

# 大腸菌 O 157 産生ベロトキシン-1 による 低ずり応力下惹起血小板凝集亢進作用に関する研究

奈良県立医科大学第2内科学教室

八木 秀 男

## STUDIES ON THE MECHANISM OF THE ENHANCED LOW SHEAR STRESS-INDUCED PLATELET AGGREGATION BY VEROTOXIN-1 OF *ESCHERICHIA COLI* O157

HIDEO YAGI

*Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received February 17, 1999

*Abstract*: The effect of verotoxin (VT)-1 produced by *Escherichia coli* O 157 on platelets was studied with a laser light-assisted shear-induced platelet aggregometer and with binding assays. VT-1 remarkably enhanced the platelet aggregation under low shear stress, but did not affect it under high shear stress. The minimal concentration of VT-1 required for the enhancement was 0.25 ng/ml, and almost maximal enhancement was achieved at a final concentration of 4 ng/ml. This enhanced platelet aggregation disappeared after leukocyte depletion from normal platelet-rich plasma with a specific filter. In contrast, with a standard platelet aggregometer such enhanced platelet aggregation was not detected either in the presence or absence of ADP. <sup>125</sup>I-Labeled VT-1 did not specifically bind to normal washed platelets depleted of leukocytes, and thin layer chromatographic analysis of neutral glycolipids extracted from normal platelet lysates also demonstrated that leukocyte-depleted platelets lacked VT-1-specific receptor globotriaosylceramide (Gb 3), but pre-filtered ones retained Gb 3. Supernatant from mononuclear cell suspension stimulated with VT-1 enhanced platelet aggregation, but that from polymorphonuclear cell suspension did not. Several cytokines released from monocytes reproduced this enhancement *in vitro*. Further, plasmas from six out of seven patients with hemolytic uremic syndrome (HUS) exhibited the same effect as did the purified VT-1. This effect was almost impaired after treatment of HUS plasmas with Gb 3 in accord with decreased levels of plasma VT-1. Taken together, these results indicate that platelet lacks Gb 3, and VT-1 appears to modulate platelet aggregation in an indirect fashion, presumably by releasing cytokines or proteins from target tissues.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 112~126, 1999)

---

**Key words**: *Escherichia coli* O 157, verotoxin (VT)-1, hemolytic uremic syndrome (HUS), low shear stress-induced platelet aggregation (Low-SIPA), globotriaosylceramide (Gb 3)

## 緒 言

溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome ; HUS) は溶血性貧血, 血小板減少, 腎不全を三主徴とする重篤な疾患である<sup>1)</sup>。成人にみられる血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura ; TTP) は HUS に神経症状を加えたものであり, 両疾患の病状は似ているため今日 HUS/TTP 症候群として取り扱われている。とりわけ HUS は, 幼児と小児においてしばしば先行する出血性腸炎のあと発症するが, これには verotoxin (VT) 産生性大腸菌 O 157 感染の強く関与する事が明らかになっている<sup>2)</sup>。最近では 1997 年に大阪府堺市で集団発生し, 12,680 名の O 157 感染者から 121 名の HUS が発症 (重症 42 名, 軽症から中等症 79 名) したと報告されている<sup>3)</sup>。HUS の原因である VT は外毒素として AB 5 に分類され, VT-1 と VT-2 とがある。VT-1 は志賀赤痢菌 (*Shigelladysenteriae* type 1) の産生する志賀毒素 (Shiga toxin ; ST) と同様哺乳動物の蛋白合成を阻害すること, また ST と同じ抗原性を持つことから志賀毒素様毒素 (Shiga-like toxin ; SLT) とも呼ばれており, 今日では両毒素を統一して志賀毒素ファミリー (Stx) と呼ばれる。構造的にも VT-1 と SLT-1 とは全く同一か, せいぜい 1 つのアミノ酸が異なるのみである。一方, VT-1 と VT-2 とでは遺伝子レベルで 58 %, アミノ酸配列でも 56 % の相同性を有しているのみで共通抗原性はほとんどみられない。VT-1 と VT-2 の構造は毒素活性を有する A サブユニットと標的細胞膜上に存在する細胞表面レセプターである糖脂質グロボトリン Gb3 セラミド (Gb3 : GbOse 3 cer) に特異的に結合する B サブユニットの 5 量体から構成されている<sup>4)</sup>。Gb3 はヒトの腎血管内皮細胞, 臍帯内皮細胞および単球に存在が報告されている<sup>5,6)</sup>。急性期の HUS 患者の病理像は, 腎で血管内皮が腫大し, 基底膜から内皮細胞が剥離して血管内に突出し, さらに血小板血栓とフィブリンの沈着とが糸球体に認められる。これは VT が特異的に腎血管内皮細胞を障害したため腎障害が起こると推察されている<sup>7)</sup>。しかし, 血小板減少の成因は未だ不明な点が多い。VT の血小板に対する作用の報告は極めて少なく, 1980 年半ばに VT 産生性細菌の培養上清と正常血漿との付置後に血小板凝集活性が認められたとの報告<sup>8)</sup>があるが, この反応系では精製 VT を用いていないため, VT 以外に内毒素や血漿成分の関与も否定できない。実際に TTP の血漿には血小板凝集活性があることが報告されており<sup>9)</sup>, HUS でも 11 例中 6 例の血漿に血小板凝集活性がみられ, 成人の血清 IgG でこの活性が抑制されると

報告されている<sup>10)</sup>。著者は血小板凝集に及ぼす VT の影響を詳細に検討するためにまず VT-1 を精製し, この精製 VT-1 を用いて血小板凝集に及ぼす影響と HUS における血小板減少の機序とについての検討を行ったので報告する。

## 試 剤 と 方 法

### 試 剤

DEAE-Sephacel ゲル, Mono-P クロマトフォーカシングカラム, Percoll は Pharmacia-LKB (Uppsala, Sweden) から, 逆相 Synchropak RP-8 カラムは Syntek (Lafayette, IN) から購入した。ADP, ウシ血清アルブミン (BSA) と Orcinol spray とは Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), Iodo-Gen は Pierce (Rochford, IL), Na<sup>125</sup>I は Amersham Corp (Arlington Heights, UK), neutral glycolipid standard mixture は Acurate Chemical and Scientific (Westbury, NY), Gb3 は Biocarb Chemical (Lund, Sweden), Aluminium coated シリカゲル F 1500 TLC は Merck (Darmstadt, Germany), tryptic soy broth は Difco Laboratories (Detroit, MI), biotin 標識抗マウス IgG 検出用キット (Vectastain ABC キット) は Vectot Lab (Burlingame, CA), 白血球除去フィルター (Purecell PL 1 J) は Pall Biochemical Products Co (Glen Cove, NY) から購入した。ヒトフィブリノゲンと von Willebrand 因子 (vWF) はそれぞれ既報の方法で純化した<sup>11,12)</sup>。蛋白質の濃度は BSA を基準とした BioRad 蛋白測定キット (Richmond, CA) にて測定した。

### VT-1 の精製

Noda らの方法<sup>13)</sup>の一部を改変した。すなわち VT-1 は SLT-1 と全く同一の構造を持つことから *E. coli* C 600 を SLT-I-converting phage で溶原化した SLT-I hyperproducing *E. coli* C 600 (86-02) 株を tryptic soy broth 10 l 中で 37°C 16 時間培養し, 遠心集菌法で菌体約 120 g を得た。この菌体を 500 ml の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6) に懸濁し, 超音波 (トミー精工社, 東京) で菌体破碎を氷冷下, 安全キャビネット内で実施した。超音波処理条件は, 出力 180 W で 2 分間の処理を 5 回繰り返した。菌体破碎液から, 高速冷却遠心機 (トミー精工社, CX-210) で 30,000 g × 30 分の遠心により SLT-I 毒素を含む上清画分を得た。この上清画分をミリポア膜 (0.45 μm) で除菌濾過後, 濾過液に結晶硫酸を 45 % 飽和になる様に添加した。硫酸沈殿法で得た沈殿物を, 4 °C 30,000 g × 30 分の遠心で回収し, 200 ml の 50 mM

Tris-HCl buffer(pH 8.6)に溶解後、4 °C 同 buffer 5 l で十分に透析を繰り返した。透析後に生じた不溶物を 13,000 g×20 分の遠心で除去して得た上清を粗毒素画分として使用した。得られた粗毒素標品を、DEAE-Sepacel カラム(K 2 x 20 cm)、さらに Mono-P chromatofocusing カラム(K 1 x 40 cm)で分離溶出し、最後に pH を希釈蟻酸で弱酸性とし、HPLC-C 8 逆相カラム(Synchropak RP-8, K 0.46 x 25 cm)にかけ、0~70 %のアセトニトリルによる勾配溶出を行った。以上の精製で 0.109~0.188 mg の精製 VT-1 が回収された。精製された VT-1 の SDS-20 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析像を示した(Fig. 1)。

#### 血小板凝集能測定

1/10 容のクエン酸 Na 加正常ヒト全血から多血小板血漿(platelet-rich plasma : PRP)を得、血小板数を  $300 \times 10^3/\mu\text{l}$  に調整し、アゴニスト惹起血小板凝集を NKK Hematracer-1(SSR Engineering, Tokyo)で測定した。この測定系で使用したアゴニストの終濃度は ADP 0.2-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。ずり応力惹起血小板凝集(SIPA)は東レ社製のコーンプレート型の機器で、PRP の血小板数を  $300 \times 10^3/\mu\text{l}$  に調整し、6-108 dynes/cm<sup>2</sup> のずり応力勾配、および一定ずり応力下に測定した<sup>12,14</sup>。さらに 1.8 mM の CaCl<sub>2</sub> を含んだ Tyrode 緩衝液(pH 7.3)で正常ヒト洗浄血小板(WP)を PRP より作成し、vWF(終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、フィブリノゲン(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を使用して SIPA を測定した。HUS 血漿の SIPA におよぼす影響は、37°C で解凍後の HUS-PPP を N-PRP に 1 : 3 の割合で混合して血小板数は  $300 \times 10^3/\mu\text{l}$  に調整し、5 分間静置した後に SIPA を測定した。

#### モノクローナル抗体

vWF の血小板膜糖蛋白 Ib(GPIb)への結合を阻害する抗 GPIb マウスモノクローナル抗体(mAb)(AP-1, IgG)、フィブリノゲンの GPIIb/IIIa への結合を阻害する抗 GPIIb/IIIa mAb(LJ-CP 8, IgG)および活性化 GPIIb/IIIa を認識する mAb(PAC-1, IgM)は Scripps 研究所の Drs. Zaverio M. Ruggeri, Thomas J. Kunichi そして Sanford J. Shattil から恵与された。VT-1 の特異的受容体 Gb 3 を認識するマウス抗 Gb 3 mAb は Accurate Chemical and Scientific(Westbury, NY)から購入した。

#### Binding assay

VT-1 は Na<sup>125</sup>I を用いて、Iodo-Gen 法で標識し

た<sup>15</sup>。<sup>125</sup>I-VT-1 は 1.0~1.5 mCi/mg であった。次に 1.8 mM の CaCl<sub>2</sub> を含んだ Tyrode 緩衝液(pH 7.3)で WP を PRP から作製した。VT-1 の血小板への結合は、種々の濃度の <sup>125</sup>I-VT-1 を WP と混合し、総量 125  $\mu\text{l}$  として室温で 30 分間静置した。各々 50  $\mu\text{l}$  ずつ 20 %蔗糖液に重層し、遠心して血小板への <sup>125</sup>I-VT-1 結合量を

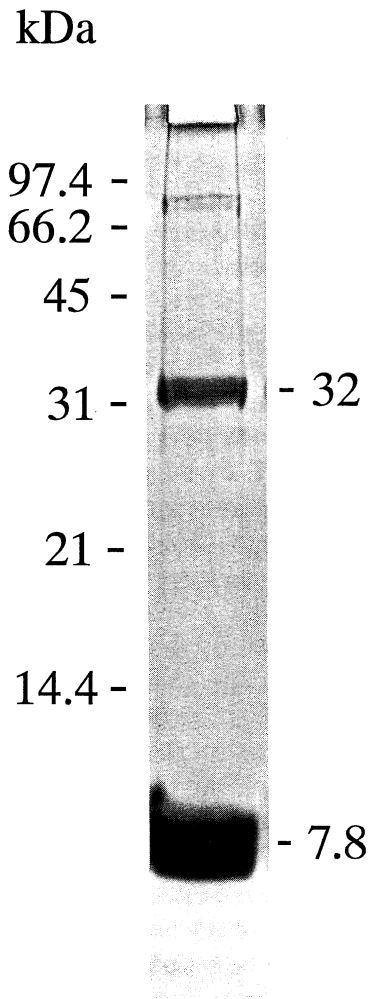


Fig. 1. SDS-20% PAGE analysis. Purified VT-1 showed two different subunits (A and B) of 32 and 7.8 kDa under non-reducing (this figure) and reducing (not shown) conditions.

ガンマカウンターで測定した。また非特異的結合量はラベルしていない 50 倍量の VT-1 存在下での血小板への結合量とし、全結合量から非特異的結合量を差し引いた量を特異的結合量とし、100%で表示した。

#### 血小板糖脂質の抽出

血小板からの糖脂質の溶出は Lingwood ら<sup>17)</sup>の方法を用いた。まず PRP とその PRP から白血球除去フィルターを使用して白血球除去 PRP とを作成した。それぞれ 4℃, 800 g×10 分間で遠心後、ペレットを phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) に浮遊し、20 容量のクロロフォルム/メタノール(2:1, vol/vol)を加えた。十分に可溶化し、沈殿物をガラスワールで除去後に等容量の水を加え、静置した。上下 2 層に分離後下層を回収し、N<sub>2</sub> ガスで風乾し、0.4 mol/L KOH エタノール 1 ml を加え、37℃で 2 時間反応させた。そこに 2 容量のクロロフォルムを加え、混和した後に 2 容の水を加え、静置した。上下 2 層に分離後、下層を回収し、薄層クロマトグラフィー(TLC)を行うまで -20℃で保存した。

#### TLC

抽出物を乾燥し、クロロフォルム/メタノール(2:1, vol/vol)に溶解した。溶解後のサンプルを silica gel TLC plate 上に添加し、クロロフォルム/メタノール/水(65/25/4)で展開した。指標として neutral glycolipid standard mixture を同時に展開し、orcinol spray で染色した。さらに Gb 3 の存在は TLC で展開後のサンプルをニトロセルロース膜に転写後にマウス抗 Gb 3 mAb を用いた TLC blot 法<sup>18)</sup>で検討した。発色は Vectastain ABC kit を用いてアビジン-ビオチン反応で行った。

#### 固層化 Gb 3 での VT-1 の吸着

メタノール可溶の Gb 3(1 mg/ml)200 μl をエッペンドルフチューブ内で N<sub>2</sub> ガスで風乾し、内壁に吸着させた。-80℃で保存した HUS-PPP を解凍後、200 μl をエッペンドルフチューブに加え、吸着のために室温で 30 分間反応させた。そのまま 4℃, 15,000 g×5 分間で遠心後に上清を回収した。HUS-PPP の VT-1 濃度は Premier EHEC(Meridian Diagnostics, Inc., Cincinnati, OH)を用いて測定し、標準品は我々が精製した VT-1 を用いて濃度を求めた。

#### PRP からの白血球除去

常法に従って作成した PRP から、白血球除去フィルター(Purecell PL 1 J)を用いて白血球を除去した。白血

球除去後に血小板数を  $300 \times 10^3/\mu\text{l}$  に調整した。

#### ヒト単核球と好中球の分離と刺激

クエン酸 Na 加正常ヒト全血に 1/5 量の 6% hydroxyethyl starch(HES)を加え、赤血球を沈澱させ、赤血球を除去した。白血球を含む上層を回収し、比重 1.082 と 1.075 g/dl の Percoll によって形成した不連続勾配の上に重層後、4℃, 800 g×20 分で遠心し、白血球を単核球と好中球とに分離した。それぞれの細胞層を回収し、洗浄後に PBS に浮遊し、細胞数を  $3 \times 10^5/\mu\text{l}$  に調整した。単核球浮遊液および好中球浮遊液に VT-1(終濃度 10 ng/ml), granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF; 100 ng/ml), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF; 100 ng/ml), macrophage colony-stimulating factor(M-CSF; 100 ng/ml), interleukin 6(IL-6; 100 U/ml)および tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ; 100 ng/ml)を添加し、それぞれ 37℃で 1 時間反応後に 800 g×20 分間遠心し、上清を回収した。これらのサイトカインは全てリコンビナント型の標品を Genzyme 社(MA)から購入した。

#### HUS 患者血漿

1996 年~1997 年に堺市で腸管出血性大腸菌 O 157 に感染し、溶血性貧血、腎不全および血小板減少を来し、糞便中に VT 産生性大腸菌または VT の存在が証明され、HUS と診断された 7 例(男性 4 例、女性 3 例、年齢 4 歳~60 歳)から得られた急性期の血漿である。

## 結 果

#### 精製 VT-1 の正常ヒト血小板凝集能に及ぼす影響

通常の血小板凝集計を用いた検討では VT-1 を終濃度 1~100 ng/ml で正常 PRP(N-PRP)に直接添加しても凝集は認められず、さらに正常血漿(N-PPP)に VT-1 を終濃度 100 ng/ml で添加し、37℃で 24 時間付置し、その後に PRP に添加しても凝集は認められなかった。ADP 惹起血小板凝集(終濃度 0.2~2 μg/ml)で VT-1 を N-PRP に終濃度 100 ng/ml で予め添加する群と対照群とで比較したが、凝集に変化は認められず、VT-1 はアゴニスト惹起血小板凝集には影響しなかった(Fig. 2)。次にずり応力惹起血小板凝集(SIPA)に対する影響を検討した。N-PRP に VT-1 を終濃度 0.025~2.5 ng/ml で添加し、5 分間静置後に、ずり応力惹起血小板凝集を観察した。6~108 dynes/cm<sup>2</sup> のずり応力勾配下では濃度依存性に低ずり応力下での血小板凝集(Low-SIPA)の亢進が観察され(Fig. 3 A)、さらに 12 dynes/cm<sup>2</sup> の一定した

低ずり応力下では明らかに VT-1 による濃度依存性の血小板凝集の亢進が観察され、終濃度 4 ng/ml でこの亢進作用は最大となった。さらに抗 GPIIb/IIIa mAb (LJCP-8) で、この亢進作用は完全に抑制された (Fig. 3 B)。一方、108 dynes/cm<sup>2</sup> の一定した高ずり応力下では終濃度 10 ng/ml でも VT-1 による高ずり応力下血小板凝集 (High-SIPA) の亢進は認められなかった (Fig. 3 C)。WP に対して VT-1 はヒトフィブリノゲン存在下でのみ PRP の場合と同様に Low-SIPA を濃度依存性に亢進したが、その亢進作用は PRP の場合と比較して減弱していた (Fig. 4 A-C)。さらに Bernald-Soulier 症候群 (Bernald-Soulier Syndrome : BSS), 血小板無力症 (Glanzmann thrombasthenia : GTA) および先天性無フィブリノゲン血症 (congenital afibrinogenemia : CAF) の PRP に対する、ずり応力下での VT-1 の影響を検討した。BSS の PRP でのみ VT-1 による Low-SIPA の亢進が認められた。GTA と CAF とでは亢進は認められなかったが、CAF-PRP にヒトフィブリノゲンを終濃

度 200  $\mu$ g/ml 添加すると Low-SIPA の亢進が観察された。

#### HUS 患者血漿の SIPA に及ぼす影響

腸管出血性大腸菌 O 157 感染後に HUS を発症した症例で急性期に -80°C で凍結保存した血漿で検討を行った。症例は 7 例で全例診断基準を満たし、血漿中の VT を Premier EHEC で測定しえた 5 例中 3 例は 0.5~1.2 ng/ml の VT を検出し、2 例は検出限界以下 (0.2 ng/ml) であった (Table 1)。この 7 例の HUS 血漿の SIPA に及ぼす影響を検討した結果、症例 2 を除く全例に、Low-SIPA 亢進を認め、High-SIPA には影響を与えなかった (Fig. 5 A)。この HUS 血漿から VT-1 を前記の方法で Gb 3 で吸着したところ、吸着後の HUS 血漿では Low-SIPA 亢進作用はほぼ完全に消失していた (Fig. 5 B)。

#### VT-1 の血小板及び白血球に及ぼす影響

白血球除去前に認められていた VT-1 による Low-

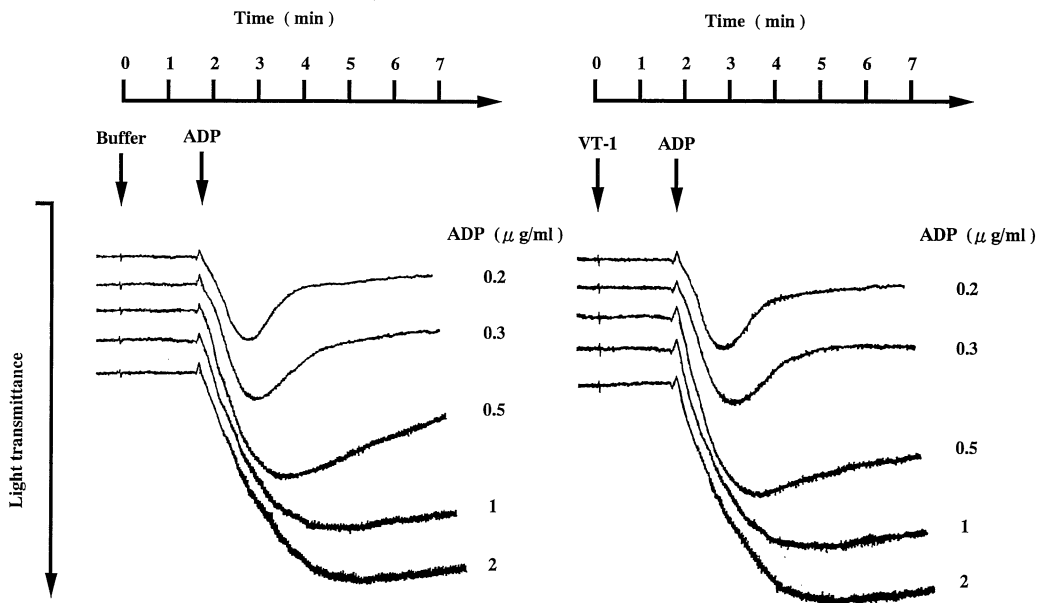


Fig. 2. Platelet aggregation studies. Purified VT-1 (100 ng/ml, final) or buffer (PBS) was added to normal PRP ( $300 \times 10^3/\mu$ l), and then ADP (0.2-2  $\mu$ g/ml)-induced platelet aggregation was measured.

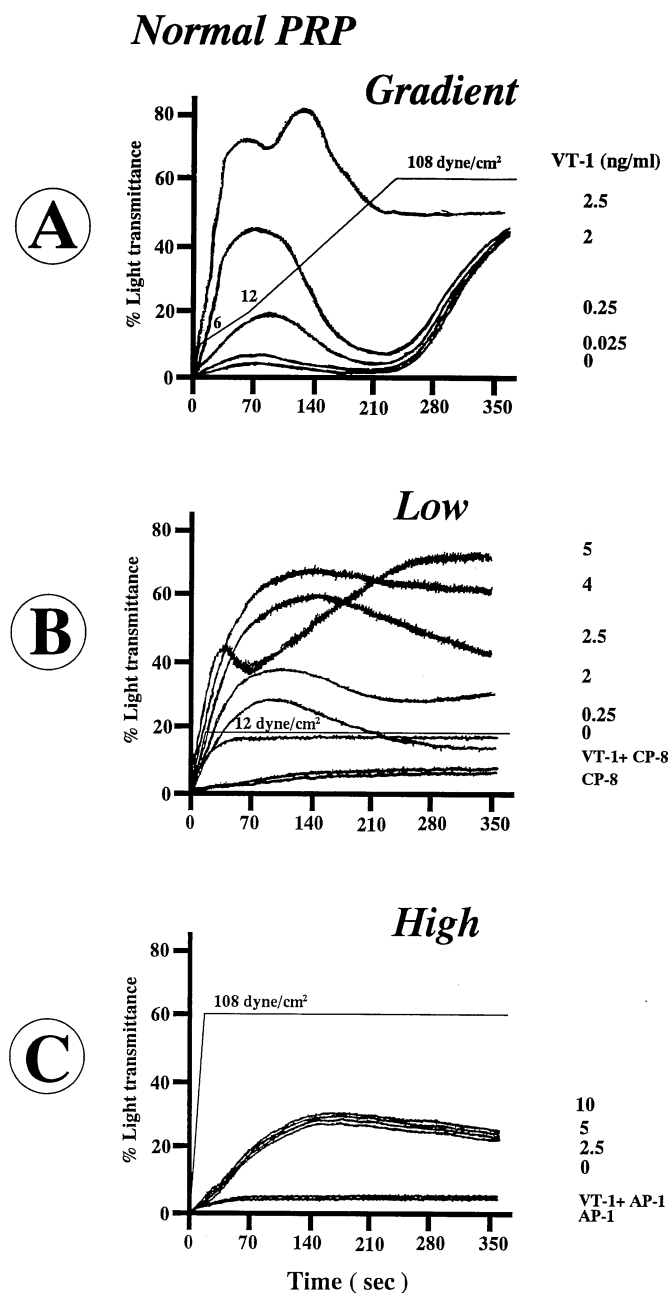


Fig. 3. Effects of purified VT-1 on SIPA in PRP system. Platelet aggregation was measured under a regular gradient shear stress (A). Low-SIPA (B) was measured at a constant shear stress of 12 dynes/cm<sup>2</sup>. High-SIPA (C) was measured at a constant shear stress of 108 dynes/cm<sup>2</sup>. Anti-GP Ib mAb AP-1 and anti-GPIIb/IIIa mAb LJ-CP8 at a final concentration of 10  $\mu$ g/ml, respectively, was used to determine the nonspecific platelet aggregation under these circumstances.

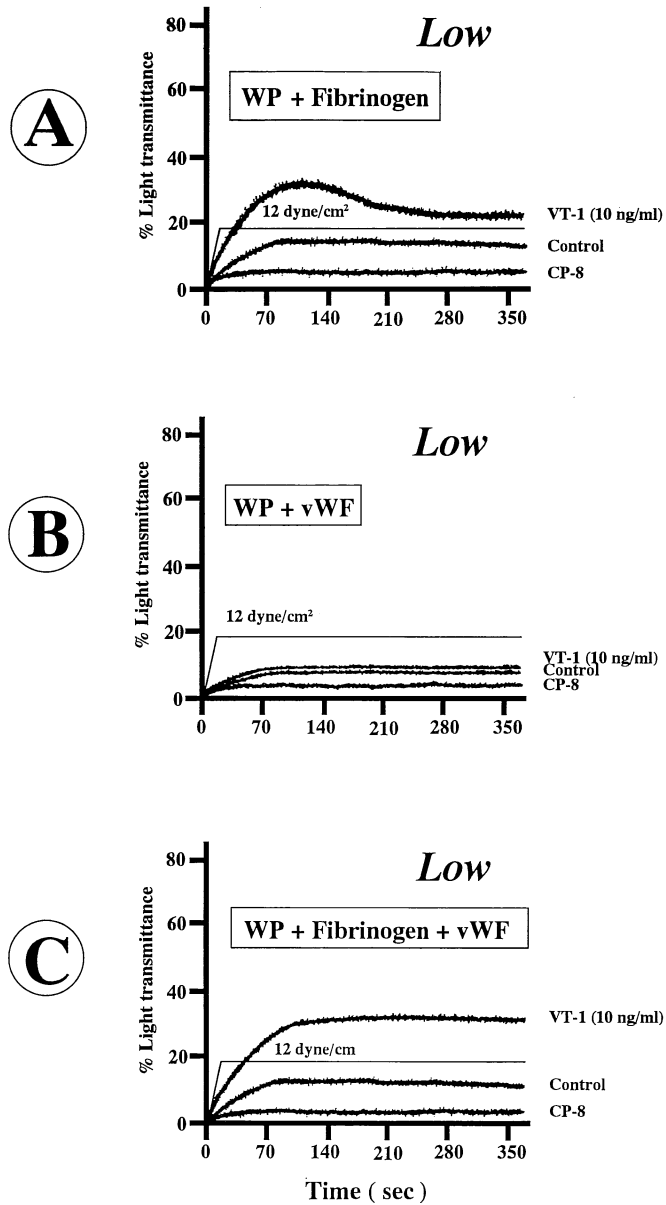
**Normal WP**

Fig. 4. Effects of purified VT-1 on SIPA in WP system. Low-SIPA was measured at a constant shear stress of 12 dynes/cm<sup>2</sup> in the presence of purified fibrinogen (100  $\mu$ g/ml, final) (A), in the presence of purified vWF (10  $\mu$ g/ml, final) (B) and in the presence of purified fibrinogen and vWF (C). Anti-GPIIb/IIIa mAb LJ-CP8 at a final concentration of 10  $\mu$ g/ml was used to determine nonspecific platelet aggregation under this circumstance.

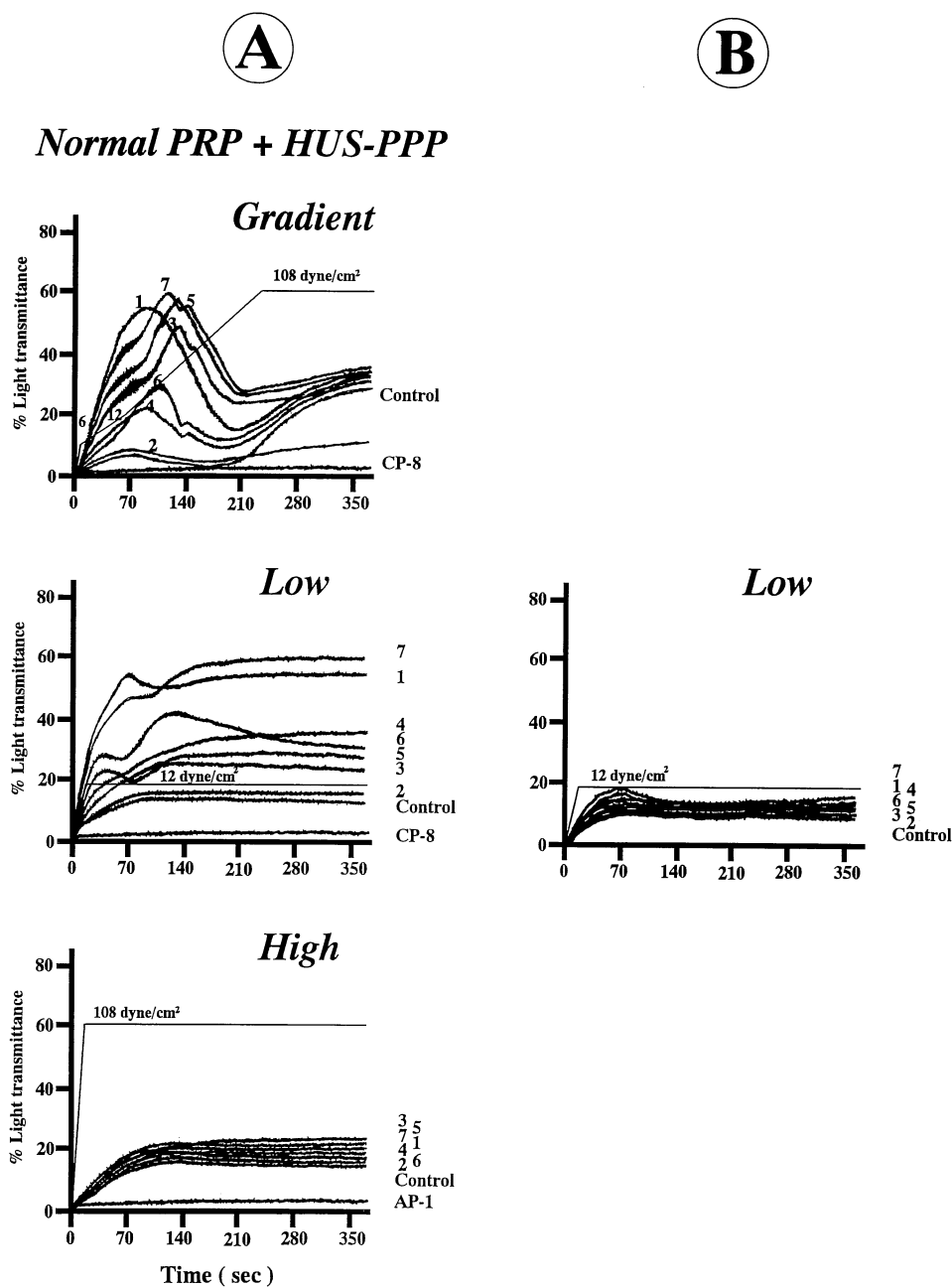


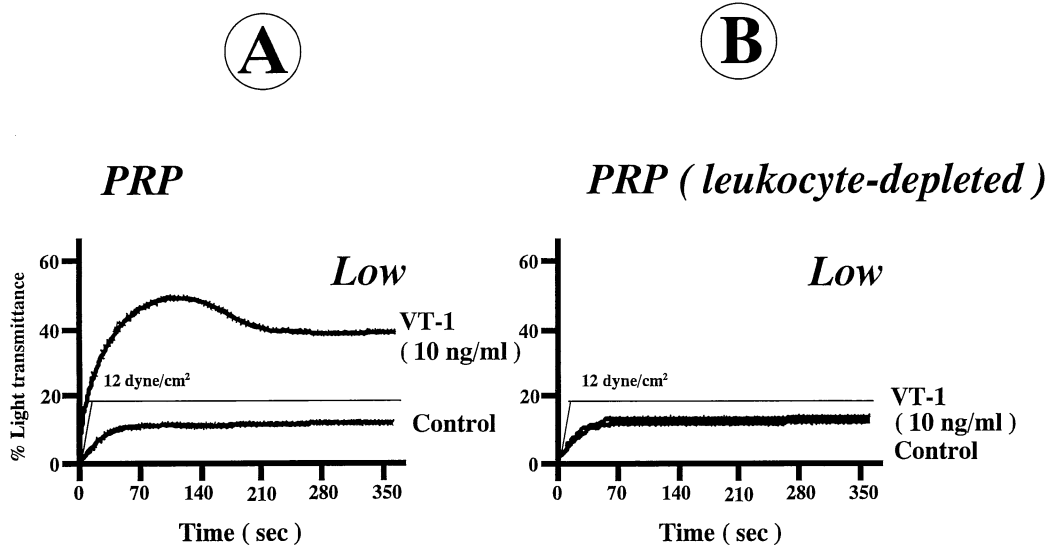
Fig. 5. Effect of HUS-PPP on SIPA in PRP system. Platelet aggregation was measured under a regular gradient shear stress (Top). Low-SIPA (Middle) was measured at a constant shear stress of 12 dynes/cm<sup>2</sup>. High-SIPA (Bottom) was measured at a constant shear stress of 108 dynes/cm<sup>2</sup>. (A). Low-SIPA was measured after treatment of HUS-plasmas with solid-phase Gb3 (B). Anti-GP Ib mAb AP-1 and anti-GPIIb/IIIa mAb LJ-CP8 at a final concentration of 10  $\mu$ g/ml, respectively, was used to determine nonspecific platelet aggregation under these circumstances.



Table 1. Laboratory findings and concentrations of VT-1 of seven patients with HUS

| Patient                           | 1     | 2     | 3     | 4      | 5     | 6     | 7      |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| Age                               | 8Y    | 10Y   | 4Y    | 10Y    | 12Y   | 60Y   | 5Y     |
| Sex                               | F     | M     | F     | M      | M     | F     | M      |
| RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ) | 2.80  | 2.77  | 3.08  | 2.10   | 3.24  | 3.24  | 2.87   |
| Hb (g/dl)                         | 8.5   | 7.5   | 8.8   | 7.4    | 8.8   | 9.3   | 7.8    |
| WBC ( $/\mu\text{l}$ )            | 6,800 | 6,500 | 8,000 | 10,000 | 7,300 | 7,400 | 15,200 |
| Plt ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) | 34    | 65    | 25    | 52     | 50    | 21    | 26     |
| LDH (IU/l)                        | 2,073 | 5,968 | 3,435 | 2,234  | 2,597 | 1,992 | 4,512  |
| BUN (mg/dl)                       | 12    | 77    | 48    | 20     | 80    | 65    | 34     |
| CRE (mg/dl)                       | 0.8   | 2.3   | 1.2   | 0.8    | 1.0   | 3.9   | 1.1    |
| Proteinuria                       | 2+    | 4+    | 4+    | 4+     | 3+    | 4+    | 4+     |
| Hematuria                         | +     | 4+    | 4+    | 3+     | 3+    | 4+    | 3+     |
| Fibrinogen (mg/dl)                | *     | 324   | 259   | *      | 231   | 414   | 263    |
| FDP ( $\mu\text{g/ml}$ )          | *     | 40    | 11.2  | *      | 37.5  | 36.3  | 60.3   |
| PT (sec)                          | *     | 10.5  | 10    | *      | 12.8  | 10.0  | 10.1   |
| APTT (sec)                        | *     | 46    | 30    | *      | 48.4  | 30.0  | 41.8   |
| D-dimer (ng/ml)                   | *     | *     | 519   | *      | *     | 3597  | 1221   |
| PIC ( $\mu\text{g/ml}$ )          | *     | *     | 2.1   | *      | *     | 3.2   | 2.9    |
| TAT (ng/ml)                       | *     | *     | 7.6   | *      | *     | 19.3  | 14.3   |
| VT-1 (ng/ml)                      | 1.2   | <0.2  | <0.2  | *      | *     | 0.8   | 0.5    |

\* : not determined

Fig. 6. A constant shear stress of 12 dynes/cm<sup>2</sup> was applied to normal (left) or leukocyte-depleted (right) PRP as described in Materials and Methods.

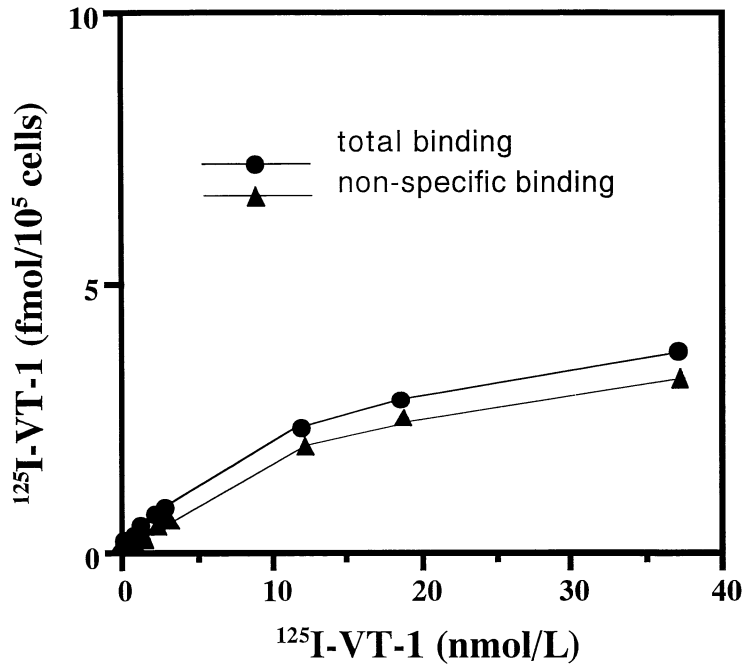


Fig. 7.  $^{125}\text{I-VT-1}$  binding to platelets. Leukocyte-depleted washed platelets were mixed with various concentrations of  $^{125}\text{I-VT-1}$  at room temperature as described in Materials and Methods. This panel indicates that VT-1 does not specifically bind to platelets, because the amount of  $^{125}\text{I-VT-1}$  bound in the presence (nonspecific binding; closed triangles) of 50 fold excess of unlabeled VT-1 was almost comparable to that in the absence (total binding; closed circles) of the unlabeled toxin.

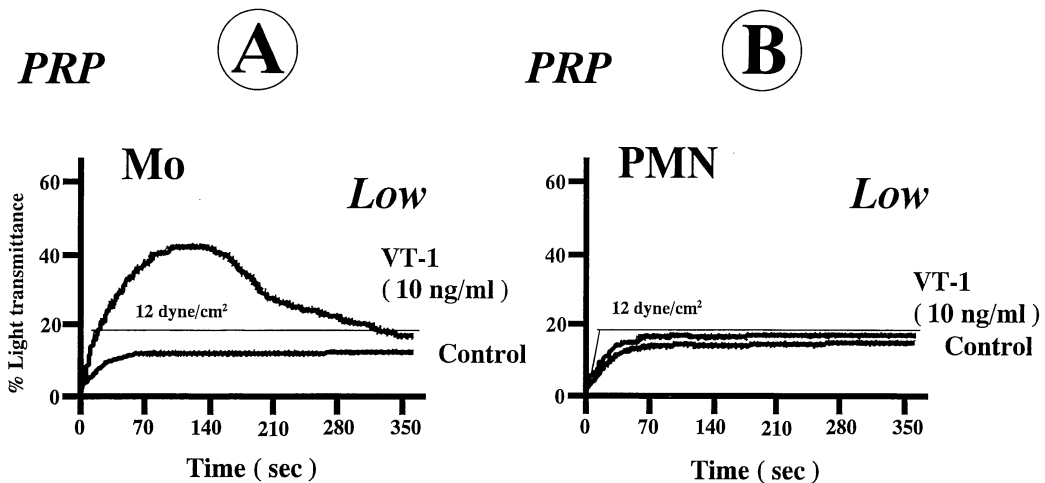
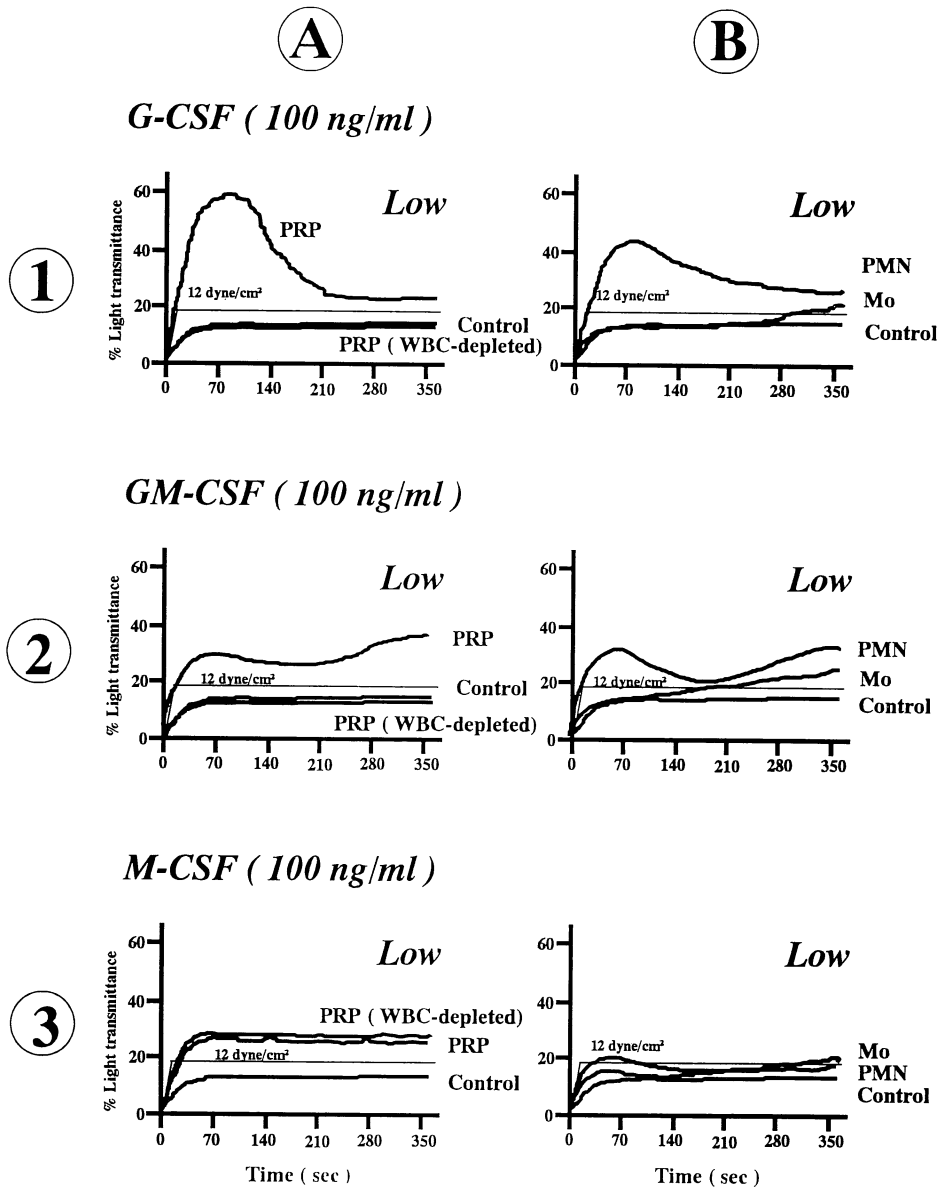


Fig. 8. A constant shear stress of 12 dynes/cm<sup>2</sup> was applied to leukocyte-depleted PRP. Supernatant of mononuclear cells (Mo, left) or polymorphonuclear cells (PMN, right) stimulated with purified VT-1 (10 ng/ml, final) was added to normal leukocyte-depleted PRP.



SIPA 亢進作用は白血球除去フィルターで白血球除去後の PRP では消失していた (Fig. 6 A-B)。この白血球除去 PRP から洗浄血小板を作製し、<sup>125</sup>I-VT-1 で binding assay を行ったところ、VT-1 の血小板に対する特異的な結合は認められなかった (Fig. 7)。更に白血球除去前後でそれぞれ PRP 中の Gb 3 の存在をマウス抗 Gb 3 mAb で検索すると白血球除去前には Gb 3 の存在を認

めたが、除去後は消失していた。次に単核球や好中球の浮遊液に VT-1 を終濃度 10 ng/ml で添加し、37°C 1 時間刺激培養後遠心により上清を回収し、これらの上清を N-PRP に添加することで Low-SIPA に及ぼす影響を検討した。VT-1 刺激で単核球浮遊液には Low-SIPA 亢進作用が認められたが、好中球浮遊液には認めなかった。(Fig. 8 A-B)。

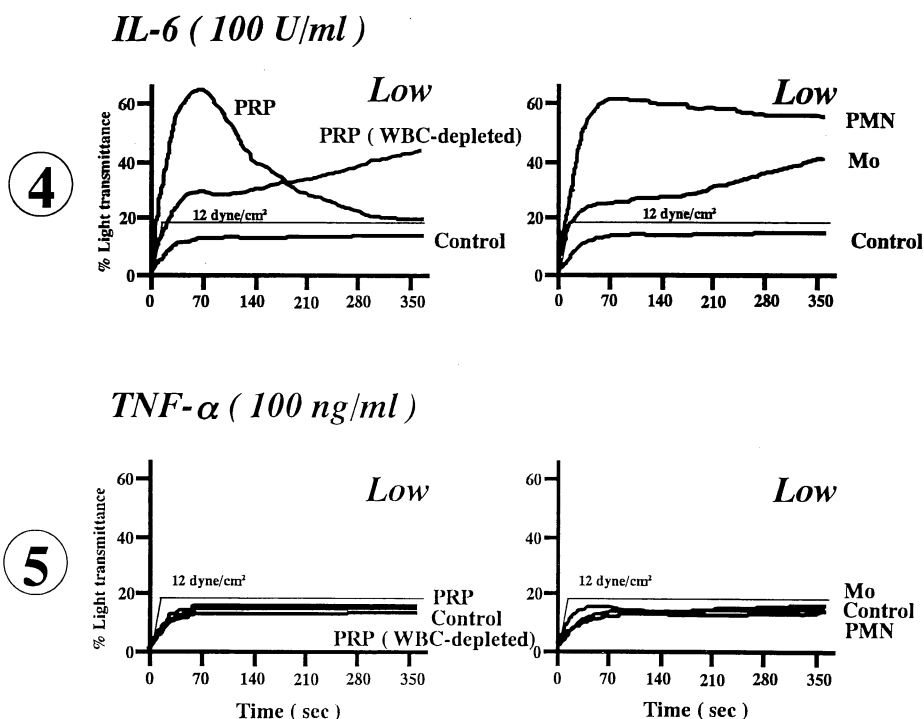


Fig. 9. Effects of several cytokines on SIPA. Platelets aggregation was measured under constant shear stress of 12 dynes/cm<sup>2</sup>. G-CSF (a final concentration ; 100 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml), M-CSF (100 ng/ml), IL-6 (100 U/ml) and TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) were added to normal PRP or normal leukocyte-depleted PRP (left). Supernatant of mononuclear cells (Mo) or polymorphonuclear cells (PMN) stimulated with these cytokines were added to normal leukocyte-depleted PRP (right).

単球由来のサイトカインによる Low-SIPA に及ぼす影響

単球から放出されるサイトカインのうち G-CSF, GM-CSF, IL-6, M-CSF, TNF- $\alpha$  の Low-SIPA に及ぼす影響を検討した。PRP に対して G-CSF, IL-6 は Low-SIPA の著明な亢進作用を有し, GM-CSF, M-CSF は軽度の亢進作用を有した。TNF- $\alpha$  には亢進作用はなかつ

た。白血球除去 PRP では M-CSF と IL-6 とに亢進作用が認められたが, IL-6 のみは PRP と比べて軽度減弱していた (Fig. 9 A ①~⑤)。次に単核球浮遊液と好中球浮遊液に単球由来のサイトカインを添加し, 単核球浮遊液には IL-6 刺激で, 好中球浮遊液には G-CSF, GM-CSF 及び IL-6 刺激で Low-SIPA 亢進作用を認め, TNF- $\alpha$  は両者に影響しなかった (Fig. 9 B ①~⑤)。

## 考 察

通常の血小板凝集計での検討では精製 VT-1 は正常 PRP に対して直接的凝集を示さず、ADP 凝集も亢進しなかった。また精製 VT-1 を正常 PPP と 37°C で 24 時間反応させ、正常 PRP に加えても凝集の亢進は認められなかった。この事は VT 産生性細菌の培養上清と正常血漿との付置後に血小板凝集活性を認めたとする Rose ら<sup>8)</sup> の報告とは異なる結果であった。そこで、コーンプレート型ずり応力惹起血小板凝集計を用いて、さらに詳細な検討を加えたところ、精製 VT-1 は終濃度 0.25 ng/ml で Low-SIPA 亢進作用を有し、4 ng/ml で最大となった。この作用は患者 PRP を用いた検討や、mAb を用いた阻害実験結果から完全にフィブリノゲンと GPIIb/IIIa (インテグリン表記  $\alpha$ IIB $\beta$ 3) に依存していることが判明した。興味あることに正常ヒト PRP から白血球除去フィルターで白血球除去すると、この PRP には VT-1 による Low-SIPA 亢進作用が消失していた。今回使用したフィルターは不織布が中性荷電であり、血小板の活性化が起こりにくく、実際にアゴニスト惹起血小板凝集に影響を与えないことから  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 の活性化はないものと考えられた。WP を用いた検討でも PRP と同様の結果で、Low-SIPA 亢進作用は PRP と比べて減弱していた。これは洗浄操作で混入している白血球が減少するためと推察された。VT-1 は細胞表面レセプターで糖脂質である Gb3 を介して作用発現する事から、血小板の Gb3 の存在を TLC blot 法で抗 Gb3 mAb を用いて検討したところ、従来の方法で作成した PRP には Gb3 を検出したが、白血球除去後の PRP では検出し得なかった。さらに白血球除去 PRP から作成した WP を用いて、<sup>125</sup>I-VT-1 の血小板への結合を測定したところ特異的な結合は認めなかった。以上の結果から血小板には Gb3 が存在せず、VT-1 は血小板に直接作用しないと考えられた。Gb3 は血液型抗原である Pk と同じ構造<sup>19)</sup> をしており、ヒトでは腎血管内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞および単球に存在する事が知られており、VT-1 により白血球、特に単球からサイトカインが放出され、血小板凝集に大きな役割を果たしていると考えられた。実際に VT-1 刺激で単核球浮遊液には Low-SIPA 亢進作用を認めたが、好中球浮遊液では認めなかった。この推論は単球が放出する各種サイトカインが血小板凝集を亢進する事実からも支持された。一方、7 例の HUS 患者は腸管出血性大腸菌 O157 感染者で、そのうち 6 例の HUS 患者血漿に正常 PRP に対する Low-SIPA 亢進作用を認めた。この作用は VT-1 によるものと同様で、固相化し

た Gb3 で HUS 患者血漿から VT-1 を吸着除去すると HUS 患者血漿中の Low-SIPA 亢進作用が消失した。実際、ELISA 法で吸着前の HUS 患者血漿中の VT を測定すると、2 例は検出限界の 0.2 ng/ml 以下、その他は 0.5 ~ 1.2 ng/ml であった。Gb3 で吸着後は全例で検出限界以下になった。今回、通常の血小板凝集計では検出されず、ずり応力血小板凝集計で初めて VT-1 の血小板凝集作用が判明したのは、ずり応力血小板凝集計は凝集にアゴニストを必要とせず、ずり応力負荷のもとでの血小板凝集を測定するため血小板凝集をより *in vivo* に近い状態で反映しているためと考えられ、この測定法の重要性が再認識された。またずり応力血小板凝集計はレーザーで凝集を測定している<sup>20)</sup> ため感度が鋭敏であることも重要と考えられた。Gb3 は種々の組織や臓器に局在し、VT-1 が Gb3 を介して標的細胞に結合して血管内での血栓形成や血小板減少を引き起こすと考えられた。VT-1 が単球に結合すると、活性化した単球から各種のサイトカインを放出し、その内の M-CSF と IL-6 とは直接的に血小板を活性化し、G-CSF、GM-CSF および IL-6 は好中球に作用して間接的に血小板を活性化して血小板凝集を亢進すると考えられた。その他にも VT-1 は血管内皮細胞に結合し、機能を傷害して高分子 vWF マルチマーを血漿に放出させ、高ずり応力下での血小板凝集、つまりは動脈血栓を引き起こすことも報告されている<sup>21)</sup>。今回の実験結果から VT-1 は血小板に間接的に作用し、血小板凝集に影響することが判明した。HUS での血小板減少は血小板機能に影響するサイトカインやその産物による二次的な凝集促進に起因することが示唆された。

## 結 語

VT 産生性大腸菌 O157 感染が HUS の発症に関与することや、HUS にみられる血小板減少に VT が関与することはよく知られているが、VT の血小板凝集に及ぼす影響、HUS の血小板減少の成因の詳細は未だ解明されていない。今回、VT の血小板凝集に及ぼす影響を検討するために、精製 VT-1 を用いて血小板凝集と、大腸菌 O157 感染 HUS 症例 7 症例の血漿を用いて HUS の血小板減少の成因とについて検討を行った。

1. 精製 VT-1 は終濃度 0.25 ng/ml で Low-SIPA 亢進作用を発現し、4 ng/ml で最大となった。この作用は BSS, GTA, CAF 患者 PRP および血小板膜特異的モノクローナル抗体による検討でフィブリノゲンと GPIIb/IIIa (インテグリン表記  $\alpha$ IIB $\beta$ 3) によることが判明した。
2. 抗 Gb3 mAb を用いた検討で VT-1 の細胞表面レセプター Gb3 は血小板表面には存在せず、正常ヒト白

血球除去 PRP から作製した洗浄血小板と  $^{125}\text{I}$ -VT-1 との特異的結合も認めなかった。従って VT-1 は血小板に直接作用しないことが判明した。

3. 正常ヒト PRP から白血球を除去すると VT-1 による Low-SIPA 亢進作用が消失すること、さらには単球由来サイトカインが Low-SIPA に影響を及ぼすことから VT-1 の結合によって単球から放出される M-CSF と IL-6 は直接的に血小板を活性化するが、G-CSF, GM-CSF および IL-6 は好中球に作用して間接的に血小板を活性化して血小板凝集を亢進すると考えられた。

4. HUS 患者血漿には VT-1 と同様の正常 PRP に対する Low-SIPA 亢進作用が認められ、HUS 患者血漿から固相化 Gb3 で VT-1 を吸着除去すると Low-SIPA 亢進作用が消失した。

以上のことから VT-1 が単球に結合し、単球由来のサイトカインが血小板を活性化して血小板凝集を亢進すると考えられた。また、HUS 患者血漿中に微量に存在する VT-1 で刺激された単球由来サイトカインや、その産生物によって生じる二次的な血小板凝集促進が HUS における血小板減少症の一因と考えられた。

この論文の要旨の一部は第 16 回 International Society on Thrombosis and Haemostasis(1997年6月：Florence)および第 60 回日本血液学会総会(1998年4月：京都)で発表した。

(謝辞：稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲をいただいた奈良県立医科大学第二内科学教室成田亘啓教授、輸血部藤村吉博教授に心から感謝致します。また御校閲をいただいた細菌学教室喜多英二教授、小児科学教室吉岡章教授に深謝致します。また、本研究を御援助くださいました諸兄姉に感謝の意を表します。)

## 文 献

- 1) Fong, J. S., De Chadarevian, J. P. and Kaplan, B. S. : Hemolytic uremic syndrome. Current concepts and management. *Pediatr. Clin. North. Am.* **29** : 835-856, 1982.
- 2) 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, 1982.
- 3) 堺市学童集団下痢症対策本部：第四部臨床医学・疫学調査研究の報告、堺市学童集団下痢症報告書(腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒の概要), 1997年.
- 4) Shimizu, H., Field, R. A., Homans, S. W. and Donohue-Rolf, A. : Solution structure of the complex between the B-subunit homopentamer of verotoxin VT-1 from *Escherichia coli* and the trisaccharide moiety of globotriaosylceramide. *Biochemistry* **37** : 11082-11087, 1998.
- 5) Obrig, T. G., Louise, C. B., Lingwood, C. A., Boyd, B., Barley-Maloney, L. and Daniel, T. O. : Endothelial heterogeneity in shiga toxin receptors and responses. *J. Biol. Chem.* **268** : 15484-15488, 1993.
- 6) van Setten, P. A., Monnens, L. A. H., Verstraten, R. G. G., van den Heuvel, L. P. W. J. and van Hinsbergh V. W. M. : Effects of verotoxin-1 on nonadherent human monocytes. : binding characteristics, protein synthesis and induction of cytokine release. *Blood* **88** : 174-183, 1996.
- 7) Kaplan, B. S., Cleary, T. G. and Obrig, T. G. : Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr. Nephrol.* **4** : 276-283, 1990.
- 8) Rose, R. E., Armour, J. A., Williams, C. E. and Hill F. G. H. : Verotoxin and neuraminidase induced platelet aggregating activity in plasma : their possible role in the pathogenesis of the haemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Pathol.* **38** : 438-441, 1985.
- 9) Lian, E. C. Y., Harkness, D. R., Byrness, J. J., Wallach, H. and Nunez, R. : Presence of platelet aggregating factor in the plasma of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and its inhibition by normal plasma. *Blood* **53** : 333-338, 1980.
- 10) Monnens, L., van de Meer, W., Langenhuisen, C., van Munster, P. and van Oostrom, C. : Platelet aggregating factor in the epidemic form of hemolytic-uremic syndrome in childhood. *Clin. Nephrol.* **24** : 135-137, 1985.
- 11) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. R., Roberts, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M., and Zimmerman, T. S : von Willebrand Factor ; a reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* **261** : 381-385, 1986.
- 12) Fujimura, Y., Ikeda, Y., Miura, S., Yoshida, E.,

- Shima, H., Nishida, S., Suzuki, M., Titani, K., Tandiuchi, Y. and Kawasaki T. : Isolation and characterization of jararaca GPIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib : *Thromb. Haemost.* **74** : 743-750, 1995.
- 13) Noda, M., Yutsuda, T., Nakabayashi, N., Hirayama, T. and Takeda Y. : Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O-157 : H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. *Micob. Patho* **2** : 339-349, 1987.
- 14) Ikeda, Y., Handa, M., Kawano, K., Kamata, T., Murata, M., Araki, Y., Ando, H., Kawai, Y., Watanabe, K., Itagaki, I., Sakai, K. and Ruggeri ZM. : The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J. Clin. Invest.* **87** : 1234-1240, 1991.
- 15) Fraker, DJ. and Speck, JC. : Protein and cell membrane iodinations with sparingly soluble chloramine, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Commun.* **80** : 849-857, 1978.
- 16) DeMarco, L., Mazzucato, M., Masotti, A., Fenton, J. W. II. and Ruggeri, Z. M. : Function of glycoprotein Ib $\alpha$  in platelet activation induced by  $\alpha$ -thrombin. *J. Biol. Chem.* **266** : 23776-23783, 1991.
- 17) Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J. L., De Grandis, S. and Karmali M. A. : Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.* **262** : 8834-8839, 1987.
- 18) Taki, K., Handa, S. and Isikawa, D. : Blotting of glycolipids and phospholipids from a high-performance thin-layer chromatogram to a polyvinylidene difluoride membrane. *Anal Biochem.* **221** : 312-316, 1994.
- 19) Lingwood, C. A., Petric, M., Brunton, J., Cocen, A. and Kamali M. A. : Glycolipid receptor for verotoxin. International Symposium and Workshop on Verotoxin Producing *Escherichia coli* Infection, Toronto, July 12-15 (Abstract STF-2), 1987.
- 20) Fukuyama, M., Sakai, K., Itagaki, I., Kawano, K., Murata, M., Kawai, Y., Watanabe, K., Handa, M. and Ikeda, Y. : Continuous measurement of shear-induced platelet aggregation. *Thromb. Res.* **54** : 253-260, 1989.
- 21) Charba, D., Moake, J. L., Harris, M. A. and Hester, J. P. : Abnormalities of von Willebrand factor multimers in drug-associated thrombotic microangiopathies. *Am. J. Hematol.* **42** : 268-277, 1993.