

## Azithromycin によるペロ毒素刺激 TNF- $\alpha$ 産生誘導の抑制

新潟大学医学部 4 年

古俣 大・真島 卓弥・持田 崇・島田健太郎

指導：細菌学教室

小塩 精一・小原 竜軌・張 慧敏・山本 達男

Inhibition by Azithromycin of Verotoxin-Stimulated TNF- $\alpha$  Induction

Dai KOMATA, Takuya MAJIMA,  
Takashi MOCHIDA and Kentaro SHIMADA

*School of Medicine, Niigata University*  
*Supervisor: Seiichi KOJIO, Tatsuki OHARA,*  
*Hui-Min ZHANG and Prof. Tatsuo YAMAMOTO*  
*Department of Bacteriology*

Verotoxin (VT) plays a role in outcome of HUS followed by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. VT induces inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , e.g. from human monocytes, which then induce a VT receptor, Gb3. In this study, we demonstrated that azithromycin can inhibit TNF- $\alpha$  induction from human monocytes stimulated by VT2, a more potent toxin than VT1.

---

Key words: verotoxin, monocyte, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), azithromycin

ペロ毒素, 単球, 腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ), アジスロマイシン

### はじめに

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) は, 下痢, 腹痛, 血便等の腹部症状 (出

血性大腸炎, hemorrhagic colitis, HC) の他に, 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) 等の重篤な合併症を惹起する. 本感染症の主要な病原因子はペロ毒

---

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1番町757番地  
新潟大学医学部細菌学教室

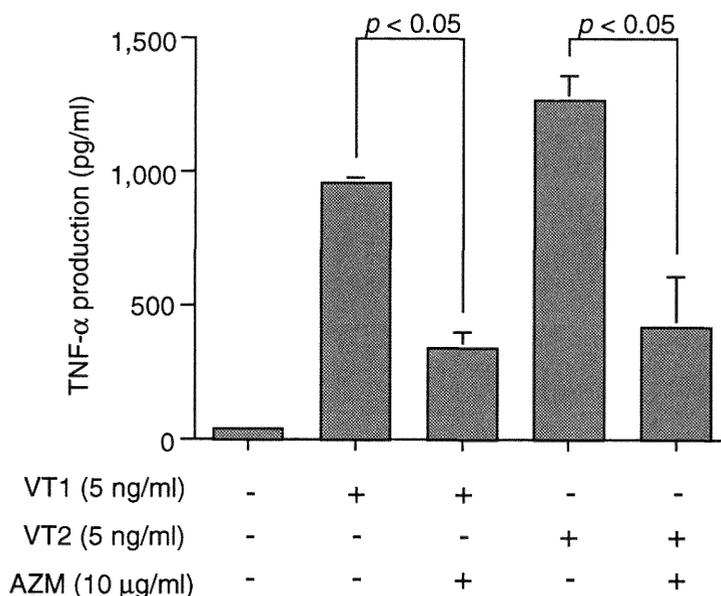


図1 AZMによるTNF- $\alpha$ の産生抑制  
ヒト単球にVT単独あるいはVTとAZMの両者を同時に16時間作用させた後、培養上清中のTNF- $\alpha$ を測定した。

素 (verotoxin, VT) である<sup>1)</sup>。VTには、VT1とVT2の2つの主要なサブタイプが知られており、両者のアミノ酸配列の相同性は約55%である。ともに受容体である標的細胞表面の糖脂質 globotriaosyl ceramide (Gb3) を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、ゴルジ体を経由して小胞体及び核にまで到達することが知られている。この後、VTは28SリボソームRNAに作用して標的細胞のタンパク質合成を阻害する<sup>1)</sup>。

腸管内で産生されたVTは、腸管上皮細胞を障害して出血性大腸炎を惹起し、血中に入り腎臓に到達、腎血管内皮細胞や尿管細胞等を障害してHUSを引き起こすと考えられている。さらに、VTは単球 (monocyte) にも作用して腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等の炎症性サイトカインの産生を誘導する<sup>2)</sup>。HUSを併発した患者では、血中及び尿中の炎症性サイトカインレベルがHCのみを発症した患者よりも有意に高いことから、HUSの発症に炎症性サイトカインの過剰な発現が深く関与していることが示唆されている<sup>3)</sup>。本研究では、15員環マクロライド系抗菌剤 azithromycin (AZM) が、このようなVT1とVT2によるTNF- $\alpha$ 産生誘導を顕著に抑制することを見

だした。

## 材料と方法

健康人由来の単球は、Sakiri, R.らの方法に従って調整した<sup>2)</sup>。Ficoll-Paque遠心分離法で分離した末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) をプラスチック製ディッシュに播き、単球をディッシュに接着させて分離した。分離した単球は、10%非働化ウシ胎児血清を加えたRPMI-1640 (GIBCO BRL, Grand Islands, NY, USA) に浮遊させ、細胞数を $1 \times 10^5$  cells/mlに調整した。図1に示したように、VT1あるいはVT2 (デンカ生研, 5 ng/ml) さらにAZM (ファイザー製薬, 10 μg/ml) を培地に添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で16時間培養した。培養終了後、遠心して上清を分離し、市販のサイトカイン測定ELISAキット (genzyme TECHNE, Minneapolis, MN, USA) を用いて、TNF- $\alpha$ を定量した。

## 結果

単球をVT1 (5 ng/ml) あるいはVT2 (5 ng/ml) で刺激すると、TNF- $\alpha$ 産生が顕著に促進された

(図 1). これらの TNF- $\alpha$  産生誘導は, AZM (10 $\mu$ g/ml) を VT と同時に添加することによって有意に抑制された (図 1). AZM の抑制作用は, VT1 で刺激した場合に 64.5%, VT2 で刺激した場合に 66.6% であり, ほぼ同程度の効果であった (図 1).

### 考 察

TNF- $\alpha$  は標的細胞の Gb3 (VT レセプター) の発現を亢進させることが知られており, HUS の発症に関わる内因性の増悪化因子の 1 つである<sup>4)</sup>. 本研究では, VT による TNF- $\alpha$  産生誘導が AZM で抑制されることを明らかにした. AZM を投与することで HUS を改善できることが期待される. また AZM は, 広範囲な細菌に対して抗菌スペクトルを持つ. 特に腸管出血性大腸菌を含むグラム陰性桿菌に対しては, 既存のマクロライド系抗菌剤以上の抗菌力を示す<sup>5)</sup>. したがって, 強い抗菌活性と免疫調節活性を併せ持つ AZM は, 腸管出血性大腸菌感染症を効果的に治療しうる抗菌剤の 1 つとして期待される.

VT2 を産生する腸管出血性大腸菌は, VT1 を産生する腸管出血性大腸菌よりも HUS を発症する頻度が高いと言われている. 原因としては, VT2 は VT1 よりも腸管からのトランスロケーションの効率がよいためであると考えられている<sup>1)</sup>. 昨年, 我々は VT1 による TNF- $\alpha$  産生誘導が AZM によって抑制されることを示した<sup>6)</sup>. 本研究では, トランスロケーションの効率が良く, より強毒性であると考えられている VT2 に対しても AZM が顕著な TNF- $\alpha$  産生抑制活性を有することを明らかにした. 今後, 動物感染モデル実験を含む更なる検討が必要である.

### 文 献

1) Melton-Celsa, A.R. and O'Brien, A.D.: Struc-

ture, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: James B. Kaper and Alison D. O'Brien (eds.) *Escherichia coli* O157: H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. ASM press: Washington D.C., pp. 121~128, 1998.

2) Sakiri, R., Ramegowda, B. and Tesh, V.L.: Shiga toxin type 1 activates tumor necrosis factor- $\alpha$  gene transcription and nuclear translocation of the transcriptional activators nuclear factor- $\kappa$ B and activator protein-1. *Blood*, **92**: 558~566, 1998.

3) Inward, C.D., Varaganam, M., Adu, D., Milford, D.V. and Taylor C.M.: Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Arch. Dis. Child.*, **77**: 145~147, 1997.

4) van der Kar, N.C.A.J., Monnens, L.A.H., Karmali, M.A. and van Hinsbergh, V.W.M.: Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: Implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood*, **80**: 2755~2764, 1992.

5) 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. *日本臨牀*, **56**: 2718~2729, 1998.

6) 吉澤麻由子, 百瀬能成, 普久原朝海, 林 正周, 堀 泰彦, 森嶋 計, 張 慧敏, 小原竜軌, 小塩精一, 山本達男: ペロ毒素による 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. *新潟医学会雑誌*, **114**: 60~62, 1999.