

平成11年度厚生科学研究

新興・再興感染症研究事業研究報告書

腸管出血性大腸菌(EHEC)感染に伴う溶血性尿毒症症候群(HUS)の病態と治療法の研究

主任研究者	伊藤 拓	国立小児病院	院長
分担研究者	山岡 完次	大阪府立病院	小児科医長
	吉岡加寿夫	近畿大学医学部	小児科教授
	上辻 秀和	奈良県立病院	小児科部長
	吉川 徳茂	神戸大学医学部	保健学科教授
	香坂 隆夫	国立小児病院	腎消化器科医長
	本田 雅敬	都立清瀬小児病院	小児科部長
	長田 道夫	筑波大学臨床医学系病理学	講師
研究協力者	五十嵐 隆	東京大学医学部附属病院分院	小児科講師
	水口 雅	自治医科大学	小児科助教授
	武林 亨	慶應義塾大学医学部	衛生学講師

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染に伴う溶血性尿毒症症候群（HUS）の病態と治療法の研究

目次	1
I 総括研究報告	主任研究者 伊藤 拓 2～6
II 分担研究報告	
1 腸管出血性大腸菌（EHEC）感染に伴う溶血性尿毒症症候群（HUS）の統計学的調査	7～9～12
山岡 完次	大阪府立病院 小児科医長
吉岡加寿夫	近畿大学医学部 小児科教授
2 腸管出血性大腸菌（O-157）感染症における凝固一線溶動態	13～14
上辻 秀和	奈良県立病院 小児科部長
3 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	15～17
吉川 徳茂	神戸大学医学部 保健学科教授
4 「HUSに関与するメデイエータ分析、HUS病態への自律神経系の関与について」	18～22
香坂 隆夫	国立小児病院 腎消化器科医長
5 HUSモデルにおける酸化的ストレスの検討	23～25
本田 雅敬	都立清瀬小児病院 小児科部長
6 溶血性尿毒症症候群（HUS）の発症病理に関する研究	26～28
長田 道夫	筑波大学臨床医学系病理学 講師
7 ペロ毒素による中枢神経障害発症の病態生理の解明	29～31
五十嵐 隆	東京大学医学部附属病院分院 小児科講師
III 総合研究報告	主任研究者 伊藤 拓 32～37

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

腸管出血性大腸菌(EHEC)感染に伴う溶血性尿毒症症候群(HUS)の病態と治療法の研究

主任研究者	伊藤 拓	国立小児病院	院長
分担研究者	山岡完次	大阪府立病院	小児科医長
	吉岡加寿夫	近畿大学医学部	小児科教授
	上辻秀和	奈良県立病院	小児科部長
	吉川徳茂	神戸大学医学部	保健学科教授
	香坂隆夫	国立小児病院	腎消化器科医長
	本田雅敬	都立清瀬小児病院	小児科部長
	長田道夫	筑波大学臨床医学系病理学	講師
	五十嵐 隆	東大分院	小児科講師
研究協力者	水口 雅	自治医科大学	小児科助教授
	武林 亨	慶大医学部	衛生学講師

研究要旨

- 1) 腸管出血性大腸菌(EHEC)感染に伴う溶血性尿毒症症候群(Stx-HUS)のデータベースを用いて平成8年度大流行時発症例の長期予後の検討、平成9年以降の通年時発症例の検討を行ない、得られた結果より診断・治療ガイドラインの改訂を行った。
- 2) ヒト HUS の進展に於ける凝固系、遺伝的要因の関与を明らかにし、拮抗因子による治療法研究への貴重な情報を得ることが出来た。
- 3) 動物実験での HUS 研究ではマウス Stx 脳症を用い幼弱個体の重症化機転を明らかにした。また Stx 脳症に対する Stx 抗体治療の効果と限界を検索した。HUS 腎症については Stx 腎症を作成し Stx の腎障害機転に関する知見を得ることが出来た。しかし、ヒト HUS 腎症に合致する糸球体病変を用い、ヒト HUS 腎症における腎障害機転の詳細を明らかにするためには、更に Stx+LPS マウス腎症、植物毒素ラット腎症の研究を進める必要がある。

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、新たな感染症予防・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。従って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(Shiga Toxin 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、メデイエータの関与、腎組織病変などを明らかにすること、③HUS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がかりをつかむ事にある。

B. 研究方法

1) 我が国における EHEC 感染症による HUS (Stx HUS) のデータベースの作成と検討

平成8年に発症した EHEC 感染に伴う HUS 患者 242 例中死亡例および成人例を除く 221 例について予後調査を行なった。回答が得られなかった症例については前回調査時の最終検査日を経過観察期間とした。平成9年・平成10年に発症した EHEC 感染症患者およびそれに伴う HUS 患者について一次調査を実施し、HUS 患者を診療したとの回答が得られた施設に対して二次調査を実施した。

2) ヒト HUS の腎・脳障害機転の検討

EHEC(O-157) HUS における凝固-線溶動態について O-157 感染症患児 26 例 (HUS は 13 例) の von Willebrand 因子(vWF)と vWF 特異的切断酵素活性、並びに内皮細胞障害、血小板活性のマーカーとされる P-セレクチンについて検討した。

PAF 分解酵素の HUS 腎障害への関与を知るため O-157 による HUS 症例の末梢白血球から DNA を抽出し、PCR 法にて PAF 分解酵素遺伝子変異の検索を行った。

小児と成人の HUS 症例腎組織における Stx の局在について Stx 抗体を用いた免疫染色法で検討した。

3) HUS 腎症と脳症の動物モデルの作成と障害機転の研究

① HUS 腎症の動物モデルとして香坂らはマウスに Stx1、Stx2、neuramidase を投与して作成した腎症の組織病変と Stx1、Stx2 モノクロナール抗体の沈着部位を検索した。池田らは LPS 感受性マウスに Stx2 と LPS を投与して血小板減少、BUN 上昇、尿異常、腎糸球体内皮細胞障害、メサンギウム障害をきたす動物モデルを作成し、組織内の SOD 活性、GSH-PX 活性、血中過酸化脂質の検討を行った。長田らは Stx2 投与マウスに於ける腎障害の組織学的検討を行った。五十嵐は Stx2 投与マウスに於ける免疫系の抑制効果を検討した。香坂らは Stx1 の腎組織障害について in vitro でのサイトカイン (TNF α 、IL-6) 発現量で検討した。

② HUS 脳症の動物モデルとして五十嵐は幼弱マウスに Stx を投与して脳症を惹起させ、組織所見の解析を行い、同時に Stx 抗体投与に

よる発症阻止効果を検討した。水口らは幼弱、および成熟ウサギに Stx を投与して脳症を惹起させ、両群の中樞神経系組織所見を比較検討した。

本研究班のデータベース作成などの調査、解析方法、研究成績の統計的評価について研究協力者 武林 亨の協力と指導を受けた。

C. 研究結果

1) 我が国における EHEC 感染症による HUS (Stx HUS) のデータベースの作成と検討

平成8年発症患者の追跡調査で発症後1年以上経過観察している症例は、135例、平均観察期間は 806 ± 171 日であった。18例で尿異常が持続し、さらに肝機能異常、神経症状の持続がそれぞれ1例ずつ認められた。しかしながら末期腎不全に陥った症例あるいは腎機能が低下した症例はなかった。経過観察が1年未満の症例は86例で、腎機能が低下した症例も尿異常が持続した症例もなかった。平成9年および平成10年の HUS 調査回答例は93例(平成9年42例、平成10年51例)であった。

殆どが O-157 による散発例で、発症年齢は $3/4$ が5歳以下であった。22例 (23.7%) で痙攣あるいは意識障害がみられ、そのうち11例 (11.8%) では呼吸管理を必要とした。さらにこれらの患児のなかで3名が死亡した。血液透析あるいは腹膜透析を必要とした症例は24例 (25.8%) であり、血漿交換療法は、10例 (11.0%) で施行され、そのうち8例は血液透析と併用されていた。調査時点では15例、16.9%で腎障害が持続していた。

2) ヒト HUS の腎・脳障害機転の検討

凝固-線溶動態の検討において HUS 急性期では非合併例に比して vWF 抗原量が増加し、血漿 vWF 切断酵素活性は低下していた。また P-セレクチン量は有意に増加していた。P-セレクチン量は凝固活性を示す TAT、内皮細胞障害マーカーである sTM と正の相関性を示していた。しかし large vWF multimer の出現は見られなかった。

PAF 分解酵素遺伝子にヘテロの変異のある患者の血中 PAF 活性は変異のない患者の 50% に低下していた。変異のある HUS 患者は変異のない患者に比し、無尿期間が有意に長く、透析を必要とする症例が有意に多かった。

HUS 症例の腎組織の検討で小児例で Stx2 が尿細管とメサンギウム領域に存在したが、成人例では尿細管のみであった。

3) HUS 腎症と脳症の動物モデルの作成と障害機転の研究

① マウスに Stx1, Stx2, neuramidase を投与して作成した腎症の組織病変では尿細管病変に加えメサンギウム細胞の増生が認められた。

Stx1, Stx2 抗体は共に尿細管のみに認められた。池田らの LPS 感受性マウスに Stx2 と LPS を投与した系では血中過酸化脂質の増加と組織内の SOD 活性、GSH-PX 活性の有意の増加が認められた。長田らの Stx2 によるマウス腎組織障害は尿細管上皮細胞の変性とアポトーシスが主たる所見であった。五十嵐らは Stx2 投与マウスで CD4+, CD8+T 細胞と B 細胞の抑制と、抗体産生能低下を認めた。In vitro の実験系で腎臓を構成する細胞は T cell, B cell に比し Stx1 に対してサイトカインの発現量で見ても感受性が高い結果が得られた。

② 五十嵐の Stx 2 投与幼弱マウスは四肢麻痺痙攣を発症し、45-68 時間後に死亡したが、Stx2 投与時に Stx2 抗体を投与すると、致死効果を除去することができた。しかし、Stx2 投与 1 時間後に Stx2 抗体を投与した場合には中枢神経正状の発症を含め予防効果は認められなかった。水口の Stx2 投与ウサギでは幼弱ウサギ脳で内皮細胞のアポトーシス、血栓形成などの病変がより著明に認められた。

D. 考察

1) 我が国における EHEC 感染症による

HUS(Stx HUS) のデータベースの作成と検討

平成 8 年に発症した HUS 患者の予後調査の結果から、急性期を乗り越えて生存した症例のその後の予後は、比較的に良好であることが再確認された。しかしながら尿異常が持続した症例は、8-10%に達しており更に注意深い経過観察が必要と考えられた。

平成 8 年以降は大流行は無いが、小規模な流行や散発例は従前通り起きていることが確認された。好発年齢も従来と同じく 5 歳以下である。しかし散発例では、平成 8 年の大流行と異なり 2-3 割の症例で中枢神経症状を呈し、透析療法を必要とする重症型であることが問題である。このことから HUS が発症したら、速やかに小児腎臓病専門医のいる病院へ転送することが必要であると考えられる。以上の検討結果を基に HUS の診断治療のガイドライン改訂版を作成した。近日中に小児腎臓専門医及び関係

機関に配布し、啓蒙を図る予定である。

2) ヒト HUS の腎・脳障害機転の検討

O-157 感染症のうち HUS 合併例の凝固-線溶系において、血中 P-セクテン量は急性期に増加し、且つ内皮細胞障害を示す sTM や thrombin 活性を反映する TAT ともよく相関したことから P-セクテンは病初期反応の結果として上昇すると予想され O-157 感染の HUS 合併の初期マーカーになりうると考えられた。vWF 抗原量が増加し、血漿 vWF 切断酵素活性が低下する理由として Vero 毒素や Cre 上昇による活性抑制も推測されるが、血小板粘着、凝集への影響を含め今後の検討課題である。

PAF 分解酵素により規定される 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障害機転を増悪させる。PAF 分解酵素遺伝子変異を持つ HUS 患児は酵素活性が低下しているため、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。今後 PAF 拮抗因子の治療応用などの可能性が示唆される。

HUS 症例の腎組織への Stx2 の局在が小児例にのみ尿細管に加えメサンギウム領域に証明されたことは、小児期に Stx2 受容体がメサンギウム領域に多く存在する事と一致する所見であり、小児期に好発する HUS の腎障害機転を示す成績と考えられる。

3) HUS 腎症と脳症の動物モデルの作成と障害機転の研究

① HUS 腎症の動物モデル作成は香坂らのマウスでの Stx1, Stx2, neuramidase 投与実験と池田らの LPS 感受性マウスに Stx2 と LPS を投与した実験が行われ、前者ではメサンギウム病変を、後者では部分的な内皮細胞障害まで惹起し得たが、ヒト HUS と合致する広範な内皮細胞障害、血栓形成を作る事は出来なかった。この不十分な動物モデルを用いての研究ではあるが病因の一つである Stx の腎尿細管障害機転についてより多くの知見を得ることが出来た。更に HUS に於ける腎障害機転について腎組織細胞が Stx に反応しサイトカインを過剰に産生すること、腎障害時に生体の防御系(抗酸化酵素の増生)を上まわる過酸化脂質の増加が起きていることを明らかに出来た。従って今後はこれらの病態に対し抗サイトカイン療法、抗酸化酵素療法の可能性を探る事が次の課題と考えられる。同時により適切な実験系を検索することが重要な課題であるが、最近、吉川らは共同

研究者の Taylor が作成したラット植物毒素腎症がヒト HUS 腎症に極めて類似していることを追試確認している。従って今後はこの系を含めより適切な実験系を作成し、ヒト HUS 腎症の発症機転の解明、治療法の開発を進める。

② 実験脳症の研究に於て、Stx2 マウスの脳症が幼弱個体で重症化することを水口らは組織学的にも証明し、幼児期ヒト Stx 脳症の重症化に、不十分な免疫のため大腸炎が重症化し大量の Stx が体内に吸収されることに加え、Stx に対する脳血管の感受性が高いことが関与していると考えられる。五十嵐らは Stx2 マウス脳症に対する Stx2 抗体の効果を検討したが、Stx2 が体内に入った後で Stx2 抗体を投与しても脳症防止効果は認められなかった。従ってヒト HUS においても Stx2 抗体による発症防止効果は O-157 感染の極めて早期に使用しない限り期待できないと考えられる。

E. 結論

1) Stx HUS の経時的全国調査により、平成 8 年度大流行症例の長期予後が比較的良好であることが確認された。一方、平成 9 年度以降の散発発症は頻度は低いが重症例が多いことが判り、適切な治療の必要性が再認識された。これらの成績を基に小児腎臓病専門医の啓蒙のためにガイドラインの改訂、配布を行なう。

2) ヒト HUS の検討で、複雑な凝固系関与の一部ではあるが、vWF の関与などについて治験を得ることが出来た。更に PAF 分解酵素異常が HUS の進展に関与することが明らかになり、今後これらの拮抗因子の治療応用が期待される。

3) HUS 腎症の動物モデルは現在、未完成であるが、LPS 感受性マウス、植物毒素によるラット腎症で、次年度にはヒト HUS 腎症の類似モデルを作成することが可能と考えている。

本年度研究でも既存のモデルを用いて HUS の腎障害機転について幾つかの治験を得ることが出来た。更により適切な動物モデルの使用が可能となれば、今後はこれらの病態に対し抗サイトカイン療法、抗酸化酵素療法の可能性を探る事が次の課題と考えられる。

HUS 脳症については Stx マウス脳症の系を確立しており、本年度は幼弱者の重症化要因の解明、Stx 抗体治療の限界について知見を得ることが出来た。

EHEC-HUS は大流行が過ぎた現在でもな

お散発例が続発しており、幼児期の脳症、腎不全の重要な原因疾患であるため、本研究の如き疫学的監視と、病態の解明、治療法の研究を忍耐強く、精力的に続けることが重要と考える。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. 伊藤 拓, 吉岡加寿夫 溶血性尿毒症症候群 - E.Coli 0157 感染に伴う HUS について - 日本透析会誌 30 : 27-33 1997
 2. 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
 3. Ito H, Yoshikawa N, Honda M Pediatric nephrology around the world. Recent outbreak of VTEC and HUS epidemics in Japan, in Pediatric Nephrology edited by Harmon WE, Barratt TM, Avner ED, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 1999 p.1354-1357
 1. Morita S, Sakai T, Yoshikawa N et al Hemolytic uremic syndrome associated with immunoglobulin A nephropathy. Intern Med 38:495-499 1999
 2. Yoshioka K, Yagi K, Moriguchi Clinical features and treatment of children with hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection: Experience of an outbreak in Sakai City 1996. Pediatr Int 41:223-227 1999
 6. 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 Pediatrics 135: 768-769 1999
 7. Xu H, Iijima K, Yoshikawa N et al Platelet-activating factor acetylhydrolase mutation in Japanese children with HUS. Am J Kidney Dis in press
 8. Kamitsuji H, Nonami K, Murakami T et al Elevated tissue factor circulating levels in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin producing E-coli. Clinical Nephrol in press
- ##### 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 1998 年 6 月
 2. Yamaoka 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 1998年9月

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 1998年11月
4. Kamitsuji H, Nonami K, Murakami T et al
Elevated tissue factor circulating levels in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin producing E-coli.
XVth Congress of Nephrology May 2-6 1999 Buenos Aires, Argentina
5. 上辻秀和、石川直子、野波一馬他
尿毒症症候群 (HUS) における血中 von Willebrand factor、血小板活性の検討
第34回日本小児腎臓病学会 新潟市 1999年5月
6. 上辻秀和、野波一馬、村上智彦他
腸管出血性大腸 (O-157) 感染及び溶血性尿毒症症候群 (HUS) における血中 Tissue factor (TF) の動態
第42回日本腎臓学会総会 横浜市 1999年6月
7. 八木規子秀男、朴永東、上辻秀和他
腸管出血性大腸菌 (E.coli O157) 感染患者における von Willebrand 因子切断酵素の測定
第22回日本止血学会 宇都宮市 1999年12月

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(EHEC)感染に伴う溶血性尿毒症症候群(HUS)の病態と治療法の研究班
腸管出血性大腸菌(EHEC)感染に伴う溶血性尿毒症症候群(HUS)の統計学的調査
分担研究者 山岡完次 大阪府立病院 小児科医長
吉岡加寿夫 近畿大学医学部 小児科教授

研究要旨 平成8年に発症した腸管出血性大腸菌(EHEC)感染に伴う溶血性尿毒症症候群(HUS)242例中死亡例および成人例を除く221例について予後調査を実施すると共に、平成9年・10年に発症したEHEC感染に伴うHUSの症例について、調査を実施した。その結果、腎機能が低下している症例は皆無であり、22例(10.0%)で尿異常が持続していた。神経学的異常が残存した症例は2例であり、肝機能異常が持続した症例は1例であった。残りの196例(88.7%)は、回復していた。平成9年・10年に発症したHUSの症例は、計93例であった。散発例が多く、起因菌は、O-157が大半であった。5歳以下が多く、死亡例が3例認められた。中枢神経症状は22例でみられ、透析を必要とした症例は24例であった。大流行は認められなかったが、低年齢が多く、重症の頻度も高いと考えられた。

A. 研究目的

平成8年に発症した前回調査対象のEHEC感染に伴うHUS発症患者の追跡調査することにより比較的長期予後についての実態を把握する。

さらに、大流行のあった平成8年以降の平成9年・平成10年でのEHEC感染に伴うHUSの症例の実態について調査検討する。

B. 研究方法

1) 平成8年に発症したEHEC感染に伴うHUS患者242例中死亡例および成人例を除く18歳未満の221例について回答のあった施設に予後調査票を送付した。さらに、転院した症例については、転院先の施設にも調査表を送付した。回答が得られなかった症例については、前回調査時の最終検査日を経過観察期間とした。

2) 日本小児腎臓病学会会員に対して平成9年・平成10年に受診したEHEC感染症患者およびそれに伴うHUS患者について一次調査を実施し、HUS患者を診療したとの回答が得られた施設に対して二次調査を実施した。

C. 研究結果

1) 平成8年発症患者の追跡調査

発症後1年以上経過観察している症例は、135例あり平均観察期間は、 806 ± 171 日(374~1101日)であった。不完全型HUSは45例でありそのうち7例で尿異常(蛋白尿あるいは血尿)が持続していた。完全型HUSでは、90例中11例で尿異常が認められ、さらに肝機能異常(胆管結石)や神経症状(視野狭窄)の持続が認められる症例がそれぞれ1例ずつ認められた。しかしながら末期腎不全に陥った症例あるいは腎機能が低下した症例はなかった。

経過観察が1年未満の症例は、86例であるが大部分の症例は、軽快しているとされ医

療機関での経過観察が中止されていた。平均経過観察期間は、 $118+107$ 日（15～353日）であった。一部の症例では、追跡調査が不能であった。不完全型 HUS 50 例中の 4 例で尿異常が調査終了時点で持続していたが、退院後の経過観察がなされなかった症例である。完全型 HUS 36 例では、腎機能が低下した症例も尿異常が持続した症例もなかった。1 例で脳波異常が残存していたが、その後の経過観察の報告がなかったため不明であった。

2) 平成 9 年および平成 10 年 HUS 患者に対する調査

小児腎臓病学会会員を対象に 1 次調査を実施したところ、409 施設から回答が得られた。そのうち、79 施設で HUS 症例を経験しており、平成 9 年のべ 70 例、平成 10 年のべ 75 例の報告がなされた。これらの施設に対して 2 次調査票を送付した結果、59 施設から回答が得られた。

回答のあった施設での EHEC による HUS 症例は計 93 例（平成 9 年 42 例、平成 10 年 51 例）であった。完全型 HUS 75 例、不完全型 HUS 16 例、不明 2 例（転院のため詳細不明）であった。起因菌が不明であった 16 例を除くと大部分の症例（74 例、96.1%）は O-157 感染症であり、発生原因も散発例が大半（89 例、95.7%）であった。年齢分布は、平成 8 年を除く従来の報告と同様に 5 歳以下が、73 例 78.5% であった。発生月は、1 月から 12 月までみられたが、6-8 月の夏季に 43 例 46.2% と比較的集中していた。

HUS 症例のなかで 22 例（23.7%）で痙攣あるいは意識障害がみられ、そのうち 11 例（11.8%）では呼吸管理を必要とした。さらにこれらの患児のなかで 3 名が死亡した。

HUS 発症前から抗生剤を投与されていた症例は 93 例中 59 例（64.0%）であった。抗生剤としては FOM が大部分であった。HUS 発症後のデータおよび治療について記載のある 91 例で集計したところ、抗 DIC 療法を施行されていた症例は、48 例（52.7%）、ハプトグロビン療法は、24 例（26.

4%）、ビタミン E 療法は、5 例（5.4%）、PGI₂ 療法は、2 例（2.2%）、抗血小板剤は、32 例（35.2%）、 γ グロブリン製剤は、33 例（36.8%）で使用されていた。

血漿交換療法は、10 例（11.0%）で施行され、そのうち 8 例は血液透析と併用されていた。血液透析あるいは腹膜透析を必要とした症例は 24 例であり、完全型 HUS 75 例中の 32% であった。

調査時点では、92 例中 3 例が死亡していた。70 例が軽快しているが、腎機能が低下したままの症例は 4 例、尿異常が残存する症例は 11 例みられ、計 15 例 16.9% で腎障害が持続していた。他には、貧血、胆石、脳波異常、神経障害がそれぞれ 1 例づつ見られた。残りの 1 例は、経過が不明であった。

D. 考察

平成 8 年に発症した HUS 患者の予後調査の結果から、急性期を乗り越えて生存した症例のその後の予後は、従来から比較的的良好であるとされていたが、今回の調査では腎機能の低下した症例はなかったことから再確認された。しかしながら尿異常が持続した症例は、8-10% に達しており更に注意深い経過観察が必要と考えられた。他の異常が残った症例は 3 例（1.4%）認められた。症例数は少ないが、これらの後遺症についても今後さらに追跡調査が必要であろう。

平成 8 年に大流行がみられたため、平成 9 年以降は大流行はみられていない。しかしながら、小規模な流行や散発例は従前通り見られていることが確認された。大流行がなければ、通常 EHEC に伴う HUS 症例は、5 歳以下に発生することが多く、O-157 によることが多い。散発例では、完全型 HUS の症例が多く、その 2-3 割の症例で中枢神経症状を呈し、透析療法を必要とすることが判明した。このことから HUS が発生したら、速やかに小児腎臓病専門医のいる病院へ転送す

ることが必要ではないかと考えられる。

また、これまでの調査結果から血漿交換療法の有効性がないことがわかり、報告してきたためか、平成8年の症例に比較し、重症患者のみにやむを得ず施行しているような傾向がみられていた。

E. 結論

EHECに伴うHUSは、大流行を除くと、通常5歳以下に発症し、重症化しやすい。また、死亡率も5%以下に低下しているが、早期治療によりさらに救命する可能性が残っている。

急性期を乗り越えると比較的予後が良好なことが多くさらに治療法の開発が望まれる。

「腸管出血性大腸菌感染に伴う溶血性尿毒症症候群 (HUS) の診断・治療のガイドライン」

日本小児腎臓病学会 (平成12年4月改定)

[1] 診断

HUS は、主に志賀毒素 (Stx) によって惹起される血栓性微血管障害で、臨床的には以下の3主徴をもって診断する。

A. 3主徴

1. 溶血性貧血 (破碎状赤血球を伴う貧血で Hb10g/dl 以下)
2. 血小板減少 (血小板数 10 万/ μ l 以下)
3. 急性腎機能障害 (血清クレアチニン濃度の年齢別基準値の 97.5% 値以上の上昇があり、かつ、各個人の通常時の血清クレアチニン濃度の 1.5 倍以上の上昇 (同一施設での測定))

B. 随伴する症状

1. 中枢神経症状：意識障害、痙攣、頭痛など。HUS 発症直後に急性脳症を合併することがある。
2. その他：肝機能障害 (トランスアミラーゼの上昇)、肝内胆管・胆嚢結石、膵炎を合併することがある。

<参考> 日本人小児の臨床検査基準値 (小児基準値研究会編) による血清クレアチニン濃度の 97.5% 値 (mg/dl, Jaffe 法)

年齢(歳)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
男	0.6		0.7						0.8				0.9		1.0		1.1
女	0.6		0.7		0.8							0.9			1.0		1.1

尚、Jaffe 法による測定結果は、酵素法による測定結果よりも 0.1-0.2 mg/dl 程度高値であるといわれている。

●HUS は下痢あるいは発熱出現後 4～10 日に発症することが多い。

●HUS を疑わせる症候としては乏尿、浮腫、出血斑、頭痛、傾眠、不穏、痙攣、血尿・蛋白尿などがある。

●HUS 重篤化の因子 (リスクファクター) として下記の検査項目が挙げられる。

腸管出血性大腸菌感染症時；白血球数の増加

HUS 発症時；白血球数の増加 (20,000/ μ l 以上)、低 Na 血症 (130 mEq/l 未満)、低蛋白血症 (5.0 g/dl 未満)、AST(GPT)の上昇 (100 IU/l 以上) などで重篤化。

また、HUS 発症時から、クレアチニン濃度が 2.0 mg/dl 以上の症例は、早期に血液浄化療法 (血液透析あるいは腹膜透析) が必要になる可能性が高い。

●三主徴が揃うもの (完全型 HUS) と揃わないもの (不完全型 HUS) がある。

<注意事項>

(1) 血小板数の急激な変動と血小板数の算定方法による違いに注意 (自動血球算定器では実際の値よりも多く算定される可能性がある)。

(2) 大腸炎の重症化 (腸穿孔、腸狭窄、直腸脱、腸重積) にも注意する。

[2] 治療

HUS の治療には支持療法と特異的治療法とがあるが、HUS の治療法の基本は支持療法である。

A. 支持療法

1) 体液管理

(1) 輸液

●水、電解質の管理を厳重に行う。

●乏尿・無尿期には強い脱水は少なく、むしろ過剰輸液による溢水 (容量負荷)、高血圧、低ナトリウム血症に注意する。

●高カリウム血症の場合と低カリウム血症の場合がある。低カリウム血症に対してはカリウムの補充を行う。

●低蛋白血症に対してアルブミン製剤の投与を行う場合には溢水に注意する。

(2) 透析

絶対的適応：

- 乏尿（10 ml/m²/時間以下）、無尿のある時
- 他の方法でコントロールできない溢水、高血圧、電解質異常、アシドーシス

透析の中止時期：利尿のみられた時（あるいは利尿剤に反応する時）

方法：施設によって慣れた方法を用いるが、一般的には次の方法が選択される。

- 年長児：血液透析(HD)または腹膜透析(PD)
- 乳幼児：腹膜透析(PD)

透析施設への転院時期：HUSが発症した場合は、急速に進行する恐れがあることから、HUS発症後はすみやかに血液浄化療法が行なえる施設にコンサルトすることが望ましい。

2) 高血圧に対する治療

HUSに伴う高血圧は溢水によることが多い。

フロセミド（ラシックス、1~2mg/kg/回を使用し、反応しない場合は透析を考慮する）、または、カルシウム拮抗剤（透析中は血圧低下に注意して使用する）。

3) 輸血

貧血の急激な進行、血小板の急激な減少に注意し、急性期には1日2回の血球算定を行う。輸血による溢水や高血圧に注意する。

赤血球輸血：Hbを6g/dl以上に維持するように輸血する。

血小板輸血は：出血傾向のある時、外科的処置の前に行う。

4) 脳症に対する治療

● 痙攣に対しては、ジアゼパム（セルシン）、ジフェニルヒダントイン（アレピアチン）を静注し、もし無効であれば呼吸管理下にチオペンタール（ラボナール）などの麻酔薬を使用する。

● 脳浮腫に対しては、除水、グリセオール投与（ただし、溢水状態を悪化させる可能性があるので注意して使用する）や透析を行う。

（小児神経科医のコンサルトを求めることが望ましい）

5) DICに対する治療

DICの診断基準を満たす場合は、メシル酸ナファモスタット（フサン）、メシル酸ガベキセート（

FOY）、ウリナスタチン（ミラクリッド）、アンチトロンビンⅢ製剤などを使用する。

6) 中心静脈栄養

1週間以上絶食例には考慮する。

B, 特異的治療法

以下の治療法は試験段階のもので、「腸管出血性大腸菌によるHUS」に対しての有効性は現時点では確立されていない。

1) 血漿交換療法

HUSの進展（腎機能障害など）の阻止に対する有効性は認められない。中枢神経症状・急性脳症に対する効果は、現在のところ不明である。血漿交換療法を行う場合は、溢水状態の悪化を防ぐために透析の併用を行うのが望ましい。

2) γ-グロブリン製剤

HUSの進展（腎機能障害、血小板減少など）の阻止効果は、認められない。

3) 抗生剤

HUSを発症している時期では一般的には使用しない。

4) 抗血小板剤、プロスタグランدينI₂ (PGL₂)

、血漿輸注、ビタミンE、ハプトグロビン

腸管出血性大腸菌によるHUSでの有効性は証明されていない。

[3] 経過観察の指標

1) 尿検査および腎機能検査

尿蛋白、尿β₂MG、クレアチニン・クリアランス、血圧、（DMSAシチ）

2) 腎生検

適応：● 長期に無尿の持続していた例。

● 回復期においても中等度以上の蛋白尿や腎機能低下、あるいは高血圧の持続する例。

時期：回復期に施行。

予後判定の指標：硬化糸球体、血管病変、腎皮質壊死の有無と程度。

3) 神経系検査

脳波、CT、MRI、（眼底所見）

（中枢神経症状のあった例には少なくとも1回は行うのが望ましい）

平成 8 年大流行発生時に診断・治療ガイドラインを日本小児腎臓病学会が作成したが、全国調査の結果により若干の見直しが必要と思われたため今回の改訂版を作成した。

本ガイドラインについてのお問い合わせは日本小児腎臓病学会事務局にお願い致します。

〒154-8509 東京都世田谷区太子堂 3-35-31

国立小児病院内

日本小児腎臓病学会事務局

電話 03-5430-5891

FAX 03-5430-5892

e-mail jspn@nch.go.jp

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

主題：腸管出血性大腸菌（O-157）感染症における凝固一線溶動態

分担研究者 上辻秀和 奈良県立奈良病院小児科部長

研究要旨：O-157感染症における凝固一線溶能を von Willebrand 因子(vWF)と vWF 特異的切断酵素、およびP-セクチンを中心に検討した。HUS 急性期の vWF 抗原量は非合併例に比して有意に増加し、vWF 切断酵素活性も有意に低下していた。この酵素活性は HUS 回復期には上昇していた。しかし自己抗体は全例陰性であった。血小板活性および内皮細胞障害のマーカーとなる P-セクチンも病初期には増加し内皮細胞障害と血小板活性を反映すると思われた。

A. 研究目的

O-157 感染症における HUS 発症にはペロ毒素による血管内皮細胞障害と血小板凝集が重要である。vWF は障害血管壁への血小板粘着、凝集に不可欠な糖蛋白である¹⁾。他方、vWF 切断酵素は vWF を特異的に切断し、血小板との反応性を調節していると考えられ²⁾、反復性の thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)や HUS では un-usually-large vWF multimers の出現とともに本酵素活性の低下、欠損が報告³⁾されている。今回、O-157 感染症における vWF と本酵素活性、並びに内皮細胞障害、血小板活性のマーカーとされる P-セクチン⁴⁾について検討した。

B. 対象および方法

対象は O-157 感染症患児 26 例で HUS は 13 例に認められた。vWF 切断酵素活性は protease-free の純化 vWF と BaCl₂ を尿素緩衝液に溶解し、希釈正常もしくは患者血漿を混和、37°C 24 時間反応後、SDS-agarose gel 電気泳動、western blot, ルミノグラフィーを行い、vWF multimer の消滅度でもって酵素活性を測定した。正常ヒト血漿中の酵素活性を 100%と設定した場合、本法の測定限度は

ほぼ 3%であった。血中の vWF 抗原量、P-セクチン、thrombin-antithrombinIII complex (TAT) および soluble thrombomodulin(sTM)はいずれも EIA Kit にて測定した。結果は平均値±標準偏差で表わし 2 群間の検査は Student's t-test で行い、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

26 例中 HUS は 13 例に認められた。HUS 急性期の P-セクチン量は非 HUS 例、対照に比して有意に増加し (215.3±116.0vs96.1±17.1, 75.8±13.9ng/ml, p<0.005), 回復期には正常域に復していた (Table 1)。P-セクチン量は凝固活性を示す TAT, 内皮細胞障害マーカーである sTM と正の相関性 (p<0.05, p<0.01)を示していた (Figure1)。しかし血小板数や血清 Cre とは相関性はなかった。

HUS 急性期の vWF 抗原量は非合併例に比して有意に増加し (175.8±62.4vs82.8±33.2%, p<0.01) 血漿 vWF 切断酵素活性も

(34.3±17.6vs65.0±16.4% p<0.005)低下していた (Table 2)。この酵素活性は 回復期に

は上昇していた。また自己抗体は 全例 陰性であった。VWF multimer pattern でも large vWF multimer の出現は見られなかった。

D. 考察

O-157 感染症のうち HUS 合併例の血中 P-セレクチン量は急性期に増加し、且つ内皮細胞障害を示す sTM や thrombin 活性を反映する TAT ともよく相関していた。このことは HUS 急性期の P-セレクチンは病初期反応の結果として上昇すると予想され O-157 感染の HUS 合併の初期マーカーになりうると考えられた。vWF 抗原量も HUS 合併例において増加していたが vWF multimer 構造に異常は見られなかった。再発性の TTP ではしばしば異常 vWF 構造である large multimer の出現が報告され、それによる血小板粘着、凝集の増加が主因と考えられている。large multimer の出現機序については不明であったが 1996 年、Furlan et al が vWF 切断酵素の存在を発表し、再発型 TTP の病態との関連が注目されるようになってきた。今回、O-157 感染症における本酵素活性を測定したが、本酵素の低下が HUS 合併例の急性期に認められ病勢の回復とともに上昇していた。O-157 感染症の HUS 急性期における低下機序については、Vero 毒素や Cre 上昇による活性抑制も推測されるが今後の検討課題である。O-157 感染症での HUS 合併例のなかには本酵素の潜在性の低下例も存在すると予想され、今後、本因子の完全純化や遺伝子レベルでの検討に待ちたい。

E. 結論

O-157 感染症の HUS 発症、進展には vWF と vWF 切断酵素活性の関与が示唆された。また血中 P-セレクチンは HUS 病初期の病勢を反映すると思われた。

F. 文献

- 1) Weiss HJ et al. Decreased adhesion of giant (Bernard-Soulier) platelets to subendothelium. Further implications on the role of the von Willebrand factor in hemostasis. Am J Med 57:920, 1974.
- 2) Furlan M et al. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. Blood 87:4223, 1996.
- 3) Furlan M et al. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 89:3097, 1997.
- 4) McEver RP. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. Blood Cells 16:73, 1990.

G. 論文発表

- 1) Hidekazu Kamitsuji et al.,: Plasma P-selectin in children with hemolytic uremic syndrome caused by escherichia coli O157:H7. J Nara Med Ass 50:515, 1999.

H. 学会発表

- 1) 八木秀男、上辻秀和 他：腸管出血性大腸菌 (E. coli O157) 感染患者における von Willebrand 因子切断酵素活性の測定。第 22 回日本血栓止血学術集会。平成 11 年 12 月 2 日 宇都宮市
- 2) 上辻秀和 他：VTEC O-157 腸炎および溶血性尿毒症症候群 (HUS) における血中 von Willebrand factor, 血小板活性の検討。第 34 回日本小児腎臓病学会学術集会。平成 11 年 5 月 26 日。新潟市

Table 1. Platelet counts and P-selectin plasma concentrations in children with E.coli O157:H7 infection and the controls.

	HUS		Non-HUS	Control subjects
	Acute stage	Recovery stage		
Platelet counts ($\times 10^4 / \text{mm}^3$)	n = 13	n = 11	n = 13	n = 10
Median	6.44 \pm 2.3*	28.5 \pm 11.1	32.0 \pm 9.3	28.8 \pm 3.8
Range	3.4 ~ 10.0	13.0~ 50.0	15.0 ~ 48.0	21.0 ~ 36.0
P-selectin (ng / ml)	n = 13	n = 11	n = 13	n = 10
Median	215.3 \pm 116.0*	112.1 \pm 42.3	96.0 \pm 17.1	75.8 \pm 13.9
Range	83.0 ~495.0	33.0 ~ 170.0	66.0 ~ 118.0	55.0 ~ 98.0

* p<0.005 vs non-HUS or control subjects

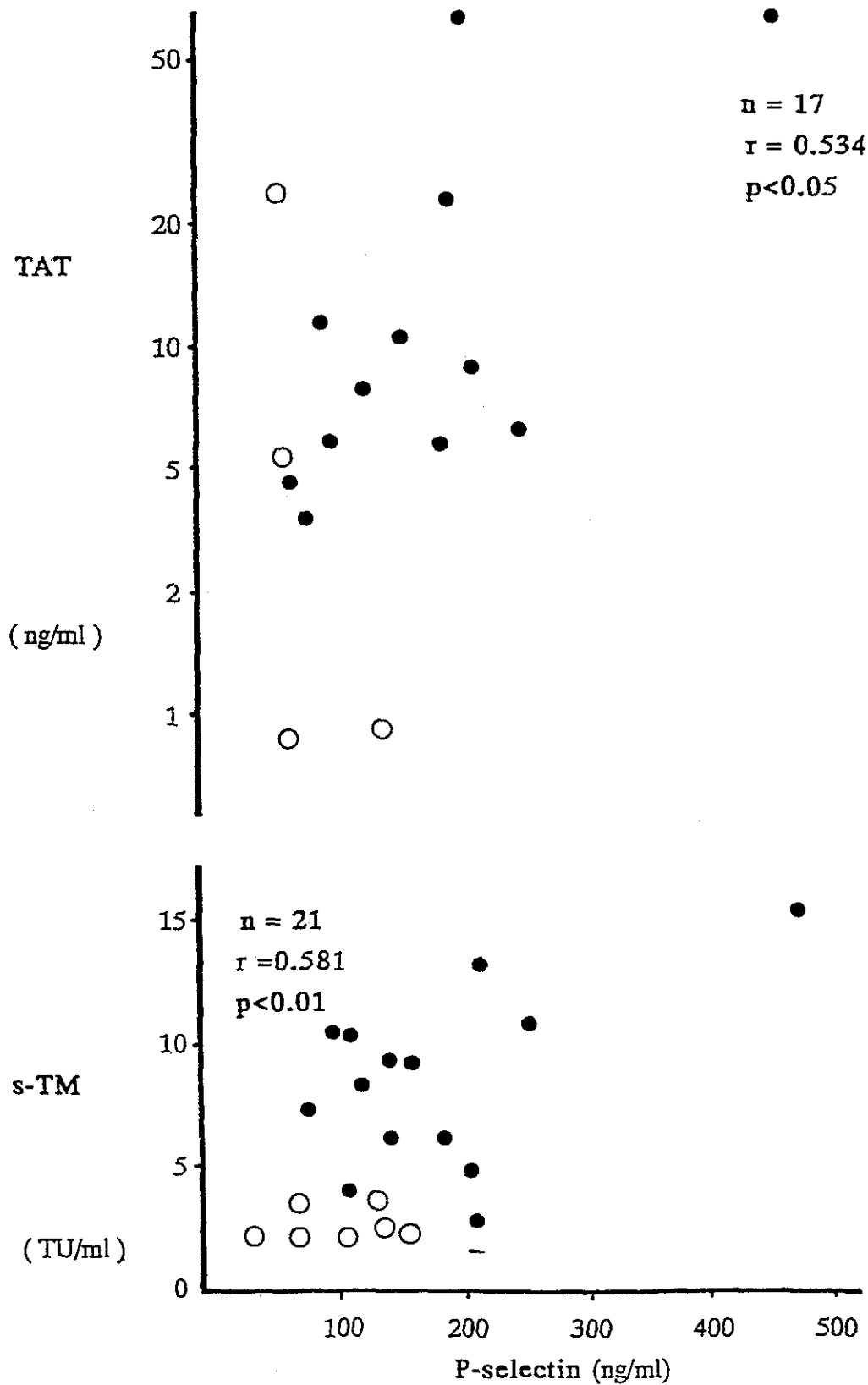


Figure 1. Relationship between P-selectin and thrombin antithrombin III complex(TAT) or soluble thrombomodulin(sTM) in HUS patients.

● :Acute phase, ○:Recovery phase

Table 2. Plasma concentration of vWF and vWF-protease activity of patients with E.coli O-157 infection

	HUS (+)	HUS (-)	
vWF antigen	n=8	n=8	
(%)	175 + 8	82.8 + 23.2	p<0.01
	118 ~ 267	62 ~ 160	
vWF-protease	n=8	n=8	
activity	34.3 + 17.6	65 + 16.4	p<0.005
(%)	5.8 ~ 62	48 ~ 100	

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、無尿期間が有意に長く、透析を必要とする症例が有意に多く、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 (Table 1, 2)

ホモの遺伝子変異はなく、ヘテロの遺伝子変異 (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 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、無尿期間が有意に長く、透析を必要とする症例が有意に多かった (73 vs 37%, $p=0.03$)。

変異のない患者は全例腎機能正常化したが、変異のある患者では 2 例が現在も腎機能低下を示している。

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 の腎病変の進展に参与する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

- 2) 吉矢邦彦, 吉川徳茂他: 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: 483-489, 1997
- 3) Xu H, Yoshikawa N et al: Platelet-activating factor acetylhydrolase gene mutation in Japanese nephrotic children. *Kidney Int* 54: 1867-1871, 1998
- 4) Tanaka R, Yoshikawa N et al: Role of platelet-activating factor acetylhydrolase gene mutation in Japanese childhood immunoglobulin A nephropathy. *Am J Kidney Dis* 34:289-295, 1999
- 5) Morita S, Yoshikawa N et al: Hemolytic uremic syndrome associated with immunoglobulin A nephropathy: a case report and review of cases of hemolytic uremic syndrome with glomerular disease. *Intern Med* 38: 495-499, 1999
- 6) Xu H, Yoshikawa N et al: Platelet-activating factor acetylhydrolase mutation in Japanese children with HUS. *Am J Kidney Dis* In press