

Table 2. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor plasma concentrations in children with E-coli O157:H7 infection and control subjects

	HUS		Non-HUS	Control subjects
	Acute stage	Recovery stage		
Tissue factor (pg/ml)	n=21	n=13	n=22	n=10
Median	356.8 + 194.6*	173.0 + 56.6	197.7 + 64.8	192.0 + 60.3
Range	176 ~ 919	90 ~ 265	88 ~ 315	115 ~ 295
Tissue factor pathway inhibitor (ng/ml)	n=18	n=11	n=17	n=10
Median	103.9 + 46.6**	77.0 + 25.2	51.8 + 16.3	62.2 + 25.6
Range	29 ~ 200	52 ~ 132	24 ~ 83	32 ~ 106

\* p<0.005, \*\* p<0.001 vs non-HUS or control subjects

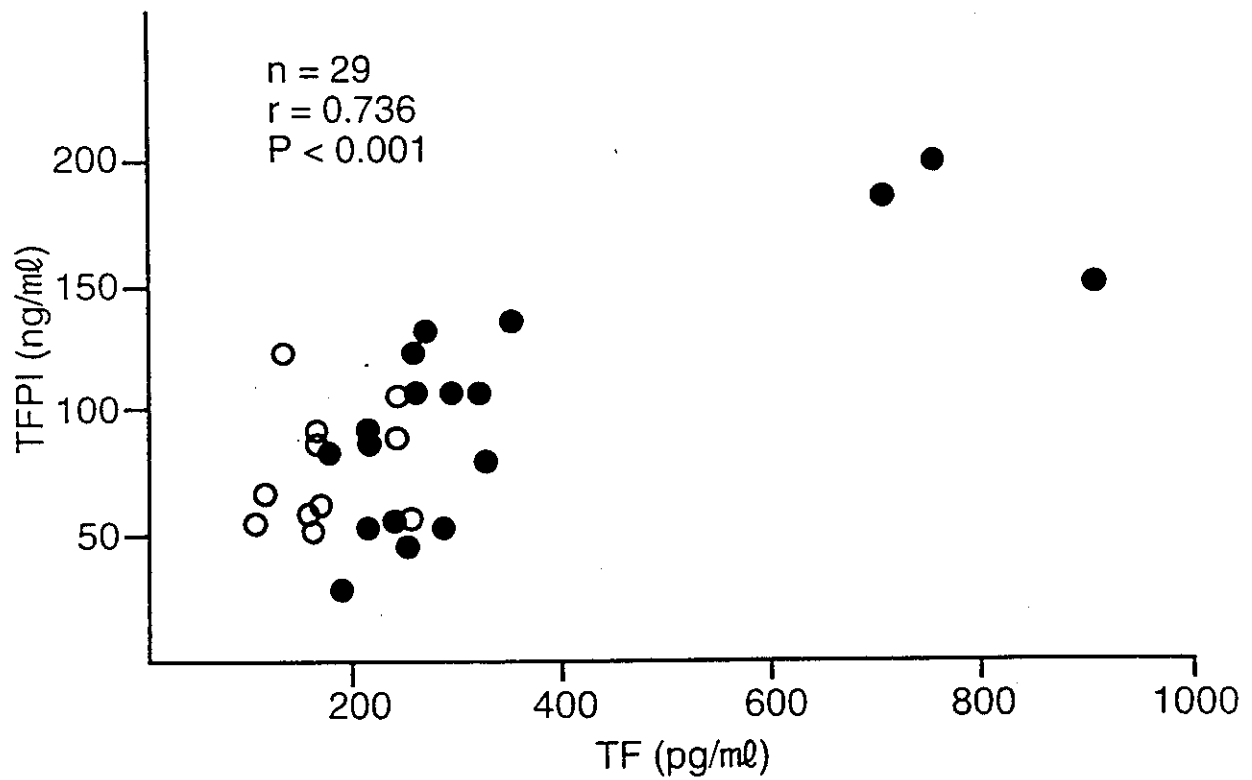


Figure 1. Relationship between tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in HUS patients.

● Acute stage, ○ Recovery stage

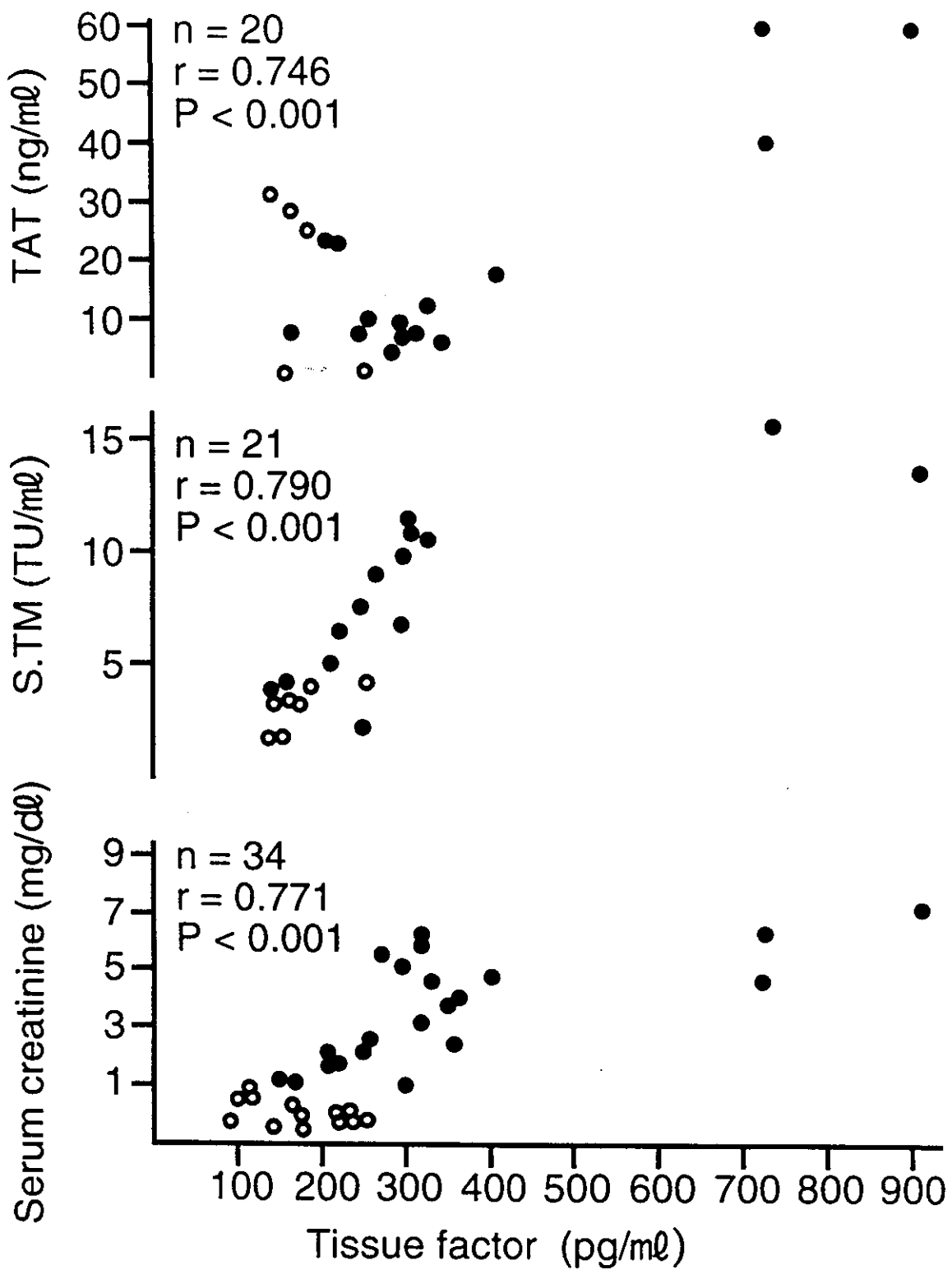


Figure 2. Relationship between tissue factor and thrombin antithrombin III complex (TAT), soluble thrombomodulin (sTM) or serum creatinine in HUS patients. ● Acute stage, ○ Recovery stage

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

O157 病原性大腸菌感染による HUS における血小板活性化因子(PAF)分解酵素遺伝子変異の解析

分担研究者 吉川徳茂 神戸大学教授

研究要旨 O157 病原性大腸菌感染による HUS 発症進展に PAF 分解酵素の遺伝子変異が関与しているかどうかを検討した。点変異 (G994T) のある患者は変異のない患者に比し、透析を必要とする症例が多く ( $p=0.03$ )、PAF 分解酵素遺伝子の変異は HUS の腎病変の進展に関与すると考えられる。

A. 研究目的

最近、PAF 分解酵素 (PAF acetylhydrolase) 遺伝子の点変異 (G994T) が日本人に発見され、変異を持つ人は酵素活性が低下していることが報告された。このような点変異を持つ人では、PAF 濃度の上昇が容易に生じ、より強い炎症を引き起こす可能性が考えられる。そこで、O157 病原性大腸菌感染による HUS 発症進展に PAF 分解酵素の遺伝子変異が関与しているかどうかを検討した。

B. 研究方法

O157 による HUS 50 例と、健常コントロール 100 例を対象に、末梢血白血球から DNA を抽出し、PCR 法にて PAF 分解酵素遺伝子変異 (G994T) の検索を行なった。

C. 研究結果

遺伝子変異 (G994T) は HUS 患者、正常コントロールのそれぞれ 30%、31%に認め、変異の頻度に差はなかった。HUS において、変異のある患者と変異のない患者の発症年齢、男女比に差は認めなかったが、ヘテロの変異のある患者の血中 PAF 抑制酵素活性は変異のない患者の 50%に低下していた。変異のある患者は変異のない患者に比し、

透析を必要とする症例が多かった (73 vs 37%,  $p=0.03$ )。

D. 考察

PAF は炎症前駆細胞の活性化や血管透過性亢進作用を有し、腎炎・ネフローゼ症候群の発症進展に関与することが明らかにされてきた。血中 PAF 濃度は PAF 分解酵素により厳密に規定されている。私達は、ネフローゼ症候群における PAF 分解酵素遺伝子変異の役割を検討し、遺伝子変異のある人では PAF が蓄積し、ネフローゼ症候群が再発しやすいことを明らかにした (Kidney Int 54:1867, 1998)。今回の HUS の患児でも、PAF 分解酵素遺伝子の点変異 (G994T) を持つ人は酵素活性が低下していた。このような点変異を持つ人では、PAF 濃度の上昇が容易に生じ、より強い腎病変を引き起こすと考えられる。これまでに、HUS 急性期の患児の尿中 PAF 排泄は増加していることが報告されてきたが、今回の私達の研究結果は HUS の進行における PAF の役割を示唆している。

E. 結論

PAF 分解酵素遺伝子の点変異 (G994T) は HUS の腎病変の進展に関与する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Xu H, Yamaoka K, Yoshikawa N et al  
Platelet-activating factor acetylhydrolase  
mutation in Japanese children with HUS.  
Kidney Int submitted

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

「ベロトキシン 2 (VT 2) 脳内投与に伴う腎交感神経活動電位の変化」

分担研究者 香坂 隆夫 国立小児病院腎消化器科医長

研究要旨

溶血性尿毒症症候群 (HUS) の中枢神経障害は腎不全により生じる高血圧、体液異常なども要因と考えられるが、ベロ毒素 (VT) による直接の神経障害や血管炎による急性脳症の発症がもっとも重要と考えられている。VT が海馬を介する交感神経に影響を及ぼし、交感神経活動電位の変化によって支配臓器の機能にまで影響するかどうかを調べる目的で、ラットを用いた実験系を作成し、VT の脳内投与に伴う腎交感神経活動電位と腎機能の関連について検討した。VT の脳室内投与により脳の Gb3 レセプターの分布は脳内の小動脈壁に Gb3 レセプターが発現していた。脳の病理組織変化では、炎症細胞の浸潤と脳内の出血と小動脈内皮細胞の腫脹、脱落、内腔の狭窄をみとめた。脳室内投与による腎交感神経活動電位の変化では、腎交感神経活動電位の有意な高進 ( $p < 0.05$ ) を認め、投与直後より上昇傾向にあり、観察記録時間の 4 時間以降も有意な高進の持続が推測された。しかしこの時間内での腎交感神経活動電位の上昇は、腎機能に影響を与える程度の上昇では無いと考えられた。

A. 研究目的

HUS の死因の第一位は中枢神経障害であり、その発症機序の解明は重要な課題である。この中枢神経障害は腎不全により生じる高血圧、代謝性アシドーシス、電解質異常、体液の過剰な貯留などが原因と考えられる。VT 2 による直接的神経障害の関与も報告されている。病原性大腸菌により産生されるベロトキシンには、大きく二つのタイプ (VT1、VT2) に分類されるが、中枢神経障害に関しては VT 2 の役割が注目されている。藤井らや水口らは、動物実験において VT 2 投与による組織学的検索から、脳の血管や神経細胞の直接障害を指摘し、脳症は微量の VT 2 の脳内進入により成立するものとしている。また喜多らは組織免疫染色から、VT 2 の陽性像が海馬部位にあることを示し、自律神経の機能障害を誘発する可能性を推察した。HUS の患者で海馬を含む側頭葉てんかんの発生の頻度が高いことから、VT 2 が海馬を介し交感神経に影響するものと考えられる。今回、VT 2 が交感神経活動電位の変化に作用するかどうか、また、その支配臓器の機能にまで影響するかどうかを調べる目的で、VT 2 の脳内投与に伴う腎交感神経活動電位と腎機能の関連について検討した。

B. 研究方法

7 週令ウイスターラットを麻酔し、脳室内に

カニューレを挿入した。脳室内投与として、生食、LPS、VT 2 の 3 群に分け、各々投与後 4 時間、Kaos 理論に基づき腎交感神経活動電位の変化を記録し、終了後、脳と腎臓を組織検索のため摘出した。また、腎機能への影響を評価するため、左腎交感神経を切断したウイスターラットを用い、脳室内投与後 4 時間まで、左右の腎機能を各々測定した。組織は、HE 染色後光顕にて組織障害の所見を検索し、また免疫組織染色により Gb3 受容体の部位を同定した。

C. 研究結果

- (1) 生食、LPS、VT 2 の脳室内投与による交感神経活動電位の変化 VT 2 の脳室内投与後 2 時間目より腎交感神経活動電位の有意な高進 ( $p < 0.05$ ) を認め、最大 180% の上昇を示した。この腎交感神経活動電位は、投与直後より上昇傾向にあり、観察記録時間の 4 時間以降も有意な高進の持続が推測された。コントロールとして使用した生食、LPS の投与では、腎交感神経活動電位の有意な変化を示さなかった (表 1)。
- (2) 生食、LPS、VT 2 の脳室内投与による血圧、脈拍の変化 血圧、脈拍の変化は、頸動脈圧受容体を介し腎交感神経活動電位に影響する。VT 2 の脳室内投与による腎交感神経活動電位の高進が、血圧、脈拍の変化によるものかどうかを調べるため、血圧、脈拍の変化をポリグラフで同時記録した。

その結果、VT2の脳室内投与は、血圧、脈拍にまったく変化を与えなかった。コントロールとして使用した生食、LPSの投与でも変化を示さなかった(表2)。

(3) 生食、LPS、VT2の脳室内投与による腎機能の変化 腎機能は腎血流量、糸球体ろ過量、ナトリウム再吸収率で評価した。左腎交感神経を切断し、脳室内投与後4時間、左右の腎機能を各々測定し比較する事により、腎交感神経系による影響を調べた。VT2の脳室内投与後、4時間腎血流量、糸球体ろ過量、ナトリウム再吸収率を記録したが、有為な変化を認めなかった。左右の腎機能の比較では、左交感神経の切断により、左腎血流量、左糸球体ろ過量の上昇、左腎ナトリウム再吸収率の低下がコントロール(生食)で見られるが、VT2の脳室内投与も同様の結果であった。これは、VT2の脳室内投与により腎交感神経活動電位が上昇したにもかかわらず、腎機能には影響する程度の上昇では無いことを示唆した。なお、LPSの投与では、左右の腎ナトリウム再吸収率の低下が、コントロール(生食)に比べ有意であり、脳から血流を通じての尿細管への直接作用と思われる(表3)。

(4) 生食、LPS、VT2の脳室内投与による脳の病理組織変化を調べた。その結果VT2の脳室内投与は、炎症細胞の浸潤と脳内の出血と小動脈内皮細胞の腫脹、脱落、内腔の狭窄をみとめた。また、プルキンエ細胞の変性、グリア細胞の腫大がみられた。光顕上、海馬領域には特異的な所見は見られなかった。LPSの投与では、小動脈内皮細胞は無変化であったが、炎症細胞の浸潤と脳内の出血、プルキンエ細胞の変性、グリア細胞の腫大を等しく認めた。コントロール(生食)では、軽度の炎症細胞の浸潤以外の所見はなかった。

(5) 生食、LPS、VT2の脳室内投与による脳のGb3レセプターの分布を検討した結果ではVT2の脳室内投与により脳内の小動脈壁にGb3レセプターが発現していた。特に、海馬のGL3周辺の血管に強く発現を認めた。コントロールとして使用した生食、LPSの投与では、Gb3レセプターが発現を示さなかった。また腎臓において、VT2の脳室内投与による腎組織上での発現は見られなかった。

#### D. 考察

本実験にVT2の脳室内投与により、脳の海馬部血管にGb3レセプターの強い発現が認められ、こ

れはVT2による海馬障害が自律神経系の機能障害を誘発する可能性を強く示唆した。事実、VT2の脳室内投与により腎交感神経活動電位の有為な高進が示され、VT2の中樞神経障害が末梢神経系を通じて末梢臓器障害にまで及ぶことが推測された。我々はさらに中樞神経障害が腎臓の機能に与える効果について調べた。その結果、腎交感神経活動電位の高進は実験期間の4時間以内では腎機能に影響を与えなかったが、実験期間を越える長期でのその効果は不明であった。また腎障害によってこれらの刺激が負の作用を示す可能性もある。従って、HUSでの腎機能障害に腎交感神経を介したVT2の中樞神経障害が関与する可能性をさらに追求する必要がある。本実験では、VT2の投与法を、脳室への直接投与としたが、その脳内組織所見は経口投与、静脈投与した場合の以前の報告所見とほぼ同じであった。VT2の中樞神経系障害は直接的な神経細胞に及ぼす効果と血管障害による二次的作用の二つのルートがあるが、直接的な神経細胞よりも血管内障害により強く発現をみた点は興味深い。VT2の投与により脳内の小動脈内皮細胞の腫脹、脱落、内腔の狭窄を全ての領域でみられたが、海馬のGL3周辺の血管に強くGb3レセプターが発現を認めたことは、VT2の海馬への親和性の強さを示唆した。また、LPSの投与では血管病変やGb3レセプターが発現を示さなかった事から、VT2の直接的な中樞神経系障害の主体も血管内皮障害であることが考えられた。VT2が海馬を介し腎交感神経活動電位の高進に寄与するメカニズムは今回明かにできなかったが、海馬から視床下部を通じて、腎交感神経の異常な脱分極を誘発させたものと推測している。ニューロペプチドY(NPY)はこの脱分極に関与しており、現在、VT2によるNPYの抑制の可能性を調査中である。このメカニズムの解明は、今後VT2の中樞神経障害の機序を知る上で重要な課題となるであろう。

#### E. 研究発表

[原著論文(欧文)]

1. Nakamura A, Johns E.J., Abe T, Kohsaka T.  
A role of beta-adrenoceptor 1 in IL-6 and TNF productions in the SHR kidney.  
Life Sci 62: 2407-2416 1998
2. Mogi S, Ebata T, Setoguchi Y, Fujime M, Heike Y, Kohsaka T, Yagita H, Okumura K,

zuma M

Efficient generation of autologous peripheral blood - derived cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic human tumors using recombinant CD80-adenovirus together with interleukin - 12 and interleukin - 2.

J. Clin. Cancer. Res. Vol.4,713-720,1998

. Nakamura A, J. Johns E, Imaizumi A, Abe T, Kohsaka T

Regulation of tumor necrosis factor and interleukin-6 gene transcription by b2 - adrenoreceptor in the rat astrocytes

. Neuroimmunol 88 (1998)144-153

. Nakamura A, J. Johns E, Imaizumi A, Abe T, Kohsaka T

Effect of b2-adrenoreceptor agonist and angiotensin II on TNF and IL-6 in rat mesangial cells Cytokine in press 1999

[原著論文 (和文) ]

香坂 隆夫、田川 学、伊藤 拓.

Ⅰ液症候群—その他の血液疾患を含めて—Ⅰ 溶血性尿毒症症候群 (HUS) 別冊 日本臨床領域別症候群シリーズ No.20, pp381~4, 1998

香坂 隆夫、岡野 幸子、小林 登.

腸管出血性大腸菌感染による溶血性尿毒症性症候群の治療 小児内科 第30巻6号 1998

樋口 智江、岡野 幸子、田川 学、鈴木

啓明、香坂 隆夫、松岡 健太郎、宮内 潤  
ⅡLDH血症を家族性に認め持続的溶血が示唆された P-ANCA 陽性の慢性に経過した進行性腎臓病の1症例

Ⅲ東小児腎臓研究会誌 14-1: 24-28 1998

[総説 (学会発表) ]

1. 大木 伸司、香坂 隆夫、東 みゆき.

CD28/CTLA-4シグナル伝達分子としてのB7-1/CD80の機能解析. 第28回日本免疫学会学術集会. 1998. 11.30-12.4

2. 大月 典子、大木 伸司、香坂 隆夫、安藤 和良、東 みゆき.

TCR/CD3非依存性のCTLA-4シグナルとB7-1/CD80発現制御に関する解析. 第28回日本免疫学会学術集会. 1998. 11.30-12.4

3. 桜井仁亨、大畑 順子、斎藤 潔、宮島 宏明、榎本 昭二、香坂隆夫、東 みゆき.

アロ抗原特異的マウスin vivo T細胞反応におけるCTLA-4機能の解析. 第28回日本免疫学会学術集会. 1998. 11.30-12.4

4. 香坂 隆夫、田川 学、庵原 俊昭、古瀬 昭夫、東野 博彦、新居 正甫、吉矢 邦彦、吉川 徳茂、本田 雅敬

全国調査による溶血性尿毒症の臨床的検討  
第101回日本小児科学会学術集会 1998.5.17



Table 1

	MAP				HR				NA			
	Abs(mmHg)		%change		Abs(Hz)		%change		Abs(mVis)		%change	
baseline	103	3			6.7	0.3			3.2	0.8		
0.5h	101	3	-1.5	0.7	6.8	0.3	1.6	1.9	3.5	0.8	7.8	2.6
1h	100	3	-2.4	1.2	6.9	0.3	2.4	2.2	3.6	0.9	12	4
1.5h	98	4	-4.3	2.1	6.9	0.2	2.5	2.7	3.8	0.9	18	4
2h	97	3	-3.2	2	7	0.1	4.9	2.9	4	0.9	18	7
2.5h	97	3	-5.5	2.1	7.2	0.1	6.7	3.9	4.2	1.1	30	6
3h	94	3	-8.8	2.3	7.2	0.1	6.8	5.1	4.3	1.2	31	8
3.5h	94	4	-8.8	2.5	7.1	0.2	5.4	5.5	4.4	1.4	33	12
4h	95	4	-7.9	2.8	7.1	0.2	5.9	6.5	4.6	1.4	38	14

Table 2

	MAP				HR				NA			
	Abs(mmHg)		%change		Abs(Hz)		%change		Abs(mVis)		%change	
baseline	97	8			6.4	0.3			2.8	0.7		
0.5h	97	7	-0.3	2.1	6.5	0.2	1.5	0.9	3.4	0.9	25	9
1h	95	7	-2.5	1.7	6.7	0.2	3.8	2.2	3.9	1.1	39	14
1.5h	96	7	-1.3	2	6.8	0.2	5.3	1.9	4.2	1.2	50	18
2h	97	6	1.3	1	7	0.1	5.3	3.3	4.7	1.4	42	26
2.5h	98	7	0.7	2.5	7.1	0.1	11	4	5.1	1.6	79	24
3h	97	7	-0.3	3.1	7.1	0.2	11	4	5.1	1.4	83	24
3.5h	98	6	0.9	3.7	7.2	0.1	12	4	5.3	1.5	97	29
4h	95	6	-1.6	3.5	7.1	0.2	10	5	5.4	1.5	99	31

Table 3

	MAP				HR				NA			
	Abs(mmHg)		%change		Abs(Hz)		%change		Abs(mVis)		%change	
baseline	104	4			6.5	0.3			4.5	0.8		
0.5h	104	3	0.4	1.6	6.4	0.3	-0.9	1.4	4.4	1	-4.4	6.6
1h	102	4	-1.7	2.4	6.5	0.2	-0.1	1.9	4.9	0.9	7.7	5.6
1.5h	103	6	-0.9	2.8	6.7	0.2	3.3	2.2	5.4	1.3	15	13
2h	105	6	1	3.1	6.9	0.3	6.1	4.8	5.9	1.5	30	17
2.5h	106	6	1.5	2.2	7.1	0.3	9.1	3.8	6.2	1.6	33	20
3h	106	6	1.4	2.3	6.9	0.2	7.4	3.6	6.1	1.7	32	23
3.5h	107	5	2.5	2.3	7	0.2	8.2	4.8	6.3	1.6	38	26
4h	104	5	0.5	4.2	6.9	0.2	7.3	6.2	6.5	1.8	44	33

Table 4

	MAP		RBF		GFR		UV		UNaV		FENa		GFR-R		UV-R		UNaV-R		FENa-R	
baseline	99	2	36.2	2.4	4.1	0.4	122	39.9	24.9	8.8	4.8	8.8	5	0.5	52	20	7.5	2.7	1.2	0.5
0.5h	102	2	37.7	2	4.1	0.6	120	23.8	25.2	5.6	5.1	1.4	5	0.5	46.2	12.2	7.7	1.8	1.2	0.4
1h	104	2	37.9	2	4.2	0.5	120	17.9	25.7	4.8	4.7	1	5	0.5	49.4	13.6	8.7	2.5	1.3	0.5
1.5h	107	1	39.6	1.8	4.4	0.4	130	22.2	28.4	4.6	4.8	0.8	5.3	0.7	58.4	11.5	10.5	3	1.7	0.8
2h	104	2	39.1	1.6	4.5	0.5	117	16.1	26.6	3.8	4.6	0.8	5.3	0.7	52.7	7.9	9.7	2.1	1.4	0.4
2.5h	105	3	39	2	4.5	0.5	125	17.2	30	4.4	5.2	1	5.3	0.8	46.6	8.2	10.5	2.2	1.5	0.4
3h	104	3	38.3	2.2	5	0.6	113	16.3	27.5	3.8	4.2	0.8	5.2	0.5	40.9	5.4	9.8	1.7	1.4	0.3
3.5h	105	3	36.9	1.8	4.9	0.4	116	20.7	28.3	3.5	4.4	0.8	5.8	0.5	44.3	8.1	11.1	2.3	1.3	0.2
4h	103	2	36.1	1.9	4.7	0.2	101	19.9	26.5	4.6	4.2	0.9	5	0.5	35.8	6.3	8.7	1.7	1.3	0.3

Table 5

	MAP		RBF		GFR		UV		UNaV		FENa		GFR-R		UV-R		UNaV-R		FENa-R	
baseline	106	3	36.3	3.7	3.7	0.3	93.8	33.6	15.9	6	3.3	1.4	4.1	0.3	37.4	8.1	5.1	1.6	0.9	0.3
0.5h	105	4	36	3.4	3	0.4	73.6	22.1	12.1	4.3	3.2	1.2	3.3	0.3	33.6	9.4	4.6	1.5	0.9	0.3
1h	102	5	35.1	3.8	3	0.5	61.9	18.1	10.6	3.2	2.2	0.6	3.4	0.5	31.2	8.5	4.4	1.4	0.8	0.3
1.5h	104	5	35.1	4.1	3.7	0.5	80	22	14.8	4.1	2.5	0.7	4.2	0.4	37.7	9.9	6.6	2.1	1	0.3
2h	102	5	34.1	4.3	3.5	0.5	65.2	15.9	13.4	3.4	2.4	0.6	3.9	0.4	31.1	9	5.5	1.8	1	0.3
2.5h	105	5	35.6	3.8	3.7	0.5	65.5	14.4	15.9	4	2.8	0.7	4.4	0.4	32.1	9.5	5.4	2.3	0.9	0.3
3h	104	5	34.9	3.8	3.6	0.5	62	13.7	15.5	3.9	2.8	0.7	3.9	0.4	30.3	8.4	6.6	2.3	1.1	0.4
3.5h	103	4	33.7	3.7	3.8	0.7	62.4	14.3	17.5	4.4	3.3	1	3.7	0.3	30.8	9.3	6.7	2.5	1.1	0.4
4h	101	5	32.7	3.5	3.5	0.4	55.7	14.2	14.8	4.4	2.6	0.8	3.9	0.4	29.3	9	6.3	2.5	1.1	0.5

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  
分担研究報告書

ペロ毒素投与による HUS 動物モデルの作成

分担研究者 本田雅敬  
研究協力者 池田昌弘、伊藤秀一、

都立清瀬小児病院腎内科  
都立清瀬小児病院腎内科

**研究要旨** LPS 感受性マウスにペロ毒素および LPS を投与し HUS モデルを作成した。HUS 発症にはペロ毒素とともに LPS が必須であった。この場合、ペロ毒素を LPS に先行して投与する必要があり、LPS を先行投与した場合は HUS を惹起出来なかった。

A. 研究目的

O157 感染に続発する溶血性尿毒症症候群 (HUS) の中心的病態はペロ毒素による血管内皮障害と考えられている。しかし、過去にペロ毒素の投与による HUS 動物モデルの作成は成功しておらずその詳細は不明である。

HUS の発症にはペロ毒素の他に Lipopolysaccharide (LPS) や、TNF、IL-1 などのサイトカインが重要であることが近年報告されている。我々は、LPS 感受性マウスを用いペロ毒素と LPS の投与による HUS モデルの作成を試みた。

B. 研究方法

方法：LPS 感受性マウス (C3H/HEN、雄性) を以下のように 5 群にわけた。

1 群：コントロール：生食腹腔内投与

2 群：ペロ毒素 (VT2) 単独投与群：VT 2 200ng を 2 日間腹腔内投与

3 群：VT、LPS 併用群<1>：1 日目 VT 2 200ng、2 日目 VT 2 200ng および LPS250  $\mu$ g を投与

4 群：VT、LPS 併用群<2>：1 日目 LPS250  $\mu$ g、2 日目 VT 2 200ng および LPS250  $\mu$ g を投与

5 群：LPS 単独群：LPS250  $\mu$ g を 2 日間投与  
いずれのマウスも 3 日目に採血後、sacrifice し両腎を摘出した。血液検査では血算、血清 BUN, LDH,

の測定をおこない、尿蛋白、尿潜血は試験紙により定性的に評価した。腎組織は HE, PAS 染色および電子顕微鏡による観察をおこなった。ペロ毒素は国立小児病院香坂隆夫先生より供与されたものを使用した。

C. 結果：(図)

3 群 (VT、LPS 併用群) のみに有意な血小板減少、BUN 上昇が認められた、LPS 投与を先行させた 4 群では有意な変化は認められなかった。

LDH 値、WBC、Hb、Ht、トロンボモデュリンはいずれの群にも変化はみられなかった。

蛋白尿、血尿は 3 群が最も顕著だった。

3 群で、電子顕微鏡にて focal な糸球体内皮細胞の剥離、腫脹、メサンギウム領域の軽度増加などが認められた。

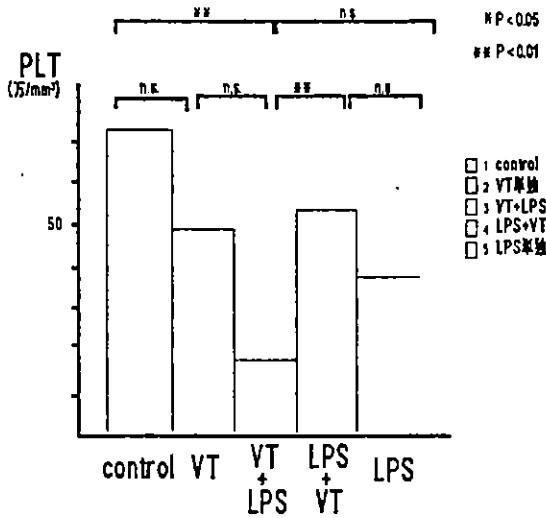
D. 考察：VT 投与単独では血液、組織とも変化が認められず、VT および LPS 併用時のみに変化が認められ、HUS の発症には LPS の存在が必須と考えられた。またこの場合でも、LPS 投与を先行させた場合には変化が認められなかった。この理由は不明だが、LPS により末梢リンパ球のペロ毒素受容体 (Gb3) の発現が増強することが知られており腎での、VT 毒性が中和された可能性が考えられ

た。

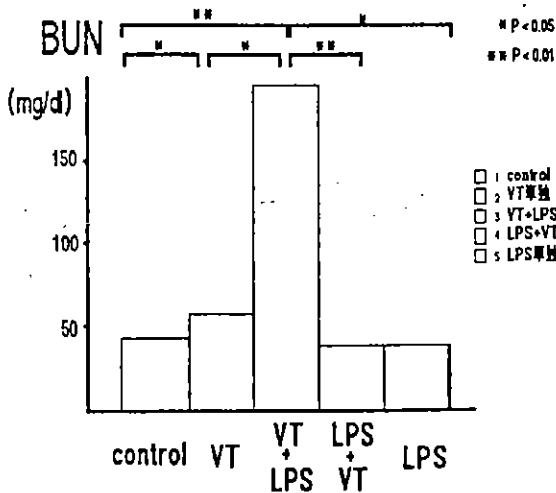
E. 結論

HUS 発症にはペロ毒素とともに LPS が必須であった。また、この場合、ペロ毒素を LPS に先行して投与する必要があり、LPS を先行投与した場合は HUS を惹起できなかった。

血小板数



血清BUN



F. 研究発表

1. 論文発表

1. 感染症と腎障害 腸管出血性大腸菌感染と HUS

本田雅敬 腎と透析 44 1998 年 3 月

2. 腸管出血性大腸炎による溶血性尿毒症症候群, 脳症の早期診断

幡谷浩史 本田雅敬 小児内科 30 1998 年 6 月

3. Ito H, Yoshikawa N, Honda M.

Recent outbreak of VTEC and HUS epidemics in Japan, in Pediatric Nephrology edited by Holiday MA, Williams&Wilkins, 1998 in press.

2. 学会発表

1. 本田雅敬 幡谷浩史

「腸管出血性大腸菌による HUS の臨床症状とその治療について」第 41 回 (平成 10 年度) 日本腎臓学会学術総会 東京、1998 年 5 月

2. 香坂隆夫 伊藤拓 本田雅敬 他

「溶血性尿毒症の臨床的検討—全国調査」第 41 回 (平成 10 年度) 日本腎臓学会学術総会 東京、1998 年 5 月

3. 上牧勇 本田雅敬 他

「溶血性尿毒症症候群の病理所見の検討」

第 33 回 日本小児腎臓病学会 横浜、1998 年 6 月

溶血性尿毒症性症候群(HUS)動物モデルの開発と病理学的解析

（分担）研究者 長田 道夫 筑波大学臨床医学系病理部

研究要旨

HUSにおける臓器障害の原因とされるベロトキシンの臓器障害機構について検討するために、ベロトキシン(VT1, VT2)を精製し、家兔免疫にて抗血清を得ることができた。これを用い、ベロトキシン受容体の種差、臓器分布などが明かとなれば、HUSの疾患表現型としての特異性についての理解が進むものと期待される。

さらに、VT2によりマウスに腎不全を惹起することができ、その病理学的解析から尿細管上皮細胞障害による尿細管壊死（アポトーシス）がその機構と思われた。この結果は従来の血管内皮細胞に加えて、VT2の標的細胞として尿細管上皮細胞あることを示唆している。

A. 研究目的

病原性大腸菌による HUS は集団発生することが多く、小児のみならず成人においても死に至る可能性のある重篤な疾患である。HUS の合併症として重要な中枢神経系の障害および腎障害は現在までのところ大腸菌が産生するベロトキシンによる細胞障害が重要な意義を持つことが明らかにされてきた。しかし、ベロトキシンがどの細胞にどのような障害を加えることにより、機能不全を伴う臓器障害が発症するのかについては不明である。ベロトキシンはその受容体を介して細胞障害に関わると考えられているものの、受容体の臓器分布、ならびに細胞内情報伝達機構については不明である。

HUS における臓器障害の治療法を開発するためには、ベロトキシンの受容体への結合を阻害することに加えて、ベロトキシンによる臓器障害の機構を明らかにする必要が不可欠である。

ベロトキシン単独投与による実験動物臓器障害モデルについては未だ成功していないのが現状である。

本研究はベロトキシンによる臓器障害機構を

検討するためにベロトキシンに対する抗体の作成、ベロトキシン投与によるマウス腎不全モデルの作成と腎障害機構について検討した。

B. 研究方法

1) ベロトキシン (VT1, VT2) の精製と各抗体の作製

VT1はDNAをpUC118をベクターとして、E.Coli (MC1601)にtransformして繁殖させた後、破碎、塩析しDEAE Sepharos,イオン交換クロマトグラフィー、HPLCを用いて純品VT1を得る。得られた毒素をトキシド化し家兔の皮内に免疫し抗VT1血清を得、この抗VT1抗血清の特異性を検討する

VT2の精製は、pCHR404をベクターをとって同様のVT1と同様の手技で純品を得る。そして、トキシド化した後、家兔に免疫しポリクローナル抗体を得て組織結合性を検討する。

2) VT2投与マウスにおける腎病変の形態学的解析

班友、香坂隆夫博士らとの共同研究として、1)の方法で純品VT1およびVT2をマウスに投与し、腎不全の病態を惹起し、その病理腎組織像からVT1,VT2の腎障害機構について

考察する。

## 実験方法

### a)VT1 投与実験プロトコール

マウス 10 匹にVT1を1回100 ng 腹腔内投与し、7 日後に屠殺。

### b)VT2 投与実験プロトコール

#### i) プロトコール1

Group1: VT2 (200 ng) 腹腔内投与群 (n=4)  
Group2: VT2 (10 ng) 静脈内投与群(n=1)  
Group3: VT2 (200 ng)腹腔内投与5日後VT2 10 ng 静脈内投与群(n=2)  
いずれも初回投与7-10日目に屠殺

#### ii)プロトコール2

Group1: VT2 静脈内 (10 ng) + 腹腔内投与 (200 ng)群(n=3)  
Group2: VT2 静脈内 (10 ng) + 腹腔内(200 ng) + neuraminidase (5U) 投与群(n=3)  
Group3:VT2 静脈内(10 ng)+ neuraminidase (5U) 投与群(n=3)  
Group4: 腹腔内投与(200 ng)群(n=3)

## C. 研究結果

### 1) ベロトキシン (VT1,VT2) の精製と各抗体の作製

上記の方法により、VT1, VT2の純品が精製できた。これをトキシド化して家兔に免疫し、抗VT1家兔血清を得た。本抗血清はオクタロニー法によりVT1に対する抗体価があることが証明された。VT2の抗血清の取得にはトキシド化の段階でやや難渋したが、抗血清は得られた。

これらの抗血清が免疫組織化学的検索に十分

使用できるために現在DE52カラムを用いてIgGを得る作業を行っている。

### 2) VT2 投与マウスにおける腎病変の形態学的解析

#### a)VT1投与実験

生化学的な腎機能の指標、腎組織学的変化は認められなかった。

#### b)VT2 投与実験プロトコール

##### i) プロトコール1

Group1とGroup2では腎機能、腎組織学的変化は軽微であり、腎症を発症したとはいえない。Group3: VT2 (200 ng) 腹腔内投与5日後VT2 10 ng 静脈内投与群において腎機能の軽度上昇に加えて尿細管に散在性にアポトーシスがみられた。

##### ii)プロトコール2

	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	蛋白尿 (定性)
A	268.5	0.54	+
B	278.2	0.68	++
C	227.5	0.71	+
D	342.5	0.7	++
E	316.3	0.58	+++
F	278.1	0.68	+++
G	177.3	0.51	++
H	194.5	0.45	+
I	236.4	0.36	++
J	36.9	0.1	-
K	27.5	0.0	-
L	23.5	0.2	-

Group1: (A, B, C)

Group2: (D, E, F)

Group3: (H, I, J)

Group4: (K, L, M)

以上から、VT2投与によりマウスに腎不全状態が惹起できることを初めて示した。それには腹腔内投与と静脈内投与を同時に組み合わせることが重要であり、さらに neuraminidase 投与による血管内皮細胞障害が VT2 の腎毒性を増強する要因であると考えられた。

腎組織学的解析は、光顕標本、電顕エポソ包埋薄切切片による観察を行った。その結果、腎機能低下を示したマウスでは尿細管の拡張、上皮細胞の剥離、アポトーシスなどが高頻度に見られ、尿細管上皮細胞の腫大や円柱などが認められた。一方、糸球体や血管系には著変はなく、電子顕微鏡的にも内皮細胞障害の所見は明かではなかった。

#### D. 考察

1) ベロトキシンの抗体作製について  
当初の目的であるVT1, VT2の精製と家兎への免疫、そして抗血清の獲得はできた。抗血清はその受容体の生体内の分布を調べるためであり、今後の研究目標は、この抗体を免疫組織化学に応用すべく、抗体の純度を高めることにある。具体的には抗血清の力価をあげるために、DE52カラムを通しIgA, IgMを吸着させてIgGを得る。VT1IgG溶液を透析、濃縮し2%のペプシンでF(ab')<sub>2</sub>とFcに切断した後、さらに濃縮し、0.1M 2-mercaptoethylamine溶液にて還元する。これに対してHRP標識を行い、Western blot, 免疫沈降で特異性を確認したのち、VT1投与したマウスの組織においてその発現、局在を確認する。

まず、マウスでの分布を調べ、剖検例を用いてヒトでの分布について検討したい。これにより、動物モデルがなぜできにくいのか、あるいは障害の表現型が何故異なるかについての考察が可能になるものと推察される。今回のベロトキシンのマウス投与実験は、これまで可能でないとされてきたベロトキシンによる臓器障害が実際に起きることを示した。さらに、VT1よりVT2に臓器障害の活性があ

ることも明かとなった。

また、VT2投与方法も腹腔内投与と静脈内投与を組み合わせることで再現性を持って腎障害を惹起できること、neuraminidase併用投与によって腎障害は増強されることから、血管内皮細胞に対する障害がVT2の臓器毒性を高めるものと推察される。

しかし、組織学的検討ではヒトHUSに見られるような血栓形成や特徴的糸球体障害像などは得られず、ヒトHUSのモデルとしての可能性は依然として十分ではない。VT2によるマウス腎不全の原因としては尿細管にしばしば見られる尿細管上皮細胞障害、アポトーシスなどが、おそらく急性尿細管壊死と同様の機序で起こるものと推察される。これらの細胞障害はin vitroの研究にも速やかに応用可能であり、VT2の細胞障害は内皮細胞に限定されない可能性が十分考えられる。そういった意味においても、抗VT2抗体を用いた全身のVT2受容体の検討は是非とも必要であり、それによって、ベロトキシンに対する毒性の臓器特異性、種差、個体差などへの理解の一助となると考えられる。

#### E. 結論

VT2投与によりマウスに腎不全が惹起できた。そのメカニズムは尿細管上皮細胞障害と考えられる。ヒトのHUS病変との違いについてはVT2受容体の分布、活性の種差などが関与する可能性があり、VT2抗血清を用いた今後の検討が待たれる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1) Fujieda M, Nagata M, Akioka Y, Hattori M, Kawaguchi H, Ito K: Antineutrophil cytoplasmic antibody-positive crescentic glomerulonephritis associated with propylthiouracil therapy. Acta Paediatr Jap 1998; 40: 286-289

2) Nagata M, Nakayama K, Terada Y, Hoshi S, Watanabe T: Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage. Am J Pathol 1998; 153: 1511-1520

3) Nagata M, Hattori M, Hamano Y, Ito K, Saitoh K, Watanabe T: Origin and phenotypic features of hyperplastic epithelial cells in collapsing glomerulopathy Am J Kidney Dis 1998; 32: 962-969

4) Nagata M, Shibata S, Shigeta M, Yu-Ming S, Watanabe T: Cyclin dependent kinase inhibitors; p27<sup>kip1</sup> and p57<sup>kip2</sup> expression during human podocyte differentiation. Nephrol Dial Transplant 1999; 14 [suppl. 1]:48-51

G. 知的所有権の取得状況  
なし。



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  
ベロ毒素による中枢神経障害発症の病態生理の解明

分担研究者 五十嵐 隆 東京大学医学部附属病院分院小児科講師

研究要旨

幼若マウスにベロ毒素 2(VT2)を投与し、四肢麻痺・痙攣を惹起させ 45-68 時間後に死亡に至らせた。病理学的検索により、脳内小動脈の血管内皮の肥厚、内皮下への浸潤、大脳皮質の神経細胞の部分的変性、小脳の出血性梗塞を認めた。また、LPS と VT2 の共投与は VT2 の致死活性を高め著しい血液凝固能の亢進をもたらした。今回の検討により、腸管出血性大腸菌感染症による中枢神経合併症は VT2 と LPS との協調作用により血管内皮細胞を肥厚させ血管内腔が狭小化し、さらに著しい血液凝固能亢進が加わり血流障害と二次的な出血を惹起することが原因であることが明らかになった。

A. 研究目的

病原大腸菌 O157 感染症の重篤な合併症である溶血性尿毒症症候群(HUS)に伴う中枢神経合併症は本症の死亡原因の主因を占める、临床上極めて重要な問題となっている。HUS における中枢神経合併症の発症機序について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

幼若マウスにベロ毒素 2(VT2)とリポポリサッカライド(LPS)を静脈投与し、中枢神経を中心に病理組織学的に検討するとともに、VT2, LPS 投与後に惹起される凝固因子、サイトカインなどのパラメーターの変動を評価した。

C. 研究結果

1) VT2 静注後 36-48 時間後にマウスは四肢麻痺、痙攣を発症し、45-68 時間後に死亡した。VT2 の致死量は 50ng/kg であった。病理学的検索により脳内小動脈の血管内皮の肥厚、内皮下への浸潤、大脳皮質の神経細胞の部分的変性、小脳の出血性梗塞が認められた。

2) VT2 と LPS をマウスに共投与したところ、

a) VT2 (致死活性 50ng/kg)あるいは LPS (致死活性 10ng/kg)の単独投与に比べ VT2+LPS の共投与は致死活性を増強し、LPS 共投与での VT2 の致死活性は単独投与の 1/10 の 5ng/kg に減量した。

b) VT2 あるいは LPS の単独投与に比べ、VT2+L の共投与は脳、腸管、肺胞内の出血梗塞を著しく惹起した。

c) 血小板減少と白血球増多が認められた。

d) 投与 1-3 時間後に血漿中の TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL6、IL10 の一過性の著しい増加が認められた。

e) 投与 12 時間後にヘパラスチン法にて凝固因子 II, VII, X 因子の総合的凝固活性が低下し、48 時間後には凝固活性は亢進した。Thrombin-antithrombin complex (TAT)レベルから見たトロンピン形成は 3 時間後に増強し、36 時間後も

正常の 2-4 倍という高値を示し、凝固活性亢進状態の持続が認められた。一方、血漿フィブリノーゲンも長時間高値に保たれていた。

f) 集合管と遠位尿細管細胞の脱落、変性が認められた。糸球体の変化は認められなかった。

g) 腎組織での tissue factor(TF)、plasminogen activator inhibitor type-1(PAI-1) mRNA の発現量が著しく増強した。一方、tissue factor pathway inhibitor(TFPI) mRNA は発現量が有意に低下した。

D. 考察

以上の結果より VT2+LPS 共投与は VT2 または LPS の単独投与に比べより著しい血液凝固能の亢進状態を招くことが明らかとなった。VT2 による血管内皮細胞の肥厚による血管内腔の狭小化に、VT2+LPS による著しい血液凝固能の亢進が加わって脳血管の血流障害と二次的な出血を惹起し、HUS における中枢神経障害を惹起させるものと推定された。また、中枢神経障害の一部には VT2 による大脳皮質の神経細胞への直接的障害性も加味されていることが推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sugatani J, Igarashi T, Shimura M, et al: Abnormalities of T-cell immune responses in mice given intravenous verotoxin 2: enhanced apoptosis in the cultured splenic T and B cells. Infect Immun (submitted)

2) Sugatani J, Igarashi T, Akihiro Miwa, 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. Throm Haemost (submitted)

3) 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)

4) 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

5) 五十嵐 隆 : 脳症・溶血性尿毒症症候群の成因 小児科診療 61: 1576-1581, 1998

6) 五十嵐隆 : 大腸菌 O157 感染症 (腸管出血性大腸菌感染症)、感染症症候群 (I) 日本臨床 (別冊) 20-21, 1999

7) 五十嵐隆 : 腸管出血性大腸菌感染症 カレントセラピー 17: 46-50, 1999

8) 五十嵐隆 : 腸管出血性大腸菌感染症 臨床医 25: 160-161, 1999

## 2. 学会発表

1) 五十嵐 隆 : VTEC-HUS の pathogenic cascade

第 41 回日本腎臓学会シンポジウム 3 (平成 10 年 5 月 12 日、東京)

2) 菅谷 純子、五十嵐 隆、水口 雅、他 : ペロ毒素 2 と LPS により惹起される血液凝固系障害 第 3 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (平成 10 年 7 月 2 日、東京)

3) 五十嵐 隆 : 腸管出血性大腸菌感染症とその合併症 第 20 回日本臨床栄養学会ワークショップ 1 (平成 10 年 11 月 5 日、東京)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

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

Stx 脳症の病態解明の研究

研究協力者 水口 雅 自治医科大学小児科

(主任研究者 伊藤 拓 国立小児病院)

研究要旨 幼弱ウサギにペロ毒素を投与し、その結果を成熟ウサギにおける結果と比較検討した。幼弱個体では急激な経過で下痢、四肢の麻痺が出現し、多くの個体が死亡した。脳の組織学的検索では脳実質内小動脈細胞の病変と脳梗塞を含む高度の障害が認められた。これらの所見は成熟マウスの反応に比して高度であり、幼弱個体の毒素易感受性を証明する所見であった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症に併発する病態のうち、溶血性尿毒症症候群と急性脳症は臨床的にとりわけ重要である。しかし脳症の病態生理には不明の点が多く、よい治療法もない。われわれは従来、ペロ毒素を成熟ウサギに静注・髄注して、脳症の動物実験モデルを作成してきた。

本年度は、ヒト脳症が幼児期に好発する事実に鑑み、幼弱ウサギにペロ毒素を投与し、その結果を成熟ウサギにおける結果と比較検討した。

なお、実験は静岡県立大学薬学部臨床薬品学教室（三輪匡男教授、菅谷純子助教授）、東京大学分院小児科（五十嵐隆講師）と共同で行った。

B. 研究方法

幼弱（4週令）、成熟の日本白色ウサギ多数を用い、2型ペロ毒素（VT2）300mg/kg を耳静脈から1回静注した。その後の臨床症状を観察し、血液、尿を検査した。種々の生存期間後に病理解剖を施行し、中枢神経系を中心に組織学的検討を加えた。この際、脳の左半分をHematoxylin-Eosin、Kluver-Barrera などの一般染色のほか、抗一本鎖 DNA 抗体による免疫染色、in situ nick-end labelling 法などの光顕レベルの検索に供した。右半分は電顕検索を行った。

C. 結果

1) 幼弱個体では、静注1-2日後に下痢が始まった。4-6日出現し、多くの個体が死亡した。血液検査上は、2-3日後に顆粒球増多、貧血、BUN 上昇が認められた。組織学的には、脳実質内小動脈を構成する細胞に核の濃縮・崩壊、壁の肥厚と内腔の狭窄などの病変が観察された。核の変化は静注1日後には既に出現し、2日後に最も顕著であった。脳血管細胞のアポトーシスに合致する変化であるので、抗一本鎖DNA抗体による免疫染色を施行したところ、血管壁に少数ではあるが陽性細胞が認められ現在 In situ nick-end labeling 法、電顕により確認中である。2日以降は血栓形成が見られるようになり、一部の個体は静注数日後に脳梗塞をきたして死亡した。脳浮腫は著明でなかったが、脊髄血管周囲には微小な出血が見られた。

2) 成熟個体では、静注3-4日後に下痢と麻痺が出現し、半数の個体が死亡した。組織学的には血管壁の軽度の肥厚が生じたが、その出現は静注2日後以降であり、核の崩壊は目立たなかった。脳梗塞を生じた個体はなかった。

D. 考察

以上の結果より、幼弱個体におけるペロ毒素静注後の脳血管病変は、成熟個体に比して、より早期から、より顕著に現れることが明らかに

なった。腸管出血性大腸菌感染症に併発する脳症が幼児期に好発する原因として、不十分な免疫のため大腸炎が重症化し、大量のペロ毒素が体内に吸収されることが推測される。さらに、本研究で得られたウサギにおける結果をヒトに外挿できるとすれば、ペロ毒素に対する脳血管の感受性が幼児期に高いため、強い循環障害を生じやすいことも推測される。

#### E. 結論

ペロ毒素に対する脳血管の感受性が幼弱期に高いことをウサギの実験系で明らかにした。このことが腸管出血性大腸菌感染症に併発する脳症が幼児期に好発する原因の一つと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1. 水口 雅

腸管出血性大腸菌感染による中枢神経合併症の治療 小児内科 30 : 777-780 1998

##### 2. 学会発表

###### 1. 水口 雅

腸管出血性大腸炎に併発する脳症とは  
第41回「日本腎臓病学会  
平成10年5月 横浜

###### 2. 菅谷純子、五十嵐隆、水口雅他

ペロ毒素2 (VT2) とLPSにより惹起される血液凝固系障害 第3回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム  
平成10年7月 東京