

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

腸管出血性大腸菌感染に伴う溶血性尿毒症症候群の病態と治療法の研究

## 研究報告書

主任研究者	伊藤 拓	国立小児病院副院長	
分担研究者	山岡完次	大阪府立病院小児科	
	吉岡加寿夫	近畿大学小児科	
	上辻秀和	奈良県立病院小児科	
	吉川徳茂	神戸大学保健学科	
	香坂隆夫	国立小児病院小児科	
	本田雅敬	都立清瀬小児病院腎内科	
	長田道夫	筑波大学臨床医学系病理	
	五十嵐 隆	東大分院小児科	
	研究協力者	水口 雅	自治医大小児科
		武林 亨	慶大公衆衛生学

腸管出血性大腸菌感染に伴う溶血性尿毒症症候群の病態と治療法の研究  
総括研究報告書

主任研究者 伊藤 拓 国立小児病院副院長

**研究要旨** 腸管出血性大腸菌感染症に伴う溶血性尿毒症症候群 (Stx-HUS) データベースを構築し、重症化予測因子など患者の治療に役立つ情報を得ることが出来た。ヒト Stx-HUS の病態研究において外因系凝固機転の関与、PAF 抑制因子遺伝子の関与など治療法の開発に結びつけ得る治験を得ることが出来た。動物モデルを用い Stx 脳症の発症機転を究明し、aging の関与、LPS の相乗障害機序を確認出来た。ヒト Stx-HUS の腎症モデルについて尿細管病変に加え糸球体病変を起こす実験系を作成出来たが、実用化には薬剤負荷などなお改良が必要と考えている。

#### A. 研究目的

1996 年春に腸管出血性大腸菌 (EHEC : enterohemorrhagic Escherichia coli) 感染症の大流行が関西を中心として起こり、HUS などの重症合併症により 10 名を越す死者が出る不幸な事態となった。この流行に対して感染経路の検索、EHEC O-157 感染症の予防、治療に関する幾つかの研究班が組織され、細菌学を中心とした基礎的分野での精力的な検討が進められて来ている。また、今年 4 月の感染症予防・医療法の施行により疾病分類 3 類感染症としてより効率的な予防対策が取られることとなった。

しかし、EHEC の経口感染経路の解明が不十分で、EHEC 感染予防、治療法がなお確立されておらず、腸管出血性大腸炎と溶血性尿毒症症候群 (HUS) などの重症合併症が続発する現状では、これらの致死合併症の治療が極めて重要である。そのためには患者の殆どを占める小児科領域に於いて HUS の疫学、病態に関する臨床的検討を進め、得られた知見を基に適切な予防・治療法を明らかにする必要がある。

本研究の目的は ① 我が国における EHEC 感染症による HUS (Stx HUS) のデータベースを作成し、多数例の臨床所見の検討により適切な「診断・治療ガイドライン」を提案すること、このガイドラインにより第一線医療における本症の迅速且つ適切な治療を可能とし、死亡率、

後遺症発現率を低下させること、②ヒト HUS の腎・脳障害機転について血管内皮障害、凝固系の活性化状態、メディエータの関与、腎組織障害などを明らかにすること、③ HUS 腎症と脳症の動物モデルを作成し、in vivo における障害機転の研究を行い、②、③の研究から抗凝固療法・抗体治療・抗サイトカイン治療法などの手ごかりをつかむ事にある。

#### B. 研究方法

##### 1. 溶血性尿毒症症候群の臨床的、疫学的検討

1996 年の流行例調査患児の中で日本小児腎臓病学会「溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドライン」HUS 診断基準を満たす 143 例を対照として HUS 重症化危険因子の検討を行った。患児を年齢により 2 群に分け、各々の腎障害の程度、中枢神経、症状致死率について大腸炎発症時、HUS 発症時の尿所見、末血所見、血液生化学所見、肝機能、CRP などとの関連を検索した。

既に報告した第 1 回 Stx-HUS 全国調査例の長期予後を検討するため追跡調査 (案) を作成する。

また、HUS データベースの継続的検討について、適切な方法を検討した。

##### 2. ヒト HUS における腎障害機転の研究

HUS の腎微小血栓形成に主として血小板が関与

すると考えられてきたが、近年の血液凝固系研究の進歩により、凝固系因子の関与も無視出来なくなっている。上辻らはHUS発症EHEC患児、HUS非発症EHEC患児、健康小児について血中 tissue factor(TF)、TF pathway inhibitor(TFPI)、TAT、soluble Thrombomodulin(sTM)をELISA法により測定し、HUS患児における外因系凝固機転の関与を検索した。

吉川らはHUS発症、重症化への遺伝的素因の関与を検索するため、HUS患児のplatelet activating factor(PAF)分解酵素遺伝子の変異をPCR法で検討した。

香坂らは志賀毒素(Stx)の直接作用によるHUS腎症発症機転に加え、Stxによる脳障害、交感神経障害を介した腎障害の可能性に注目し、以下の研究を行った。7週齢ウイスターラット脳室内にStx2を投与し、腎交感神経活動電位と腎機能を測定し、更に脳、腎の組織検索を行った。

### 3. 実験動物によるStxの脳障害の研究

ヒト脳症が幼児期に好発する事実に鑑み、水口ら(研究協力者)は幼弱、成熟ウサギにStx2を静注し、臨床所見、血液・尿所見、中枢神経系の組織学的所見による比較を行った。更に五十嵐らは幼弱マウスにStxとLPSを静注し、中枢神経系の組織検索と凝固因子、サイトカインなどのパラメーターの変動を検索した。

### 4. HUS動物モデルの作成と病理学的解析

長田らはStxに対する家兎好血清の作成を試みた。また香坂らがマウスにStx、neuramidaseを静注/腹腔内投与して作成したHUSモデルの腎組織所見を検討し、ヒトHUSとの類似性を検討した。

池田らはLPS感受性マウスに対するStx2、LPSの腹腔内投与を種々の条件下で比較し、HUS動物モデル作成条件を研究した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 溶血性尿毒症症候群の臨床的、疫学的検討

143例のStx HUSについて多変量解析による危険因子の検討を行った結果、学童死亡例、

重症例において腸管出血性大腸炎時(HUS発症前)の末梢血白血球数、HUS発症時の末梢血白血球数、CRPの上昇が優位な危険因子となった。我が国を含め過去の腸管出血性大腸菌感染に伴うStx HUSの好発年齢は乳幼児期であり、学童期でのこのような情報は全く得られていなかった。今後我が国で発症頻度が増すと考えられる学童期Stx HUSの重症化危険因子が明らかになったことは、学童流行時の重症例の早期予測、早期よりの適切な管理・治療に役立つ成果である。また今回検討した長期経過調査は、HUS患児では重症例は勿論、軽症例においても長期の経過で腎機能、脳神経系合併症を残すとの報告が欧米であるためである。更に継続的HUSデータベースの確立のために平成11年度に予定する第2期全国調査内容も作成したが、研究協力者の武林の臨床疫学研究に関する指導と協力を得て、これらの調査内容ををより適切で、効果的なものにする事が出来た。

### 2. ヒトHUSにおける腎障害機転の研究

上辻らのヒトHUSにおける凝固系検索では外因系凝固因子のTF、TFの抑制因子のTFPIが増加しており、TFは血管内皮細胞障害マーカーであるsTM、血清クレアチニンと正の相関を示した。即ちHUSにおいては血小板系活性化以外にStx、LPLによる血管内皮細胞障害が外因系凝固機転を活性化し、微少血栓形成による腎障害を惹起する機転を示唆する所見であり、血中TFが腎障害の有用なマーカーになり得ること、更にTF系の動態研究により抗血小板剤/抗凝固剤併用療法の可能性を明らかに出来ると考えられる。

吉川らのPAF分解酵素遺伝子の検索でヘテロの遺伝子変異を示すHUS患者は酵素活性の低下を伴い、変異のないHUS患者に比して重症例が多い成績が得られた。この結果よりPAF分解酵素遺伝子の変異を持つ患者はPAF濃度の増加が容易に生じ、より強い腎病変を惹起すると考えられ、HUS重症化例の予測、PAF阻害剤の臨床応用の可能性が期待できる。

香坂らの Stx 脳障害ラットにおいて腎交感神経電位の有為な亢進を認めたが、STX 投与後 4 時間までの観察ではその結果としての明らかな腎機能障害は確認できなかった。脳障害、脳神経系を介しての腎障害惹起の可能性について更に長時間の検討が必要と考えられる。

### 3. 実験動物による Stx の脳障害の研究

水口らは aging による Stx 感受性を検討し、幼弱マウス脳は成熟マウス脳と比較して Stx (志賀毒素) 感受性が高い事を明らかにした。このことはヒト HUS が幼児期に重症化することと一致する成績であり、このマウス脳組織障害の検索を進めることにより aging による Stx 感受性の違いについて明らかにしたい。

五十嵐らはマウスへの Stx 単独投与による脳障害を既に報告しているが、今回の Stx + LPS (lipopoly-saccharide) 投与により更に著しい血液凝固能の亢進、脳神経障害の増強が起きる事を明らかにした。即ち、HUS 腎障害で報告されている Stx + LPS の相乗的障害機転が脳障害においても起きていることを示す所見であり、その障害機序について病理組織学的検索を含め更に検討が必要である。

### 4. HUS 動物モデルの作成と病理学的解析

Stx HUS の動物モデルは本疾患の病態解明、治療法の開発に欠かせぬ実験系であり、多くの研究者がその作成に努力しているが、極めて困難なゴールであり、特に HUS 腎症の作成には至っていない。池田らは LPS 感受性マウスに対する Stx2、LPS の腹腔内投与を種々の条件下で比較し、HUS 動物モデル作成条件を研究し、Stx2 を先行投与し、その後 LPS を併用投与したマウスで血小板減少、BUN 上昇などの臨床所見とともに軽度の糸球体病変を惹起することが出来た。現在までの Stx 単独投与あるいは Stx2、LPS 併用投与の報告で腎機能障害が報告されているが、腎組織病変は尿細管が主体であり、ヒト HUS のような特徴的糸球体病変を惹起していない。池田らは今回の実験系で軽度であるが初めて糸球体病変を作り得ており、次年度に

Stx HUS の動物モデル作成のため更に研究方法を発展させていきたい。

また香坂らはマウスに Stx、neuramidase を静注/腹腔内投与して HUS モデル作成したが、強い腎不全症状にも関わらずその腎組織所見は尿細管上皮細胞障害による尿細管壊死であった。従ってこの実験系は完全なヒト HUS モデルではないが、ヒト HUS 腎障害機転の一部としての尿細管障害を描写している可能性はある。長田はこのような視点からこのマウス腎組織を検討した結果を報告している。

### D. 結論

本研究班が行った第 1 期 HUS データベースの分析から、以前には少なかった学童期 Stx-HUS の病形を検索し、重症化危険因子を明らかにすることが出来た。更に Stx-HUS の長期予後の解明、第 2 期データベース作成のための調査方法について臨床疫学的検討を加え、より適切、有用な調査表を作成した。

ヒト HUS における腎障害機転の研究で微少血栓形成による腎障害の惹起に外因系凝固機転の活性化が関与すること、HUS 重症化に遺伝的素因が関与すること、HUS 腎障害に脳障害による腎交感神経系が関与する可能性を指摘した。

実験動物による Stx の脳障害の研究により aging による毒素感受性の違い、更に脳障害における LPS の相乗作用を明らかにした。

ヒト HUS モデルの作成は HUS の病態解明、治療法の研究に不可欠な手段であるが、残念ながら我々を含め完成に至っていない。しかし、池田らによる LPS 感受性マウスに対する Stx2、LPS の腹腔内投与 HUS モデルはヒト HUS に極めて近いモデルと考えられ、実験系の更なる改良が期待される。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Ito H, Yoshikawa N, Honda M  
Pediatric Nephrology around the world

- Japan, in *Pediatric Nephrology* edited by Holliday MA, Barratt TM, Avner ED, Baltimore, Williams & Wilkins, 1999 p. 1354-1357
2. 伊藤 拓, 吉岡加寿夫  
溶血性尿毒症症候群 (HUS) - E.Coli 0157 感染に伴うHUSについて-  
透析会誌 30:27-33 1997
  3. 山岡完次, 伊藤克己他  
O157 とHUS、流行時の状況からみた今後の  
対策 透析会誌 31:1059-1065 1998
  4. 宍戸清一郎, 本田雅敬, 伊藤 拓  
溶血性尿毒症症候群を原病とする腎不全患児  
に対する腎移植成績  
日本小児腎不全学会誌 18:250-252 1998
  5. 吉矢邦彦, 吉川徳茂他  
溶血性尿毒症症候群 51 例の臨床的検討 (Vero  
毒素産生性大腸菌との関連について)  
日本小児腎臓病学会雑誌 10: 83-86. 1997
  6. 吉矢邦彦, 飯島一誠, 吉川徳茂  
小児期急性腎不全 90 症例の臨床病理学的検討  
日本腎臓学会誌 39:503-506 1997
  7. Hidekazu Kamitsuji et al Elevated tissue  
factor circulating levels in children with  
hemolytic uremic syndrome caused by  
verotoxin producing E-coli.  
*Clinical Nephrol* in press
  8. Xu H, Yamaoka K, Yoshikawa N et al  
Platelet-activating factor acetylhydrolase  
mutation in Japanese children with HUS.  
*Kidney Int* submitted
  9. Sugatani J, Igarashi T, Shimura M et al  
Abnormalities of T-cell immune responses  
in mice given intravenous verotoxin  
enhanced apoptosis in the cultured splenic T  
and B cells.  
*Infect Immun* (submitted)
  10. Sugatani J, Igarashi T, Munakata M et al  
Increased susceptibility of LPS treated  
C57BL/6 mice to verotoxin 2(VT2)-  
induced lethal shock : contribution of  
additive activation of coagulation by VT2  
and LPS. *Thomb Haemost* (submitted)
  11. Mizuguchi M, Igarashi T, et al  
Neuronal and vascular pathology  
produced by verocytotoxin 2 in the rabbit  
central nervous system.  
*Acta Neuropathol* 91:254-262 1996
  12. Igarashi T, Inatomi J, Wake A et al  
Failure of pre-diarrheal antibiotics to  
prevent hemolytic uremic syndrome in  
serologically proven *Escherichia coli*  
O157:H7 gastrointestinal infection.  
*J Pediatr* (submitted)
  13. 五十嵐 隆  
腸管出血性大腸菌による溶血性尿毒症症候群  
の発症機序 小児内科 30:709-713 1998
  14. 五十嵐 隆  
脳症・溶血性尿毒症症候群の成因  
小児科臨床 61:1576-1581 1998
  15. 水口 雅  
腸管出血性大腸菌感染による中枢神経系合併  
症の治療 小児内科 30:777-780 1998
  16. Sugatani J, Igarashi T, Shimura M et al  
Abnormalities of T-cell immune  
responses in mice given intravenous  
verotoxin enhanced apoptosis in the  
cultured splenic T and B cells.  
*Infect Immun* (submitted)
  17. Sugatani J, Igarashi T, Munakata M et al  
Increased susceptibility of LPS treated  
C57BL/6 mice to verotoxin 2(VT2)-  
induced lethal shock : contribution of  
additive activation of coagulation by VT2  
and LPS. *Thomb Haemost* (submitted)
  18. Mizuguchi M, Igarashi T, et al  
Neuronal and vascular pathology  
produced by verocytotoxin 2 in the  
rabbit central nervous system.  
*Acta Neuropathol* 91:254-262 1996

19. Igarashi T, Inatomi J, Wake A et al  
Failure of pre-diarrheal antibiotics to  
prevent hemolytic uremic syndrome in  
serologically proven Escherichia coli  
O157:H7 gastrointestinal infection.  
J Pediatr (submitted)

2. 学会発表

1. 山岡完次  
腸管出血性大腸菌感染症による溶血性尿毒  
症症候群 第33回日本小児腎臓病学会総会  
横浜市 平成10年6月
2. Ymaoka K, Yoshikawa K, Ito H  
Outbreak of the HUS associated with  
verotoxin producing E.Coli in Japan,  
1996 11th Congress of International  
Pediatric Nephrology Association.  
London Sept. 1998
3. 伊藤 拓他  
小児科領域の腸管出血性大腸菌感染症に対す  
る志賀毒素吸着剤 TAK 751 S の臨床的検討  
第28回日本腎臓学会東部学術大会  
東京都 平成10年11月

腸管出血性大腸菌（VTEC）感染に伴う溶血性尿毒症症候群（HUS）の進展に關与する危険因子の検討

分担研究者 山岡 完次 大阪府立病院 小児科  
吉岡 加寿夫 近畿大学医学部 小児科

#### 研究要旨

平成8年に発症した溶血性尿毒症症候群（HUS）患者の中で、腎機能障害を含めた3主徴を認めた143例を対象として進展に關する危険因子を検討した。腸管出血性大腸菌感染症発症時の検査では、1-5歳群で、尿潜血を認める症例でその後の神経症状の発生頻度が上昇が見られたが、他には有意な関係は見られなかった。HUS発症時の検査結果では、全例の検討（特に6-16歳群）では、白血球数の増加・低ナトリウム血症・低蛋白血症がその後の死亡症例につながる可能性を認めた。腎機能障害の程度とは、1-5歳群では、GPTの上昇、6-16歳群では、白血球数の増加が有意な関係を認めた。全例の検討では、病初期からのクレアチニンの上昇および低蛋白血症が進展因子としてあげられた。これらの進展因子が病初期から認められる症例では、HUSが重症化する可能性があり注意が必要である。

#### A,研究目的

腸管出血性大腸炎時あるいは溶血性尿毒症症候群（HUS）発症時に、腸管出血性大腸菌（VTEC）に伴うHUSの進展に關与する危険（予測）因子が明らかになれば、HUSの治療を行う上で、適切な医療施設への転送あるいは透析などの治療の準備をすることが可能であり有用と考えられる。

#### B,研究方法

平成8年に調査したHUS患者の中で、クレアチニン濃度が年齢相当の基準値の上限以上に上昇し、Hb濃度が10 g/dl以下の溶血性貧血および血小板数が10万以下に減少した血小板減少症の3主徴を満たしていた143例を対象とした。

腎機能障害の程度は、（1）クレアチニン濃度が年齢相当の基準値の上限以上 （2）クレアチニン濃度が年齢相当の基準値の1.5倍以上 （3）クレアチニン濃度が年齢相当の基準値の1.5倍以上上昇し、無尿を認める の3群に分けた。

腸管出血性大腸炎時および患者基礎データとしては、年齢・性別・尿異常（尿潜血および尿蛋白）・WBC数・CRP値について検討した。

HUS発症時あるいは入院時のWBC・CR

P・Hb・血小板数・BUN・Cre・血清蛋白・Na・GOT・T. Bil・LDHについて検討した。

平成8年のHUS発生患者では、堺市での学童の集団発生が見られたため、従来の報告や諸外国の報告とは異なり、学童年齢の患者数が増加していた。したがって、5歳以下と6歳から16歳までの2群に大きく分けて検討した。

統計解析は、腎機能障害の程度・神経症状の有無・死亡と上記のデータとの間で単相関およびステップワイズ回帰分析を行った。また、腎機能障害の程度を（1）・（2）群と（3）の2群にわけてロジステック解析を行った。

#### C,結果

##### 1、腸管出血性大腸炎時および患者基礎データ

##### 1) 全例での検討

腎機能障害の程度と相関する有意な因子は認められなかった。神経症状の発生には、ステップワイズ回帰分析で尿潜血およびWBC数の上昇と相関が見られ、ロジステック解析では、+以上の尿蛋白（オッズ比 4.1）で有意な予測因子とされた。死亡例に対しては、ステップワイズ回帰分析でWBC数の上

昇と相関が見られ、ロジステック解析では、有意な因子は認められなかった。

### 2) 1-5歳での検討

神経症状の有無と尿潜血の程度とは、有意な相関が見られ、ロジステック解析でも、2+以上の尿潜血でオッズ比 26.0 と上昇していた。腎機能障害および死亡との相関は認められなかった。

### 3) 6-16歳での検討

腎機能障害の程度とは有意な相関は、認められなかった。神経症状とは、WBC数と相関がみられたが、ロジステック解析では有意ではなかった。死亡例とは、WBC数はステップワイズ回帰分析で有意であったが、ロジステック解析では有意ではなかった。

## 2. HUS発症時あるいは入院時の検査項目

### 1) 全例での検討

腎機能障害の程度とは、ステップワイズ回帰分析で低蛋白およびクレアチニンの上昇と有意な関係が認められたが、ロジステック解析では、2.0 mg/dl以上のCre(オッズ比 11.4)・5.0 g/dl未満のT.Pro(5.3)・130 mEq/l未満のNa(4.3)・100 IU/l以上のGPT(6.9)・5000 IU/l以上のLDH(4.0)・2万以上のWBC(2.8)で有意な結果がえられた。神経症状の有無に対しては、ステップワイズ回帰分析で低蛋白のみが有意であり、ロジステック解析でもT.Pro(4.1)に有意な結果が認められた。それに反して、死亡例では、ステップワイズ回帰分析でWBCおよびCRPに有意な相関を認め、ロジステック解析では、WBC(25.6)・Na(7.4)・T.Pro(6.4)であった。

### 2) 1-5歳での検討

腎機能障害の程度とは、ステップワイズ回帰分析でGPTと有意であり、ロジステック解析では、Cre(14.9)・T.Pro(6.3)・GPT(7.3)で有意であった。神経症状との有意な相関は認められなかった。死亡例とは、ステップワイズ回帰分析でGPTおよびCRPと有意な関係を認めたが、ロジステック解析では有意ではなかった。

### 3) 6-16歳での検討

腎機能障害の程度とは、ステップワイズ回帰分析でWBCのみと相関を認めたが、ロジステック解析では、WBC(6.2)・Cre(7.5)・T.Pro(4.5)・Na(4.4)・LDH(12.2)で有意な関係を認めた。神経症状の有無とは、ステップワイズ回帰分析でT.Pro・LDH・CRPに有意な相関を認め、ロジステック解析ではT.Pro(7.8)・WBC(6.2)・Na(6.3)・Cre(4.5)・GPT(8.4)に有意な関係を認めた。死亡例に対しては、ステップワイズ回帰分析では、CRPおよびWBCに相関を認めた。ロジステック解析では、WBC(14.9)・Na(8.3)・T.Pro(10.0)に有意な関係を認めた。

## D, 考察

従来からいわれていたHUSの重症化進展因子としては、著しい血便、腹痛、発熱の持続、白血球数の増加、病初期からの尿潜血、蛋白尿、2歳以下、血小板数の低下、LDHの上昇、ビリルビンの増加、低蛋白血症、クレアチニンの増加など文献によりさまざまである。今回我々の検討では、死亡例が9例であったが、学童や高齢で認められたことから、年齢による危険因子は認められなかった。

我々の検討では病初期からの尿潜血・白血球数の増加・低蛋白血症・低ナトリウム血症・クレアチニンの増加・GPTの上昇が悪化進展因子として認められた。GPTの上昇は、腎以外の他臓器でも障害が強い症例であることを意味するのではないか。これらの結果はGPTの上昇以外は従来の報告とかわらず注意が必要である。

## E, 結論

腸管出血性大腸炎時では、はっきりした危険因子としては、1-5歳で尿潜血、6-16歳で、炎症所見を示すWBCおよびCRPの上昇があげられる。

HUS発症時では、1-5歳では、GPTの上昇が要注意であろう。一方、6-16歳では、WBC数の増加が腎機能障害の程度や死亡を予測する因子としてあげられる。これは、暴露されたVTEC量が多いことを反映しているのかも知れない。



F、研究発表

1、論文発表

1) 山岡完次

腸管出血性大腸菌感染症、溶血性尿毒症症候群における重篤な消化管合併症とその治療・ケア  
小児看護 21(6):727-730 1998

2) 伊藤克己、山岡完次、飽津泰史、寺岡泰彦

O-157とHUS、流行時の状況からみた今後の対策

透析会誌 31(7):1059-1065 1998

3) 山岡完次

溶血性尿毒症症候群の治療  
臨床成人病 28(11):1409-1411  
1998

2、学会発表

1) 第33回 日本小児腎臓病学会

腸管出血性大腸菌感染症による溶血性尿毒症症候群

2) 第11回 国際小児腎臓学会

Outbreak of the HUS associated with verotoxin producing E.Coli in Japan, 1996

G、知的所有権の取得状況

特になし

Table 1. The risk factors of the labo data during the enterocolitis

A, Overall

Severity of the renal failure

Linear regression analysis

no significant correlation with any factors

Stepwise regression analysis

no significant correlation with any factors

Logistic regression analysis (for grade 3 severity)

no significant correlation with any factors

Neurological symptoms

Linear regression analysis

	R	P value
Hematuria	0.355	0.008
Proteinuria	0.330	0.014
WBC	0.267	0.013

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
Hematuria	0.143	0.067	0.276		
WBC	0.00002	0.000009	0.303		
				0.458	0.0025

B: Unstandadized regression coefficient

A: Standadized regression coefficient

Logistic regression analysis

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
Hematuria ( $\geq 2+$ )	5.067	0.972-26.415	0.0541
Proteinuria ( $> 1+$ )	4.125	1.122-15.162	0.0329

Mortality

Linear regression analysis

	R	P value
CRP	0.311	0.0084
WBC	0.280	0.0117

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
WBC	0.000013	0.000005	0.311		
				0.311	0.0087

Logistic regression analysis

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
Sex (female)	6.293	0.765-51.745	0.0870

**B, 1-5 years old**

**Severity of the renal failure**

Linear regression analysis

Stepwise regression analysis

Logistic regression analysis (for grade 3 severity)

no significant correlation with any factors

no significant correlation with any factors

no significant correlation with any factors

**Neurological symptoms**

Linear regression analysis

	R	P value
Hematuria	0.605	0.0087

**Logistic regression analysis**

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
Hematuria (>2+)	26.000	1.118-604.677	0.0424

**Mortality**

Linear regression analysis

Stepwise regression analysis

Logistic regression analysis

no significant correlation with any factors

no significant correlation with any factors

no significant correlation with any factors

**C, 6-16 years old**

**Severity of the renal failure**

Linear regression analysis

Stepwise regression analysis

Logistic regression analysis (for grade 3 severity)

no significant correlation with any factors

no significant correlation with any factors

no significant correlation with any factors

**Neurological symptoms**

Linear regression analysis

	R	P value
WBC	0.310	0.0219

**Logistic regression analysis**

no significant correlation with any factors

**Mortality**

Linear regression analysis

	R	P value
WBC	0.497	0.0001
CRP	0.298	0.0417

**Stepwise regression analysis**

	B	SE	A	R	P value
WBC	0.000025	0.000006	0.522	0.522	0.0002

**Logistic regression analysis**

no significant correlation with any factors

Table 2. The risk factors of the labo data at the onset of HUS

A, overall

Severity of the renal failure

Linear regression analysis

	R	P value
T.Protein	-0.394	<0.0001
Creatinine	0.388	<0.0001
GPT(AST)	0.376	<0.0001
LDH	0.317	0.0001
Na	-0.303	0.0003
WBC	0.299	0.0003
BUN	0.199	0.0174

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
T.Protein	-0.316	0.086	-0.305		
Creatinine	0.188	0.048	0.323		
				0.501	<0.0001

B: Unstandadized regression coefficient

A: Standadized regression coefficient

Logistic regression analysis (for grade 3 severity)

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
Cre (>2.0 mg/dl)	11.429	4.164-31.370	<0.0001
T.Pro (<5.0g/dl)	5.323	2.284-12.405	0.0001
Na (<130 mEq/l)	4.273	1.694-10.777	0.0021
GPT (>100 IU/l)	6.857	1.611-29.191	0.0092
LDH (>5000 IU/l)	3.959	1.320-11.872	0.0140
WBC (>2x10 <sup>4</sup> /μl)	2.751	1.083-6.989	0.0333

Neurological symptoms

Linear regression analysis

	R	P value
T.Protein	-0.263	0.0024
GPT(AST)	0.213	0.0137
WBC	0.209	0.0123
LDH	0.178	0.0354

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
T.Protein	-0.0162	0.053	-0.271		
				0.271	0.0026

Logistic regression analysis

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
T.Pro (<5.0g/dl)	4.056	1.727-9.522	0.0013
WBC (>2x10 <sup>4</sup> /μl)	2.417	0.938-6.228	0.0676
Na (<130 mEq/l)	2.300	0.898-5.892	0.0826

Mortality

Linear regression analysis

	R	P value
WBC	0.499	<0.0001
Na	-0.287	0.0005
CRP	0.282	0.0010
GPT(AST)	0.231	0.0072
T.Protein	-0.231	0.0079

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
WBC	0.000014	0.000002	0.535		
CRP	0.010	0.004	0.191		
				0.621	<0.0001

Logistic regression analysis

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
WBC ( $\geq 2 \times 10^4 / \mu\text{l}$ )	25.594	4.885-134.093	0.0001
Na (<130 mEq/l)	7.368	1.813-29.939	0.0052
T.Pro (<5.0g/dl)	6.385	1.232-33.081	0.0272
GPT (>100 IU/l)	4.776	0.832-27.397	0.0794

B,1-5 years old

Severity of the renal failure  
Linear regression analysis

	R	P value
GPT(AST)	0.477	0.0005
Creatinine	0.375	0.0063
T.Protein	-0.351	0.0162
Na	-0.307	0.0297
LDH	0.290	0.0405
BUN	0.286	0.0415

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
GPT(AST)	0.007	0.002	0.545	0.545	0.0002

B: Unstandardized regression coefficient  
A: Standardized regression coefficient

Logistic regression analysis (for grade 3 severity)

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
Cre ( $\geq 2.0$ mg/dl)	14.875	2.584-85.619	0.0025
T.Pro ( $< 5.0$ g/dl)	6.250	1.597-24.456	0.0085
GPT ( $> 100$ IU/l)	7.333	1.152-46.670	0.0348

Neurological symptoms

Linear regression analysis

no significant correlation with any factors

Stepwise regression analysis

no significant correlation with any factors

Logistic regression analysis (for grade 3 severity)

no significant correlation with any factors

Mortality

Linear regression analysis

	R	P value
GPT(AST)	0.563	$< 0.0001$
CRP	0.474	0.0007
WBC	0.346	0.0133
Na	-0.339	0.0155
T.Protein	-0.350	0.0165

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
GPT(AST)	0.002	0.00037	0.553		
CRP	0.009	0.003	0.342		
				0.716	$< 0.0001$

Logistic regression analysis

no significant correlation with any factors

C,6-16 years old

Severity of the renal failure

Linear regression analysis

	R	P value
WBC	0.437	<0.0001
T.Protein	-0.434	<0.0001
Creatinine	0.408	0.0001
LDH	0.339	0.0020
Na	-0.331	0.0026
Hb	0.318	0.0035
GPT(AST)	0.318	0.0048
CRP	0.267	0.0187

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
WBC	0.000033	0.000007	0.492	0.492	<0.0001

B: Unstandardized regression coefficient

A: Standardized regression coefficient

Logistic regression analysis (for grade 3 severity)

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
WBC ( $\geq 2 \times 10^4 / \mu\text{l}$ )	6.152	1.733-21.835	0.0049
Cre ( $\geq 2.0$ mg/dl)	7.500	1.833-30.687	0.0051
T.Pro ( $< 5.0$ g/dl)	4.500	1.373-14.747	0.0130
Na ( $< 130$ mEq/l)	4.394	1.138-16.961	0.0317
LDH ( $> 5000$ IU/l)	12.200	1.184-125.746	0.0356

Neurological symptoms

Linear regression analysis

	R	P value
T.Protein	-0.448	<0.0001
WBC	0.403	0.0001
LDH	0.374	0.0006
CRP	0.372	0.0008
Creatinine	0.270	0.0140
Na	-0.260	0.0196
GPT(AST)	0.238	0.0382

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
T.Protein	-0.172	0.067	-0.285		
LDH	0.000069	0.000029	0.262		
CRP	0.040	0.019	0.242	0.564	<0.0001

Logistic regression analysis

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
T.Pro (<5.0g/dl)	7.785	2.290-26.459	0.0010
WBC ( $\geq 2 \times 10^4 / \mu\text{l}$ )	6.152	1.733-21.835	0.0049
Na (<130 mEq/l)	6.327	1.639-24.424	0.0074
Cre ( $\geq 2.0$ mg/dl)	4.538	1.145-17.995	0.0314
GPT ( $> 100$ IU/l)	8.429	0.713-99.686	0.0908

Mortality

Linear regression analysis

	R	P value
CRP	0.544	<0.0001
WBC	0.511	<0.0001
Na	-0.364	0.0008
PLT	-0.247	0.0248
LDH	0.245	0.0283
GPT(AST)	0.244	0.0337
T.Protein	-0.229	0.0484

Stepwise regression analysis

	B	SE	A	R	P value
CRP	0.049	0.012	0.458		
WBC	0.0000077	0.0000027	0.323		
				0.703	<0.0001

Logistic regression analysis

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
WBC ( $\geq 2 \times 10^4 / \mu\text{l}$ )	14.889	2.377-93.248	0.0039
Na (<130 mEq/l)	8.250	1.418-47.985	0.0188
T.Pro (<5.0g/dl)	10.000	1.052-95.072	0.0451
PLT	4.609	0.788-26.968	0.0900



研究要旨：O-157感染症における凝固-線溶能を血中 tissue factor(TF)の動態を中心に検討した。HUS 合併例、急性期の血中 TF 値は非合併例、対照に比して有意に増加し回復期には正常域に復していた。同様の結果は TF 特異的抑制因子である TF pathway inhibitor (TFPI)においても認められた。HUS での血中 TF 値は thrombin 活性を示す TAT や血清クレアチニン値のみならず血管内皮細胞障害マーカーである soluble thrombomodulin (sTM)とも正の相関性を示したことより TF はO-157感染 HUS の凝固活性に強く関与し、かつ腎障害の有用なマーカーになりうると思われた。

#### A. 研究目的

O-157 感染症に合併する溶血性尿毒症症候群 (HUS)の病態は腎の微小血栓形成を伴う微小循環障害でこれが腎障害や出血傾向の原因とされている。HUS 合併には凝固、線溶系因子および血小板が関与することは血中でTAT, FDP の増加、腎組織内での fibrin 関連因子の存在<sup>1)2)</sup>により明かであるが、いずれも結果を示すものであって HUS の病態を直接反映するものではない。近年、全身性汎種性血管内凝固症候群 (DIC) など 微小血栓形成には外因系凝固の開始因子である TF が初期反応因子として重要な役割をになっていることが知られるようになってきた。TF は血管内皮細胞をはじめ種々の組織や細胞膜表面に発現し凝固第 VII 因子との複合体を通じて第 VII 因子の活性化とそれに 引き続く第 X, IX 因子の活性化を促進する糖蛋白<sup>3)</sup>である。今回、O-157 感染症における TF の血中での推移について検討した。

#### B. 対象および研究方法

対象は O-157 感染症患児 43 例で HUS は 21 例に認められた。O-157 感染症の診断は便培養による E-coli O157:H7 の同定、あるいは O-157 lipopolysaccharide の検出によった。HUS の診断は Hb<10mg/dl, 血小板数<10x10<sup>4</sup> / $\mu$ l, Cre >1mg/dl の三者が存在するものとした。尚、対照として同意の得られた健康小児 10 例についても同様の検討を行なった。

血中 TF, TFPI, sTM, TAT は ELISA 法にて測定した。結果は平均値±標準偏差で表われ 2 群間の検定は Student's t-test で行ない、2 群間の相関関係は Spearman's correlation test で評価した。危険率 5%未満を有意差ありとした。

#### C. 結果

43 例中 21 例は HUS を合併し、うち 11 例に腹膜透析を施行した。経過中、痙攣や意識障害は 3 例に見られたがいずれも回復した

(Table 1)。

HUS 急性期の TF は  $356.8 \pm 194.6$  pg/ml で非 HUS の  $197.7 \pm 64.8$  pg/ml あるいは対照の  $192.0 \pm 60.3$  pg/ml に比して有意に増加していた ( $p < 0.005$ )。同様に HUS 急性期の TFPI も  $103.9 \pm 46.6$  ng/ml で非 HUS の  $51.8 \pm 16.3$  ng/ml, 対照の  $62.2 \pm 25.6$  ng/ml に比して有意に増加していた ( $p < 0.001$ )。

しかし非 HUS 例と対照の TF、TFPI の間には有意差は見られなかった。HUS 患児の血中 TF と TFPI の間には正の相関性が認められた ( $r = 0.736$ ,  $p < 0.001$ , Table 2, Figure 1)。

HUS 急性期の血中 TAT、sTM 及び Cre は非 HUS、対照に比して明らかに増加していた。

HUS 患児においては TF は TAT ( $r = 0.746$ ,  $p < 0.001$ ), sTM ( $r = 0.790$ ,  $p < 0.001$ ), Cre ( $r = 0.774$ ,  $p < 0.001$ ) と正の相関性を示した。また TFPI と TAT の間にも  $r = 0.669$   $p < 0.001$  が認められた (Figure 2)。

#### D. 考察

O-157 感染症のうち HUS 合併例の血中 TF は急性期において明かに増加し回復期には正常域に復していた。さらにこの TF 量は血清 Cre のみならず thrombin 活性を反映する TAT とよく相関していた。この結果は O-157 感染 HUS において TF が凝固活性と腎障害に強く関与することを示していた。先きのべた如く TF は内皮細胞をはじめ種々の細胞、組織内に存在し炎症や障害によつて細胞表面に出現、外因系凝固機転を活性化する。

O-157 感染による HUS の血管内皮細胞障害には verotoxin や lipopolysaccharide の刺激による  $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{IL-1 } \beta$  の産生増加が主体をなすとされているが<sup>4)</sup>、TF と内皮細胞障害マーカーである sTM との間に見られた相関性は急性期に増加していた TF が障害された内皮細胞に由来することを強く示唆していた。TF 同様、血中 TFPI は急性期に増加していたが TFPI は TF による第 VII, X 因子の活性化を特異的に阻害するプロテアーゼインヒビターで、内皮細胞で産生され炎症反応により流血中に放出されるものである<sup>9)</sup>。TF と TFPI の間の正の相関性は TF と TFPI が同一の組織内に存在しかつ同一の機序によって出現することを示していた。また TFPI と TAT の間の正の相関性は TFPI による TF 依存の凝固活性抑制が不完全であることを示すと思われた。

一般に腎不全患者においては腎からの排泄障害の結果として種々の血中蛋白が増加する。事実、腎不全患者の血中 sTM 量は尿中への排泄低下により Cre と相関し増加するとされている<sup>8)</sup>。他の腎不全患者において血中 TF 量と Cre を比較検討したが両者間に相関関係はなかった。したがって HUS 急性期の TF 増加は腎不全の結果でなく内皮細胞障害に由来し腎障害への進展に関与すると考えられた。

今後、腎組織内での TF、TFPI の動態を観察し HUS 発症へのさらなる検討を行ないたい。

#### E. 結論

O-157 感染症における凝固-線溶能を血中

のTF, TFPIの推移を中心に検討した。HUS合併例、急性期のTF, TFPIは非合併例に比して有意に増加しTAT, sTM, Cre値とも相関していた。このことはTF / TFPIはO-157感染のHUS発症に関与しかつ腎障害の有用なマーカーになりうると思われた。

#### F. 文献

- 1) Hoyer JR et al. Immunofluorescent localization on antihemophilic factor and fibrinogen in human renal disease. J Clin Invest 53:1375,1974
- 2) Colasanti G et al.: Deposition of fibrin-stabilizing factor (FXIIIa and s) and fibrinogen-related antigen fibrinogen degradation products and antihemophilic factor in renal diseases. Clin Nephrol 28:28,1987
- 3) Nemerson Y: Tissue factor: Then and now. Thromb Haemost 74:180,1995
- 4) Ruggerenti P et al. : Pathogenesis and treatment of thrombotic microangiopathy. Kidney Int 51: S97, 1997
- 5) Osterund B et al. : Site of tissue factor pathway inhibitor and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. Thromb Haemost 73:873,1995
- 6) Ogawa I et al.: Elevation of plasma thrombomodulin levels in primary glomerulonephritis with heavy proteinuria. Jpn J Nephrol 38:300, 1996

#### G. 論文発表

- 1) Hidekazu Kamitsuji et al. : Elevated tissue factor circulating levels in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin producing E-coli. Clinical Nephrol in press

#### H. 学会発表

- 1) Hidekazu Kamitsuji et al. : Elevated tissue factor circulating levels in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin producing E-coli. XVth International Congress of Nephrology May 4th,1999, Argentina
- 2) 石川直子、上辻秀和 他：腸管出血性大腸菌 O157 感染における PMN elastase (PMNE)の動態 第12回近畿小児科学会、平成11年3月7日、京都市
- 3) 上辻秀和 他：腸管出血性大腸菌(O157)感染症および溶血性尿毒症症候群における血中 tissue factor の動態。第42回日本腎臓学会学術総会、平成11年6月25日 横浜市

Table 1. Characteristics of the subjects

	Controls	non-HUS	HUS
No.	10	22	21
M / F	5 / 5	10 / 12	9 / 12
Age (y)	9.8 ± 3.4	5.0 ± 3.8	6.1 ± 5.6
O-157 (+) and / or LPS(+)	N.D.	22	21
VT1	N.D.	9 (+) 1 (-)	8 (+) 1 (-)
		12 (N.D.)	12 (N.D.)
VT2	N.D.	10 (+) 12 (N.D.)	9 (+) 12 (N.D.)
Dialysis		0 / 22	11 / 21
Encephalopathy		0	3 / 21