

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 安全性研究部
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、VT2) を用い、カニクイザルでの Vero 毒素の病原性について病理組織学的解析を行った。その結果、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、期間に一致して認められた。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。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症を引き起こす O157 に対する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として現在までの解析でカニクイザルが適当と考えている。特に毒素の投与量と回数を考慮することにより、ヒトの HUS や脳症の発症を期待している。そこで感染患者と同等の病態を引き起こす実験系の確立を目指し、カニクイザルに対し、VT1 および VT2 毒素の様々な投与方法を行い、引き起こされた病態について感染病理学的解析を行った。

B. 研究方法

1) 使用動物

カニクイザル (筑波霊長類センター育成)
合計 12 頭

2) 投与経路と投与量

VT1

静脈内投与

100 mouseLD₅₀/kg の多量単回投与、
1.0mouseLD₅₀/kg の少量単回投与、
0.1 mouseLD₅₀/kg x3回+1.0mouse LD₅₀
/kg x 3 回の少量不連続頻回投与、

1 mouseLD₅₀/kg x3 回の少量連続投与、
0.1mouseLD₅₀/kg x5 回の少量連続投与、
1.0 mouseLD₅₀/kg x5 回 の少量連続投与

VT2

静脈内投与

1000 mouseLD₅₀/kg の多量単回投与、
5.0 mouseLD₅₀/kg の少量単回投与、
1.0mouseLD₅₀/kg x2 回の少量連続投与、
0.1mouseLD₅₀/kgx3 回の少量連続投与、
0.01mouseLD₅₀/kg x5 回の少量連続投与

VT2

胃内投与

多量単回投与 3x10⁷mouseLD₅₀/head

ただし、連続投与の場合は 1 日一回、毎日の連続投与とし、静脈内投与はケタラル麻酔下で伏在静脈より行った。

3) 病理組織学的検索

動物の死亡後もしくは安楽殺後、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。

C. 研究結果

1) 臨床経過と死因

臨床経過については一部、本年度の他報告書を参照のこと。VT1 毒素静脈内投与において100 mouseLD₅₀/kg 投与のサルでは投与後3日目に肺水腫、心筋梗塞による死亡が確認された。0.1 mouseLD₅₀/kg x3 回を行った後、無症状で耐過したため、その1ヶ月後に1.0 mouseLD₅₀/kg x3 回投与を行った動物では全身の血栓形成に起因する多臓器不全による死亡が確認された。1.0 mouseLD₅₀/kg x5 回投与後のサルは一時的に血液生化学的に腎機能の低下と一過性の神経症状(後肢の振戦)を示したため接種後11日目に過麻酔による安楽殺を行った。その他では血液生化学的検査で凝固能、腎機能が一時的に低下するものがみられたものの、特に臨床症状を示さず、接種16日-1ヶ月後に安楽殺を行った。

VT2 毒素静脈内投与では0.01 mouseLD₅₀/kgx5 回投与の動物をのぞく4頭で小腸をふくむ出血性腸炎を認め、投与開始後1-4日目に主に失血による死亡を確認した。ただし5 mouseLD₅₀/kg 単回投与の動物は出血性大腸炎であった。0.01 mouseLD₅₀/kgx5 回投与の動物は投与開始後7日目に右半身麻痺、血液生化学的に腎不全の所見が認められ、安楽殺を行った。

2) 病理組織学的所見

臨床症状、剖検所見と組織所見について表にまとめた。

それぞれの組織病変の強さは毒素量、臨床症状の程度と相関がみられた。組織病変の共通所見について以下に記す。

a) 腸管の出血性病変(図1-3)

小腸あるいは大腸の粘膜固有層の全層にわたる出血を主体とする病変で、粘膜上皮は変性、壊死、剥離がみられるものの、陰窩上皮もしくは固有腺は残存している。炎症性細胞の浸潤はほとんどみられない。これらの病変はVT1の1.0 mouseLD₅₀/kgx5 回静脈内投与では結腸に限局して病変がみられた。また、VT2 投与群では0.01 mouseLD₅₀/kgx5 回投与で腸管病変

を欠き、5 mouseLD₅₀/kg 単回投与の動物では盲腸以下大腸病変に限局していた。他は小腸-大腸全層にわたり病変がみられた。VT2 胃内投与の動物では十二指腸、空腸、回腸の順に病変の程度が強く、大腸は死後変化が強かった。

b) 尿細管病変(図4b)

皮質あるいは髄質の尿細管上皮の変性、壊死、脱落がみとめられ、病変部位には好中球を主体とした炎症性細胞浸潤がみられる。病変部上位の尿細管腔は代償性の拡張がみられる。実質では点状出血をみとめる。尿細管内には蛋白尿円柱がみられる。臨床症状に一致して本病変がみられた。VT2を0.01 mouseLD₅₀/kgx5 回投与した動物では特に髄質と皮質境界部の尿細管の変性、壊死と脱落が顕著であった。

c) 糸球体病変(図4、5)

内皮細胞の腫大、基底膜の肥厚、メサングウム領域の拡大、メサングウム細胞の増加、フィブリン血栓、血管腔内への好中球の浸潤が病変の強さ、期間に一致して種々の程度でみられる。これらの病変は臨床症状に一致している。特にVT2を0.01 mouseLD₅₀/kgx5 回投与した動物では糸球体血管内皮細胞の腫大が顕著であった。

d) 血栓形成(前年度報告書参照)

肺、心、腎、脳を中心として血栓形成がみられる。いずれも血管の透過性の亢進をとめない、肺水腫、脳浮腫病変、微少出血が認められる。これらの病変は臨床症状に一致している。

D. 考察

初年度に行った小動物のVT1およびVT2静脈内投与の結果から、この毒素はいったん血中に入ると血管内皮、尿細管上皮に取り込まれ若しくは吸着することによって、細胞傷害を引き起こすことがわかった。また、病態の発症は動物種により様々であった。次年度にはカニクイザルを用いてVT1 多量単回の静脈内投与の実験を行い、毒素が血管内皮に傷害し、肺の出血と肺水腫、副腎皮質の出血性壊死、くも膜下出血、腎の点状出血を引き起こすことを明らかにした。また、腎尿細管上皮に直接的影響を起こすことがわかった。

以上のことから、毒素の投与量、回数を考慮することにより HUS や脳症の動物モデルを作ることが可能であろうと考え様々な実験系を行った。その結果、VT1 投与群でみられた主な症状は血栓症による循環障害であった。VT2 投与群では出血性腸炎が引き起こされたことが特徴的であり、これによる失血によって動物は死亡した。

しかしながらこれらの動物には組織学的に腎病変が認められ、少量の毒素を連続的に投与することによって腎病変のみを誘発することを期待した。そこで VT1 の $1.0 \text{ mouseLD}_{50}/\text{kg} \times 5$ 回静脈内投与を行ったところ、食欲不振と一過性の後肢の振戦がみられた。組織学的には結腸の顕微鏡的出血がみられ、腎病変も軽度のみみられた。全体的に血管の透過性が亢進し、軽度な脳浮腫がみられたものの、明らかな梗塞像は認められなかった。一方、VT2 を $0.01 \text{ mouseLD}_{50}/\text{kg} \times 5$ 回投与を行ったところ、腸管病変をおこすことなく腎不全、神経症状を発症し組織学的にも糸球体と尿細管病変が主病変であった。また、血管透過性の亢進による肺水腫、脳浮腫、脳、脊髄における微小出血がみられた。しかしながら明らかな梗塞像はみられなかった。

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られる。

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できた。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。

また、O157 の胃内投与による感染実験をカニクイザルで行ったが、感染の成立と発症を認めなかったため、腸管からどのように毒素が血中に移行していくのかを明らかにすることはできなかった。感染実験に使用する菌株の選択が検討課題と思われる。

E. 結論

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。その結果、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った。それぞれの病態のモデル動物として有用であると考えた。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。本実験系を有用に使うことにより O157 感染発症の機序を解明し、トキシイドワクチンの有効性、安全性の評価に役立てたい。

F. 研究発表

なし

表 Vero 毒素投与後のカニクイザルの病理学的変化のまとめ

静脈内投与 VT1

	投与量 mouse LD ₅₀ /kg	主な臨床症 状と死因	出血性 腸管病変	尿細管 病変	糸球体 病変	血栓 形成	転帰
多量単回	100	肺水腫、 心筋梗塞	-	++	+	+	3日後 死亡
少量単回	1	-	-	-	-	-	1ヶ月後 安楽死
少量 不連続	0.1x3 +1x3	全身血栓症 による 多臓器不全	-	+	+	++	*4日後 死亡
少量連続	1x3	血尿	-	+	+	-	16日後 安楽死
少量連続	0.1x5	-	-	-	-	+	16日後 安楽死
少量連続	1x5	食欲不振と 一過性の後 肢の振戦	+	+	+	-	11日後 安楽死

*0.1mouseLD₅₀/kg3回連続投与後臨床症状を示さなかったため1ヶ月後に再度1mouse LD₅₀/kgを3回投与したところ、2回目の実験開始後4日目に死亡した。

静脈内投与 VT2

	投与量 mouse LD ₅₀ /kg	主な臨床症 状と死因	出血性 腸管病変	尿細管 病変	糸球体 病変	血栓 形成	転帰
多量単回	1000	出血性腸炎 による失血	+++	+++	+	-	1日後 死亡
少量単回	5	出血性大腸炎 による失血	++	++	+	-	2日後 死亡
少量連続	1x2	出血性腸炎 による失血	++	++	+	+	2日後 死亡
少量連続	0.1x3	出血性腸炎に よる失血と 腎不全	++	+++	++	+	4日後 死亡
少量連続	0.01x5	右半身麻痺 腎不全 肺水腫	-	+++	++	+	7日後 安楽死

胃内投与 VT2

	投与量 mouse LD ₅₀ /kg	主な臨床症 状と死因	出血性 腸管病変	尿細管 病変	糸球体 病変	血栓 形成	転帰
多量単回	3x10 ⁷ /一頭	出血性腸炎に よる失血	+++	-	+	-	2日後 死亡

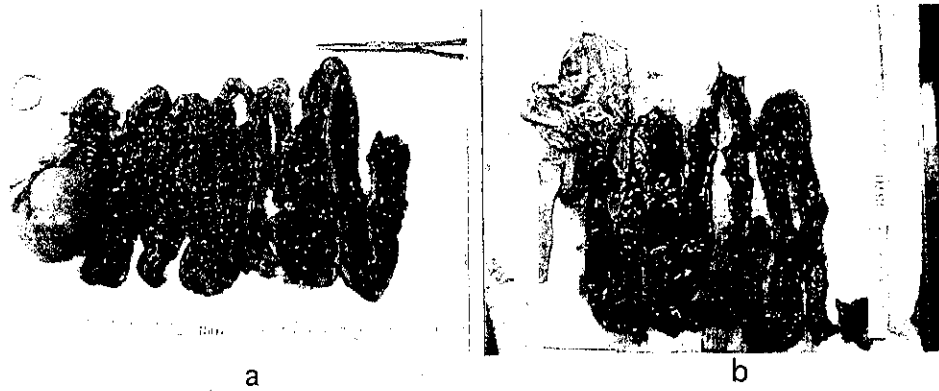


図1 VT2 毒素投与後の腸管病変 a: VT2(5mouseLD₅₀/kg) X1 静脈内投与後の腸管。盲腸以下の出血が顕著である。b: VT2(3x10⁷ mouseLD₅₀)x1 胃内投与後の腸管。十二指腸以下の出血が顕著である。

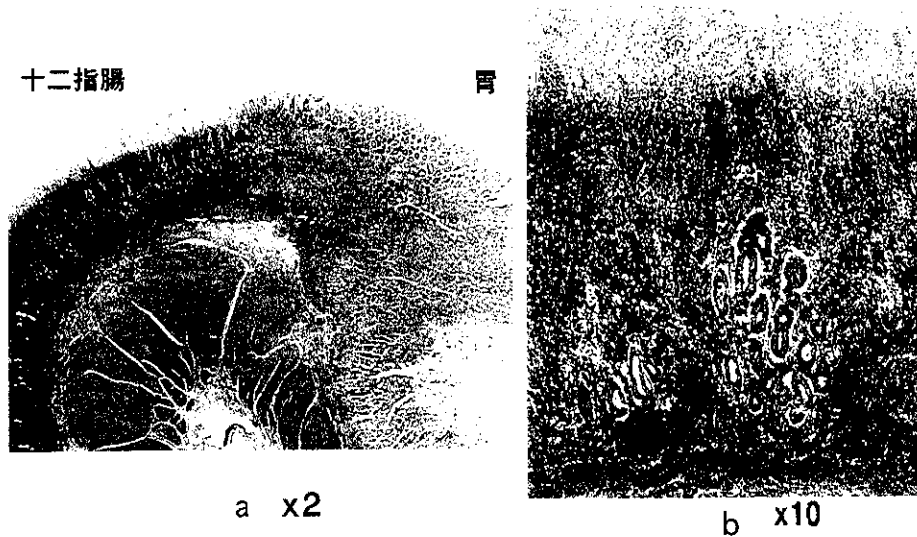


図2 VT2(1mouseLD₅₀/kg)x2 静脈内投与後の小腸組織病変 a: 幽門部を境にみられた十二指腸粘膜固有層における出血。b: 同部位拡大。十二指腸粘膜上皮は脱落、壊死し、陰窩や十二指腸腺は残存している。

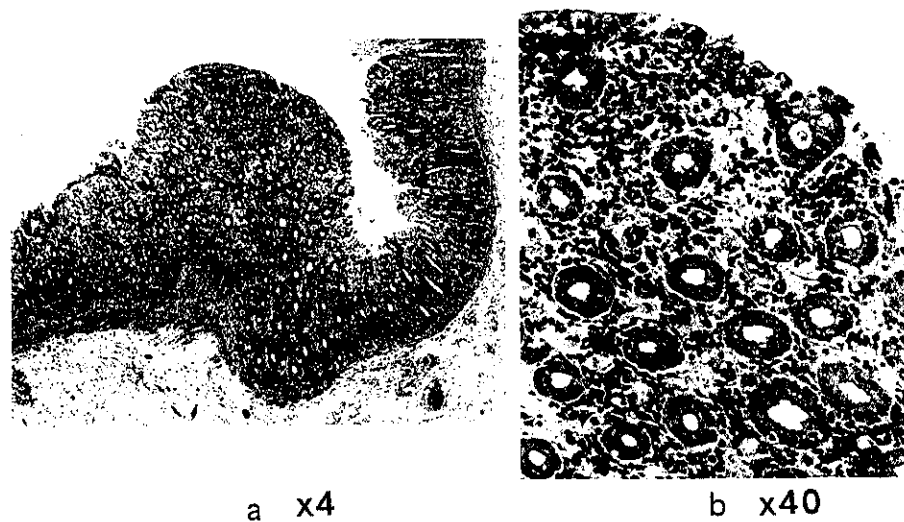


図3 VT2(5mouseLD₅₀/kg) X1 静脈内投与後の大腸組織病変 a: 結腸粘膜固有層の出血。筋板直下の水腫も顕著である。b: 同部位拡大。粘膜上皮の空胞変性、壊死、脱落がみとめられ、陰窩上皮は残存している。

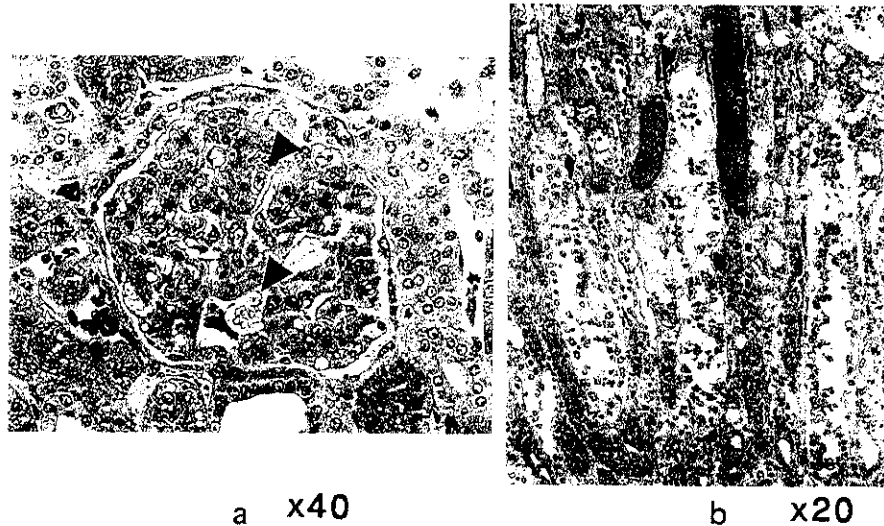


図4 VT2(0.01mouseLD₅₀/kg) X5 静脈内投与後の腎組織病変 a: 糸球体内皮細胞の核の腫大、淡明化がみられ核小体が目立つ(矢頭)。血管腔内は泡沫状であり、血球成分に乏しい。メサンギウム領域の拡大が見られる。b: 腎髄質の尿細管上皮の変性、壊死、脱落が顕著である。皮質尿細管は代償的に拡大している。中小静脈の鬱血が顕著であり、血管内には好中球が認められた。

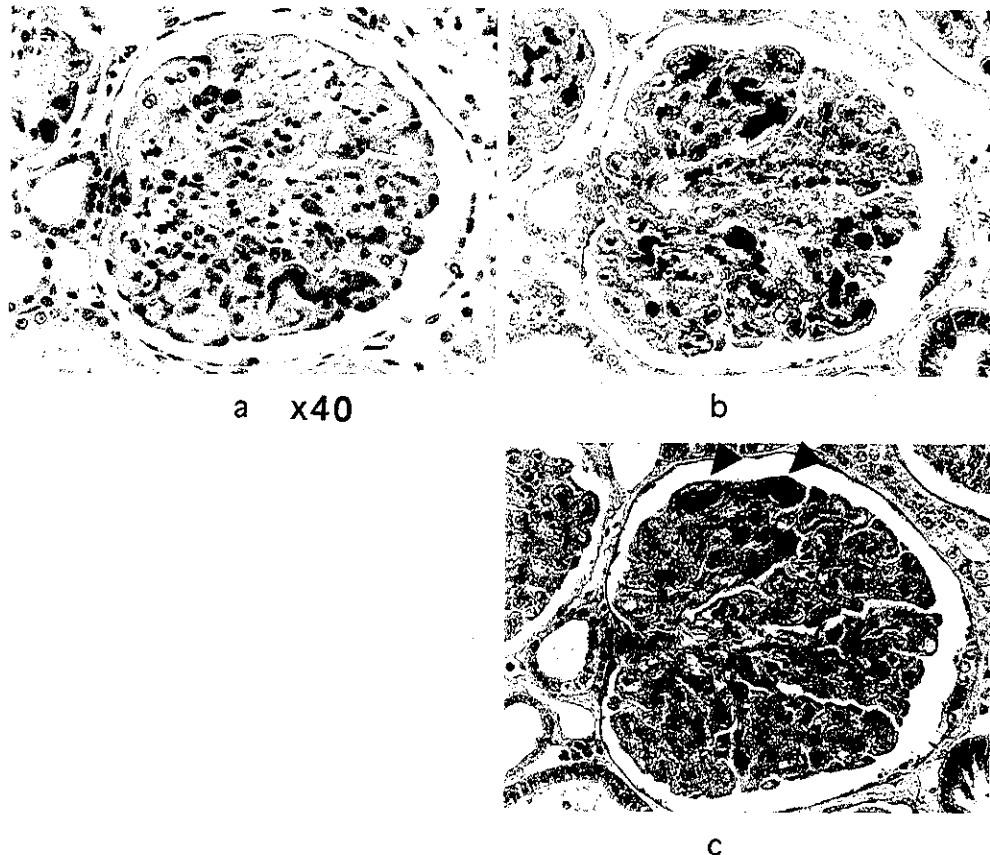


図5 VT1(0.1mouseLD₅₀/kg) X3+(1mouseLD₅₀/kg)x3 静脈内投与後の腎組織病変 a: 糸球体メサンギウム領域の拡大とメサンギウム細胞の増加がみられる。b: 同部位マッソントリクローム染色。基底膜の肥厚がみられる。c: PTAH 染色。血管腔のフィブリン血栓を証明した(矢頭)。

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病機構に関する研究

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

研究要旨

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。血清生化学的変化では、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、脳波には顕著な変化はみられなかった。

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。本研究では、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るとともに、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行うことを目的としている。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。そこで今年度は VT-1 毒素の低濃度連続投与により HUS および脳症が誘発できるか否かを検討した。

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、育成された雄（実験番号#4：7歳）と雌（#5：17歳）の成体カニクイザルに1.0マウスLD50/Kg（以下mLD50と略）量のVT-1をそれぞれ3日間および5日間連続して静脈内投与した。さらに、19歳の雌カニクイザル（#7）に0.1mLD50のVT-1を5日間連続して静脈内投与した。投与後毎日臨床症状の観察を行うとともに、投与開始直前、投与開始後1、2、3、4、7、9、14（#4、#5）日および安楽殺をおこなった11日（#7）および16日（#4、#5）目にケタラール麻酔下で、EDTA加血0.5ml、クエン酸加血4.5ml、血清用4.5mlを採血した。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。ウロステイックを用いた尿検査は、投与前、投与開始後2、4、7、10、12、14日目におこなった。また、脳症の発症をモニターするため、採血時に対光反射の有無を、投与3日前、投与開始後3、8、11、14、16日目にキシラジン・ケタラール麻酔下で6誘導（左右前頭部、側頭部、後頭部）による大脳皮質脳波、1Hz ランダムフラッシュ刺激による視覚誘発電位（VEP）および10Hz クリック音による聴覚誘発電位（ABR）の測定をおこなった。

C. 研究結果

1) 臨床経過：毒素を投与した3頭のいずれにおいても、投与後に食欲不振と体重減少が認められた（図1）。特に1.0mLD50、5日間投与個体では投与終了後でも食欲の回復は認められなかった。神経症状を疑わせる所見としては、1.0mLD50、5日間投与個体で投与開始8、9日目に後肢のわずかな振戦が観察された。タンパク尿は投与した3頭のすべてで検出されたが、体温低下および粘血便は観察されなかった。

2) 血液凝固能：図1に示すように、1.0mLD50を投与した2頭のカニクイザルでは、投与開始7日目にフィブリンノーゲン量が一過性に増加した。1.0mLD50、3日間投与個体では同時期に血小板数の減少が認められた。その他の血液凝固能および血球成分に関わる測定値には顕著な変化はみられなかった。

3) 血清生化学検査値：図1に示すように、0.1mLD50、5日間投与個体で変化が見られた項目はLDHの上昇のみであった。一方、1.0mLD50投与個体では投与日数に関わらず、CPK、LDH、BUN、CREの上昇が認められた。

4) 脳波：VT-1、1.0mLD50、5日間投与個体での毒素投与前と投与開始後11日目の大脳皮質脳波および継時的に測定したABRを図2に示す。図に示すように毒素投与による顕著な脳波の異常は認められなかった。

5) リンパ球サブセット：図3に毒素投与後のCD69陽性B細胞とDR陽性CD4+T細胞の変化を示す。図に示すように毒素投与量および投与日数に関わらず、投与直後から初期活性化マーカーCD69陽性のリンパ球が増加した。さらに、DR陽性の活性化

T細胞が投与直後に一過性の増加を示した。

D. 考察

昨年度までの実験でサル類はマウスに比べてVT-1およびVT-2に対する感受性が高いこと、低濃度毒素の単回投与ではO-157感染者の一部で報告されているHUSや脳症などを発症させることができないことを明らかにしている。感染者では前駆症状発症後3-9日目にHUSの発症が生じることから、Vero毒素による持続的な作用がHUS発症に必要である可能性が考えられる。そこで今回はカニクイザルでのHUS発症モデルを作出する目的で、VT-1の低濃度連続投与実験を試みた。その結果、5mLD50投与群で軽微ではあるが毒素投与開始後8、9日目に2日間連続して後肢の振戦が観察された。同時期に調査した脳波には異常が見られなかったが、Vero毒素の低濃度連続投与により神経症状をともなう脳症を発症させる可能性が示唆された。一方、1.0mLD50のVT-1を投与した個体では投与日数に関わらず、CPK、LDH、BUN、CREの上昇が認められた。CPKは骨格筋、心筋、脳などの臓器局在性が高く、LDHは多臓器に含まれる普遍的な酵素であるが、いずれも組織傷害により血中に流出する酵素として知られている。VT-1投与により特定組織もしくは多臓器に一過性の傷害が生じていることが推測される。また血中BUNが増加することから、急性の組織傷害により腎臓尿細管に傷害が引き起こされることが考えられるが、病理所見でも尿細管の傷害が指摘されている。またフィブリンノーゲン量の増加と血小板減少は血液線溶系への影響を示しており、これらの所見はいずれも高濃

度単回投与で著しい変化として報告したものである。今回の実験で、VT-1は1.0mLD50という低濃度連続投与でもVT-1が多面的な組織傷害を引き起こすことが実証された。

これまでの1000または100mLD50といった高濃度の毒素単回投与実験では毒素投与後に初期活性化マーカーの一つであるCD69陽性またはDR陽性の末梢リンパ球サブセットが増加することを見いだしており、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も考えられる。今回、0.1mLD50という微量のVT-1投与でも活性化リンパ球の増加が認められ、特にT細胞が投与直後に活性化されることから、サイトカインによる臓器障害を実証する意味でも、今後、血中TNF α およびFasLの量的変化を調査する必要がある。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

図1. O-157 VT-1微量連続投与による臨床症状の変化

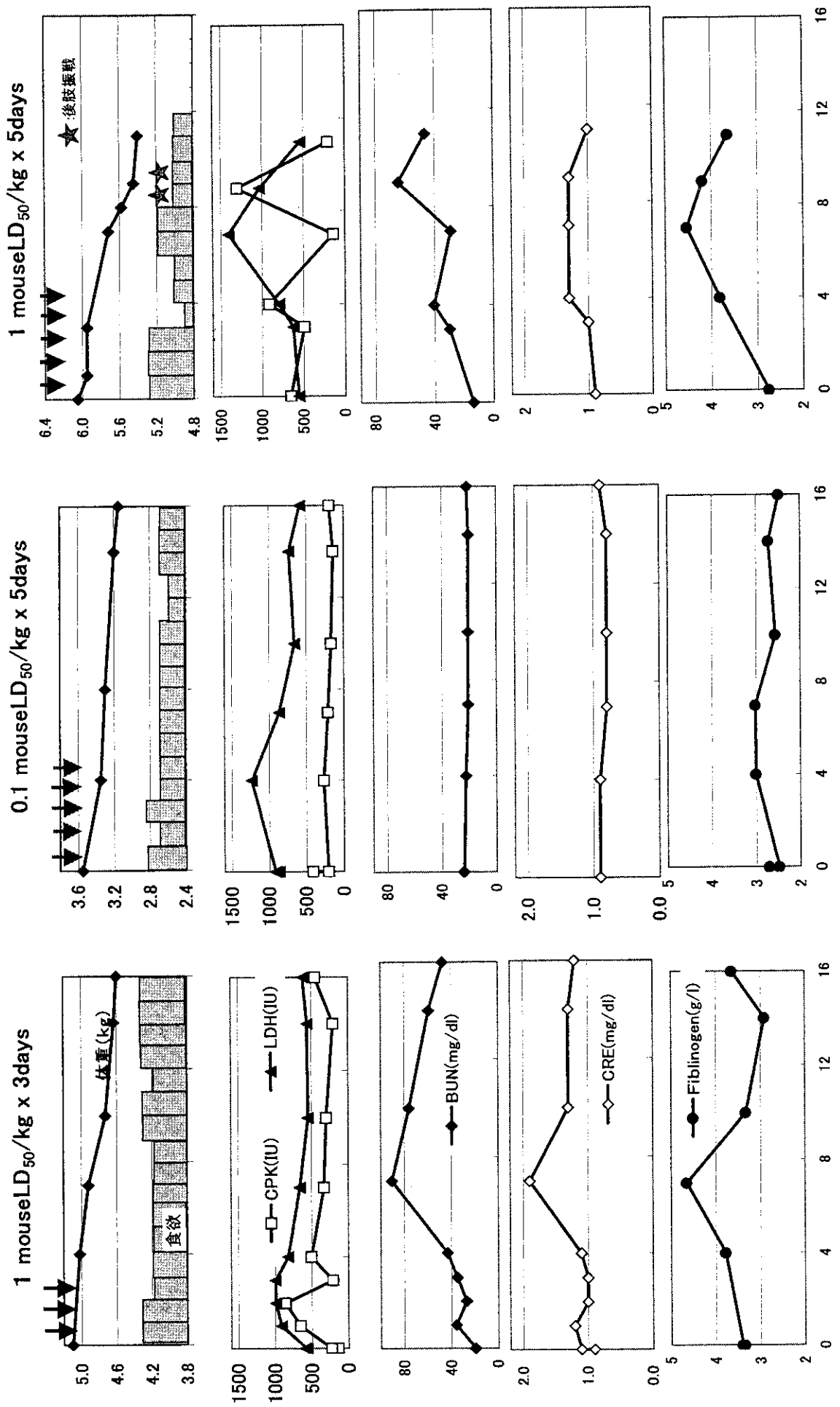
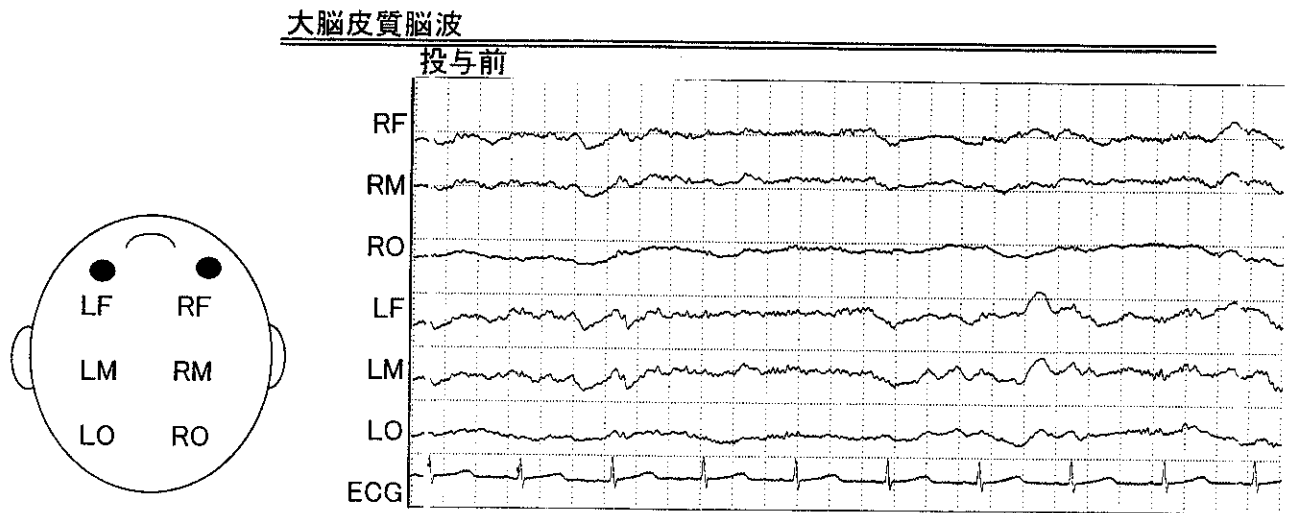
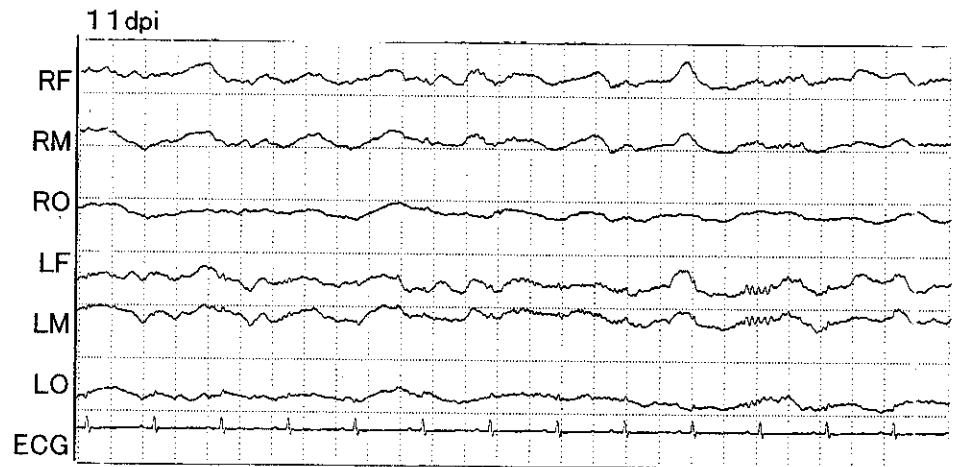


図2. O-157 VT-1微量連続投与(1 mouseLD50/kg x 5days)による脳波の変化



100 μ V/div

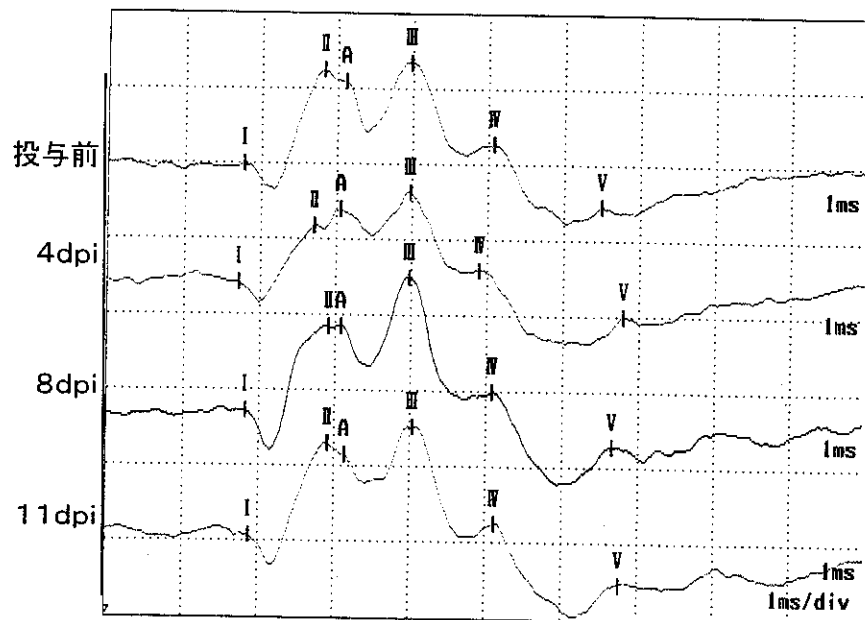
200ms/div



ABR(聴性感覚誘発電位)

Stimulation rate;10Hz
Intensity; 90dB
Average; 500

1 μ V/div
1ms/div



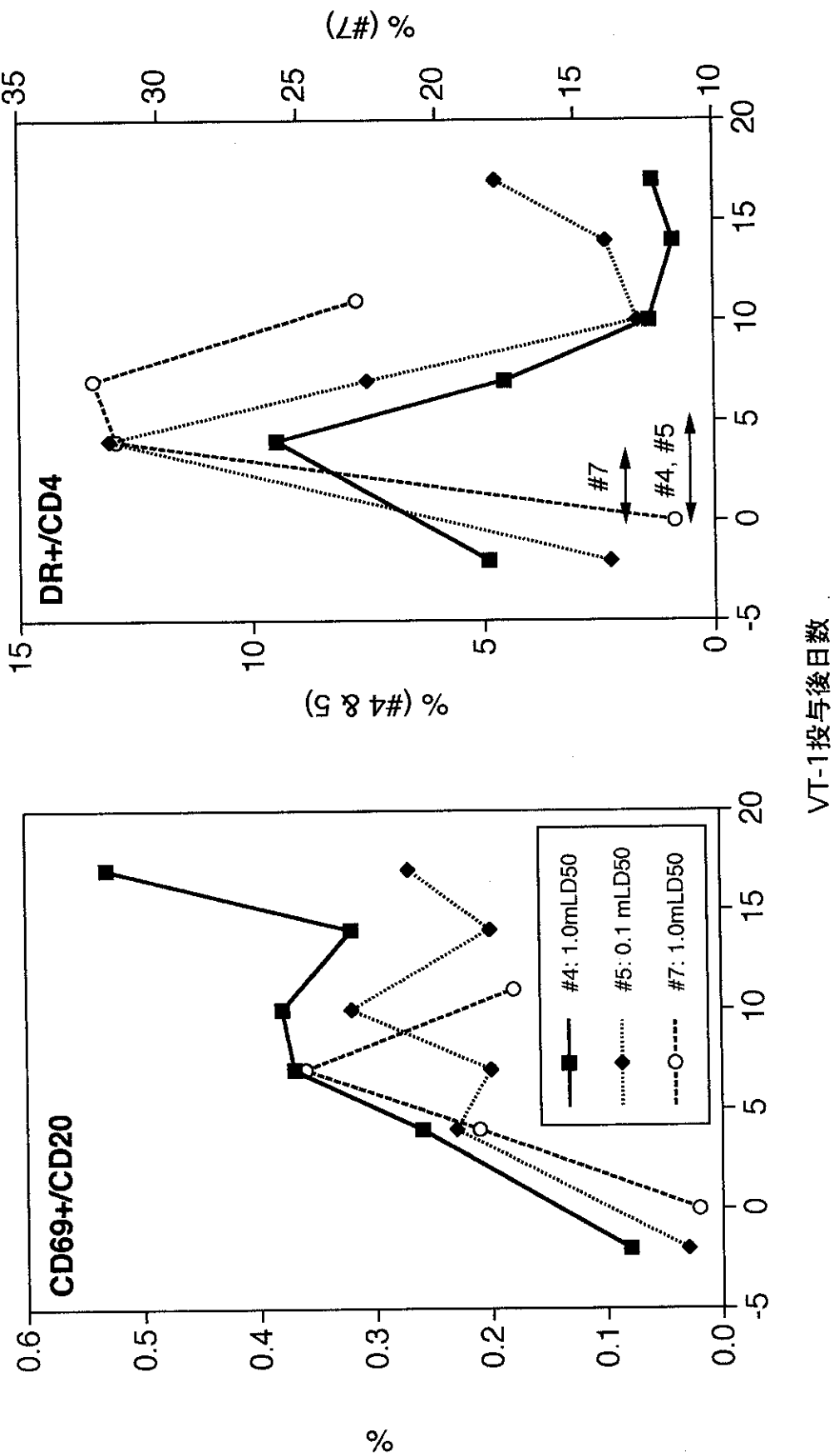


図3 : VT-1投与にともなう活性化マーカー (CD69、DR) 陽性サブセットの変化

分担研究報告書

リポソーム結合ベロトキシンによる抗ベロトキシン抗体産生の誘導

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、加藤 博史
(国立感染症研究所・安全性研究部)

研究要旨 平成9年度の本研究において、我々は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ることを報告した (Int. Arch. Allergy Immunol. 1997;114:293-297)。平成10年度の本研究においては、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が誘導されることを報告した (Int. Arch. Allergy Immunol. 1998;116:313-317)。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。サルにリポソーム結合ベロトキシン (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ペロ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。

A. 研究目的

我々はこれまでに、抗原-リポソーム結合物が IgG 抗体産生をよく誘導し、IgE 抗体産生を選択的に抑制することを見だし、この抗原修飾方法をアレルギー反応を惹起しにくいワクチンの創製へと応用するための検討を行ってきた。本研究では、ベロトキシン-リポソーム結合物を作製し、ベロトキソイドあるいはベロトキシンワクチンとしての臨床応用の可能性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。

サル: カニクイザル (2才3カ月、雄、および3才6カ月、雄)を使用した。

ベロトキシン: 前年度に同じ。

リポソーム: 前年度に同じ。

ベロトキシンとリポソームとの結合: 前年度に同じ。

抗原-リポソーム結合条件の検討: 抗原 (卵白アルブミン (OVA)) とリポソームとの結合物 (OVA-リポソーム) を、従来法のグルタルアルデヒド (GA) を用いた方法 (図-1) の他に、N-(6-maleimidocaproyloxy) succinimide (EMCS) (図-2)、disuccinimidyl suberate (DSS) (図-3)、N-

succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (図-4) を用いて作製し、マウスに免疫して抗体産生、および免疫マウス由来脾細胞によるサイトカイン産生を検討した。

抗体の測定：マウスおよびサル血清中の抗原特異的 IgG, IgE, Ig サブクラス抗体は酵素抗体法 (ELISA) を用いて測定した。

T 細胞によるサイトカイン産生：OVA-リポソーム免疫 6 週後、マウスより脾細胞をとり、試験管内にて抗原とともに 24~72 時間培養して培養上清中のサイトカイン量をサイトカインアッセイキットを用いて測定した。

C. 研究結果

VT2-リポソーム結合物投与後のサルにおける抗

VT2 抗体産生：図-5 に VT2-リポソーム免疫後のサルにおける抗 VT2 IgG および IgE 抗体産生の推移を示す。2 週毎に免疫を行った結果、初回免疫後 3 週で顕著な抗 VT2 IgG 抗体産生が観察され、3、4 回目の免疫によって高値の抗体産生が誘導された。しかし、このとき抗 VT2 IgE 抗体産生は観察期間を通じて観察されなかった。図-6 に同一血清サンプルについて行われた中和試験の結果を示す。図-5 に示した IgG 抗体産生の結果と良く一致して中和抗体価の上昇が観察された。

結合方法の異なる OVA-リポソームを投与したマウスにおける抗 OVA 抗体産生：図-7a に 4 種類の方法で作製した OVA-リポソーム結合物を免疫したマウスにおける抗 OVA IgG 抗体産生を示す。すべての群において非常に近似した量の抗体産生が誘導された。しかし、EMCS および SPDP を用いて OVA-リポソームを作製した群では 2 次免疫後に低値ながら有意な抗 OVA IgE 抗体産生が観察された (図-7b)。免疫 6 週後の血清について抗 OVA Ig サブクラスを検討したところ、GA

および EMCS 群においては IgG2a が IgG1 と比べて優位であったが、DSS 群では反対に IgG1 が優位であった (図-7c)。

OVA 免疫マウス由来脾細胞によるサイトカイン産生：OVA-リポソーム免疫マウス由来脾細胞を試験管内で抗原とともに培養したところ、すべての群において IL-4 産生が観察されなかった (図-8a)。IFN- γ の産生 (図-8b) はすべての群で観察されたが、IL-2 産生 (図-8c) と相関しなかった。また、いわゆる Th2 サイトカインである IL-5 (図-8d) および IL-10 (図-8e) の産生もすべての群で観察された。

D. 考察

我々がこれまでにマウスを用いて検討した結果はサルを用いた検討においても再現された。ペロトキシン-リポソーム結合物は IgG 抗体産生をよく誘導し、IgE 抗体産生を誘導しなかった。また、誘導された IgG 抗体はペロトキシンをよく中和した。抗原とリポソームとの結合方法を検討した結果、DSS を用いる方法とともに、従来法である GA を用いた結合方法は本研究の目的に即したものであることが示された。また、Ig サブクラスおよびサイトカイン産生の検討の結果、抗原-リポソーム結合物によって誘導される IgE 抗体産生の選択的無反応はいわゆるタイプ 1 免疫応答が誘導された結果ではないことが示され、IgE 抗体産生の調節が必ずしも Th1/Th2 のバランスによって行われるとは限らないことが示唆された。

E. 結論

本研究で得られた結果によって、リポソーム結合抗原はペロトキソイド、あるいはペロトキシンワクチンの創製に応用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

Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S.,
Takita, Y., Naito, S., Horino, A., Kato, H.,
Taneichi, M., Komuro, K., Uchida, T.

(1999) Antigen-specific, IgE-selective
unresponsiveness induced by antigen-
liposome conjugates: Comparison of four
different conjugation methods. *Int. Arch.*
Allergy Immunol. 120:199-208.

図—1 : グルタルアルデヒドを用いたリポソームとOVAの結合

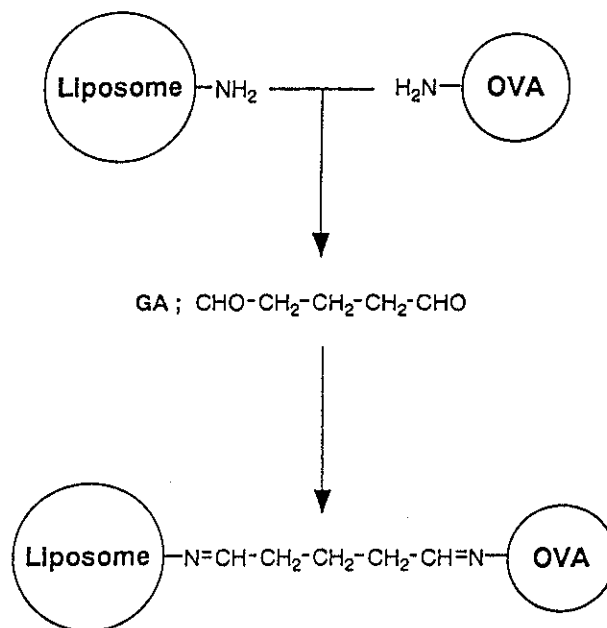


図-2 : EMCSを用いたリポソームとOVAの結合

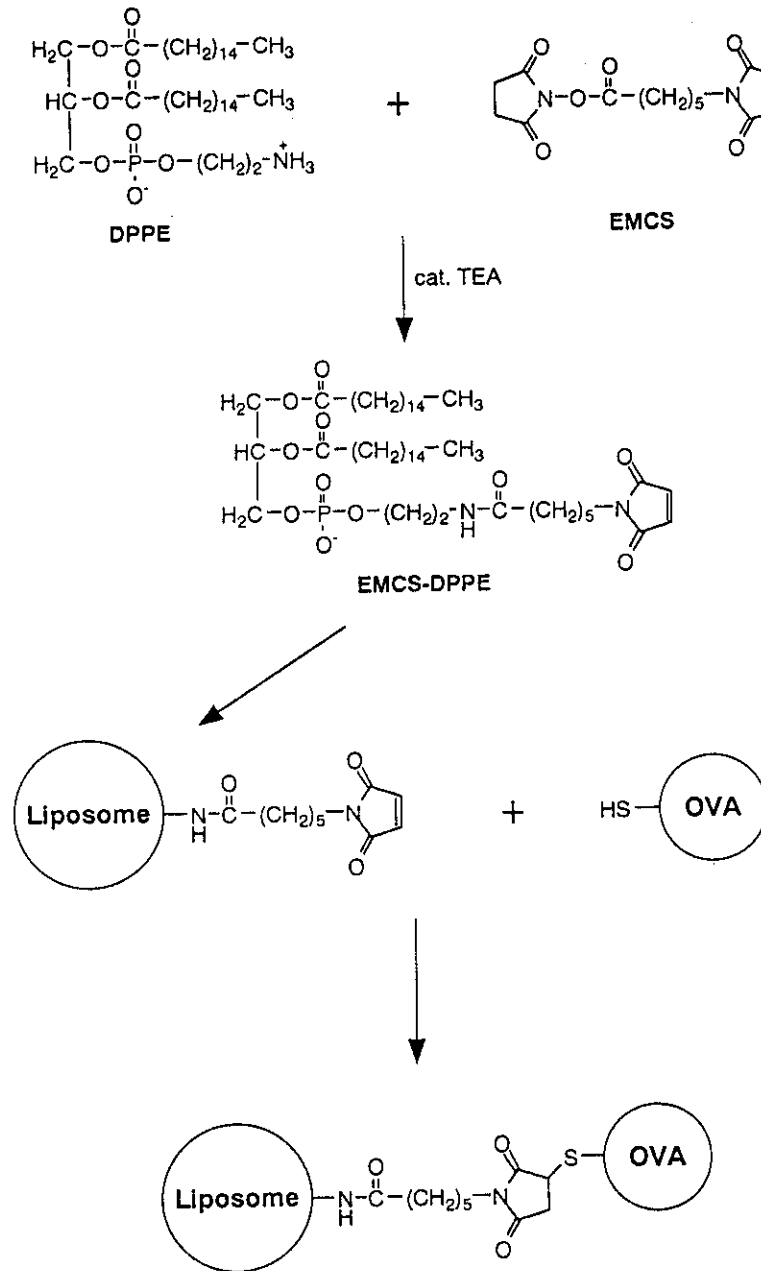


図-3 : DSSを用いたリポソームとOVAの結合

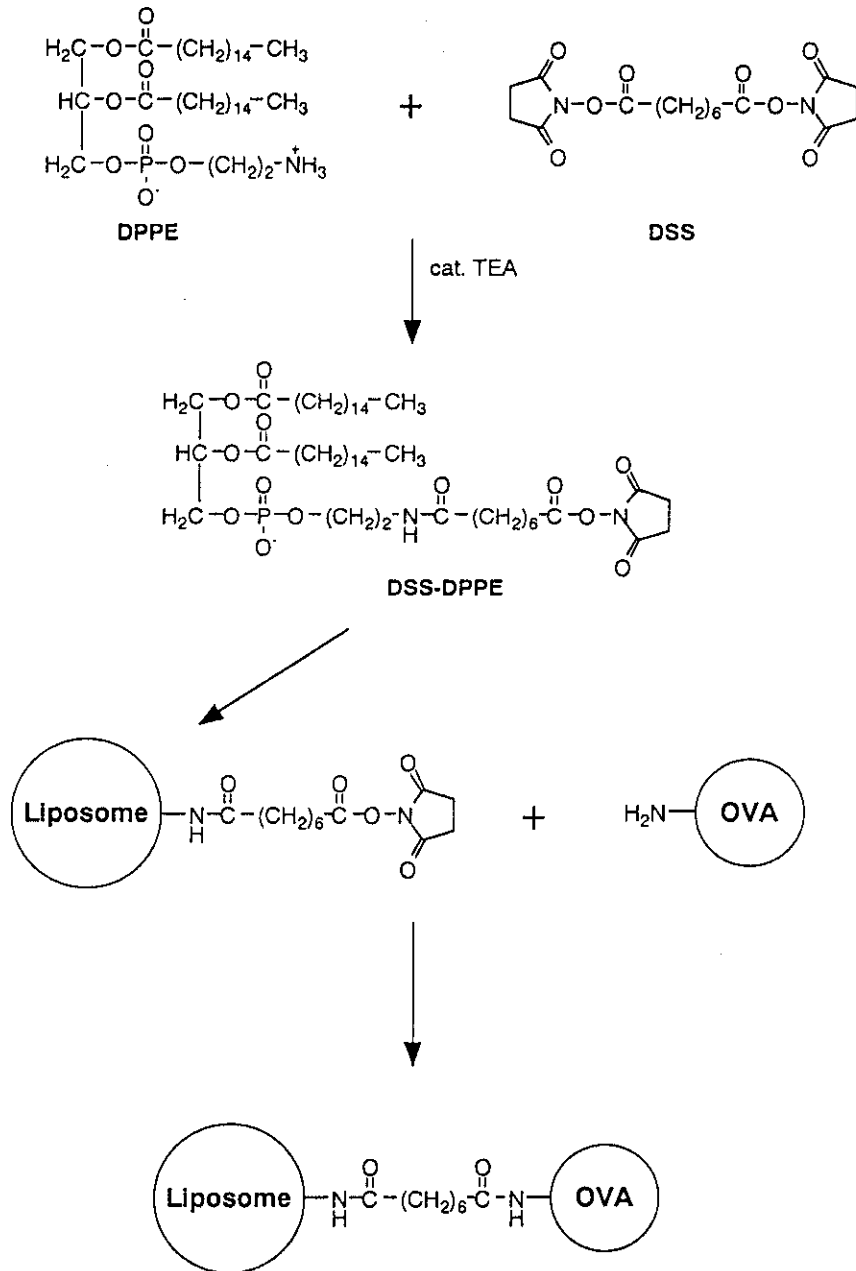


図-4 : SPDPを用いたリポソームとOVAの結合

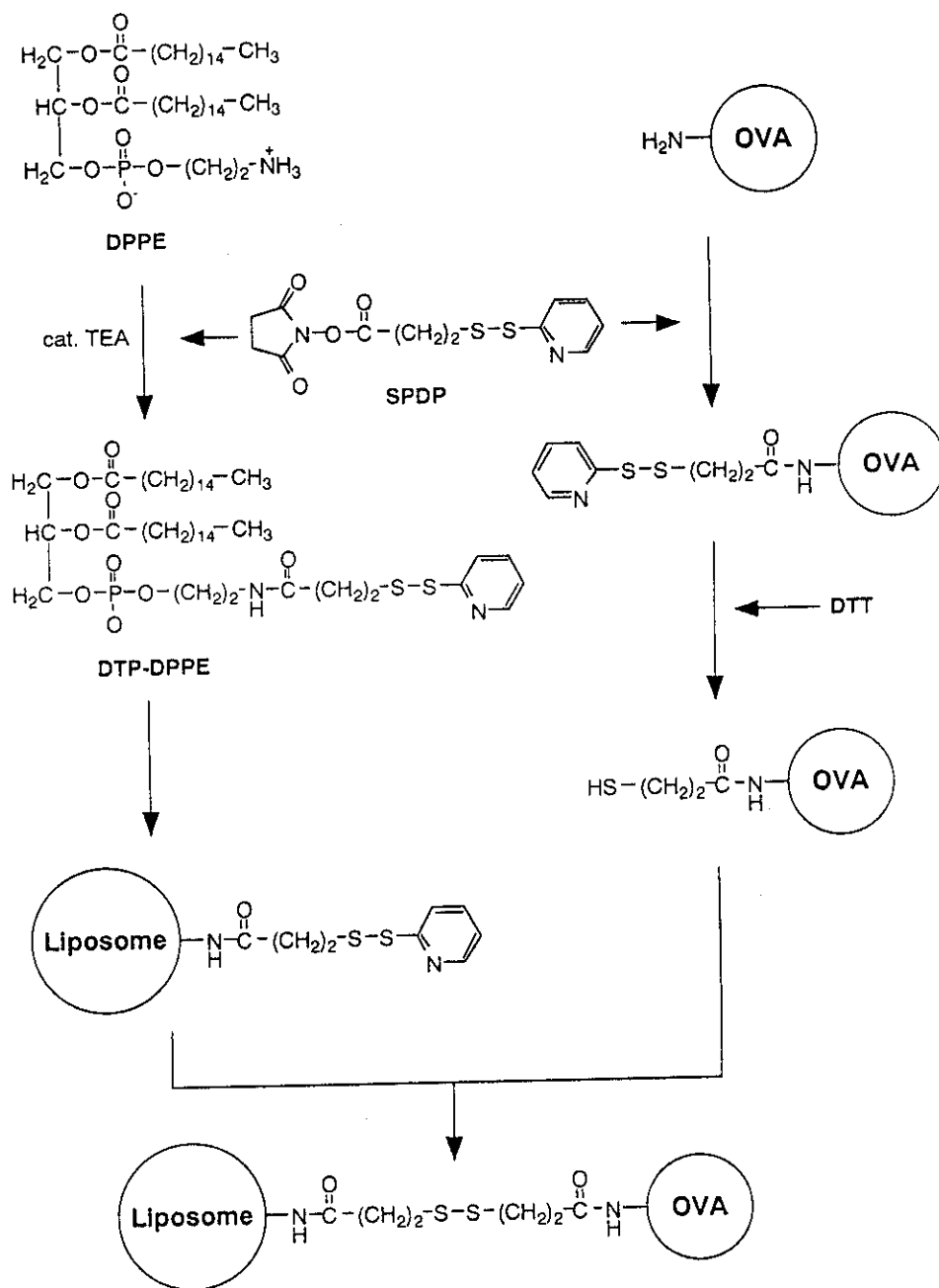


図-5 : VT2-リポソーム免疫後のサルにおける抗VT2抗体産生

