

厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

総合研究報告書

Vero 毒素のトキシ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

平成11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 11 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
 波田野焜持 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
 伊豫田淳 国立感染症研究所 細菌部 研究官
 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
 大隈邦夫 (財) 化学及血清療法研究所 次長
 作間 晋 (財) 化学及血清療法研究所 同 第二課長
 諸熊一則 (財) 化学及血清療法研究所 同 研究員
 小堀徳廣 (財) 化学及血清療法研究所 阿蘇支所長
 有働睦夫 (財) 化学及血清療法研究所
 朝賀俊文 (株) 大正製薬 創薬研究所 次席研究員

伊藤修正 (株)大正製薬 創薬研究所 主任研究員

事務及び経理担当者

岡宮洋子 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

厚生科学研究費補助金(新興・再興研究事業) 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

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であり、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。また、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し、サルに注射して副反応と免疫応答を調査した。VT2 で高度免疫して得たウマ血清を材料として、昨年確立した *in vivo* 試験法により抗毒素価を定量し、国内標準品の候補を作製した。また、患者への緊急時対応として治療目的とした抗毒素製剤を試作製造した。さらに、腸管内の毒素を特異的に中和する経口投与用抗毒素を製剤化中である。また、昨年鹿児島県において発生した HUS 患者から単離された Stx2 産生性大腸菌 O86:HNM の病原因子の分布について PCR とサザンハイブリダイゼーションを用いて解析した。

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)

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て検討する。また、作製したウマ抗毒素血清を用い、現在ジフテリア

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。

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°C 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、昨年度までに報告した精製方法について再検討し、精製の効率化を検討した。

(荒川班員)

(2) EHEC : O157 感染動物モデルの作製と病理組織学的解析

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。

昨年度に引き続き各種実験動物 (マウス、ラット、モルモット、カニクイザル等) 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、ヒトに近縁な実験用サル類を用いて、HUS および脳症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の開発を目指した。昨年までの研究で、VT-1 および VT-2 のいずれも精製毒素の単回投与では HUS モデルが作成できないことが明らかになっている。今年度は両毒素の多量または少量単回、少量連続投与後の病原性について病理組織学的解析を行った。

(山田班員、倉田班員、網班員、高橋)

(3) トキソイドワクチンの試作と評価

昨年までに、リポソーム結合ベロトキシン(VT1 および VT2) をマウスに投与することにより、致死量の VT1 あるいは VT2 に対する抵抗性が誘導され、さらにリポソーム結合ベロトキシン(VT1 および VT2) を投与したマウスに病原性大腸菌 O157:H7 経口感染に対する抵抗性も誘導されることを確認した。本年度は、これまでにマウスにおいて得られた結果が、より高次の動物において再現されるか否かについて検討することを目的として、サルを用いた検討を行った。

(小室班員、高橋)

(4) HUS 患者から単離された Stx2 産生性大腸菌 O86:HNM の病原因子に関する研究：

1999 年 9 月、鹿児島県において、志賀毒素産生性大腸菌(STEC) O86:HNM の感染による死亡例が報告された。血清型として O86 を持つ STEC は、国外において環境由来株または動物由来株としていくつか単離されている。しかし、患者由来株としては国内外でこれまでに 1 例ずつ報告されているに過ぎず、その病原性の詳細については不明な点が多かった。本年度は、この菌株が持つ病原因子の分布について PCR とサザンハイブリダイゼーションを用いて解析した。

(渡邊班員)

(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 ー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 ㎖ずつ部分採血する。血中抗毒素価の測定は、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中和抗毒素価定量法で行った。

(高橋)

C. 結果と考察

(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培養後、10L の培養液から得られる培養菌液 (Tp8 株) から、菌の超音波破碎処理、40 %硫酸アンモニウム沈澱法、60 %硫酸アンモニウム沈澱法、DEAE セファロース、さらにハイロード Q セファロースの精製過程を経て、総ラテックス活性で 10^8 LU の VT2 が得られた。精製 VT2 の回収率は菌の粗毒素の約 10% であった。粗精製として VT が沈澱する硫酸アンモニウム濃度を確認した結果、40%未満の濃度では VT が沈澱せず、また 60% の濃度までに VT の 99% が沈澱する事が確認できた。従って、硫酸アンモニウム沈澱法を 2 回のステップに分割して、1 回目の 40% では VT 以外の夾雑蛋白質の除去を目的に、2 回目の 60% では VT を回収する事とした。菌の産生した低分子タンパクや培地成分をあらかじめ除去する事により、その後の工程における不純物と毒素タンパクとの結合を防止することが出来ると考える。

(2) これまでの実験でカニクイザルへの O-157 Vero 毒素の高濃度、低濃度単回投与では感染者で報告されている HUS や脳症を発症させることができないことが明らかになっている。そこで今年度は VT-1 の低濃度連続投与により、HUS および脳症モデルを作成することを目的として、成体カニクイザル 3 頭に、それぞれ 1 マウス LD₅₀/Kg/日の精製 Vero 毒素 VT-1 を 3 日および 5 日連続投与、0.1 マウス LD₅₀/Kg/日の VT-1 を 5 日間連続して静脈内投与した。毒素投与後 1 - 3 日間隔で採血し、臨床的、血液学的、免疫学的変化を調査すると共に、脳波測定をおこなった。今回の投与量では死亡例はみられなかったが、いずれの個体も投与後に食欲不振と体重減少が観察された。1 マウス LD₅₀、5 日間連続投与個体では、投与後 8 日目に後肢のわずかな振戦が観察された。血清生化学的变化では、1 マウス LD₅₀ を投与した 2 頭で、血清中の CPK、LDH、BUN、CRE の一過性の上昇が認められた。末梢リンパ球サブセットでは投与量、投与日数に関わらず 3 頭のいずれでも CD69 または DR 陽性の活性化リンパ球が増加した。一方、脳液には顕著な変化はみられなかった。

病理組織学的な観察では、病変がみられた動物においては血管内皮の傷害、腎尿細管上皮の病変に起因する病態が毒素の投与量、期間に相関して認められた。血管内皮の傷害によって引き起こされた病変としては腸管の出血、腎糸球体病変、肺水腫、くも膜下出血、脳浮腫などがみられた。毒素投与によって急性期に死亡した動物は VT1 投

与群では循環傷害による心筋梗塞、肺水腫が、VT2 投与では出血性腸炎による失血が死因であった。いずれの動物においても尿細管の病変、糸球体病変がみられたため毒素の少量、連続投与を試みたところ、臨床的に神経症状や腎不全の所見が得られ、組織学的にも脳浮腫や糸球体病変を得ることができた。これらの病変は O157 感染患者にみられる臨床症状や HUS 所見と類似していることから、本実験系が HUS、脳症、出血性腸炎の動物モデルとして有用であると結論した。今後、追試を行い再現性を確認し、本実験系を有効に使うことにより O157 感染発症の機序を解明し、トキソイドワクチンや抗毒素の有効性、安全性の評価に役立てたい。

また、O157 感染患者において腸管出血をみることなしに HUS や脳症の発症例の報告があるが、今回の結果から毒素が微量ながらも数日間あるいは長期にわたり血中にはいることにより発症することが示唆された。また、腸管の出血は腸管腔側からも血管側からも Vero 毒素により引き起こされることが明らかとなった。O157 感染患者に対し、感染早期から腸管内あるいは血中の Vero 毒素を中和するための治療を施すことが予後の改善につながると考えられた。特に抗生物質による菌の排除が不可能なケースにおいても腸管内の毒素を中和する事は予後改善に意義のあることと考えている。これらの投与毒素量はマウス 50 %致死量を基準として設定を行ったが、サルにおける生物活性は VT2 の方が強いことが示唆された。サルにおける本実験系において HUS、脳症、出血性腸炎を引き起こすことが確認できた。しかし、今回すべての実験系は動物の数の制限から 1 群 1 頭ずつとしたが、今後、追試を行い再現性を確認することにしている。

(3) サルにリポソーム結合 VT2 を投与することにより、顕著な抗 VT2 IgG 抗体産生が誘導された。この免疫血清中には高値の中和抗体が含まれることが Vero 細胞を用いた中和試験によって確かめられた。リポソーム結合抗原は抗原特異的 IgG 抗体産生を誘導し、IgE 抗体産生が選択的に抑制されることがこれまでのマウスを用いた検討によって明らかになっているが、サルにおいても VT2-リポソームは抗 VT2 IgE 抗体産生を選択的に抑制することが確かめられた。今年度はまた、抗原とリポソームとの結合方法についての検討を行った。4 種類の架橋方法を用いて抗原-リポソーム結合物を作製し、抗体産生の誘導能を検討した結果、従来法のグルタルアルデヒドを用いた架橋方法、および架橋剤として DSS を用いた方法で作製した抗原-リポソーム結合物において

IgG 抗体産生の誘導能、および IgE 抗体産生の選択的抑制効果ともに良好な成績が得られた。なお、研究年度内では完了しなかったが、免疫中のサルは VT2 を静脈内注射して、発症防御効果を確認する予定である。

(4) 患者から単離された Stx2 産生性大腸菌 O86:HNM の病原因子について検討した結果、この菌株は多くの STEC または腸管病原性大腸菌 (EPEC) で、宿主細胞表層の不可逆的な壊変に必要とされる因子をコードする *eaecA* と、多くの EPEC で宿主細胞への接着因子として機能している繊毛遺伝子 *bfpA* を保持しない一方で、腸管凝集性大腸菌 (EAEC) に特徴的な病原性プラスミドを保有することが明らかとなった。HEp-2 細胞を用いて *in vitro* で宿主細胞への接着様式を調べたところ、EAEC に特徴的な凝集性接着能を示したことから、この菌株は STEC と EAEC の両方の特徴を持つ大腸菌であることが明らかとなった。一方、この菌株に存在する *stx2* 遺伝子が、他の STEC 株と同様にファージにコードされている可能性を検討したところ、STEC O157:H7 の典型的な菌株である EDL933 株に溶原化している *stx2* ファージと、構造的、機能的に同性的のあるファージにコードされていることが判明した。以上の知見は、これまで独立したカテゴリーに属すると考えられていた下痢原性大腸菌が、その特徴をそれぞれ組み合わせたタイプとしても存在し、少なくともその一部のものは、ファージあるいはプラスミドの水平伝達によって病原因子を獲得している可能性が強く示唆された。

(5) 基礎免疫として VT2 リポソームワクチンを、追加免疫として VT2 をウマに注射した (昨年度報告)。免疫後 30 週目に試験採血した血清中の抗毒素価を確認し、頸静脈より 5 リッターずつ 4 回採血し、総計約 8 リッターの血清を得た。この血清は濾過膜通過後、約 4.5 リッターは標準抗毒素の候補用として、2 ml ずつ小分け凍結乾燥したものを約 2000 本作製した。残りの 3.5 リッターは治療用抗毒素として、現行の抗毒素製剤と同様な工程でペプシン処理・精製した後、2 ml ずつ小分け凍結乾燥したものを約 1500 本製造した (図 1)。候補標準抗毒素標品は表 1 と 2 に示すような品質試験を行った。また、力価試験は、本研究班で確立したマウスを用いた中和試験法で定量した結果、2 ml で溶解後 100 倍希釈した 1 ml は 200 - 400 LD₅₀ の VT2 を中和し、1000 倍希釈した 1 ml は 20 - 40 LD₅₀

の VT2 を中和した。4回の試験成績を統計解析した結果、抗毒素の希釈と毒素の用量反応線が得られる区間を図2に示した。なお、培養細胞法での測定結果は、10,000 倍希釈した 1 ml は 16 CD₅₀ の VT2 を中和した。また、治療用の抗毒素の力価は、ペプシン消化、精製工程操作により多少低下し、標準品の約 1/2 の中和抗毒素価であった。

腸管内の毒素を特異的に中和する経口投与用抗毒素は、治療対照患者は下痢症状を呈していること、患者の家族や医療従事者に予防用に投与するためには、抗毒素抗体は腸管内で長時間留まる剤型としたい。さらに、胃酸や消化酵素による作用を逃れるために、粘張剤とともに抗毒素抗体を腸溶カプセルに充填し、パイロット剤を作製し、サルで効果確認試験を予定している。

抗 VT1 の標準品については、現在ウマを免疫中であるが、VT2 に比べ抗毒素価の上昇は高くない。しかし、国内標準品と治療用の抗毒素作製量は確保できる見込みである(図3)。

また、(3)で免疫中のサルの血中抗毒素価の現在までの推移を図4に示した。

D. 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40%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と考える。

小動物およびカニクイザルを用いて VT1 あるいは VT2 毒素を投与し、生体への影響を病理組織学的に検索した結果、Vero 毒素は血管内皮細胞の傷害、腎尿細管上皮、腸管出血を引き起こすことが明らかとなった。これらの病態は動物種により特徴的であり、モデル動物として有用であると考え。特にカニクイザルに VT1、VT2 いずれも少量の毒素を連続的に静脈内投与することによって O157 感染患者にみられる HUS、脳症と同様の病態を引き起こすことが病理組織学的に明らかになった。

また、1.0 および 0.1 マウス LD₅₀/Kg の VT-1 をカニクイザルに3日間、5日間連続投与した結果、CPK、LDH、BUN、CRE などの組織損傷を反映すると見られる測定値が一過性に上昇すると共に、1.0 マウス LD₅₀/Kg、5日間投与個体で投与終了後3、4日目に後肢の軽微な振戦が認められた。脳波には異常をみとめなかったが、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ることと併せて、Vero 毒素の投与量と投与期間を考慮することによりカニクイザルを用いて HUS および脳症発症モデルが作成できる可能性がある。

リポソーム結合抗原は Vero トキソイド、あるいは Vero トキシンワクチンの創製に応用することが、ヒトに近縁な実験用サルを用いた実験で安全性、有効性に問題がないことが確認できた。

HUS 患者由来の STEC O86:HNM 株は、STEC に加え、EAEC の特徴を示すことが判明した。HUS 由来の O86:HNM 株に存在する stx2 は、ファージゲノム上にコードされており、STEC O157:H7 の菌株に溶原化している stx2 ファージと、構造的、機能的に類似したものであることが判明した。

VT2 に対する標準抗毒素の候補品と緊急用治療用の抗毒素製剤を作製した。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) Iyoda S., Wada, A., Weller, S.J.A Flood, E Schreiber, B. Tucker, and Watanabe, H. 「Evaluation of AFLP, a high resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates.」 *Microbiol. and Immunol.* 43:803-806, 1999

2. 学会発表

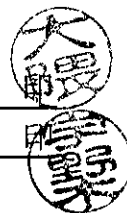
(1) 高橋元秀、小宮貴子、福田 靖、有働睦夫、小堀徳広、大隈邦夫、内田哲也、荒川宜親「腸管出血性大腸菌が産生する毒素 SLT-2 に対する標準抗毒素の試作」第3回日本ワクチン学会(1999.7.31)

(2) Komiya, T., Fukuda, T., Nagaoka, Y., Naito, S., Uchida, T., Okhkuma, K., Sakuma, S., Morokuma, K., Arakawa, Y, and Takahashi, M. 「Pilot production of a standard antitoxin against Shiga-Like toxin-2 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli*.」 Fifth Asia-Pacific congress on animal, plant and microbial toxins. THAILAND. Oct. 1999

(3) Khawplod, P., Khaw, O., Thaitumnu, S., Noiphrom, J., Limusanno, S., Saengseesom, W., Pakmanee, N., Satoh, T., Takahashi, M., and Sitprija, V. 「Serotype of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. (EHEC) O157:H7 and non-O157 isolated from diarrhea patients in Thailand.」 The 38th kasetsart University Annual Conference Feb. 2000

表 1

VT2-ウマ抗血清(粗血清)の製造・試験記録

製造管理責任者 大隈 邦夫品質管理責任者 宇野木 正憲製造所名 (財)化学及血清療法研究所製造番号 9901C製造年月日 1999年5月26日

小分製品製造記録

1. 製剤の条件:

蛋白窒素量 10.6 mgPN/mL (凍結乾燥前)分注量 2 mL/10 mL-バィル保護剤 無添加

2. 凍結乾燥:

凍結乾燥年月日 1999年5月24日～5月26日

小分製品試験記録

	判定年月日	成績
1. 外観検査	<u>1999年6月4日</u>	<u>適合</u>
2. 溶解性試験	<u>1999年6月4日</u>	<u>適合</u>
3. 不溶性異物試験	<u>1999年6月4日</u>	<u>適合</u>
4. 蛋白窒素量	<u>1999年5月27日</u>	<u>9.5 mgPN/mL (注射用水 2 mLで復元後)</u>
5. 含湿度	<u>1999年6月15日</u>	<u>0.41%</u>
6. 無菌試験	<u>1999年6月9日</u>	<u>適合</u>
7. 総合評価	<u>1999年6月15日</u>	<u>適合</u>

備考

出荷記録:

1. 出荷先 国立感染症研究所 細菌・血液製造部
2. 出荷本数 2,000本

図 1

VT2(O157)-ウマ抗毒素

Batch 9901C
(Batch 1313-1110, 1313-1118, 1313-1125 & 1313-1202)

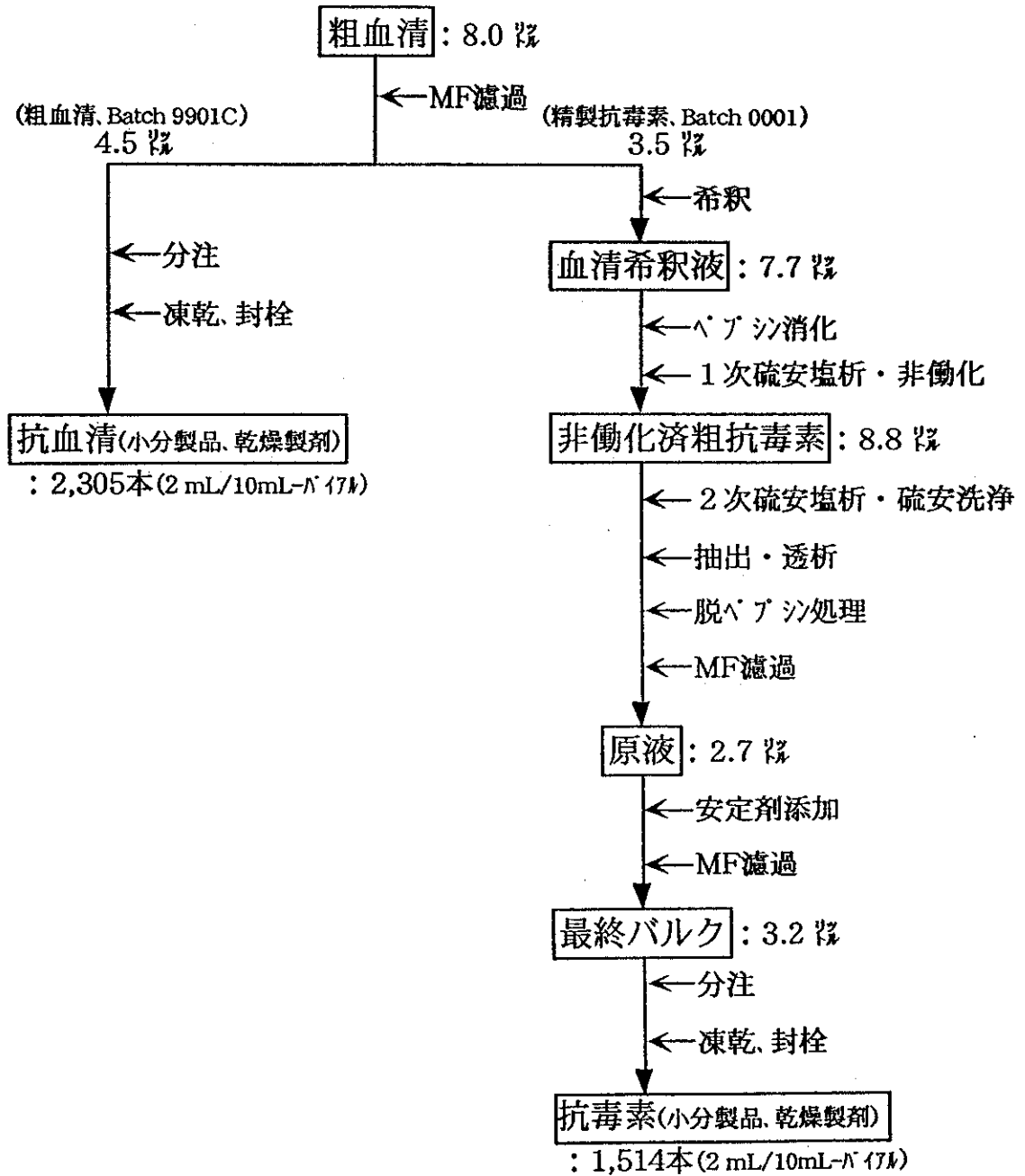


表 2

* 標準品候補：凍結乾燥標品として2,000本作製

* 試験項目

1 : 含湿度	0.41%
2 : タンパク含量	19 mgPN/vial
3 : 無菌試験	適合
4 : 溶解度試験	適合
5 : 力価試験	

バイアル1本を2mlの蒸留水で溶解

抗VT2抗体価を測定

(1) 培養細胞法 (VERO細胞)

10,000倍希釈した1mlは16 CD50の SLT-IIを中和する

(2) マウス中和試験法

100倍希釈した1mlは200-400 LD50の SLT-IIを中和する

1,000倍希釈した1mlは 20-40 LD50の SLT-IIを中和する

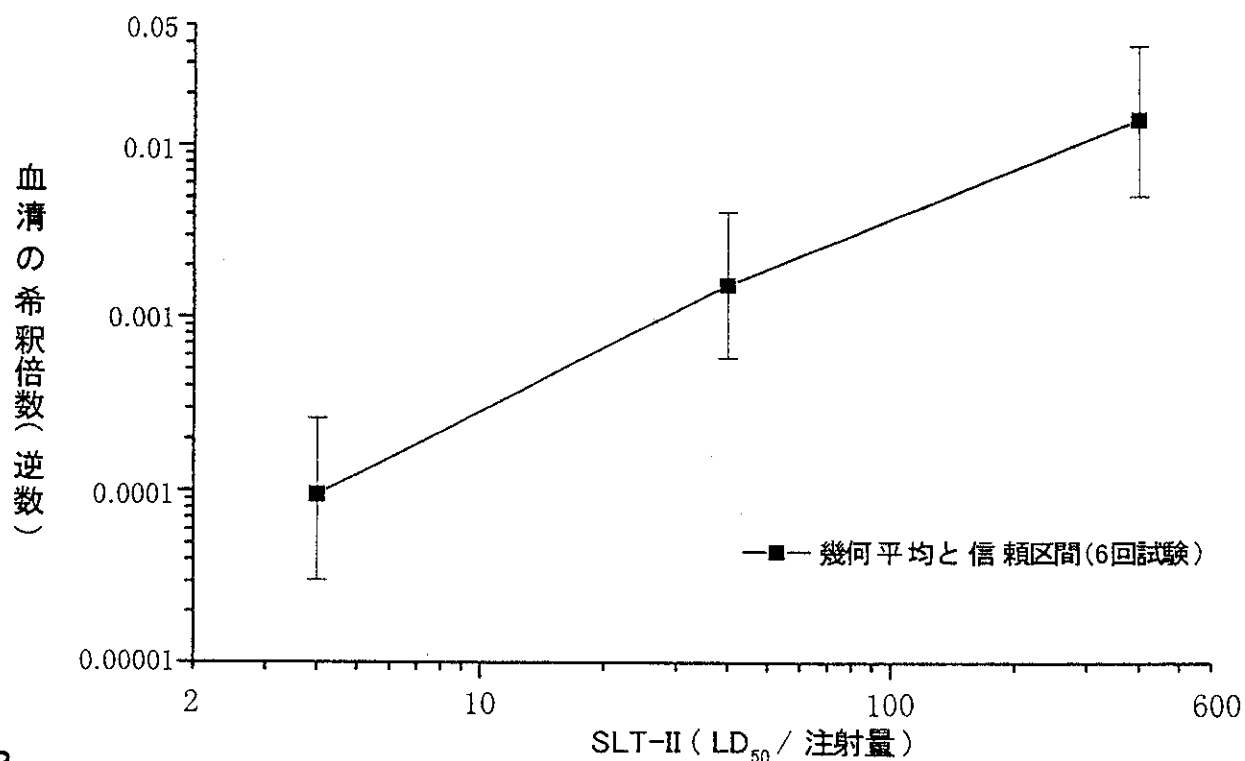


図 2

マウス中和試験で用量反応直線区間が得られる毒素と血清の関係

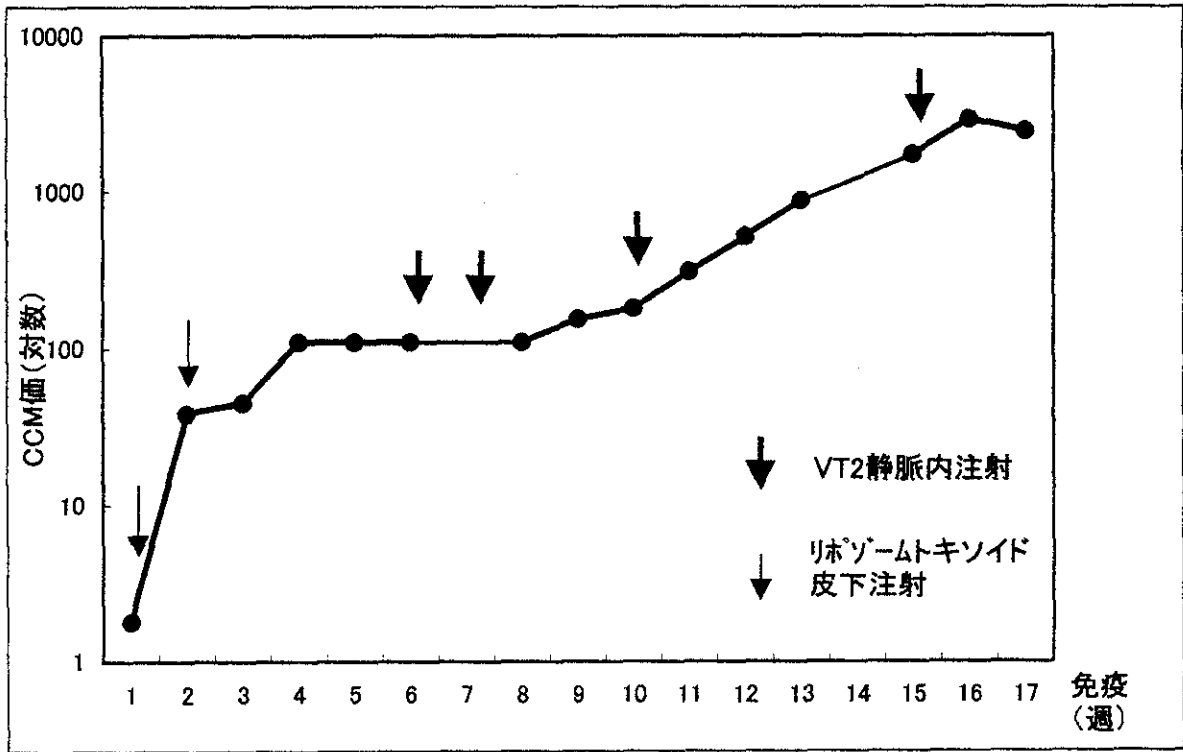


図3 VT1免疫ウマの抗毒素価の経時的推移

分担研究報告書

菌の大量培養と Vero toxin 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

我々は遺伝子組換え Vero toxin (VT) 大腸菌を利用し、簡便かつ安価な 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。培養菌体を超音波破碎処理を施し、粗毒素を抽出する。その後、40%の硫酸アンモニウム沈澱法で、粗毒素から夾雑蛋白を除去し、60%の硫酸アンモニウム沈澱法で毒素を沈澱・回収する。さらに HPLC を含む2回のイオン交換クロマトグラフィーで、VT を精製した。その結果、約 10L の培養液から回収した菌体から 10mg 前後の VT を得る事ができた。

また、精製した VT の毒素活性が冷凍 (-80℃) 保存する事により低下する現象が観察された。この現象に関しても検討した。

A. 研究目的

1996 年に我が国において世界で最大規模の腸管出血性大腸菌 (STEC, EHEC) O157:H7 (O157) による多発性の集団食中毒が発生し、一部の症例では HUS を併発し、重篤例では死亡者も報告され大きな社会問題となった。しかし、未だその有効な治療法は確立されておらず、電解質バランスの補正などの対症療法に頼らざるえないのが現状である。O157 による感染症は数十から数百 CFU/mL という少量の菌の摂取により成立すると言われている。食材の生産や流通、保管、調理などその全ての過程における厳重な衛生管理以外に、有効な予防策は無いと考えられている。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 感染症もその産生毒素である VT に対するトキソイドワクチンを作製して、接種

する事によりその発症を予防できると考えられる。

有効性や安全性の確認試験に必要される量のトキソイドを作製するためには、数百 mg の精製 VT を必要とする。さらにワクチンの品質向上の点で、副反応の原因の一つと考えられている混入夾雑蛋白質を可能な限り、原料である毒素から除去しておく事が望ましい。また、トキソイドの有効性や安全性の確認試験に用いるためにも安定した性状を持つ VT を十分量得る必要がある。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。その製剤中の抗原純度は、副反応の起因物質と考えられている夾雑蛋白質の混入により、60% 前後に留まっている。抗原純度の向上は、トキソイドワクチンにとって大きな至上命題である。トキソイドを安価に供給するためには毒素精製のコストを抑える事も重要である。

そこで、VT を簡便かつ安価に精製する条件を検討した。

また、-80℃の超低温冷蔵庫内で凍結保存する事により精製 VT の毒素活性が低下する現象がみられたが、この現象に関しても検討した。

B. 研究方法

毒素を精製する際に用いた 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 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 BamH1-BglII (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^{1,2)}。これらの菌株は(当時)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。組換え体はその親株の約 10 倍の毒素産生能を有している。

菌の培養方法と毒素の精製方法は、VT1 に関しては Noda らによる原法³⁾、VT2 に関しては Yutsudo らによる原法⁴⁾を参考にした。また、菌の培養から毒素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。

VT 活性の定量では、凝集活性は VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研 単位-LU ;Latex Unit)を、細胞毒性はベロ細胞を用いた細胞培養法を、さらにマウス致死活性はマウス静脈内注射法を用いた。蛋白量測定は BCA

Protein Reagent (Pierce)もしくは吸光度法 (OD=280)でおこなった。

以下、VT2 に関して具体的な精製方法を示す。菌の調整は、-80℃の超低温冷凍庫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、トリメトプリム 10 μ g/mL を含む 10mL の LB 培地 (以下、TMP-LB) で、37℃ 9 時間振盪培養した。その培養菌液 2mL を 1L の TMP-LB に加え、37℃ 18 時間振盪培養した (通常 1 回 :1L \times 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、10,000 \times 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、超低温冷凍庫で数日間凍結保存した。

80 mL の保存菌液を 37℃の温湯で速やかに溶解後、超音波処理で菌を破碎 (80 mL/回流水で冷却しつつ連続 30 分 約 200W KUBOTA Insonator 201M) 後、17,000 \times g 30 分間遠心した上清を粗毒素とした。

粗毒素に 2 回の硫酸アンモニウム沈澱法を実施した。最初に超音波処理遠心上清を、硫酸 40%下で炭雑蛋白質を沈澱させる。17,000 \times g 30 分間遠心した上清を次に 60%まで硫酸濃度を上昇させて、毒素成分を沈澱させる。沈殿物をバッファーに溶解し、同じバッファーで透析した。

イオン交換クロマトグラフィーでは、弱陰イオン交換体である DEAE セファロース CL-6B 180mL をカラム (2.8 \times 25cm) に充填し、1L のバッファーで平衡化した後に、粗毒素をアプライした。さらに、1L のバッファーでカ

ラム洗浄後、おのおの 500mL のバッファーを用いて、NaCl (0 → 0.5M) で溶出させる。VTEC-RPLA「生研」を用いて、VT2 分画を収集 ($10^6 \leq \text{LU}/\text{mL}$)・透析後、イオン交換 HPLC であるハイロード Q セファロース 26 /10 (強陰イオン交換体) にアプライして、おのおの 1000mL のバッファーを用いて、NaCl (0 → 0.4M) で溶出させた。VT2 分画を収集 ($10^6 \leq \text{LU}/\text{mL}$) し、最終精製毒素とした。

また、超低温冷蔵庫内で凍結保存後の VT の安定性に関しては、-80 °C で約 1.5 年間凍結保存した精製 VT1 及び VT2 のいくつかロットの毒素活性を、凍結前後で比較した。VT の毒素活性は細胞毒性とマウス致死活性を検討した。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所 動物実験委員会の承認を経て、精製 VT を含めて精製段階の VT 活性の確認のためにマウスを使用する実験をおこなった。

C. 実験結果

10L の培養液から得られる培養菌液 (Tp8 株) から、菌の超音波破碎処理、40% 硫酸アンモニウム沈澱法、60% 硫酸アンモニウム沈澱法、DEAE セファロース、さらにハイロード Q セファロースの精製過程を経て、総ラテックス活性で 10^8LU の VT2 が得られた。精製 VT2 の回収率は菌の粗毒素の約 10% であった。

また、精製 VT の凍結保存前後の VT 活性の変化では、今回の試験から凍結後の VT1 活性

は、凍結前の細胞毒性と比較すると凍結後は 6.9 ~ 78%、マウス致死活性で 90 ~ 108% という結果であった。一方、VT2 に関しては同様に細胞毒性で 1.1 ~ 132%、マウス致死活性で 0.2 ~ 9.0% であった。

D. 考察

VT トキソイドの試作・生産の検討に関しては、原料となる毒素から副反応の原因と考えられる夾雑蛋白質を可能な限り除去しておくことが望ましい。また、性状の安定したトキソイドを作成するためには、安定した再現性がある精製方法を確立する必要がある。

毒素精製の原法では、VT2 では菌の培養上清を 80% 硫酸アンモニウム沈澱法で、毒素を回収した。しかし、この方法では培養上清の量に応じて硫酸アンモニウムが大量に必要となる上に、サンプルの取り扱いも容易では無い。そこで我々は培養上清と菌体中の VT を測定した結果、双方で毒素活性が確認できたが、菌体中に毒素活性の 90% 以上が存在する事から、上清からの毒素の回収は実施しない事とした。また、原法の硫酸濃度 80% では殆どの蛋白質が沈澱する。そこで我々は硫酸アンモニウム沈澱法の濃度を検討し、VT が沈澱する濃度を確認した結果、40% 未満の濃度では VT が沈澱せず、また 60% の濃度までに VT の 99% が沈澱する事がわかった。そこで硫酸アンモニウム沈澱法を 2 回のステップに分割して、1 回目の 40% では VT 以外の夾雑蛋白質の除去を目的に、2 回目の 60% では VT を回収する事とした。これらの結果、最終精製毒素での蛋白当たり比活性は、40% 硫

安のステップを入れた事により、約 30 倍上昇した。

また、原法では 80% 硫酸アンモニウム沈澱法、イオン交換クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、ゲル濾過 HPLC の精製過程を経て、VT1 では 12L の培養液から 440 μg の毒素が、また VT2 では 14L の培養液から 200 μg の毒素が、精製された。一方、我々は、トキソイドを大量かつ安価に供給するために簡便かつ低コストな精製方法を確立する必要がある事から、精製方法の見直しを含めて検討を行った。現在では 2 回の硫酸アンモニウム沈澱法、2 回のイオン交換クロマトグラフィーを使用している。これらの精製課程を経て、VT1・2 ともに 10L の培養から約 10mg の精製毒素を得ている。しかし、この 2 回のイオン交換クロマトグラフィーは、ともに陰イオン交換体を用いている事から、原法で採用されているゲル濾過クロマトグラフィーや、等電点クロマトグラフィーを導入する事も今後検討する。

さらに、トキソイドなどの生物学的製剤では、混入した夾雑蛋白質の他に、エンドトキシンも副反応の原因と現在考えている。そこで、より安全なワクチンの実用化という点で、混入エンドトキシンの除去も十分に検討する必要がある。現在 精製毒素のエンドトキシン量を測定する準備をすすめている。

また、O157 感染症と同じ細菌性毒素疾患である破傷風やジフテリアでは、産生する毒素のトキソイドを接種する事によりそれらの発症をほぼ 100% 予防する事ができる。これらのトキソイド製剤の抗原純度は現在 60% 前

後であるが、比較的副反応が少ないワクチンである事が知られている。今後、VT の人体用トキソイドを作製する時には、原料毒素として最低限要求される抗原純度などの毒素の品質も検討しなければならない。

精製 VT の凍結保存前後の VT 活性の変化に関しては、今回の実験から VT2 では細胞毒性・マウス致死活性ともに、著しく減少していた。一方、VT1 では細胞毒性は減少しているにも拘わらず、マウス致死活性は減少していなかった。この現象が何を示すかは、現時点では不明である。タンパクの長期保存方法は、 -80°C で凍結保存する事が望ましいと考えられている。今回の精製 VT は、 -80°C の超低温冷蔵庫内で保存していたが、バッファーは原法で使用されたトリスバッファーであった。しかし、このトリスバッファーは、温度が低下すると pH が上昇する事が知られている。そこで、今回の VT 活性低下の原因としては、VT の至適 pH とバッファーの pH の不一致、凍結の際の pH の変化、さらに VT の溶解方法などの原因が考えられる。今後精製 VT の保存に関しては、バッファーを含め pH を再検討する。凍結による VT 活性の失活が避けられない事であるなら、グリセロールなどの安定化剤を用い、62% グリセロールバッファーとして、 -20°C 保存とする事も検討課題となる。今後は再試験を実施するなど、詳細を明らかにしていきたい。

E. 結論

組換え VT 産生大腸菌を利用し、約 10L の培養液から回収した菌体から 10mg 前後の VT

を得る精製方法を確立した。しかし、最終精製 VT の回収率は粗毒素の 10%前後であり、改善の余地が存在する。そこで、今後はゲル濾過クロマトグラフィーなどの原理が異なる精製方法を加える事や、各精製段階の条件を再度見直す事により、毒素の回収率と純度の向上をめざして検討を重ねる予定である。

Properties of Vero toxin from *Escherichia coli* O57:H7 that is immunologically unrelated to Shiga like toxin. *Microb. Pathog.*, 3, 21-30 (1987)

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

H. 参考文献

1. Shinji Y. et al.: Importance of arginin a t position 170 of the A subunit of Vero toxin 1 produced by enter by enterohaemo. *Microb. Pathog.*, 11, 1 - 9 (1991)

2. 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)

3. Noda T. et al. : Purification and some Properties of shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. *Microb. Pathog.*, 2, 339 - 349 (1987)

4. Yutsudo T. et al. : purification and some

分担研究報告書

病原性大腸菌O157感染動物モデルの作成に関する研究 3、カニクイザル感染モデルの検討

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 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O157感染モデルをカニクイザルを用いて作成する検討を行った。大量の菌を単回あるいは複数回連続的に胃内接種しても、菌は腸管内に定着、増殖せず速やかに排出された。その間、腎機能を指標とした症状に変化は認められず、大腸菌 O157はカニクイザルに病原性を有しないと考えられた。VT2の胃内投与によりHUSと同様の症状を引き起こすことが可能であった。投与する毒素量を検討することにより、HUSの病態モデルとして有用なモデル系と成りうることが示唆された。

A.研究目的

大腸菌O157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 VT1、VT2によると考えられている溶血性尿毒症候群(HUS)に代表される腎疾患、神経症状の起因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O157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。マウス感染モデルにおけるマウス系統差は、菌の増殖あるいは体内動態に関与せず、毒素の腸管吸収に起因することを昨年度報告した。しかしながら、マウスモデルでは、腸管の病変が欠如していること、病態解析には個体が小さいため、詳細な検討ができないこと、とくに脳症の発症機序、解析には適当でないことなどから、主としてワクチン等の予防法の評価系として用いられるべきモデルと考えられる。

マウス感染モデルの欠点を補うべく、本年度はカニクイザルを用いた感染モデルの検討を行った。

B.研究方法

カニクイザル：筑波霊長類センターで繁殖、育成された4歳雄2頭、8.5歳雌1頭、計3頭を用いた。サルはP2レベルの飼育室で飼育し、菌感染後は、陰圧アイソレーター式のラックに収納されたケージ内で飼育し、排泄物等はヨード剤による滅菌処理を行った。

マウス：4から6週齢のSPFマウス、BALB/Cを用いた。

接種菌の調整および投与方法：大腸菌 O157は、VT2産生臨床分離株#120を、前培養後、37°C 130rpmの条件下で2.5時間震盪培養したものを用いた。接種後の菌液については、菌数の測定を行った。サルへの経口投与には、ケタラールキシラジン混合液の麻酔下で、胃内にカテーテルを挿入し、胃酸の中和を目的として、0.5% NaHCO₃ 水溶液を3ml 投与した後、7~10ml の菌液を接種した。マウスには、体重に関わらず、同様に調整した菌液 0.5ml をカテーテルを用いて胃内に接種した。それぞれの方法で投与後、臨床症状および生死の観察を行った。

菌測定法：接種菌液および経時的に接種サルから採材した便材料は、RAINBOW AGAR を用い、常法に従って菌数を測定した。便材料は、PBS(-)で10% (W/V) 乳剤を作成し、200 rpm, 5min 遠心上清を測定に用いた。

臨床病理学的検査：接種したサルは、毎日臨床観察を行った。経時的に採血を行い、血液検査および血漿中のBUN、クレアチニン(CRE)、LDH、CRP を富士ドライケムで測定した。毎日、尿を採取し、ウロラボスティック(三共マイルズ)で尿検査を行った。また、採便を行い菌数の測定を行った。

C.研究結果

接種菌数と定着性の検討

2頭のカニクイザルに10³、10⁶ CFUの菌を接種したところ、便中に菌の排出を検出できなかった。臨床症状も観察されず、この菌数では感染が成立しないことがわかった。次に、同じサルに10⁹ CFUの菌を接種したところ、1頭では1日後に10⁶CFU

/0.1g、1頭では2日後10⁵CFU/0.1gそれぞれ便中に接種菌を検出したが、急速にその菌数は減少し接種後6日いずれのサルにおいても検出できなくなった(図1)。この間、血清中のBUN、CRE、LDH

に変化は認められなかったが、好中球を主とする白血球数の増加が、約1週間にわたり観察された。

カニクイザルへの菌連続投与

上記の結果から、大腸菌 O157はカニクイザル腸管に定着せず、速やかに排出されるものと考えられた。腸管内での一定菌数の維持が大腸菌 O157による病態の成立に関与するものと考え、1日おきに3回、 10^{11} CFUの菌を胃内接種し、その病態の解析を行った。接種1日後には、 10^5 CFU/0.1g 便中に菌が検出されたが、2日後には 10^2 まで減少した。ふたたび菌を接種すると 10^5 CFU/0.1gとなるが、翌日には速やかに減少する繰り返しであった(図2)。この間、接種4日後にCRP、6日後にLDHのわずかな上昇が観察された(図3)。また、間欠的に軟便が認められ、尿検査ではpHの上昇(8.5)、ケトン体が検出された。1回目の菌接種後好中球の増多が認められた。

BALB/c マウスへの菌連続投与

0.5ml中に 10^{10} CFUを含む菌液を原液とし、10倍希釈した液を、サルへの接種と同じスケジュールでBALB/c マウスに胃内接種し、生存の観察を行った。原液では、100%が死亡したが、10倍希釈液以上では、およそ70%から80%が生存した(図4)。

カニクイザルへのVT2 胃内投与

10ml 中に 10^7 mouseLD50 VT2 を含む毒素液をカニクイザルに胃内投与し、腸管からの毒素吸収について検討を行った。動物は菌を連続投与したカニクイザルを用い、臨床症状の観察、血液生化学的検査を行った。投与後1日から、食欲の廃絶、嘔吐、粘血便、尿検査では潜血、蛋白が陽性となり、好中球増多を認めた。症状は進行し、投与2日後に死亡した。この間、BUN, CRE, LDH, CRPが上昇した(図3)。

D. 考察

カニクイザルに大腸菌 O157 を胃内に接種しても、菌は腸管で積極的に定着しなかった。接種菌量が低い場合には、排出されないことから、腸管内でほとんど増殖することはないと考えられた。また、単回接種では、臨床症状にも顕著な変化を呈することなく腸管における病変も、存在したとしてもおそらく最小限のものであったと考えられる。すなわち、通常の細菌叢を有するカニクイザルには大腸菌 O157は病原性を示さないと考えられる。

HUSの発症には、VTが血液循環にのり、標的細胞に吸着することが必要と考えられるが、本実験の条件下での菌接種では発症に十分な毒素を血液循環に供給できないことになる。また、1日おき3回連続投与の条件下でも、軽度の腸管病変を引き起こしたに過ぎない。同一条件でのマウスの結果から、HUSを引き起こす為にはカニクイザルとマウスの腸管での毒素吸収率に差がないと仮定すると、体重比を換算し 10^{12} CFUの菌液が必要となる。

毒素投与では、急性であったが、腸管病変を伴う腎機能障害を引き起こすことが可能であった。本実験における毒素投与死亡時の便中の毒素量は、ラテックス凝集反応で測定すると、 10^{11} CFU接種時のおよそ100倍であり、 10^{12} ~ 10^{13} CFUの連続接種は症状の発現を期待できる数値であるものの、実験系として成立しえないと考えられる。反対に、毒素投与の系では 10^6 mouse LD50の連続投与は、实际的であり、HUSを引き起こす系として有用であると考えられる。

E. 結論

大腸菌 O157はカニクイザルの腸管内で、定着、増殖することはなく、病原性を有しなかった。しかし、VT2を胃内に投与すると、腸管病変および腎機能不全を引き起こし、HUSのモデル動物と成りうると思われた。

F. 研究発表

なし

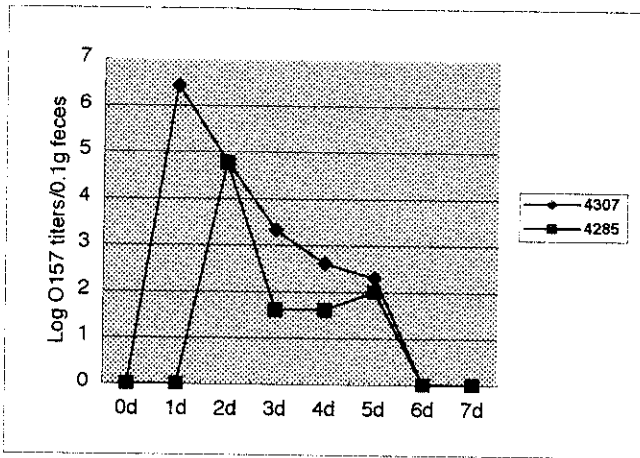


図 1

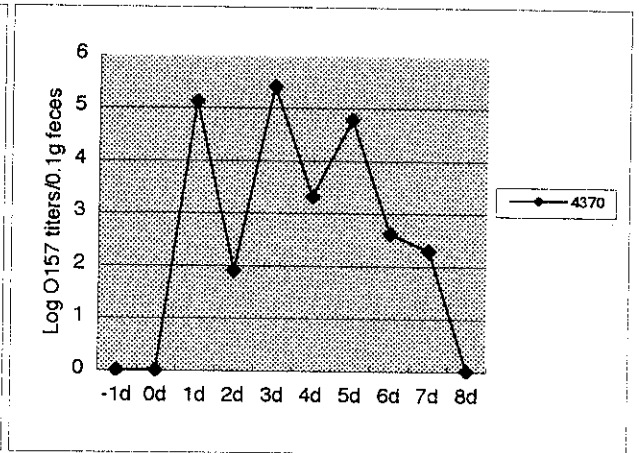


図 2

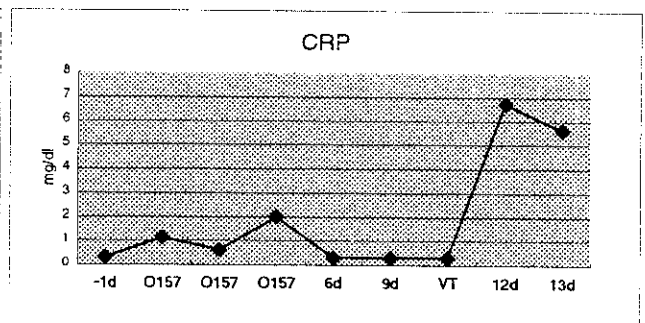
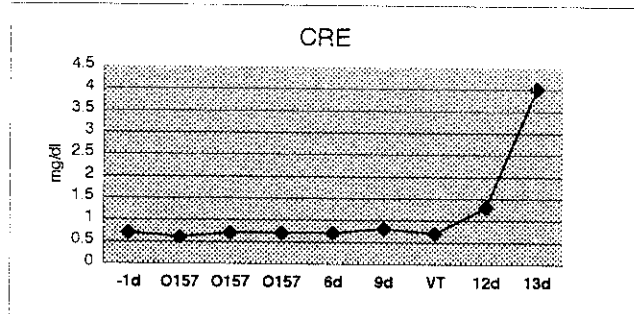
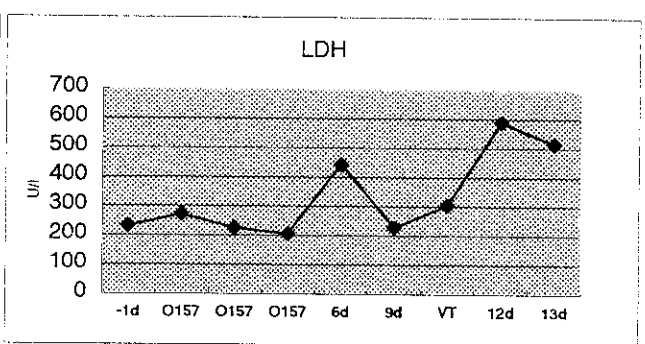
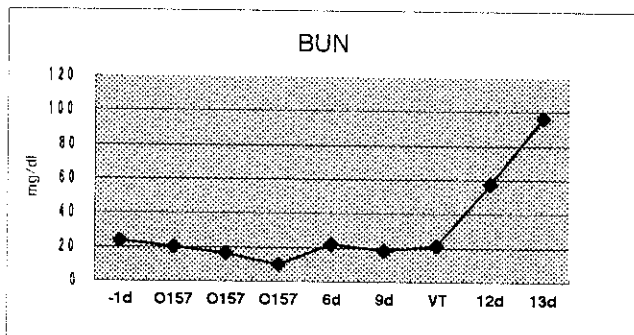


図 3 大腸菌O157連続接種、VT胃内投与サル血清生化学値

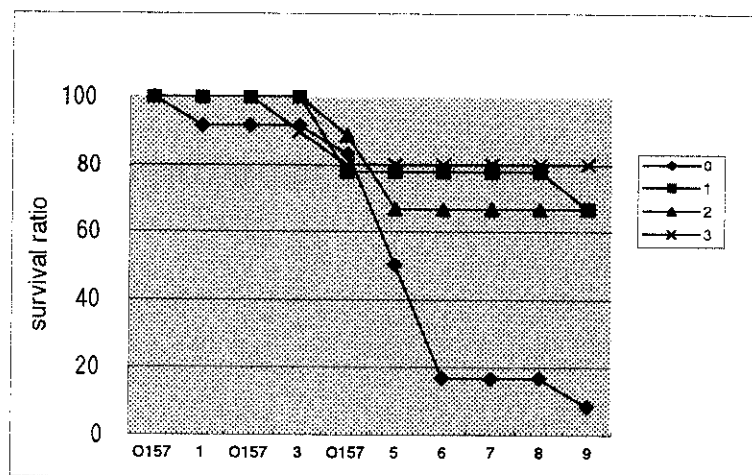


図4 大腸菌O157連続接種BALB/cの生存率