ベロ毒素 (verotoxin 1) 投与マウスにおける アジスロマイシン与薬の影響

新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染症学講座細菌学分野¹⁾, 内部環境医学講座 (第二内科)²⁾

小原 竜軌¹⁾²⁾ 小塩 精一¹⁾ 張 慧敏¹⁾
下條 文武²⁾ 山本 達男¹⁾

(平成 13 年 7 月 2 日受付)

(平成 13 年 11 月 9 日受理)

Key words : verotoxin, azithromycin, cytokine

[感染症誌 76 : 126~128, 2002]

はじめに

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) は, 1982 年に米国で見いだされた新興病原菌である。以来, 主に先進国で EHEC の流行が繰り返され, 対策の必要性が指摘されてきた。わが国では, 1996 年 (平成 8 年) に, 世界最大規模の流行が発生している¹⁾。EHEC は腸管粘膜を感染初発部位とし, 水様下痢や出血性大腸炎などの腹部症状を惹起する。さらに, 全身性の微小血管障害である溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) や脳症などの深刻な合併症を併発する²⁾。主要な病原因子はベロ毒素 (verotoxin, VT) であり, サブタイプとして, VT1 および VT2 が存在する。

ベロ毒素は蛋白合成を阻害して標的細胞を死に至らしめる他, LPS などと同様に単球などに作用して, 炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β , IL-6, IL-8 などの産生を誘導する³⁾。HUS の発症には, このような炎症性サイトカインによる過剰な生体防御反応が深く関与していると考えられ

ている。

本研究では, VT1 を投与したマウスにニューマクロライド系抗菌薬である azithromycin (AZM) を引き続き投与し, 血清中サイトカイン濃度の変化と生命予後に関する検討を行った。

材料と方法

精製 VT1 (0.2 mg protein/ml) は, VT1 遺伝子を導入した大腸菌株 87-27⁴⁾ を材料に, 先に報告された方法⁵⁾⁶⁾で, ゲル濾過クロマトグラフィーにより単一のピークとして得た。エンドトキシンの混入は, リムルステスト (第一化学薬品) により, 検出限界値 (0.06 endotoxin units/ml) 以下であることを確認した。

1 群 10 匹の 5~6 週齢のマウス (雄, C57BL6) に VT1 を 2.75 μ g/kg (体重) の濃度で腹腔内 (i.p.) 投与した。その 5 分後に, AZM (ファイザー製薬) を, 0 (生理食塩水), 0.38, 0.75, 1.5, あるいは 3.0 mg/kg (体重) の濃度で腹腔内 (i.p.) 投与した。

一定時間後に採血し, 血清中のサイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 量を ELISA キット (genzyme TECHNE, USA) で測定した。また, 1 週間後の生存率を各群で比較した。サイトカイン量は Student の *t* 検定によって, 生存率は Fisher の直接確率計算法を用いて有意差を検定した。

別刷請求先 : (〒951-8510) 新潟市旭町通 1 番町 757 番地
新潟大学大学院医歯学総合研究科
国際感染症学講座細菌学分野

山本 達男

結果と考察

マウスに VT1 を投与し、経時的に血清中のサイトカイン量を測定した (Fig. 1). TNF- α 量は 1.5 時間後に高値を示し、3 時間後以降は検出されなかった. IL-1 β の場合には、投与 3 時間後に高値を示し、時間の経過とともに比較的緩やかに減少した. IL-6 では、投与後 1.5 時間から 3 時間で高値を示し、6 時間後には低値となった.

VT1 に引き続いて AZM を 3.0 mg/kg で投与した場合には、ピーク時のサイトカイン量が、TNF- α で 16%, IL-1 β で 19%, IL-6 で 47% にそれぞれ減少した (Fig. 1). また、マウスの 1 週間後の生存率は、ペロ毒素単独投与群で 0% (0/10) であったのに対して、VT1 と AZM (3 mg/kg) 投与群では 40% (4/10) と、有意に上昇した ($p < 0.05$).

AZM の投与量を 1/2 (1.5 mg/kg) に減じた場合には、サイトカイン量は、TNF- α と IL-1 β で 32% と 21% に減少したが ($p < 0.05$), IL-6 では有意な減少は認められなかった. マウスの 1 週間後の生存率は 20% (2/10) で、AZM 3.0 mg/kg 投与の場合の生存率を下まわっていた.

過剰に産生された炎症性サイトカインは HUS の重篤化因子である. HUS 患者では、血中の炎症性サイトカイン (IL-6 や IL-8 など) が上昇している⁷⁾. また、TNF- α と IL-1 β はペロ毒素のレセプターである globotriaosylceramide (Gb3) の発現を促進し、標的細胞のペロ毒素に対する感受性を高める⁸⁾.

本研究では、マウスを用いた実験系で AZM が VT1 による炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) の誘導を有意に抑制し、最大 40% の救命効果を示すことを確認した.

マクロライド系抗菌薬は抗炎症作用を示す. AZM の場合には、LPS などで刺激したヒト単球からの炎症性サイトカインの産生を抑制し、formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) などで刺激した好中球からのスーパーオキシドの産生を抑制する^{9,10)}.

また、AZM は EHEC に対してマクロライド系抗菌薬の中では最も強い抗菌力を示す (MIC₉₀ (μ g/ml): AZM, 4; クラリスロマイシン, 32; エ

Fig. 1 Suppression by AZM of VT1-induced serum inflammatory cytokine levels in mice

The circulating concentrations of cytokines (TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C)) were measured by ELISA assay. Open squares represent cytokine levels of mice injected with VT1 (2.75 μ g/kg) and saline intraperitoneally. Serum samples were collected sequentially. Closed circles represent cytokine levels of mice injected with VT1 (2.75 μ g/kg) and AZM (3.0 mg/kg). Values are expressed as means $\pm$ S.D. There are significant differences between the peaks of cytokine levels of VT1-injected mice treated with and without AZM (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$).

リスロマイシン, 64; ロキタマイシン, 128; ロキシスロマイシン, 128)¹¹⁾. さらに, キノロン系抗菌薬などとは異なり, EHEC 細胞破壊による VT1 および VT2 の放出は起きないことが報告されている¹²⁾.

本研究で確認された AZM のマウス血清中炎症性サイトカイン抑制作用は, クラリスロマイシンよりも強い傾向にあった. さらに, 他のマクロライドとの比較, および炎症性サイトカイン抑制作用のメカニズムについて検討を行っている.

VT2 は VT1 よりも, 腎血管内皮細胞毒性で約 1,000 倍¹³⁾, マウス致死作用で約 400 倍¹⁴⁾ 活性が強い. In vitro でヒト単球を VT で刺激すると, TNF- α などのサイトカインの産生が促進される. 我々はこの実験系で, AZM (10 μ g/ml) が VT1 (5 ng/ml), VT2 (5 ng/ml) どちらの場合でもほぼ同程度の抑制効果 (VT1, 64.5%; VT2, 66.6%) を示すことを見いだした¹⁵⁾. 現在 VT2 に関して, マウスにおける AZM 与薬の影響を検討中である.

文 献

- 1) Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K : Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996. *Lancet* 1996 ; 348 : 831—2.
- 2) Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H : The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985 ; 151 : 775—82.
- 3) van Setten PA, Monnens LA, Verstraten RG, van den Heuvel LP, van Hinsbergh VW : Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes : binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood* 1996 ; 88 : 174—83.
- 4) Yamasaki S, Furutani M, Ito K, Igarashi K, Nishibuchi M, Takeda Y : Importance of arginine at position 170 of the A subunit of Vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity. *Microb Pathog* 1991 ; 11 : 1—9.
- 5) Noda M, Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y : Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. *Microb Pathog* 1987 ; 2 : 339—49.
- 6) Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y : Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. *Microb Pathog* 1987 ; 3 : 21—30.
- 7) Proulx F, Turgeon JP, Litalien C, Mariscalco MM, Robitaille P, Seidman E : Inflammatory mediators in *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1998 ; 17 : 899—904.
- 8) Kaye SA, Louise CB, Boyd B, Lingwood CA, Obrig TG : Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome : interleukin-1 β enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 1993 ; 61 : 3886—91.
- 9) Khan AA, Slifer TR, Araujo FG, Remington JS : Effect of clarithromycin and azithromycin on production of cytokines by human monocytes. *Int J Antimicrob Agents* 1999 ; 11 : 121—32.
- 10) Anderson R, Theron AJ, Feldman C : Membrane-stabilizing, anti-inflammatory interactions of macrolides with human neutrophils. *Inflammation* 1996 ; 20 : 693—705.
- 11) 山本達男, 脇坂紀子 : 本邦における抗菌薬耐性腸管出血性大腸菌の出現状況と対策. *日本臨床* 1998 ; 56 : 2718—29.
- 12) Yoh M, Frimpong EK, Voravuthikunchai SP, Honda T : Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol* 1999 ; 45 : 732—9.
- 13) Louise CB, Obrig TG : Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* 1995 ; 172 : 1397—101.
- 14) Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD, *et al.* : Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun* 1993 ; 61 : 3392—402.
- 15) 古俣 大, 真島卓弥, 持田 崇, 島田健太郎, 小塩精一, 小原竜軌, 他 : Azithromycin によるベロ毒素刺激 TNF- α 産生誘導の抑制. *新潟医学会雑誌* 2001 ; 115 : 408—10.

Protective Effect of Azithromycin against Verotoxin

Tatsuki OHARA¹⁾²⁾, Seiichi KOJIO¹⁾, Hui-Min ZHANG¹⁾,
Fumitake GEJYO²⁾ & Tatsuo YAMAMOTO¹⁾

¹⁾Division of Bacteriology, Department of Infectious Disease Control and International Medicine

²⁾Division of Respiratory Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences