

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11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、分担及び総合研究報告書

平成12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)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括報告書

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

O157, Stx1 及び Stx2 遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法を開発し、この方法が多数の検体の中の STEC の存在をスクリーニングするのに有効であることを、インドカルカットのサンプルを用いた調査により明らかにした。全国小児医療機関から集めた腸管出血性大腸菌感染症患者情報の分析の結果、白血球増多や貧血は HUS 発症群、非 HUS 群の双方にみられ、さらに白血球の増多は患者の重傷度に依りて上昇し、非 HUS 患者に比べ死亡例の場合は約 6 倍の上昇が認められることがわかった。Stx による造血細胞系への作用を *in vitro* で検討した結果、Stx2 のみの処理ではマクロファージが誘導され、Stx2 と IL-1 β の処理では主に顆粒球が誘導されることが明らかとなり、STEC 感染症の発症機構への関与が示唆された。Stx の細胞表面受容体である中性糖脂質・Gb3 の糖鎖部分をカルボシランデンドリマーに結合させたポリマーは培養細胞への Stx 毒性に対して強い中和活性を示すことを見出した。この化合物の Stx に対する結合は抗体に匹敵する程強く、さらにマウスに対する Stx の毒性も中和することがわかった。

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)

竹田多恵 国立小児病院小児医療研究センター
感染症研究部長

(二年度のみ：中尾浩史・感染症研究部研究員)

PCR 法の開発、臨床医学細胞生物学的研究、さらに新規治療法の開発としてペロ毒素と強く結合することにより低濃度でその毒性を中和する糖鎖ポリマーの開発及びその有効性の評価を行った。本報告書では新規治療法の開発について記載することとし、迅速診断法の開発及び臨床医学細胞生物学的研究については分担研究者の報告書を参照されたい。

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ペロ毒素/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、その機構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を目的とする。さらに腸管出血性大腸菌感染症における合併症阻止のために、新規化合物を用いた治療法を開発を試みた。

今年度は迅速診断法としてマルチプレックス

HUS や脳症は、腎や脳などの細小血管内皮に対するペロ毒素の細胞障害が原因と考えられている。従って血液中に入ったペロ毒素を中和できれば、これらの合併症を阻止できる可能性がある。ペロ毒素は酵素活性を有する A 鎖 1 本と受容体結合活性を有する B 鎖 5 本から構成される。ペロ毒素は B 鎖を介して細胞表面にあるペロ毒素受容体・中性糖脂質 Gb3 (Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc α 1 \rightarrow ceramide) に結合し、細胞内に取り込まれる。すなわち B 鎖の Gb3 への結合を阻害することにより、毒素の細胞内侵入や細胞毒性を防ぐことができる。また B 鎖はペンタマー構造をとっていることから、Gb3 糖鎖がクラスターを形成していることが結合に重要と推測される。ペロ毒素の吸着剤として Gb3 の糖鎖部分を結合させたビーズ・Synsorb Pk が開発された。これは腸管内で産生されたペロ毒素を吸着して体内への侵入を防ぐことにより同菌感染症の症状を抑制しようというものであるが、その有効性は未だ確認されていない。またこのビーズの作製過程では

糖鎖の数や配置を厳密に制御できないために、ペロ毒素との結合の強さに及ぼすこれらの影響などは調べられていない。

そこで本研究ではペロ毒素と強く結合することにより低濃度でその毒性を中和する糖鎖ポリマーを開発することを目的として研究を行った。用いたポリマーは有機ケイ素樹枝状高分子(カルボシランデンドリマー)であり、それに Gb3 糖鎖の数、配置及び骨格からの距離を厳密に制御して種々の化合物を作成し、それらのペロ毒素中和活性を培養細胞レベル及び個体レベルで比較検討した。

B. 研究方法

Gb3 糖鎖を 3, 6 及び 12 個有するカルボシランデンドリマーを設計・合成し以下の研究に用いた。Stx の Gb3 結合に対する阻害は、薄層上の Gb3 に対する Stx の結合を抗体を用いて検出する方法、あるいは培養ペロ細胞へのアイソトープ標識 Stx を検出する方法を用いて、カルボシランデンドリマーの活性を調べた。さらに本化合物と Stx の直接の結合定数は分子相互作用解析装置 (Biacore) を用いて測定した。細胞レベルでの毒性中和活性については、培養ペロ細胞に対する Stx の細胞毒性試験に Gb3 糖鎖含有カルボシランデンドリマーを共存させて 3 日間培養し、生存する細胞を WST 法にて定量することによりその中和活性を測定した。動物レベルについては、致死量 (5ng) の Stx をマウスに投与する際に、予めあるいは同時に Gb3 糖鎖含有カルボシランデンドリマーをマウスに投与し、その後のマウスの症状を観察した。形態学的観察には毒素投与後 16, 48 あるいは 72 時間後にマウスを屠殺し、脳及び腎を採取、ホルマリン固定・パラフィン包埋した試料を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験においては施設の規定に従い、動物愛護上の配慮を充分に行っており、倫理面での問題はないと判断した。

C. 研究結果

Gb3 糖鎖を 3 つ含むカルボシランデンドリマーは培養細胞に対して全く中和活性を示さなかったが、6 つあるいは 12 個含む化合物は ng/mL のオーダーで Stx1 及び Stx2 の細胞毒性を中和した。またこれらの化合物の Stx に対する結合は 10^{-8} M オーダーと低く、毒素に対する結合が極めて強いことがわかった。一方これらの化合物の生体内における中和活性を調べたところ、5 ng の Stx2 をマウスに投与すると全てのマウス

が 7 日以内に死亡するのに対し、Stx2 と同時に Gb3 糖鎖を 6 つ含むカルボシランデンドリマーを投与すると Stx の致死活性を完全に抑制することが明らかになった。

Stx2 を投与したマウスの小脳や中脳では鬱血や出血像が観察されるのに対して、Gb3 糖鎖を 6 つ含むカルボシランデンドリマーを投与するとこれらの病変がほぼ完全に抑制されることがわかった。また免疫組織化学的手法により脳内の Stx を観察したところ、Stx 単独投与群では脳内の赤血球や血管に Stx の沈着が見られたのに対し、カルボシランデンドリマー共投与群ではその沈着が減少していることが明らかとなった。これらの結果からカルボシランデンドリマーは Stx の脳への移行あるいは脳での沈着を阻害することにより、Stx の致死活性を抑制すると考えられた。

さらに同化合物を前投与し、6 時間後に Stx2 を投与してもその毒性を完全に抑えることがわかった。この結果から、同化合物は生体内で比較的安定に存在して毒素中和活性を示すことが明らかとなり、腸管出血性大腸菌感染後のなるべく早い時期に本化合物を投与することにより、合併症の発症を抑制できる可能性が示唆された。一方、この化合物のみあるいは毒素と共投与したマウスは 2 カ月の観察の後にも顕著な毒性観察されなかった。

D. 考察

現在まで、体内に入った Stx の活性を抑制する手段として唯一用いられているのは免疫グロブリン療法であるが、その有効性には疑問が持たれている。今回新たに開発した化合物は Stx に対して強い結合活性を有し、さらに細胞レベル及び個体レベルにおいて Stx の毒性に対する中和活性を示した。この化合物の生体内における動態や代謝については今後の課題であるが、腸管出血性大腸菌感染症の治療薬としての可能性を秘めた化合物と言える。

最近、培養細胞に対する Stx の毒性を中和する化合物が報告され、腸管出血性大腸菌感染症に対する新しい治療薬として注目されている (Nature 403:669-672, 2000)。これは我々と同じアイデアから設計され、Gb3 糖鎖を 10 個含有する水溶性の化合物であり、本研究で用いる中和化合物と同様に、糖鎖のクラスター構造により強力に毒素と結合して中和するものである。しかし彼らは培養細胞による効果判定のみでその有効性を主張しており、個体レベルでの検討は行っていない。一方我々は培養細胞に対する毒性中

和活性は個体における毒性中和とは必ずしも一致しないことを明らかにし、さらに個体レベルで有効な中和剤 (Gb3 糖鎖 6 個含有カルボシランデンドリマー) を既に見出している。また本研究で用いる化合物の骨格は上記化合物とは異なって分岐点にケイ素を用いることで生体内での安全性と安定性を高めている。これらのことから、本研究で用いたカルボシランデンドリマーの方が薬剤としての利用価値は高いと考えている。

腸管出血性大腸菌の産生する Stx のうち 1 型 Stx (Stx1) はある種の赤痢菌の産生する志賀毒素と同一構造を有する。従って本研究で開発したカルボシランデンドリマーは志賀毒素に対しても中和活性を示すはずであり、この赤痢菌感染症に合併する HUS の発症の抑制についても有効な薬剤となる可能性がある。さらに細菌毒素の中にはコレラ毒素などのように Stx と同じく B サブユニットがペンタマー構造を有し、糖脂質糖鎖を受容体とするものが知られている。従って、本研究で用いた Gb3 糖鎖の代わりに例えばコレラ毒素の受容体である GM1 糖鎖を結合させた化合物はコレラ毒素の中和剤として有効であると考えられ、細菌感染症対策において本研究の発展性は高いものと考えている。

E. 結論

腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療法として新しい毒素中和剤による系を創出した。これは菌が感染した後でも早期に同薬剤を投与することにより、重大な合併症を防止する可能性を示していると考えられる。この系がヒト腸管出血性大腸菌感染症の有効な対応策となることが期待される。

また分担研究報告書に記したように、本研究によってスクリーニングに適した迅速簡便診断法としてマルチプレックス PCR 法を開発し、その有用性をインドカルカッタから得られた実際の試料を用いて証明した。さらに同感染症の発症・進展の病態解明の一環として白血球に対する Stx の作用について臨床材料を用いた検討及び細胞レベルにおける解析を行い、Stx の全く新しい生物活性を発見することに成功した。

これらの研究成果は腸管出血性大腸菌感染症の診断や治療への貢献が大きいと考えている。

F. 研究発表

1. Y. Yamamoto-Shuda, K. Nakayama, T. Saito, Y. Natori: Therapeutic effect of glucocorticoid on experimental crescentic glomerulonephritis. *J. Lab. Clin. Med.*, 134(4):410-418, 1999

2. Z. L. Ou, Yu. Natori, Y. Natori: Transient and sequential expression of chemokine mRNA in glomeruli in puromycin aminonucleoside nephrosis Nephron, in press
3. Bag PK, Nandi S, Bhadra RK, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Nishibuchi M, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Clonal diversity among the recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2354-2357, 1999.
4. Uchida, H., Kiyokawa, N., Takeda, T., Fujimoto, J.: The detection of Shiga toxin in the kidney of a patient with hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Res.*, 45: 133-137, 1999.
5. Takeda, T., Yoshino, K., Adachi, E., Sato, Y., Yamagata, K.: In vitro assessment of a chemically synthesized Shiga toxin receptor analog attached to Chromosorb P (Synsorb Pk) as a specific absorbing agent of Shiga toxin 1 and 2. *Microbiol. Immunol.* 43: 331-337, 1999.
6. Hashimoto, H., Mizukoshi, K., Nishi, M., Kawakita, T., Hasui, S., Kato, Y., Ueno, Y., Takeya, R., Okuda, N., and Takeda, T.: Epidemic of gastrointestinal tract infection including hemorrhagic colitis attributable to Shiga toxin 1-producing *Escherichia coli* O118:H2 at a junior high school in Japan. *Pediatrics* 103: electronic pages (Abstract in P.141), 1999.
7. Aoki, Y., Yoshida, Y., and Takeda, T.: Shiga toxin 2 promotes stem cell differentiation into granulocytosis in mice. *J. Infection*, 39:97, 1999.
8. Uchida, H., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Horie, H., Fujimoto, J., and Takeda, T.: Shiga toxins induce apoptosis in bronchial epithelium derived cells. *J. Infect. Dis.* in press.
9. Nakao, H., Kiyokawa, N., Fujimoto, J., Yamasaki, S., and Takeda, T.: Monoclonal antibody to Shiga toxin 2 which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. *Infect. Immun.* 67:5717-5722, 1999.
10. Tanaka, H., Toyoda, N., Adachi, E., and Takeda, T.: Immunological evaluation of an *Escherichia coli* O157 infected pregnant woman. *J. Reproduct. Med.* in press.
11. Katagiri, Y.U., Mori, T., Nakajima, H., Katagiri, C., Taguchi, T., Takeda, T., Kiyokawa, N., and Fujimoto, J. Activation of Src family kinase Yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. *J. Biol. Chem.* in press.
12. 足立枝里子、吉田祐司、田中浩彦、豊田長康、竹田多恵：腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染

- した妊婦の血清及び母乳中に検出される抗体、感染症誌、73:451-456, 1999.
13. 菅原由人、雑賀威、長谷川美幸、小林寅鉄、栗本文彦、竹田多恵：ELISA 法による腸管出血性大腸菌 O157 由来 LPS IgM および IgG 抗体測定的基础及び臨床的検討、感染症誌、73:593-599, 1999.
 14. 足立枝里子、吉野健一、竹田多恵：腸管出血性大腸菌 O157 の成人、小児患者及び成人保菌者の抗 O157 LPS 抗体価の変動、感染症誌、73:772-777, 1999.
 15. Dohi, H., Nishida, Y., Mizuno, M., Shinkai, M., Kobayashi, T., Takeda, T., Uzawa, H., and Kobayashi, K.: Synthesis of an artificial glycoconjugate polymer carrying Pk-antigenic trisaccharide and its potent neutralization activity against Shiga-like toxin. *Bioorganic Med. Chem.* 7: 2053-2062, 1999.

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

要旨：EHEC 感染症の迅速な診断法として、O157 に特異的な O 抗原合成遺伝子、志賀毒素 1 (Stx1) 及び志賀毒素 2 (Stx2) の遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法を開発した。これを用いて、インドカルカットにおいて家畜の糞便、下痢患者由来の糞便から O 群血清型 O157 を含む EHEC の分離を試みた。家畜糞便からは Stx1 陽性、Stx2 陽性、Stx1 Stx2 両者陽性を示す菌株が、患者検体からは Stx1 陽性及び O157 陽性を示す菌株が見つかった。これらの結果は Beads-ELISA、Vero 細胞毒性試験、抗血清を用いた凝集反応等によって確認された。本マルチプレックス PCR 法は特異性が非常に高くかつ検出感度も優れており、EHEC 感染の簡便迅速診断に適していることがわかった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic E. coli; EHEC) 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。EHEC 感染症は重症化すると溶血性尿毒症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可能性があるため、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、EHEC 感染症の迅速な診断法として、O157 に特異的な O 抗原合成遺伝子、志賀毒素 1 (Stx1) 及び志賀毒素 2 (Stx2) の遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法を開発すること、それが EHEC 感染症の迅速診断法として有用であるかどうかを実際に便検体を用いて確認することを目的とした。

B. 研究方法

Stx1 遺伝子、Stx2 遺伝子及び O157 特異的 O 抗原合成遺伝子からプライマーセットをデザインした。偽陰性を防ぐため、O157 特異的 O 抗原合成遺伝子プライマーとアニールし異なる長さの増幅産物を生じるインターナルコントロールの鋳型 DNA を作製した。これらを同一の PCR 反応系に入れ、種々の条件を検討し最適化した後、あらかじめ Stx1 あるいは Stx2 の存否が明らかになっている大腸菌 O157 及び非 O157、さらに大腸菌以外の種々

の菌株を用い特異性の検定を、菌培養液の希釈液を用いて検出感度の検定を行った。

次に本マルチプレックス PCR 法が実際の便検体に適用可能かを確認するため以下の実験を行った。インドカルカットにおいて採取した家畜の糞便及び下痢症患者便を選択培地である EC-broth に添加し、37℃で一夜振とう培養を行った。培養液に TE バッファーを加え、100℃、10 分間加熱処理した後、本マルチプレックス PCR 法により Stx1 遺伝子、Stx2 遺伝子及び O157 特異的 O 抗原合成遺伝子の増幅をスクリーニングした。PCR で陽性となった検体を、さらに選択培地 SMAC と L-agar に接種し、37℃で一夜培養を行った後、ナイロン膜に菌体 DNA をブロッティングし、DIG で標識した Stx1 遺伝子、Stx2 遺伝子及び O157 特異的 O 抗原合成遺伝子に特異的な DNA プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションを行った。陽性となった検体について、さらに PCR、Stx1 及び Stx2 検出用 Beads-ELISA、Vero 細胞毒性試験、O157 特異的抗血清を用いた凝集反応によって確認した。

C. 研究結果

Stx1 プライマーによる増幅産物は 349bp、Stx2 プライマーによる増幅産物は 112 bp、O157 特異的 O 抗原合成遺伝子プライマーによる増幅産物は 457 bp、インターナルコントロールによる増幅産物は 641 bp であった。マルチプレックス PCR 後の各増幅産物は、3%程度のアガロースゲルによる電気泳動で十分に分離・同定が可能であった。

あらかじめ Stx1 あるいは Stx2 の存否が明らかになっている大腸菌 O157 及び非 O157 を材料とした実験の結果、Stx1、Stx2 及び O157 特異的 O 抗原合成遺伝子を検出する特異性は 100% であった。また大腸菌以外の 40 種の菌を材料として本マルチプレックス PCR 法を行ったところ、Stx1 遺伝子を持つ赤痢菌では 349bp の DNA の増幅が見られたが、それ以外は完全に陰性であり、非特異的反応は全く観察されなかった。さらに菌培養液の段階希釈液を用いて検出限界を調べたところ、およそ 10 個の菌で検出が可能であり、マルチプレックスでない通常の PCR と比べ遜色のない検出感度が得られた。

本マルチプレックス PCR 法を用いインドカルカッタにおいて家畜の糞便と下痢症患者由来の糞便について Stx1 遺伝子、Stx2 遺伝子及び O157 特異的 O 抗原合成遺伝子の存否をサーベイしたところ、カルカッタ近郊の屠殺場から得た牛糞便 80 検体中、33 検体で PCR 陽性となり、そのうちの 13 検体で Stx1 のみ陽性、9 検体で Stx2 のみ陽性、11 検体で Stx1 と Stx2 の両方で陽性であった。O157 特異的 O 抗原合成遺伝子が陽性となったものはなかった。一方、西ベンガル州立伝染病病院から得た下痢便 412 検体のうち、3 検体で PCR 陽性となり、そのうちの 2 検体で Stx1 のみ陽性、1 検体で O157 陽性、Stx2 に陽性となったものはなかった。同じく血便 39 検体について調べたところ、1 検体で Stx1 についてのみ陽性となった。これら陽性となった検体の一部から大腸菌を分離した後、さらに PCR、Beads-ELISA、Vero 細胞毒性試験、抗血清を用いた凝集反応によって O 群血清型を確認したところ、Stx1、Stx2 で陽性となったものは、PCR、Beads-ELISA、Vero 細胞毒性試験でそれぞれ陽性であった。また、O157 について陽性となった株は、O157 に対する抗血清では凝集したが、Stx1、Stx2 は陰性であった。

D. 考察

マルチプレックス PCR 法は通常の一組のプライマーで行う PCR 法に比べ一般的に検出感度が低いとされ、また病原菌の検出においては偽陰性が起こりやすいことも問題となる。本研究では、標的遺伝子特異的にデザインされたプライマーセットを、さらに試行錯誤により組み合わせ方や反応に加える量比を最適化し、上記の問題点をクリアした。

また本法を用いたサーベイにより、カルカッタ

の下痢症患者の中にすでに EHEC が原因菌となっている例があることが明らかとなった。その原因となっているのは、全て Stx1 産生性の non-O157 に属する EHEC であった。一方、家畜については、すでに Stx1 あるいは Stx2 単独産生性の EHEC や、Stx1 及び Stx2 の両方の毒素を産生する EHEC に汚染されていることが明らかとなった。Stx 遺伝子は Stx フェージによって菌種間を移動することが報告されているので、今後、家畜由来の Stx 遺伝子が、O157 を含む人に感染する大腸菌に感染して下痢症の原因となることや家畜にすでに汚染されている EHEC も人の感染源となることが考えられる。本マルチプレックス PCR 法は、EHEC の汚染状況や患者からの分離状況を迅速に調べることができ、流行を未然に防ぐために有用であると考えられる。

E. 結論

本研究により開発した、O157 特異的な O 抗原合成遺伝子、Stx1 及び Stx2 遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法は、特異性・感度ともに良好であり、また実際に糞便検体に適用可能であった。本マルチプレックス PCR 法が EHEC 感染の簡便迅速診断に適していると考えられる。

F. 研究発表

論文発表

1. Bag PK, Nandi S, Bhadra RK, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Nishibuchi M, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Clonal diversity among the recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread, *J. Clin. Microbiol.* 37: 2354-2357, 1999.

学会発表

なし

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

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 竹田多恵 国立小児病院小児医療研究センター

O157 を代表とする腸管出血性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*:STEC) は新興感染症として先進国を中心として重大な問題となっている。患者を救命するためには発症早期に如何に診断するか、さらに重症化への移行を如何に予防するかにかかっている。STEC 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 STEC 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 は血管内皮細胞を傷害することにより、溶血性貧血や腎不全を惹起するとされてきたが、Stx の持つ蛋白合成阻害作用だけでは説明の付かないこともある。本研究では、病態、特に、貧血、好中球増多、血小板減少など、血液像に見られる異常と志賀毒素 (Stx) の関連について解析を試みた。我々が全国小児医療機関から集めた患者情報から、死亡例 5 例と HUS 85 例、不完全 HUS 44 例、非 HUS 428 例について、入院時の臨床検査データを分析した結果、白血球増多、貧血は HUS、出血性大腸炎の双方にみられた。白血球の増多は、患者の重傷度に応じて上昇し、非 HUS 患者と比較して死亡例の場合は約 6 倍の上昇が認められた (Fig. 1)。

この白血球の増多と Stx との関連を解明するために、マウス (Icl:ICR 6 weeks male) の腹腔内に精製 Stx2 (0.2-1 ng) を投与し、経時的に末梢血または骨髓細胞を採取し、顆粒球、有核細胞、巨核球の計数を行った。マウスへの Stx2 投与により、骨髓中の有核細胞と巨核球の総数には変化はなかったが、顆粒球の増加と赤芽球の減少が認められた (Fig. 2 上)。末梢血でも顆粒球は優位 (約 7 倍) に増加した (Fig. 2 下)。この効果は熱失活 Stx2 毒素や精製 LPS では認められなかった。Stx1 にはこのような作用はみられなかった。この現象は、STEC-HUS 患者に見られる貧血が Stx2 の特異的な作用によるものであることを示唆する。

Stx による造血細胞系への作用を *in vitro* で検討した。ヒト末梢血単核球、臍帯血および骨髓細胞を 1.3%メチルセルロース培地 (30%FCS, 10%BSA) 中で 16 日間培養し、種々サイトカイン添加群と Stx 添加群とにおけるコロニー形成の様子を比較観察した。*in vitro* においてヒト

骨髓細胞に Stx2 のみを添加した場合、顆粒球マクロファージ刺激因子を添加した場合と同等数の顆粒球-マクロファージのコロニーを生じた。しかし、G-CSF が主に顆粒球-マクロファージコロニーを誘導するのに対し、Stx2 のみでは主にマクロファージが誘導された。Stx2 と IL-1 β を作用させると主に顆粒球のコロニーが観察された。他のサイトカイン (G-CSF, IL-1 α) ではそのような相乗効果はなかった。同様な結果が臍帯血や末梢血からも得られた。熱失活毒素ではコロニー刺激効果はなかった。Stx2 は G-CSF のような顆粒球増多を引き起こすサイトカインの産生を促進することによって顆粒球増多症を引き起こしていることが考えられる。著しい顆粒球の増加は STEC 感染症においてしばしば観察されるが、原因は明らかではなかった。今回の結果より、Stx2 が骨髓幹細胞の顆粒球への分化に対して作用していることが示された。このような蛋白合成阻害作用以外の生物活性、特に、Stx2 に特異的な作用は今まで報告されていない。

このような Stx2 に特異的な生物活性の発現に重要な構造を解明することを目的に Stx ハイブリッド毒素および Stx の迅速精製法の開発を試みた。すでに樹立している Stx に対するモノクローナル抗体 (Stx1: 5-5B, Stx2: VTm1.1) を CNBr-activated Sepharose 4B にそれぞれ結合させ、各種 Stx 毒素精製のためのイムノアフィニティカラムを作成した。このイムノアフィニティカラムを用いると 3 段階 (イオン交換樹脂、イムノアフィニティ、ゲル濾過) で単一バンドになるまで Stx1 または Stx2 を精製できた。ハイブリッド毒素を作成するために、Stx1 および Stx2 の A サブユニット、B サブユニットを特異的に増幅する PCR プライマーを作成し、増幅断片を組み込んだクローンを調整した。それぞれのクローンは DNA 塩基配列とそれぞれのサブユニットを産生していることを確認した。Stx2B クローンには Stx1A を持つプラスミド、Stx1B クローンに Stx2A を持つプラスミドを形質転換することによって Stx1A/2B および Stx2A/1B ハイブリッド毒素産生株を調整した。現在、これらの株より前述した精製法を応用してハイブリッド毒素を精製中である。

研究協力者 青木 洋祐 実践女子大学

Fig. 1. Correlation between WBC count and prognosis of EHEC O157 infection seen in children (16 years)

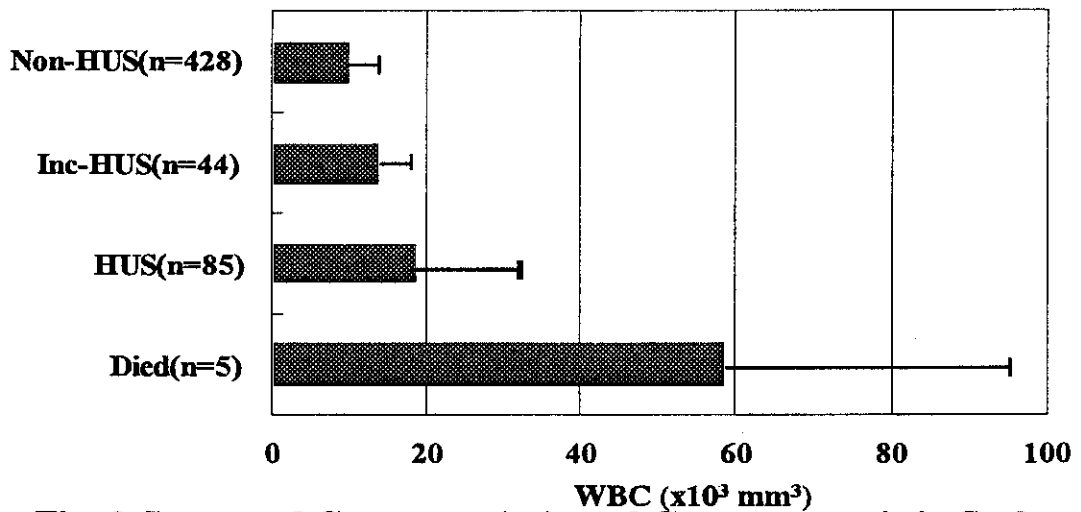


Fig. 2. Increased Granulopoiesis and Granulocytosis in Stx2 Injected Mice

