

## ベロ毒素による TNF- $\alpha$ の産生誘導とカスパーゼ-3 の 活性化および抗菌剤による抑制効果の検討

新潟大学医学部 4 年

吉澤麻由子・百瀬 能成・普久原朝海  
林 正周・堀 泰彦・森嶋 計

指導：細菌学教室

張 慧敏・小原 竜軌・小塩 精一・山本 達男

TNF- $\alpha$  Induction and Caspase-3 Activation by Verotoxin  
and Effects of Antibiotics on the Apoptosis-Related Factors

Mayuko YOSHIKAWA, Takashige MOMOSE, Tomomi FUKUHARA  
Masachika HAYASHI, Yasuhiko HORI and Kazue MORISHIMA

*School of Medicine, Niigata University*

*Supervisor : Hui-Min ZHANG, Tatsuki OHARA,*

*Seiichi KOJIO and Prof. Tatsuo YAMAMOTO*

*Department of Bacteriology*

Verotoxin (VT) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is associated with hemolytic uremic syndrome (HUS). VT induces apoptosis in several kinds of tissues and cell lines such as pediatric tubular cells which are considered to be one of the target tissues for HUS. TNF- $\alpha$ , which is induced by VT or EHEC lipopolysaccharide, stimulates the VT-induced apoptosis. In this study, we have demonstrated that VT1 caused caspase-3 activation in THP-1 cells, and that azithromycin (AZM) significantly inhibited TNF- $\alpha$  induction by VT1 in peripheral blood mononuclear cells. These data provide a useful in vitro model to investigate the mechanism of VT-induced apoptosis through caspase-3, and the suggestion on a possible use of AZM as an

---

Reprint requests to: Department of  
Bacteriology, School of Medicine,  
Niigata University  
757 Ichibanchou, Asahimachi-dori,  
Niigata city, 951-8510 JAPAN.

別刷請求先：

〒951-8510 新潟市旭町通一番町757  
新潟大学医学部細菌学教室

immunomodulator to downregulate TNF- $\alpha$  induction.

Key words: Verotoxin, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), caspase-3, antimicrobial agent  
ペロ毒素, TNF- $\alpha$ , カスパーゼ-3, 抗菌剤

## はじめに

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) が産生するペロ毒素 (Verotoxin, VT) は EHEC が惹起する溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) の原因毒素である<sup>1)</sup>。VT は HUS の標的組織の 1 つである小児腎尿管の細胞等にアポトーシスを惹起するが<sup>2)</sup>、このようなアポトーシスも HUS 発症の一因であると考えられている。VT や EHEC のリポポリサッカライド によって誘導される TNF- $\alpha$  は VT によるアポトーシスを増強する<sup>3)</sup>。また一般に、カスパーゼ-3 がアポトーシスに至るカスパーゼカスケードの要に位置し、DNase を活性化することにより DNA の断片化を引き起こすことが報告されている<sup>4)</sup>。本研究では、VT によって誘導されるアポトーシスへのカスパーゼ-3 の関与を検討した。また、VT による TNF- $\alpha$  産生誘導やカスパーゼ-3 活性化に対する抗菌剤の抑制効果を調べた。

## 材料と方法

ヒト末梢血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) はヒトヘパリン加静脈血から Ficoll-Paque 遠心分離法で分離した。ヒト単球由来株細胞 THP-1 細胞 (ATCC, Rockville, Maryland) と精製 VT 1 (デンカ生研) を用いた。抗菌剤としてホ

スホマイシン (FOM, 明治製菓), ニューマクロライドであるクラリスロマイシン (CAM, 大正製薬), アジスロマイシン (AZM, ファイザー) を使用した。

PBMC を用いた実験では、細胞数を  $1 \times 10^6$  /ml に調整し、VT 1 を最終濃度 5 ng/ml で添加後、FOM, CAM, もしくは AZM をそれぞれ 400  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml の濃度で加え、5 時間培養した。遠心後、培養上清中の TNF- $\alpha$  産生量を ELISA kit (genzyme TECHNE, Minneapolis, Minnesota) で、細胞内のカスパーゼ-3 活性を FluorAce™ Apopain Assay Kit (BIO RAD, Hercules, California) で測定した。

THP-1 細胞を用いた実験では、細胞数を  $1 \times 10^6$  /ml に調整し、VT 1 (最終濃度 5 ng/ml) を添加後、FOM を 400  $\mu$ g/ml の濃度で加え、5 時間培養した。遠心後、細胞内のカスパーゼ-3 活性を測定した。

## 結 果

VT 1 はヒト PBMC に作用して TNF- $\alpha$  の産生を著明に誘導した (図 1)。FOM は 400  $\mu$ g/ml の濃度でも、CAM は 10  $\mu$ g/ml の濃度でも TNF- $\alpha$  の産生誘導を抑制しなかった。これに対して AZM の場合には 10  $\mu$ g/ml の濃度で TNF- $\alpha$  誘導を 61% 抑制した (図 1)。ヒト PBMC を用いた場合には VT 1 によるカス

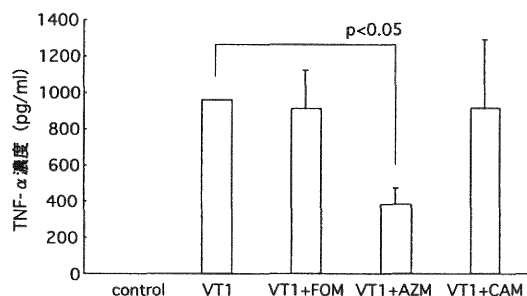


図 1 VT1 によって誘導される TNF- $\alpha$  の産生に及ぼす FOM, AZM, CAM の効果

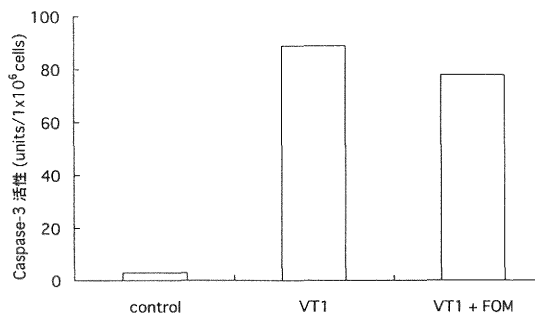


図 2 VT1 によって誘導されるカスパーゼ-3 活性に及ぼす FOM の効果  
VT1, 5 ng/ml; FOM, 400  $\mu$ g/ml

パーゼ-3の活性化は見いだされなかった(図2)。そこで、ヒト単球由来 THP-1 細胞を用いたところ、カスパーゼ-3の活性化が顕著に見いだされた。このカスパーゼ-3の活性化は FOM によっては阻止されなかった。

### 考 察

VT による HUS の発症は、VT が誘導する TNF- $\alpha$  等のサイトカインが補助因子となり、アポトーシスを介して惹起される。今回の研究で、AZM がイムノモデュレーターとして TNF- $\alpha$  の産生を顕著に抑制することが明らかとなった。抗菌剤投与によって重症合併症である HUS の発生を押さえる可能性を更に検討する必要がある。AZM が、CAM に比べて強い抑制作用を示した理由は、AZM のリソソームへの分布特性<sup>5)</sup>と関係するかもしれない。

VT がカスパーゼ-3 活性を上昇させることが明らかになった。従って、VT の場合にも、カスパーゼ-3 経路を介してアポトーシスが誘導されと考えられる。本実験系は、VT に関連したカスパーゼ-3/アポトーシス経路を調べる *in vitro* 実験系のモデルとして有用である。なお、THP-1 細胞を用いたカスパーゼ-3 活性への FOM の抑制効果は顕著ではなかった。さらに AZM や CAM の効果について検討を加える必要がある。

### 文 献

- 1) Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, D.C., Arbus, G.S. and Lior, H.: The association between idiopathic hemolytic syndrome and infection by verocytotoxin producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **151**: 775-782, 1985.
- 2) Karpman, D., Hakansson, A., Perez, M., Isaksson, C., Carlemalm, E., Caprioli, A., Svanborg, C.: Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. *Infect. Immun.*, **66**: 636-644, 1998.
- 3) Harel, Y., Silva, M., Giroir, B., Weinberg, A., Cleary, T.B. and Beutler, B.: A reporter transgene indicates renal - specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin. Possible involvement of TNF in hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Invest.* **92**: 2110-2116, 1993.
- 4) Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X.: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89** (2): 175-184, 1997.
- 5) McDonald, P.J. and Pruul, H.: Phagocyte uptake and transport of azithromycin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **10**: 828-833, 1991.

(平成11年11月11日受付)