

病原性大腸菌 O157 感染症の  
迅速診断法の開発と発症機構に関する研究

(課題番号 H10-新興-15)

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）  
総括及び分担報告書

平成11年3月

主任研究者 名取 泰博  
(国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部長)

病原性大腸菌 O157 感染症の迅速診断法の開発と発症機構に関する研究

主任研究者 名取 泰博 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部長

研究要旨

Stx1、Stx2 各々に対するモノクローナル抗体を作製し、これらを用いて簡便迅速 Stx1 及び Stx2 検出法（イムノクロマト法）を開発した。本法は ng オーダーの Stx を 20 分以内に検出することが可能である。Stx 処理後のヒト腎尿細管由来腫瘍細胞及び溶血性尿毒症症候群（HUS）患者検体において、DNA の断片化が起き、アポトーシス特異抗原が出現することから、Stx がアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、サイトカイン TNF- $\alpha$  や蛋白合成阻害剤シクロヘキサミドと Stx を共存すると Stx によるアポトーシスが増強されることから、Stx による細胞障害の機序としての蛋白合成阻害及びアポトーシス誘導が、いくつかの因子の影響を受けることを明らかにした。さらに HUS 動物モデルとして有用なラット腎動脈直接 Stx 投与モデルを作成し、この方法により Stx の腎への沈着が見られること、その後激しい腎病変が惹起されることを明らかにした。培養細胞を用いた実験から、ヒト赤血球は生体内においてキャリアーとして Stx を全身に運ぶ作用を示すことを示唆した。

分担研究者

濱端 崇 国立国際医療センター研究所  
細菌感染研究室長

（初年度：山崎伸二・適性技術開発研究室長）

中尾浩史 国立小児病院小児医療研究センター  
感染症研究部研究員

（初年度：竹田多恵・感染症研究部長）

A. 研究目的

病原性大腸菌 O157 をはじめとする腸管出血性大腸菌の感染症における最も重大な問題は一部の患者に溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症を併発することであり、これらの合併症が時に患者を死に至らしめることがある。同大腸菌の主な病原因子はベロ毒素/志賀毒素（Stx）であり、Stx の細胞毒性が HUS の原因となると考えられている。しかし、その機序には不明な点が多く、また同菌の感染を感度よく且つ簡便迅速に診断するのに適した検査法はない。本研究では腸管出血性大腸菌感染症の迅速診断法の開発と臨床医学的細胞生物学的手法や動物モデルや培養細胞を用いた手法を用いて HUS などの合併症の発症機構を解明することにより、同感染症による重大な障害の発生を防止する方策を開発するための基盤を作ることとする。

B. 研究方法

1. 迅速診断法の構築：抗 Stx1 及び Stx2 モノク

ローナル抗体と金コロイド化抗 Stx1 及び Stx2 IgG を用いてイムノクロマト法による Stx1 の検出系を構築し、検出感度及び特異性を調べた。またマレイミドヒンジ法によりオリゴヌクレオチド導入抗 Stx1 及び Stx2 モノクローナル IgGFab を調製し、それに相補的な配列を持つトラップ用オリゴヌクレオチドをニトロセルロース膜に塗布し、Stx1 及び Stx2 に対する検出感度及び特異性を調べた。

2. 臨床医学的細胞生物学的研究：EHEC 感染による HUS にて死亡した女兒の剖検腎、正常マウスあるいは Stx を投与したマウスの腎組織を用いて病理学的、免疫組織学的検索を行った。また培養細胞を用いて Stx の影響を調べた。

3. HUS の発症機構：Stx による腎障害動物モデルはラット右腎の動・静脈に入れたカニューレを通して種々の濃度の Stx1 を還流し、その後カニューレをはずし血管縫合して血流を再開することにより作製した。病原性大腸菌感染症における赤血球の役割を調べるために、赤血球膜のモデル膜構造として、リポソームによる Stx の中和実験を以下のように行った。レシチン、コレステロール、ホスファチジルセリンに Gb3 を加え超音波処理してリポソームを調製した。赤血球膜は健康人赤血球より right-side-out ghost を調製して用いた。Stx1 (10 pg/ml) でベロ細胞を 3 日間処理する際にリポソームあるいは赤血球膜を共存させた時の生存ベロ細胞数から中和活性を

調べた。

### C. 研究結果

1. 迅速診断法の構築のための調製材料を Stx1 検出用イムノクロマトに適用したところ、1 ng/ml を検出できた。導入に最適なオリゴヌクレオチドの検討等を行い、特異的オリゴヌクレオチド導入抗 Stx1 及び Stx2 モノクローナル IgG (Fab) を調製した。上記オリゴヌクレオチドと相補的な配列のトラップ用オリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチド導入イムノクロマト法を用い精製 Stx1 及び Stx2 に対する検出感度を調べたところ、1 ng/ml (絶対量として 100pg) と 5 ng/ml (絶対量として 500pg) を検出可能であり、100 ng/ml の精製毒素を用いても交叉反応は見られなかった。Stx1 単独産生株、Stx2 単独産生株、Stx1+Stx2 産生株の培養上清に含まれる毒素を Stx1+Stx2 同時検出イムノクロマト法で検出したところ、Stx1 単独産生株からは Stx1 のみが、Stx2 単独産生株からは Stx2 のみが、Stx1+Stx2 産生株からは両者が検出できた。

2. 臨床医学的細胞生物学的研究: Stx によって腎障害が引き起こされると考えられているにもかかわらず、実際の症例において、Stx が腎臓に移行し存在することは実証されていなかった。我々は EHEC O157:H7 に感染し、HUS を発症して死亡した 1 歳 9 ヶ月の小児の凍結組織切片を用いて、これを証明した。免疫染色法によって Stx1 および Stx2 が遠位尿管に残存しており、かつ、その部位は Stx のレセプターである Gb3 の局在部位とほぼ一致していた。

一方、Stx の細胞毒性にアポトーシスが関与しているとの報告が出されたために、患者剖検組織を用いてその可能性を調べた。その結果、患者の腎凍結切片上で *in situ* endolabelling (TUNEL 法) により断片化 DNA を検出し、アポトーシスを起こした細胞を観察することができた。すなわち、Stx による腎組織の細胞死にはアポトーシスの誘導が関与していることが証明できた。培養細胞において、サイトカイン TNF- $\alpha$  や蛋白合成阻害剤シクロヘキサミドと Stx を共存させると Stx によるアポトーシスが增強されることから、Stx による細胞障害の機序としてのタンパク質合成阻害及びアポトーシス誘導がいくつかの因子の影響を受けることも明らかにした。

3. HUS の発症機構: 2 mg/ml Stx1 をラット右腎に 5 分間還流後、左腎を摘出すると、24 時間後には血清尿素窒素 (BUN) が上昇し、48 時間後には  $154 \pm 76$  mg/dL に達した。72 時間後

にはさらに BUN が上昇し、一部のラットは死亡した。緩衝液のみを還流、左腎摘出したコントロール群では BUN は正常であった ( $21 \pm 2$  mg/dL)。2 mg/ml Stx1 還流群では毒素の沈着は見られなかったが、2 mg/ml Stx1 を投与したラットでは還流直後に腎集合管に沈着が観察された。また病理学的検索から、腎における広範な組織障害が観察された。これらのことから、本モデルは Stx による腎障害の有用なモデルと考えられた。

Gb3 含有リポソームは用量依存的に Stx1 の細胞毒性を中和した。Gb4 含有リポソームではこの活性は見られなかったことから Gb3 特異的な反応であることが示された。また中和活性を示すには他の脂質に対する Gb3 の比率 (リポソーム膜上での密度) が一定以上であることが必要であり、ヒト赤血球膜上の比率と考えられる Gb3/リン脂質=1/150 のリポソームに中和活性は見られなかった。さらにヒト赤血球膜を血中と同程度の量になるように加えても Stx1 の毒性に対する抑制効果は全く見られなかった。以上のことから Stx の中和に必要な Gb3 の密度には閾値が存在することが明らかになった。また標的細胞として、通常のペロ細胞の代わりに、Gb3 含量が低く Stx に対する感受性が低下したペロ細胞を用いたところこの閾値が低下し、赤血球と同程度の、低い Gb3 密度のリポソームでも中和活性が見られた。これらの結果から生体内において赤血球は、Gb3 含量の低い細胞に対しては中和活性を示すが、Gb3 含量が高く Stx に対して高感受性を示す細胞に対しては中和活性を示さないことがわかった。このことから、Stx は Gb3 含量によって膜間を移動することが示唆され、赤血球は Stx のキャリアーとなっていることが示唆された。

### D. 考察

抗 Stx1 及び Stx2 モノクローナル抗体と金コロイド化抗 Stx1 及び Stx2 IgG を用いてイムノクロマト法による Stx1 及び Stx2 の検出系を構築し、さらにオリゴヌクレオチド導入法を取り入れ改良を試みた。できあがったイムノクロマト法の Stx1 及び Stx2 に対する検出感度は 1 ng/ml と 5 ng/ml であり、100 ng/ml の精製毒素を用いても交叉反応は見られなかった。同一膜上で Stx1 と Stx2 を同時にあるいは独立に検出することが可能であった。

EHEC によって引き起こされる臨床症状は、国内の多くの患者臨床像を集計分析すると、出血性大腸炎を主とする消化器症状にとどまらず、HUS、TTP (thrombotic thrombocytopenic

purpura)、これらに伴うけいれん、意識障害などの中枢神経症状、肺炎、心筋炎、肺出血、肝障害などが報告された。腎障害機序と類似の変化がこうした多臓器にも及んでいることが推測され、これらの臨床症状に対する Stx の関与を明らかにするために、種々の培養細胞及びヒト各種組織切片についてさらに検討し、重症化への進展防止の方法を探る予定である。Stx の腎における標的細胞の一つは尿細管細胞であり、EHEC 感染の病初期においてはたとえ、HUS が発症していなくても、既に尿細管障害が起きていると考えられた。

Stx の腎還流によりラットに急性腎不全を起こすことができた。全身投与とは異なり、このモデルでは他臓器への作用がない状態で腎への影響を調べることができ、腎への Stx の作用を解析するのに有用なモデルと考えられる。一方生体内における赤血球の役割について、ヒト赤血球膜は Gb3 密度が低いためにペロ毒素高感受性細胞に対しては中和活性を示さないことが示唆された。赤血球は生体内に侵入したペロ毒素を組織に運ぶキャリアーとして作用すると考えられる。

#### E. 結論

本研究から、ベッドサイドで応用可能な病原性大腸菌 O157 を含む Stx 産生性の大腸菌感染症の簡便迅速診断法の基本的手法が確立された。今後、本法の感度をさらに向上させるとともに、実際の臨床検体の測定を試みたい。また同菌感染による HUS などの合併症の発症機構について、アポトーシスの関与、動物モデルの作製、赤血球の役割などに関する新しい知見を得た。今後さらにこれらの研究を進め、新しい診断、治療法の開発へと発展させたい。

#### F. 研究発表

1. C. Yamasaki, Yu. Natori, X.-T. Zeng, M. Omura, S. Yamasaki, Y. Takeda and Y. Natori: Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin-1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. *FEBS Lett.* 1999, 442(2-3):231-234
2. Z. L. Ou, Yu. Natori and Y. Natori: Gene expression of CC chemokines in acute tubulointerstitial nephritis induced by puromycin aminonucleoside. *J. Lab. Clin. Med.* 1999, 133(1):41-47
3. Y. Nishizawa, F. Fukai, Y. Natori and T. Katayama: Characterization of fibronectin-related substances in normal and passive Heymann nephritis rats. *Biol. Pharm. Bull.* 1998, 21(5):429-433
4. Yu. Natori, Z. L. Ou, Y. Yamamoto-Shuda and Y. Natori: Expression of lymphotactin mRNA in experimental crescentic glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 1998, 113(2):265-268
5. K. Yanagisawa, Y. Sakakibara, M. Suiko, Y. Takami, T. Nakayama, H. Nakajima, K. Takayanagi, Y. Natori and M.-C. Liu: cDNA cloning, expression, and characterization of the human bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62(5):1037-1040
6. Z. L. Ou, Yu. Natori, N. Doi, K. Kawasaki, M. Nishijima and Y. Natori: Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction for determination of rat CC and C chemokine mRNA and its application to experimental glomerulopathy. *Anal. Biochem.* 1998, 261(2):227-229
7. A. Kimura, J. Ohnishi, H. Okimura, T. Hamabata and T. Takahashi: Localization of prolyl endopeptidase mRNA in small growing follicles of porcine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 50:121-127
8. 山崎伸二、竹田美文: 特集 感染症'98 I. 診断の進歩 2. 腸管出血性大腸菌感染症の迅速診断法、日本内科学会雑誌、第 87 巻、第 11 号別冊、2185-2190
9. H. Uchida, N. Kiyokawa, T. Takeda, J. Fujimoto: The detection of shiga toxin in the kidney of a patient with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res.*, 1999, 133-137
10. A. G. Chaudhuri, J. Bhattacharya, G. B. Nair, T. Takeda, M. K. Chakrabarti: Rise of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and activity in rat enterocytes by heat-stable enterotoxins of *Vibrio cholerae* non-O1. *FEMS Lett.* 1998, 160:125-129
11. T. Taguchi, H. Uchida, N. Kiyokawa, T. Mori, N. Sato, H. Horie, T. Takeda, J. Fujimoto: Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. *Kidney Int.* 1998, 53:1681-1688
12. N. Kiyokawa, T. Taguchi, T. Mori, H. Uchida, N. Sato, T. Takeda, J. Fujimoto: Induction of apoptosis in normal human renal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* Shiga toxin (Stx) 1 and Stx 2. *J. Infect. Dis.* 1998, 178:178-184
13. C. Sharma, M. Thungapathra, A. Ghosh, K. A. Mukhopadhyay, A. Basu, R. Mitra, I. Basu, S. K. Bhattacharya, T. Shimada, T. Ramamurthy, T. Takeda, Y. Takeda, G. B. Nair: Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36:756-793

14. K. Ohmi, N. Kiyokawa, T. Takeda, T. Fujimoto:  
Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to shiga toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 251:137-141
15. H. Furuya, K. Yoshino, T. Shimizu, T. Mantoku, T. Takeda, K. Nomura, N. Suzuki:  
Mass spectrometric analysis of phosphoserine residues conserved in the catalytic domain of membrane-bound guanylyl cyclase from the sea urchin spermatozoa. *Zool. Sci.* 1998, 15:507-516
16. J. Fujii, Y. Kinoshita, Y. Yamada, T. Yutsudo, T. Kita, T. Takeda, S. Yoshida: Neurotoxicity of international Shiga toxin 2 and protection by intrathecal injection of anti-Shiga toxin 2 antiserum in rabbits. *Microb. Pathog.* 1998, 25:139-146

分担研究報告書

迅速診断法の開発研究及び病態発症機構の解明に関する研究

分担研究者 濱端 崇 国立国際医療センター研究所 細菌感染研究室長

研究要旨：金コロイド標識抗体と特異的オリゴヌクレオチド導入抗体を用いたVT1、VT2 各々のイムノクロマト法による検出系を構築した。検出感度および特異性を評価したところ、VT1については1 ng/ml まで、VT2は5 ng/ml まで検出可能であり、100 ng/mlの精製毒素を用いてもお互いに交差反応を示さなかった。また同一ニトロセルロース膜状でVT1とVT2を同時にあるいは独立に検出することが可能であった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症は、欧米をはじめとする先進国で死亡例を伴う集団事例が相次いで報告されており、世界的に大きな社会問題となっている。我が国においても、1996年に学校給食を巻き込んだ大規模集団事例が多発し、少なくとも12名が死亡した。腸管出血性大腸菌感染症は重症化すると溶血性尿毒症候群や脳症を引き起こし、小児や老人を中心に死亡する場合があるので、早期に迅速な診断を下し、適切な治療を行うことが重要である。

本研究では、ベッドサイドでの簡便で迅速な診断法を開発し早期治療に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

1. イムノクロマト法によるVT1検出系の構築：前年度までに抗VT1及びVT2モノクローナル抗体と金コロイド化抗VT1及びVT2 IgGは調製できた。これを用いてイムノクロマト法によるVT1の検出系を構築し、検出感度及び特異性を調べた。
2. VT抗体へのオリゴヌクレオチドの導入：抗VT1及びVT2モノクローナルIgGをペプシン消化後還元処理を行ってFab'とし、各々特異的なオリゴヌクレオチドをマレイミドヒンジ法により結合させた。
3. 特異的オリゴヌクレオチド導入抗体を用いたイムノクロマト法によるVT1及びVT2検出系の構築：上記オリゴヌクレオチド導入抗VT1及びVT2モノクローナルIgGFab'とそれに相補的な配列を持つトラップ用オリゴヌクレオチドをニトロセルロース膜に塗布し、VT1及びVT2に

対する検出感度及び特異性を調べた。

4. VT1・VT2同時検出系の検討：VT1及びVT2抗体特異的（相補的）オリゴヌクレオチドを同一ニトロセルロース膜上に少し場所を違えて塗布し、VT1とVT2の同時あるいは独立検出が可能かどうかを調べた。

C. 研究結果

1. 調製材料をVT1検出用イムノクロマトに適用したところ、1 ng/ml を検出できた。
2. 導入に最適なオリゴヌクレオチドの検討等を行い、特異的オリゴヌクレオチド導入抗VT1及びVT2モノクローナルIgG (Fab)を調製した。上記オリゴヌクレオチドと相補的な配列のトラップ用オリゴヌクレオチドを合成した。
3. オリゴヌクレオチド導入イムノクロマト法を用い精製VT1及びVT2に対する検出感度を調べたところ、1 ng/ml（絶対量として100pg）と5 ng/ml（絶対量として500pg）を検出可能であり、100 ng/mlの精製毒素を用いても交叉反応は見られなかった。
4. VT1単独産生株、VT2単独産生株、VT1+VT2産生株の培養上清に含まれる毒素をVT1+VT2同時検出イムノクロマト法で検出したところ、VT1単独産生株からはVT1のみが、VT2単独産生株からはVT2のみが、VT1+VT2産生株からは両者が検出できた。

D. 考察

抗VT1モノクローナル抗体と金コロイド化抗VT1 IgGを用いたイムノクロマト法では、1 ng/mlの精製毒素を検出できたが、当初バッファーのみのコントロールでも非特異反応のバンドが見られ、

た。この問題は金コロイド標識IgGの濃度を調節することで解決できたが、抗原抗体反応による発色では特異性及び検出感度に限界があることが推察された。

そこで近年イムノクロマト法を高感度化する方法として開発された、遺伝子導入タンパク質を用いた方法を導入した。この方法は、膜状の一端に特異的オリゴヌクレオチドを固層化し、他端の試薬パッド中には金コロイド標識抗VT抗体及び固層化したオリゴヌクレオチドの相補鎖オリゴヌクレオチドを導入した抗VT抗体を乾燥状態で潜ませておき、この端をVTを含む検体に浸すと、金コロイド標識抗体とサンドイッチ複合体を形成したオリゴヌクレオチド導入抗体が膜状を毛細管現象で上がって固層化しているオリゴヌクレオチドとアニールしてトラップされ赤色ラインを形成する、という原理に基づいている。本法の特長は、抗原抗体反応は液層中で起こり、分子も小さく親和性も強いオリゴヌクレオチド同士のアニーリングは固層（膜状）で行われることであり、これにより検出感度や特異性が高まることが期待される。

このオリゴヌクレオチド導入法を用いたイムノクロマトの検出感度は、結果的に精製VT1及びVT2に対しそれぞれ1 ng/ml及び5 ng/mlであり、従来法と比較して検出感度を上げることはできなかった。しかしオリゴヌクレオチドの配列や抗体へのオリゴヌクレオチドの導入効率の改善等今後最適化すべき点は多く、さらに感度を上げられる可能性は十分に考えられる。特異性に関しては優れており、VT1検出系は100 ng/mlのVT2に対しても反応せず、同様にVT2検出系は100 ng/mlのVT1に対しても反応は見られなかった。またこの特異性の高さにより同一ニトロセルロース膜状でのVT1とVT2の同時あるいは独立の検出が可能であった。

このイムノクロマト法によるVT検出系は20分という短時間で、しかも簡単な操作で結果が得られるため、ベッドサイドでの簡便迅速診断法として最適であり、臨床の現場での有用性が期待される。さらなる検出感度の改善が今後の課題と考える。

#### E. 結論

抗VT1及びVT2モノクローナル抗体と金コロイド化抗VT1及びVT2 IgGを用いてイムノクロマト法によるVT1及びVT2の検出系を構築し、さらにオリゴヌクレオチド導入法を取り入れ改良を試みた。

できあがったイムノクロマト法のVT1及びVT2に対する検出感度は1 ng/mlと5 ng/mlであり、100 ng/mlの精製毒素を用いても交叉反応は見られなかった。同一膜状でVT1とVT2を同時あるいは独立に検出することが可能であった。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. 山崎伸二、竹田美文：特集 感染症'98 I. 診断の進歩 2. 腸管出血性大腸菌感染症の迅速診断法、日本内科学会雑誌、第87巻、第11号別冊、2185-2190。

##### 学会発表

1. 川野由希、田中徹也、小沢綾子、山崎伸二、竹田美文：イムノクロマト法を用いた志賀毒素（Stx）迅速検出法構築の検討、第72回日本細菌学会総会、1998年、松本。
2. 川野由希、田中徹也、小沢綾子、山崎伸二、竹田美文：イムノクロマト法を用いた志賀毒素（Stx）迅速検出法構築の検討、第73回日本細菌学会総会、1999年、東京。

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

病原性大腸菌 O157 感染症の臨床医学的細胞生物学的研究

分担研究者 中尾 浩史 国立小児病院小児医療研究センター感染症研究部研究員

研究要旨

患者情報の解析、剖検腎の組織学的解析、動物実験及び培養細胞を用いた実験の結果から、Stx の腎における標的細胞の一つは尿細管細胞であり、EHEC 感染の病初期においてはたとえ、HUS が発症していなくても、既に尿細管障害が起きていると考えられた。また Stx 処理後のヒト腎尿細管由来腫瘍細胞及び溶血性尿毒症症候群 (HUS) 患者検体において、DNA の断片化が起き、アポトーシス特異抗原が出現することから、Stx がアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、サイトカイン TNF- $\alpha$  や蛋白合成阻害剤シクロヘキサミドと Stx を共存すると Stx によるアポトーシスが増強されることから、Stx による細胞障害の機序としての蛋白合成阻害及びアポトーシス誘導が、いくつかの因子の影響を受けることを明らかにした。

A. 研究目的

大腸菌 O157 に代表される腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染によってしばしば引き起こされる HUS (hemolytic uremic syndrome) の発症機構として EHEC の産生する志賀毒素 (shiga toxin: Stx) が関与するとされている。従来、Stx は血管内皮細胞を障害することにより、溶血性貧血や腎不全を惹起するとされてきた。実際に HUS の回復期 (1-2 ヶ月後) の腎生検像において内皮細胞腫大や血管内腔の血栓形成など、ほとんどの所見の報告が血管障害説を支持している。しかし、小川らは 1990 年の埼玉における EHEC の集団発生において病初期に死亡した HUS 症例で、腎における急性尿細管壊死像を報告している。また、我々が行った EHEC 感染による HUS 症例についての臨床所見の検討では、病初期に尿中  $\beta_2$ -microglobulin (BMG) と *N*-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) が全ての症例で異常な高値を認め、腎尿細管障害が疑われた。しかも、これらの異常は発症後 1-2 週で正常に復することもわかり、尿細管は比較的早期に修復されることもわかった。すなわち、回復期の腎生検では見逃される所見であると考えられた。そこで、Stx による腎障害機序を解明するため臨床的解析と動物実験などの研究を進めた。

B. 研究方法

我々が全国小児医療機関から集めた患者情報から HUS 80 例と 出血性大腸炎 (hemorrhagic colitis, HC) 29 例について、入院時の臨床検査データを分析した。EHEC 感染による HUS にて死

亡した女児の剖検腎、正常マウスあるいは Stx を投与したマウスの腎組織を用いて病理学的、免疫組織学的検索を行った。また培養細胞を用いて Stx の影響を調べた。

C. 研究結果

白血球増多、貧血は HUS、HC の双方に見られたが、血小板減少 (HUS:  $9.4 \pm 11.0 \times 10^4/\text{mm}^3$ ; HC:  $22.5 \pm 12.2 \times 10^4/\text{mm}^3$ )、BUN (HUS:  $61.1 \pm 43.6 \text{ mg/dl}$ ; HC:  $16.2 \pm 12.2 \text{ mg/dl}$ )、Cr (HUS:  $2.6 \pm 2.6 \text{ mg/dl}$ ; HC:  $0.4 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$ ) の上昇は腎障害が存在する HUS に見られた。また、細菌感染にも関わらず、CRP が著しく高値でないのは、EHEC 感染症の特徴の一つと考えられた。一方、尿検査においては尿中 BMG、NAG とともに異常な高値を示し、尿細管障害を認めた。HUS に進展した患者では病初期から顕著な異常高値を示しており、HUS の合併症を認めない患者では高値を示すものの、そのレベルは低いことがわかった。この現象が EHEC 感染に特有のものであるか否かを調べるため、血便を呈したキャンピロバクター腸炎の患児 9 例について、早期の尿中 BMG、NAG の値を調べたところ、1 症例を除いて正常値であった。従って、EHEC 感染症においてはその早期から尿細管障害が出現していることが特徴的であると考えられた。また、マウスへ Stx2 を静注した 15 時間後の腎組織では、広範囲にわたって間質の組織構築が乱れており、尿細管の壊死が観察された。しかし、糸球体及び血管の形態は正常に保たれていた。また、正常マウスの腎凍結切片上における Stx2 の結合親和性の実験では、尿細管の限



局した部位及び集合管に Stx2 の特異的な強い結合親和性が認められた。この Stx の特異的結合親和性は Stx1, 2 とともに認められ、マウスの週齢には関係なく同様に認められた。これらの結果より、Stx の腎における標的細胞の一つは尿細管細胞であり、EHEC 感染の病初期においてはたとえ、HUS が発症していなくても、既に尿細管障害が起きていると考えられた。

Stx によって腎障害が引き起こされると考えられているにもかかわらず、実際の症例において、Stx が腎臓に移行し存在することは実証されていなかった。我々は EHEC O157:H7 に感染し、HUS を発症して死亡した1歳9ヶ月の小児の凍結組織切片を用いて、これを証明した。免疫染色法によって Stx1 および 2 が遠位尿細管に残存しており、かつ、その部位は Stx のレセプターであるグルボトリオシルセラミド (Gb3) の局在部位とほぼ一致していた。一方、Stx の細胞毒性にアポトーシスが関与しているとの報告が出されたために、患者剖検組織を用いてその可能性を調べた。その結果、患者の腎凍結切片上で *in situ* endolabelling (TUNEL 法) により断片化 DNA を検出し、アポトーシスを起こした細胞を観察することができた。すなわち、Stx による腎組織の細胞死にはアポトーシスの誘導が関与していることが証明できた。培養細胞において、サイトカイン TNF- $\alpha$  や蛋白合成阻害剤シクロヘキサミドと Stx を共存させると Stx によるアポトーシスが增強されることから、Stx による細胞障害の機序としてのタンパク質合成阻害及びアポトーシス誘導がいくつかの因子の影響を受けることも明らかにした。

#### D. 考察

EHEC によって引き起こされる臨床症状は、国内の多くの患者臨床像を集計分析すると、出血性大腸炎を主とする消化器症状にとどまらず、HUS、TTP (thrombotic thrombocytopenic purpura)、これらに伴うけいれん、意識障害などの中枢神経症状、脾炎、心筋炎、肺出血、肝障害などが報告された。腎障害機序と類似の変化がこうした多臓器にも及んでいることが推測され、これらの臨床症状に対する Stx の関与を明らかにするために、種々の培養細胞及びヒト各種組織切片についてさらに検討し、重症化への進展防止の方法を探る予定である。

#### E. 結論

Stx の腎における標的細胞の一つは尿細管細胞であり、EHEC 感染の病初期においてはたと

え、HUS が発症していなくても、既に尿細管障害が起きていると考えられた。

#### F. 研究発表

1. H. Uchida, N. Kiyokawa, T. Takeda, J. Fujimoto: The detection of shiga toxin in the kidney of a patient with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res.*, 1999, 133-137
2. A. G. Chaudhuri, J. Bhattacharya, G. B. Nair, T. Takeda, M. K. Chakrabarti: Rise of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and activity in rat enterocytes by heat-stable enterotoxins of *Vibrio cholerae* non-O1. *FEMS Lett.* 1998, 160:125-129
3. T. Taguchi, H. Uchida, N. Kiyokawa, T. Mori, N. Sato, H. Horie, T. Takeda, J. Fujimoto: Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. *Kidney Int.* 1998, 53:1681-1688
4. N. Kiyokawa, T. Taguchi, T. Mori, H. Uchida, N. Sato, T. Takeda, J. Fujimoto: Induction of apoptosis in normal human renal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* Shiga toxin (Stx) 1 and Stx 2. *J. Infect. Dis.* 1998, 178:178-184
5. C. Sharma, M. Thungapathra, A. Ghosh, K. A. Mukhopadhyay, A. Basu, R. Mitra, I. Basu, S. K. Bhattacharya, T. Shimada, T. Ramamurthy, T. Takeda, Y. Takeda, G. B. Nair: Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36:756-793
6. K. Ohmi, N. Kiyokawa, T. Takeda, T. Fujimoto: Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to shiga toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 251:137-141
7. H. Furuya, K. Yoshino, T. Shimizu, T. Mantoku, T. Takeda, K. Nomura, N. Suzuki: Mass spectrometric analysis of phosphoserine residues conserved in the catalytic domain of membrane-bound guanylyl cyclase from the sea urchin spermatozoa. *Zool. Sci.* 1998, 15:507-516
8. J. Fujii, Y. Kinoshita, Y. Yamada, T. Yutsudo, T. Kita, T. Takeda, S. Yoshida: Neurotoxicity of international Shiga toxin 2 and protection by intrathecal injection of anti-Shiga toxin 2 antiserum in rabbits. *Microb. Pathog.* 1998, 25:139-146
9. X. Huang, K. Yoshino, H. Nakao, T. Takeda: Nucleotide sequence of a gene encoding the novel *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin that includes a proregion-like sequence in its mature toxin molecule. *Microb. Pathog.* 1997, 22:89-97