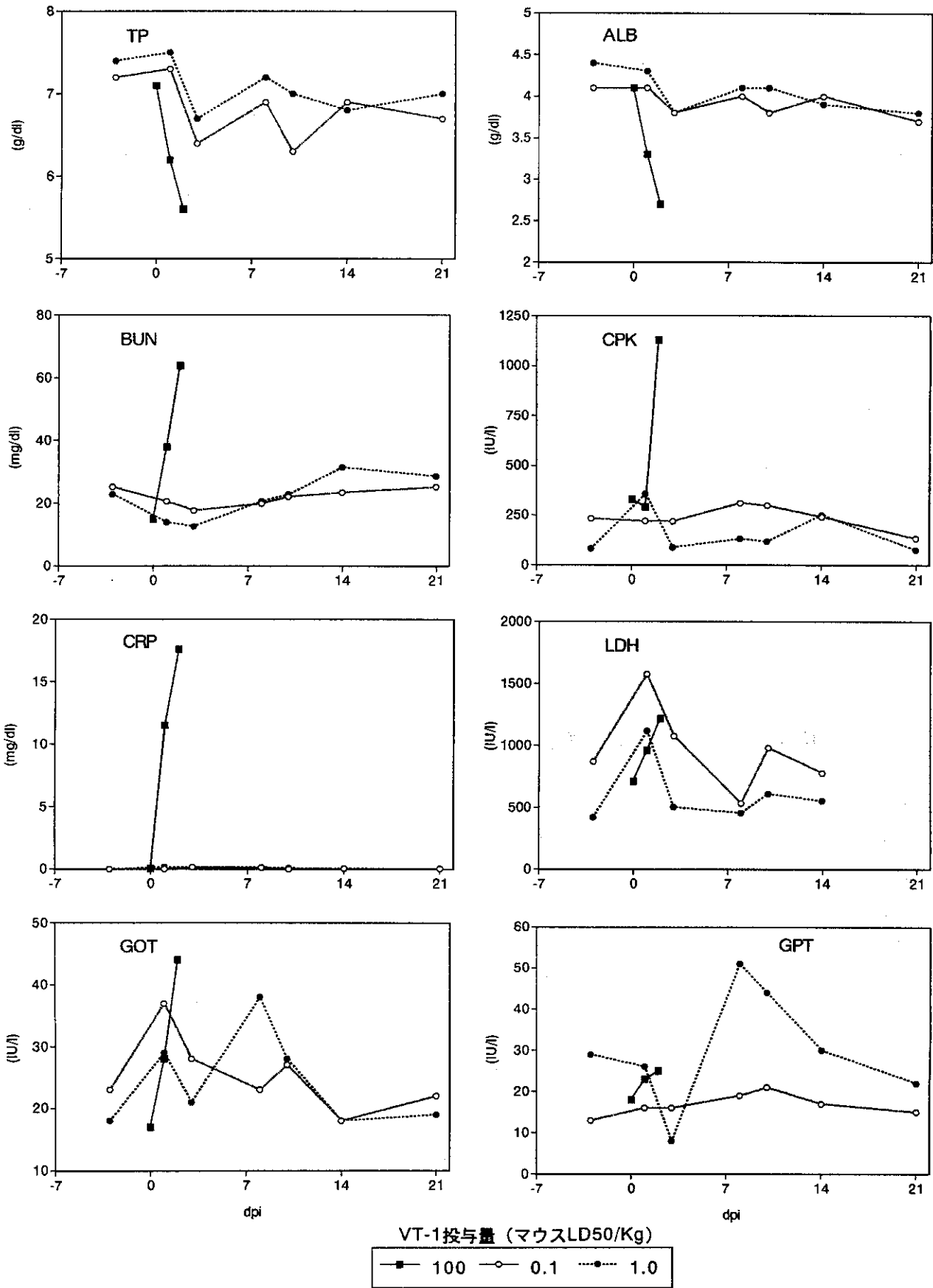


図4：血清生化学値におよぼすVT-1投与の影響-2

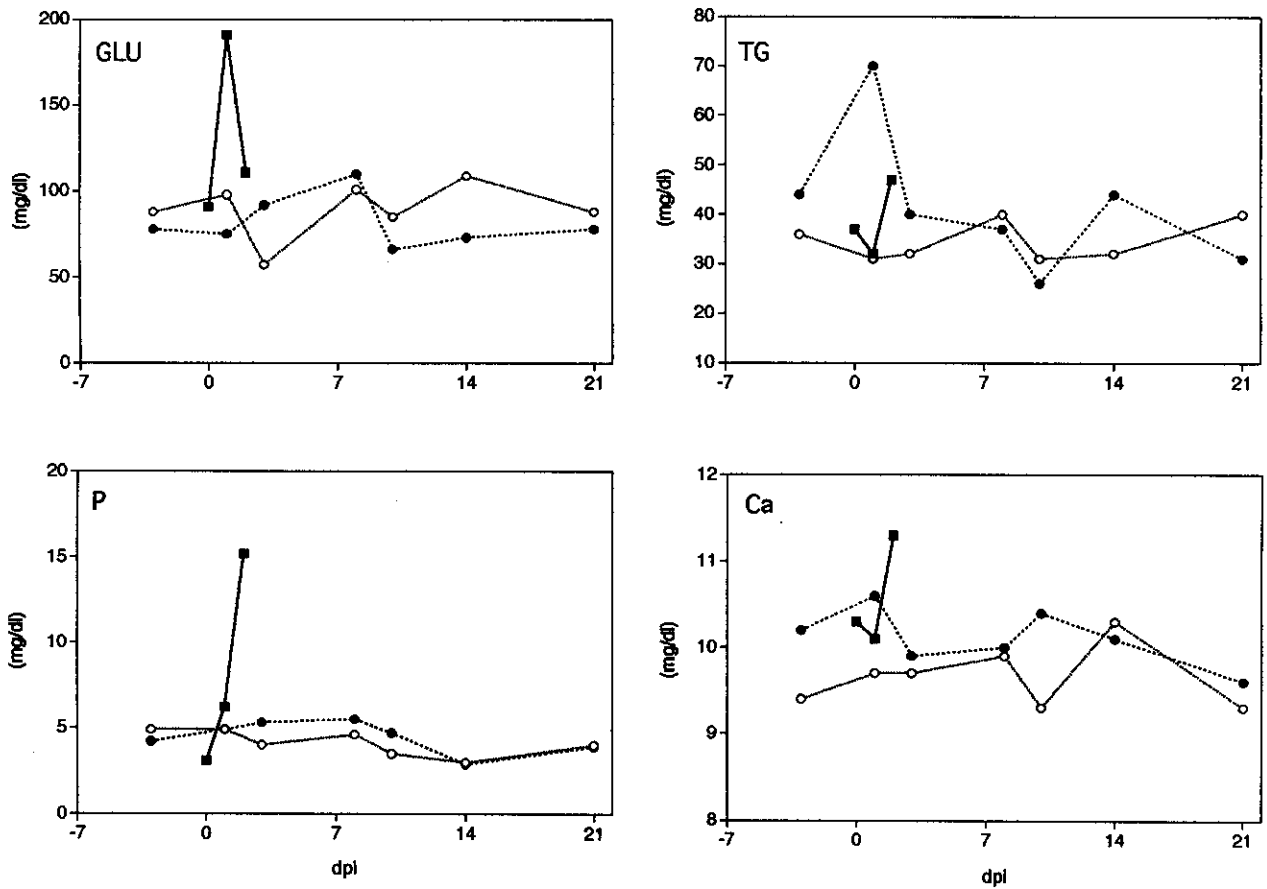


図5：主要リンパ球サブセットレベルにおよぼすVT-1投与の影響-1

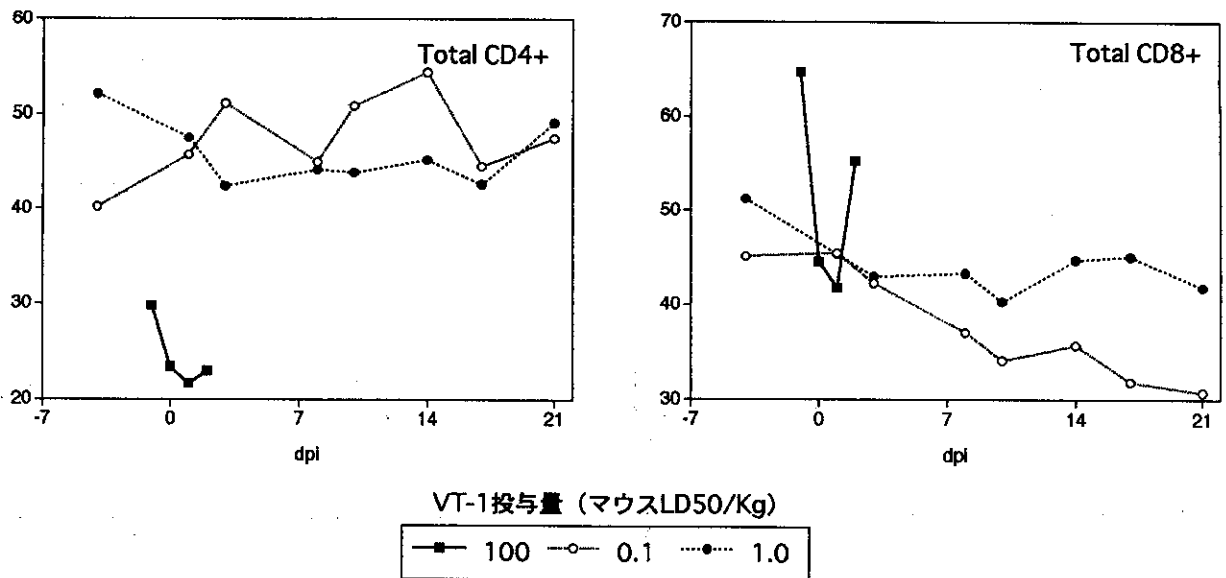
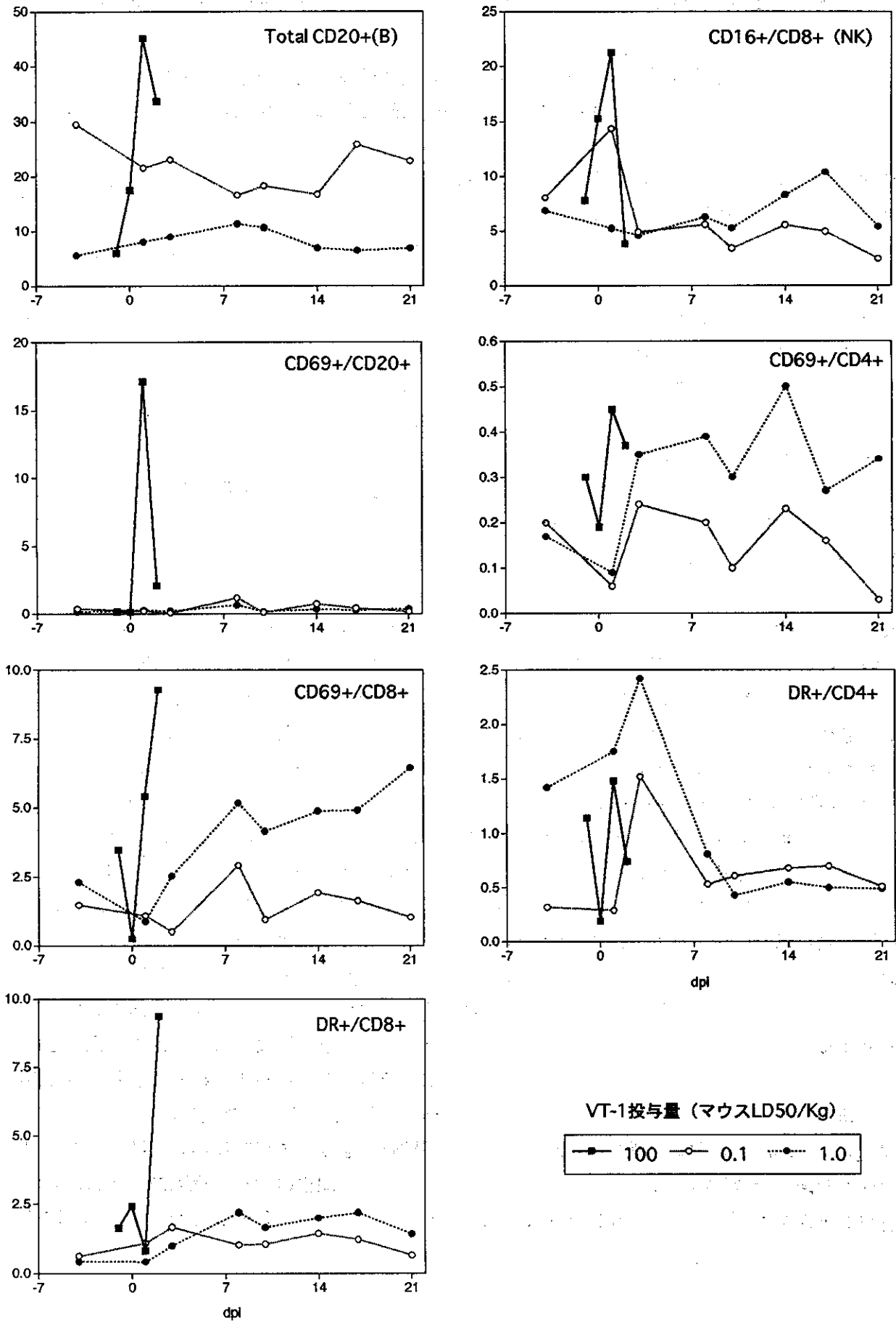


図6：主要リンパ球サブセットレベルにおよぼすVT-1投与の影響



リポソーム結合ペロトキシン投与マウスにおけるO157:H7経口感染に対する抵抗性の誘導

分担研究者： 小室 勝利 (国立感染症研究所・安全性研究部 部長)

内田 哲也、内藤 誠之郎 (国立感染症研究所・安全性研究部)

研究要旨 我々は昨年度の本研究において、VT1-リポソームあるいはVT2-リポソームを免疫したマウスに致死量のVT1あるいはVT2を静脈投与すると、非免疫対照群では顕著な体重減少ののちに全マウスが死亡したのに対して、VT1-リポソーム免疫群では有意な体重減少抑制効果と延命効果とが見られ、VT2-リポソーム免疫群では体重減少も見られず、全マウスが観察期間中生存したことを報告した。本年度は、VT-リポソーム免疫によってO157:H7の経口感染に対する抵抗性を誘導することの可否をマウスを用いて検討した。マウスにVT1およびVT2-リポソームを3回にわたって腹腔投与し、致死量のVT1あるいはVT2を静脈投与したところ、全マウスで体重減少をはじめとする異常が観察されなかった。このマウスにO157:H7を経口投与したところ、対照群の非免疫マウスでは顕著な体重減少がおり投与後5日以内に全マウスが死亡したのに対して、VT-リポソーム免疫群では全マウスにおいて体重減少も見られず、観察期間中無兆候で生存した。このことから、VT-リポソーム免疫によってO157:H7経口感染による致死を回避することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまで、IgE抗体産生を誘導しにくくワクチンの開発にむけた検討を行ってきた。その過程で、リポソームの表面に抗原を結合させたものをマウスに投与すると、抗原特異的IgE抗体産生が選択的に抑制されることを見いだした。本研究では、リポソーム結合抗原をペロトキソイドの作製に応用し、ペロトキシン-リポソーム結合物による、ペロトキシンあるいはO157経口感染に対する抵抗性誘導の可否を検討し、ペロトキシン-リポソーム結合物のペロトキシンワクチンへの応用を検討することを目的とする。

B. 研究方法

マウス：BALB/c (8週齢、雌)は Charles River Japanより購入した。

ペロトキシン：デンカ生研より分与された精製

VT1およびVT2を用いた。実験群と週齢を同じ

くするマウスにおける静脈投与時のLD₅₀は、

VT1=15 ng、VT2=6 ngであった。

リポソーム：VTとの結合に用いたリポソーム (45 mg lipid/ml)は、dipalmitoyl phosphatidyl choline、dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine (DPE)、Cholesterol、Dimyristoyl Phosphatidyl Glycerolから成り、DPEのアミノ基と抗原のアミノ基をグルタルアルデヒド (GA)を介して架橋した。

VTとリポソームとの結合：前年度に同じ。

免疫：マウスにVT1-リポソームあるいはVT2-リポソームを腹腔投与し、免疫後1週ごとに採血を行った。血清中の抗VT IgGおよびIgE抗体はELISA法を用いて測定した。

O157経口感染：本研究においては、ストレプトマイシン耐性O157経口感染系(Wadolkowski et. al. Infect. Immun. 1990;58:2438-2445)

を用いた。ストレプトマイシン(5mg/ml)を含む水を摂取させたマウスに 1×10^9 CFUのストレプトマイシン耐性 0157:H7 strainを経口投与した。

C. 研究結果

VT-リポソーム免疫マウスにおける、抗VT IgGおよびIgE抗体産生：マウスにVT1-リポソームおよびVT2-リポソームを0週、4週、6週の3回にわたって腹腔投与し、抗VT1および抗VT2 IgG抗体産生を観察したところ、図-1 aに示す様に、抗VT1 IgG抗体産生は初回免疫後1週から顕著に観察され、2次免疫によってさらに増強された。これに対して、抗VT2 IgG抗体産生は初回免疫後は低値であったが、4週、6週における追加免疫によって顕著に増強され、初回免疫7週時点で血中抗VT1および抗VT2 IgGとも同レベルとなった。また、この時抗VT1 IgE、抗VT2 IgEともに検出されなかった(図-1 b)。

VT-リポソーム免疫マウスにおける、VTに対する抵抗性：VT-リポソーム初回免疫8週後、マウスに10LD₅₀のVT1あるいはVT2を投与したところ、図-2に示すように、VT-リポソーム投与群ではVT1、VT2のいずれの投与によっても体重減少が観察されず、すべてのマウスが無兆候で観察期間中生存した。これに対して、非免疫対照群ではVT1あるいはVT2の投与によって顕著な体重減少の後、3日以内に全マウスが死亡した。このように、VT-リポソーム免疫マウスではVT1およびVT2に対する抵抗性が誘導されていることが確認された。

VT-リポソーム免疫マウスにおける、0157経口感染に対する抵抗性：VT-リポソーム初回免疫9週後、マウスに0157を投与したところ、図-3に示すように、体重の推移は同一週齢の正常マウスのそれと変わらなかった。一方、同一条件で

0157を経口感染させた非免疫対照群では顕著な体重減少の後5日以内に全マウスが死亡した。

D. 考察

VT-リポソームによる免疫は致死量のVTの投与に対する抵抗性だけでなく、0157の経口感染に対する抵抗性を誘導することがマウスにおいて示された。言うまでもなく、VTに対する中和抗体の産生を誘導することを目標においたワクチンは0157感染を防御するものではない。しかしながら、本研究において、VTに対する中和抗体を誘導することによって、0157の経口感染による致死から回避することが可能であることが示された。

E. 結論

本年度は、VT-リポソーム投与マウスにおける、0157経口感染に対する抵抗性の誘導の可否を検討した。その結果、VT-リポソーム免疫によって0157経口感染による致死を回避することが可能であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fukuda T, Komiya T, Takahashi M, Arakawa Y, Ami Y, Suzaki Y, Naito S, Horino A, Satoh S, Gondaira F, Sugiyama J, Nakano Y, Mori M, Nishinohara S, Komuro K, Uchida T. (1998) Induction of Protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7 in mice by Shiga-like toxin-liposome conjugate. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 116:313-317.

2. 学会発表

1) Naito S, Horino A, Komuro K, Uchida T. Induction of protection against oral infection with verotoxin-producing O157:H7 in mice by verotoxin-liposome conjugate. The 10th International Congress of Immunology. 1998, New Delhi, India.

2) Uchida T. Development of liposome-coupled VT toxoid vaccines. New Frontiers in The Development of Vaccines Against Enterotoxigenic (ETEC) and Enterohemorrhagic (EHEC) E. coli Infections. 1998, Tokyo, Japan.

図-1a

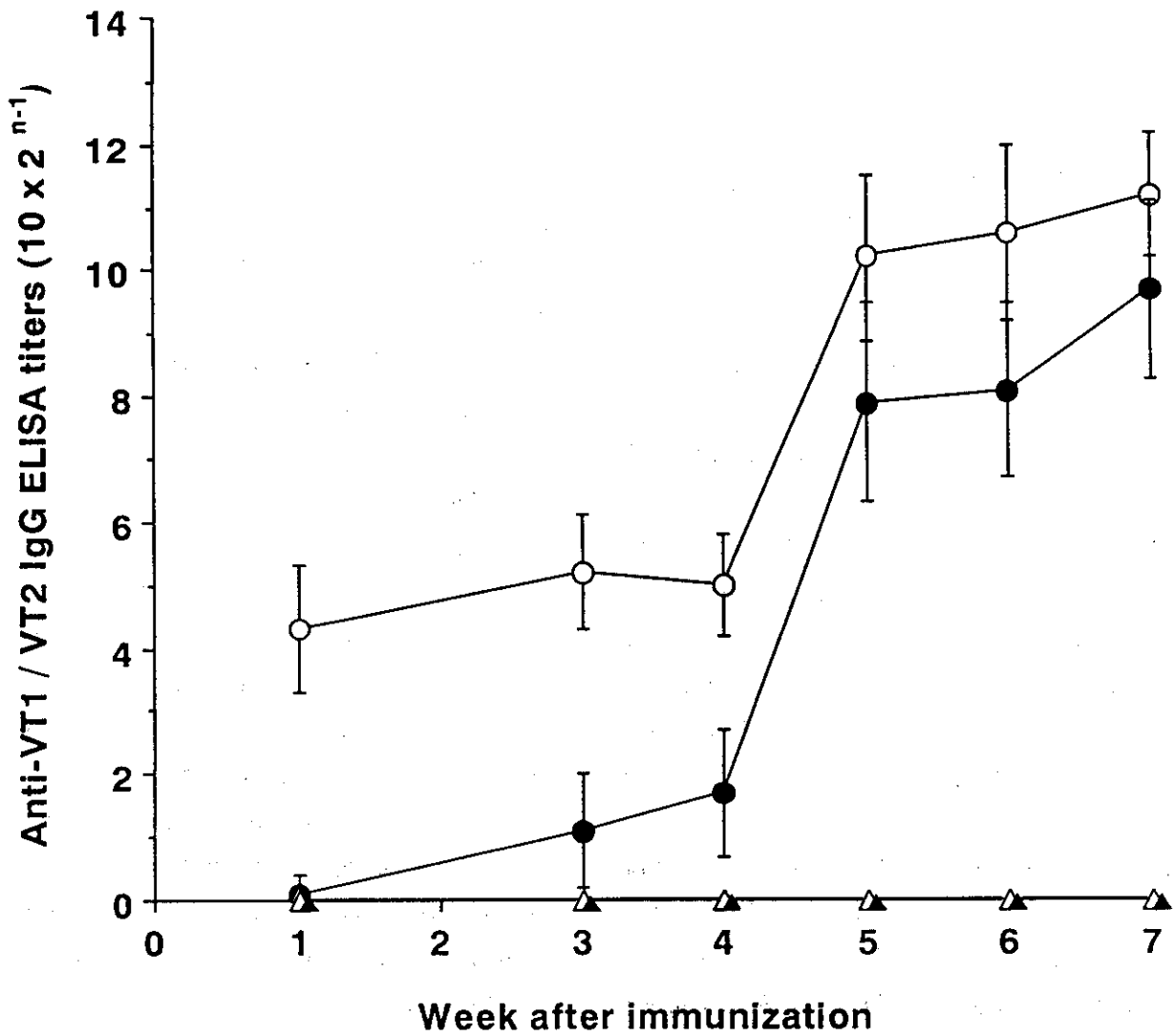


Figure 1 b

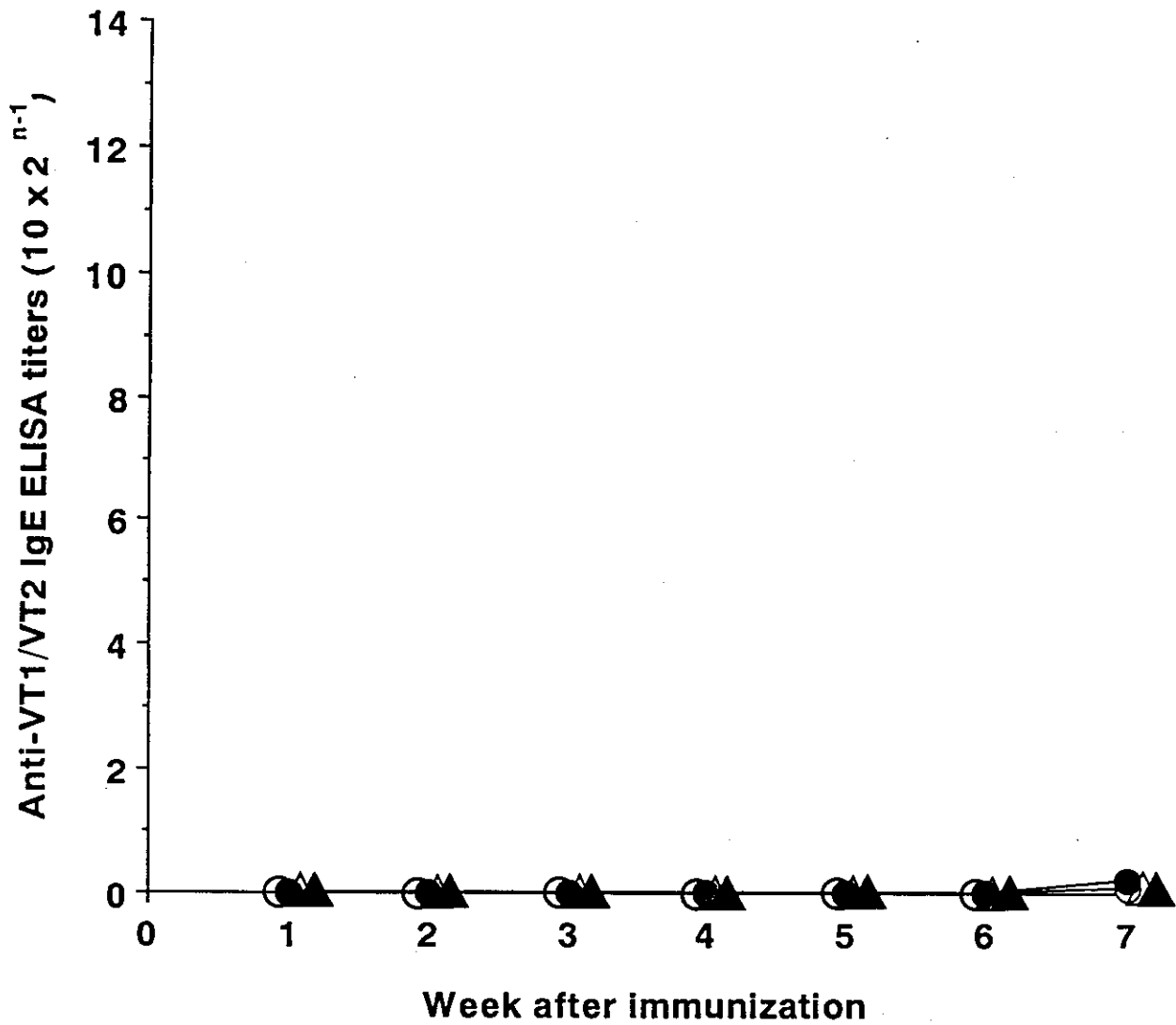


Figure 1 : Anti-VT1 (○, △) or -VT2 (●, ▲) antibody production in mice immunized with the mixture of VT1-liposome and VT2-liposome (○, ●) or ovalbumin-coupled liposome (△, ▲). Four weeks and six weeks after primary immunization, mice received booster injection with the same dose of VT-liposomes as primary immunization. a: IgG antibody production. b: IgE antibody production. Data represent mean ELISA titer and SE of fifteen mice per group.

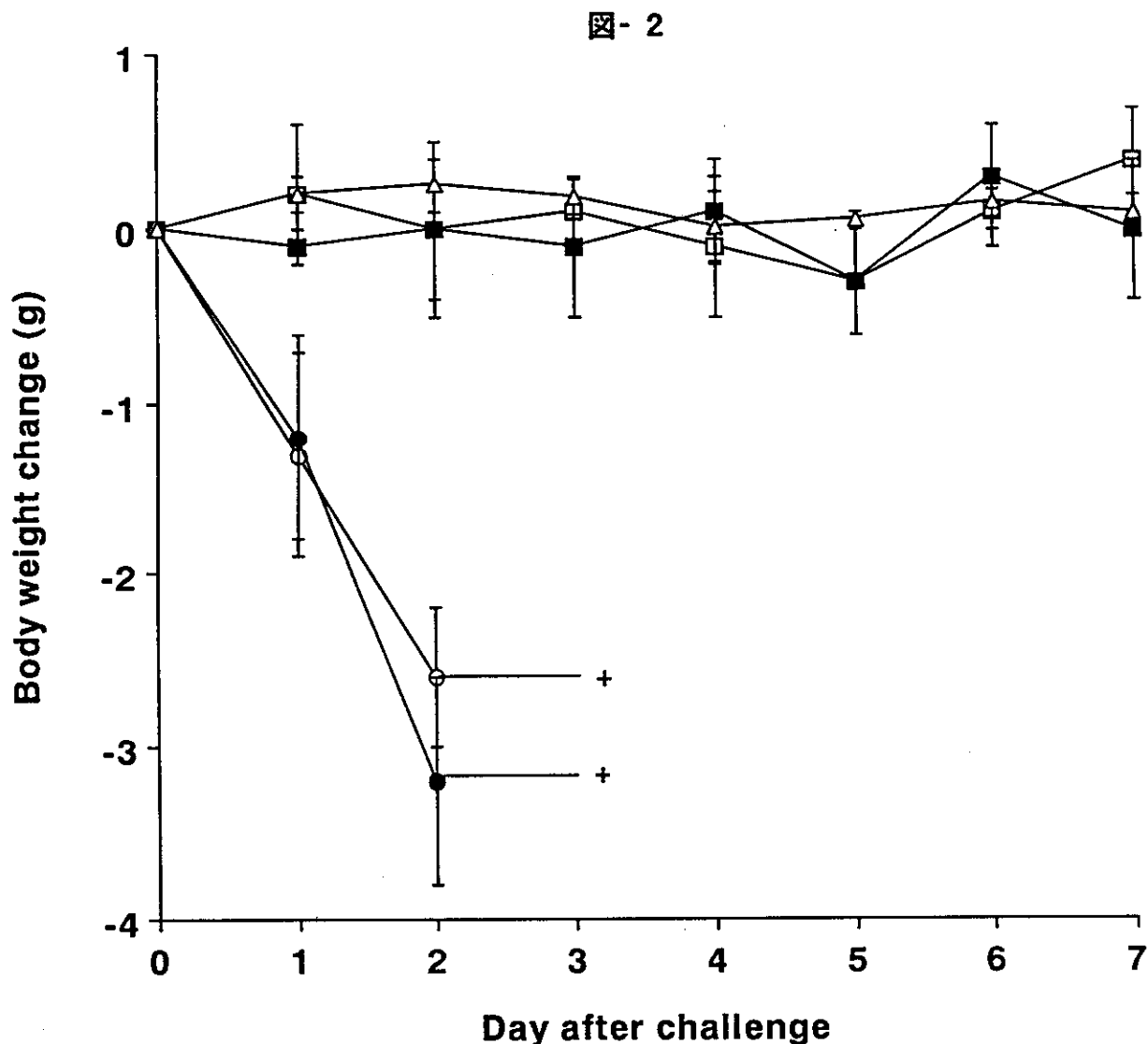
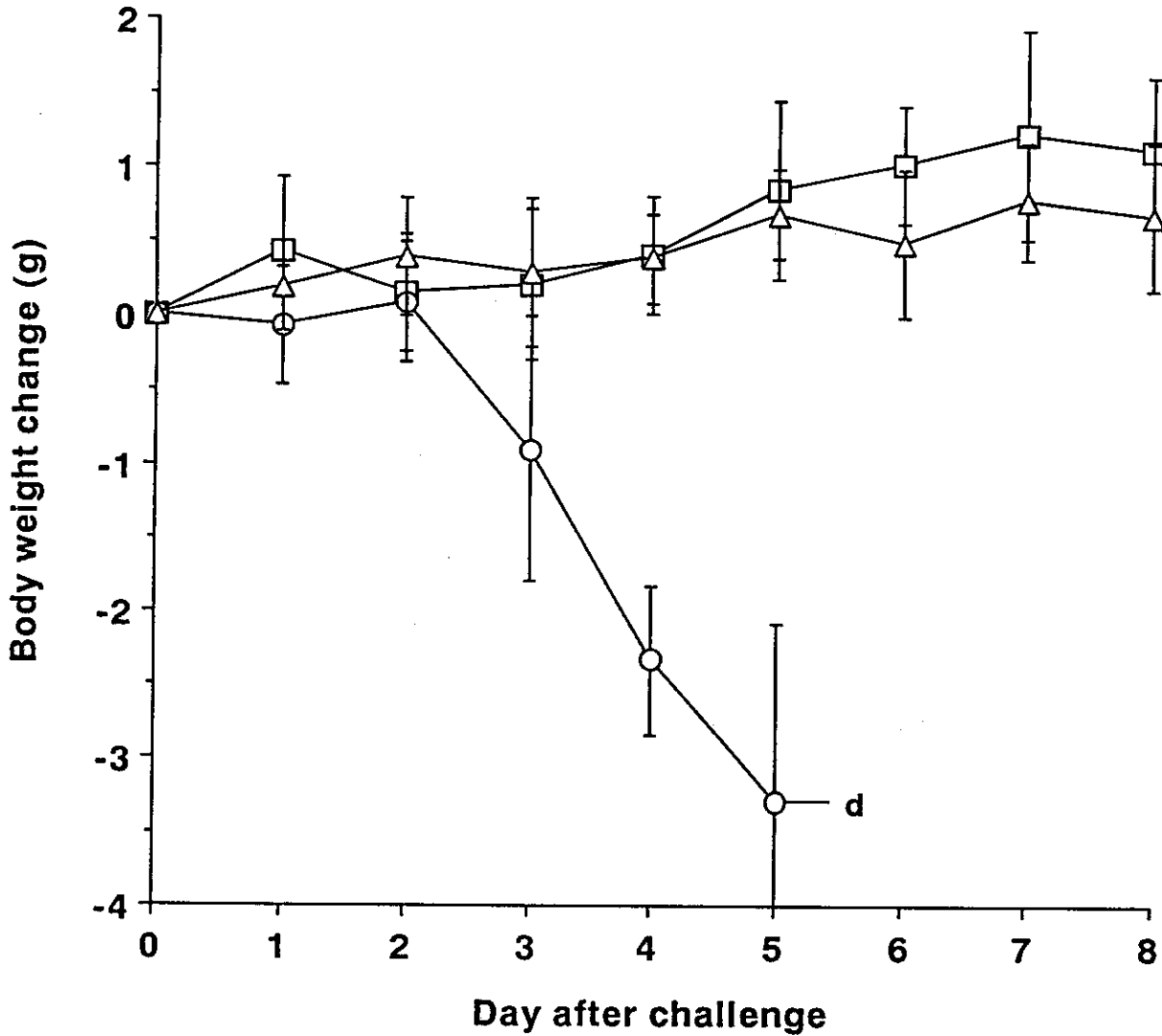


图- 2 : Protection against intravenous challenge with VT in VT-liposome-immune mice. Changes of body weights in mice after intravenous injection with either SLT-I or SLT-II. Eight weeks after primary immunization, $10LD_{50}$ of VT1 (○, □) or VT2 (●, ■) was injected i.v. into VT-liposome-immune mice (□, ■) or age-matched control mice (○, ●) and body weights of each mice were measured thereafter. Control mice received no immunization. Changes of body weights of five age-matched non-infected mice (△) were also shown. Data represent mean body weight change and SE of five mice per group. d: Died on the day after.

☒- 3



☒- 3 : Protection against intragastrical challenge with *E. coli* O157:H7 in VT-liposome-immune mice. Changes of body weights in mice after oral infection with *E. coli* O157:H7. Nine weeks after primary immunization, 1×10^9 CFU of *E. coli* O157:H7 was inoculated intragastrically into VT-liposome-immune mice (☐) or age-matched control mice (○) and body weights of each mice were measured thereafter. Control mice received no immunization. Changes of body weights of five age-matched non-infected mice (△) were also shown. Data represent mean body weight change and SE of five mice per group. d: Died on the day after.

Tadashi Fukuda^a, Takako Kimiya^a
Motohide Takahashi^a
Yoshichika Arakawa^a, Yasushi Ami^b
Yuriko Suzaki^b, Seishiro Naito^c
Atsuko Horino^c, Noriyo Nagata^c
Sachihiko Satoh^d, Fumio Gondaira^d
Jun-ichi Sugiyama^d, Yoshio Nakano^e
Masahito Mori^e
Shouichi Nishinohara^e
Katsutoshi Komuro^e, Tetsuya Uchida^e

- ^a Department of Bacterial and Blood Products,
^b Division of Experimental Animals Research,
and
^c Department of Safety Research on Biologics,
National Institute of Infectious Diseases,
Tokyo,
^d Denka Seiken Co. Ltd., Niigata,
^e NOF Corp., Tsukuba Research Laboratory,
Ibaraki, Japan

Key Words

SLT-I
SLT-II
SLT-liposome
Vaccine

Introduction

Infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli* has become a public health problem of serious concern because it causes two life-threatening complications, hemorrhagic colitis and the hemolytic uremic syndrome [1]. Among Shiga-like toxins (SLT), two antigenically distinct SLT, referred to as SLT-I and SLT-II, are known to be associated with human disease [2]. Although the two toxins are cytotoxic for the same cell lines (Vero and HeLa), SLT-I and SLT-II differ in their biological activities; injected SLT-II produces overt hemorrhagic colitis in rabbits while SLT-I

Induction of Protection against Oral Infection with Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Mice by Shiga-like Toxin-Liposome Conjugate

Abstract

We have previously reported that purified Shiga-like toxins (SLT), SLT-I and SLT-II coupled with liposomes induced a substantial amount of anti-SLT-I and anti-SLT-II IgG antibody production, respectively, in mice. The levels of anti-SLT antibody in the sera of SLT-liposome-immune mice correlated well with the protection against subsequent challenge with SLT. In this study, mice were immunized intraperitoneally with the mixture of SLT-I-liposome and SLT-II-liposome and protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 was evaluated. All of the mice that received immunization with the mixture of SLT-I-liposome and SLT-II-liposome were protected against subsequent intravenous challenge with 10 LD₅₀ of either SLT-I or SLT-II. Eight weeks after primary immunization, mice were inoculated intragastrically with 10⁹ CFU of *E. coli* O157:H7 strain 96-60. All SLT-liposome-immune mice tested survived without any apparent symptom while control mice died within 5 days. In addition, as shown by other antigen-liposome conjugates, SLT-liposome induced undetectable anti-SLT IgE antibody production while they induced substantial amounts of anti-SLT IgG antibodies. These results suggest that SLT-liposome conjugate may serve as a candidate vaccine that induces protection against cytotoxin-producing *E. coli* infection.

produces only mild nonbloody diarrhea [3]. To protect against systemic complications of human infection, active immunization with detoxified SLT to induce production of neutralizing antibodies against SLT would be an important option. We have previously reported that SLT coupled with liposome via glutaraldehyde induced production of a substantial amount of anti-SLT IgG antibody and protection against intravenous challenge with SLT [4]. The aim of this study was to examine whether SLT-liposome conjugate could protect against SLT-induced death after oral infection with cytotoxin-producing *E. coli* in mice.

KARGER

E-Mail karger@karger.ch
Fax +41 61 306 12 34
www.karger.com

© 1998 S. Karger AG, Basel
1018-2438/98/1164-0313 \$15.00/0

This article is also accessible online at:
<http://BioMedNet.com/karger>

Correspondence to: Dr. Tetsuya Uchida
Department of Safety Research on Biologics, National Institute of Infectious Diseases
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208 (Japan)
Tel +81 425 61 9724, Fax +81 425 61 9722, E-Mail tuchida@nih.go.jp