

**Table 1.** Genotypes and allele frequencies of the platelet-activating factor acetylhydrolase gene in controls and patients with hemolytic uremic syndrome

	n	Genotype			Allele	
		GG	GT	TT	G	T
Controls	100	69(69%)	30(30%)	1(1%)	0.84	0.16
Patients with hemolytic uremic syndrome	50	35(70%)	15(30%)	0	0.85	0.15

**Table 2.** Clinical characteristics of patients with hemolytic uremic syndrome according to the genotype at position 994 of the platelet-activating factor acetylhydrolase gene

Genotype	GG (n=35)	GT (n=15)	P
Age at onset (year)	6.3 ± 3.3	5.8 ± 3.1	0.64
M/F	17/18	9/6	0.54
Plasma PAF acetylhydrolase activity (nmol/min/50 ml)	1.79 ± 0.38	0.86 ± 0.30	<0.0001
Neutrophil count at onset (/μl)	7300 ± 4100	6400 ± 2200	0.89
Minimum hemoglobin (g/dl)	6.6 ± 1.4	6.4 ± 2.0	0.40
Minimum platelet count (x10,000/μl)	3.0 ± 2.0	2.3 ± 1.4	0.28
Maximum blood urea nitrogen (mg/dl)	55.7 ± 32.8	67.1 ± 33.9	0.48
Maximum serum creatinine (mg/dl)	2.5 ± 2.2	2.7 ± 2.0	0.31
Duration of oligoanuria (days)	4.2 ± 6.4	10.9 ± 8.1	0.012
Patients requiring dialysis	13 (37%)	11 (73%)	0.03
Patients with seizures	12 (34%)	3 (20%)	0.72

\*For categorical variables the p values were based on Fisher's exact test. The p values for continuous variables were based on Mann-Whitney U-test.

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候群の病態と治療法の研究  
分担研究報告書

「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」

国立小児病院腎消化器科 香坂 隆夫

研究要旨 志賀毒素(stx)の毒性については、臨床的には溶血性尿毒症を引き起こすことによって確立されたと考えられているが、実際、stx が溶血性尿毒症の病態の特徴である血栓形成による腎炎、脳症を引き起こす事が出来るか否かについては明らかでない。これらの病態を解明するために、in vitro、in vivo の系で実験を行った。In vivo の系では、マウスを用いてピーズに吸着させた stx を投与することにより、尿細管の変化をノイラミダーゼを併用することによって糸球体の変化を引き起こすことが可能であった。さらに、臓器内の分布を調べたところ、急速に不活化されており、腎尿細管に認められる stx については、今後検討が必要と考えられた。In vitro の系では、stx による炎症性サイトカインの誘導を確認し、これらの細胞の活性化が発症に関与していることが示唆された。今後は、これらのサイトカインと stx の関連から血栓形成の機序を解明していきたい。

A. はじめに

病原性大腸菌 O-157 は、流行を見るが、とくに、埼玉の白鷺幼稚園、堺の給食を介しての流行などが記憶に新しい。これらの流行の死亡例は、溶血性尿毒症に移行した例が大部分であり、出血性大腸炎のみによる死亡例は少ない。したがって、本症そのものよりも、溶血性尿毒症への移行を如何に阻止するかが本治療の問題となり、とくに、溶血性尿毒症の原因となる志賀様毒素（ペロ毒素: Stx）の存在が重要となる。O 157 が特に恐れられるのも Stx I、II とくに Stx II の産生菌が認められるためである。臨床的に溶血性尿毒症への移行は、年齢依存型があり個体例の条件も大きく関与していること、しかも、その移行の率は 10% 程度であり、実際に統計的に有意差を得るには多数例が必要であり検討が非常に難しくことがあげられる。この

ように病原性大腸菌 O-157 が産生する志賀毒素 (Stx) が溶血性尿毒症の発症に関与していることは疫学的に明らかにされているが、Stx が直接的に溶血性尿毒症とくに血管炎あるいは血栓形成を介して臓器障害を生じるか否かは明らかでない。実験モデルに関しても Stx 投与により明らかな血栓形成に成功した報告はない。我々はマウスに Stx を投与し、Stx の臓器障害について検討したのでその結果について報告する。また、モノクロナール抗体を作成し臓器分布や腎組織への沈着について調べ、その意義について調べた。In vitro の stx の作用と比較し stx の腎炎発症の役割について明らかになった点を報告する。また、モノクロナール抗体を作成し、臓器分布や腎組織への沈着について調べ、その意義について調べた。In vitro の stx の作用と比較し、stx の腎炎発症の役割について明らかになった

点を報告する。

## B. 実験方法

動物は、6週令雌 Balb/C マウスと6週令雌 CBS7 マウスを用い、検討し、両者の反応に差が認められなかったため最終的に6週令雌 Balb/C マウスを6匹用いた。Stx の毒性に関しては、マウスで特に強く出現し、直接投与後273日で死亡してしまうことが知られている。この点を改善するため、Stx を Gb3 が結合したビーズに吸着させて投与するという方法を用いた。まずすべてのマウスに、Gb3 結合ビーズに Stx2 を吸着させ、30ng を腹腔内注射した。そのマウスを2群に分け、一つの群には4日目に neuraminidase を投与後さらに Stx1 30ng および Stx2 10ng を静注した。他の群には neuraminidase を投与せずに Stx1 30ng および Stx2 10ng を静注した。原則として5日目に臓器を摘出し標本を作成した。実験に用いた Stx1 および Stx2 に対するモノクローナル抗体は、マウスに Stx を不活後に投与し、それぞれ3種類（すべて IgG 抗体）、2種類（IgG 抗体と IgM 抗体）の抗体を作成した。これらの力価および性質の確認は ELISA 法および Western blotting 法によって確認した。抗 Stx1 抗体の3種類は A subunit に対する、他の2種類は B subunit に対する抗体と考えられ、抗 Stx2 抗体は IgG 抗体が A subunit に対する、他の抗 IgM 抗体は A subunit、B subunit の両方に対する抗体と考えられた。

## C. 研究結果

### 1. Stx 投与前後の血液学的変化

投与前、投与後の血液検査では、BUN、クレアチニンの上昇が認められ、腎機能障害はあきらかと考えられた。下痢の症状が認められ、

脱水の影響も考慮する必要があるが、ヘマトクリットの変化は認められない。

### 2. Stx 投与による病理的变化

尿細管の組織所見では、neuraminidase の投与の有無に関係なく、尿細管は比較的容易に傷害され、上皮細胞の脱落、委縮などの像が得られた。糸球体の組織所見では、neuraminidase 投与群と、neuraminidase 非投与群の間で相違が認められた。非投与群の糸球体の組織所見ほとんど変化を認めなかったが、投与群ではメサングウム細胞の増加、基質の増生を認めた。腸の組織所見の変化は比較的顕著であった。消化管粘膜の組織所見ですが、粘膜の脱落、再生上皮、粘膜下の好中球浸潤を認めた。

### 3. Stx のモノクローナル抗体を用いた検討

尿細管における Stx1 の有無をモノクローナル抗体を用いて検討した結果、尿細管に一致して陽性所見が得られた。しかしすべてのモノクローナル抗体に反応するのではなく、特定のモノクローナル抗体に反応しただけなので、Stx の一部の成分のみが付着していると考えられた。これは尿細管における Stx2 の有無をモノクローナル抗体を用いて検討した結果ですが、尿細管に一致して陽性所見が得られた。同様にすべてのモノクローナル抗体に反応するのではなく、特定のモノクローナル抗体に反応するだけなので、Stx の一部の成分のみが付着していると考えられた。これは脳内における Stx の有無をモノクローナル抗体を用いて検討した結果、海馬領域の一部で陽性所見が得られた。

4. 各臓器における Stx1 蛋白、活性の分布  
次に、マウスに Stx1 300 ng を静注後1時間で臓器を摘出し、各臓器における Stx 蛋白分布、活性について検討した。摘出臓器を

ホモジネートし、生理食塩水で2倍希釈し、上清中の Stx 抗原量とその活性をしらべた。その結果、蛋白抗原分布で高値を示したのは肝臓、脾臓、腸、腎臓であり、血中、脳、心臓、肺は低値であった。活性を残している臓器は、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺であり、血中、脳、脾臓では活性が認められなかった。Stx による臓器障害は、血清や赤血球および脾臓ではすみやかにその活性が失われるので、それらに対する Stx の作用は、直接的なものではなく、むしろ trigger としての働きが主たるものと考えられた。

#### 5. Stx1 による細胞障害の機序

Stx1 を投与したときの細胞障害、臓器障害をサイトカインの点から検討しました。方法は、腎糸球体メサンギウム細胞、腎皮質細胞、ACHN 細胞のおおのにおに Stx1 の投与量を変えて反応させたときの TNF $\alpha$ 、IL-6 の発現の違いを検討した。ACHN 細胞に Stx1 を、それぞれ 20pg、50pg、125pg、250pg 反応させたときの IL-6 の発現量と、MTT 細胞生存率を比較した。Stx1 の投与量が多くなると、細胞生存率が減少するが、IL-6 の発現量は 125pg を投与したときが最大でした。250pg を投与したときで IL-6 の発現量が減少しているのは死滅した細胞が多いためと考えられた。ACHN 細胞に Stx1 を、それぞれ 20pg、50pg、125pg、250pg 反応させたときの TNF $\alpha$  の発現量と、MTT 細胞生存率を比較しました。TNF $\alpha$  の発現量は 125pg を投与したときが最大であった。

これらの細胞に Stx1 を反応させた場合、TNF $\alpha$ 、IL-6 の発現は T 細胞、B 細胞、monocyte における反応と相違を示した。pg レベルの少量投与で腎糸球体メサンギウム細胞、腎皮質細胞、ACHN 細胞、とくに ACHN 細胞は TNF $\alpha$  を多く発現した。これは ng レ

ベルの量を投与して反応する T 細胞、B 細胞、monocyte よりはるかに感受性が高いと考えられた。

#### D. 考察

Stx を投与することにより、尿細管は比較的容易に傷害され、上皮細胞の脱落、委縮などの組織所見が得られた。尿細管障害部位に Stx1、Stx2 が存在するかどうかの検討では、特定のモノクローナル抗体のみに反応することより Stx そのものではなく、Stx の一部の成分のみが付着しているか、この抗体とクロスする物質の存在が考えられた。臓器に沈着した Stx は、モノクローナル抗体との反応ではある特定の抗体のみとしか反応しないことから、Stx そのものではなく Stx と抗原性を共通のもの、あるいは Stx の構成成分の一部と考えた。また、各臓器における Stx1 を投与したときの細胞障害、臓器障害蛋白分布、活性 Stx の検出からは臓器により Stx に対する反応性が異なることが判明した。

今後はさらに新たなモノクローナル抗体を作成して評価をすること、stx 2 についても臓器分泌を調べることなどが必要である。腎臓を構成する細胞は少量の Stx を投与したときの細胞障害、臓器障害で炎症性サイトカインが誘導されるが腎組織学的に溶血性尿毒症の合致する所見は得られていないため、血管炎をおこすためには新たな工夫が必要であると考えられた。

#### E. まとめ

Stx 2 投与による腎障害は主として尿細管に出していた。これを改善するために Neuramidase を投与し、糸球体の変化を起こすことが出来た。血栓形成については、さらに、

工夫が必要である。Stx 1 の投与による臓器分布では、不活化が顕著であり、stx の毒性の作用は速やかに失活すると考えられた。Stx の作用として、in vitro の系でサイトカイン誘導態が認められた。今後これらの結果をもとに溶血性尿毒症の病態を解明していく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kohsaka T, Takekoshi T, Yanagisawa H, Tadokoro K, Yamada M.

Exon 9 mutations in WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. Human mut. 14:466-470 1999

Yan K, Kudo A, Hirano H, Watanabe T, Tasaka T, Kataoka S, Nakajima N, Nishibori Y, Shibata T, Kohsaka T.

Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus. Kindney Int. 56 :65-73 1999

Nakamura A, Johns JE, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T.

Modulation of interleukin-6 by b2-adrenoceptor in endotoxin-stimulated renal macrophage cells.

Kiney Int.56:839-8491999

Nakamura A, Johns JE, Imaizumi A, Abe T, Kohsaka T.

Effect of b2-adrenoceptor agonist and angiotensin II on TNF and IL-6 in rat mesangial cells

Cytokine11(10):759-765 1999

Seprenyi G, Ito Y, Kohsaka T.

Generated Single Point-Mutations can considerably dismantle the lymphocyte overstimulation induced by Yersinia pseudotuberculosis superantigen.

Cellular Immunology, 192,96-106, 1999

Jin KJ, Kang SJ, Kim SJ, Bang EH, Hwang HZ, Tadokoro K, Yamada M, Kohsaka T. Transcriptional Regulation of PDGF-A and TGF- $\beta$  by +KTS WT 1 Deletion Mutants and a Mutant Mimicking Denys-Drash Syndrome.

Renal Failure, 21(6), 685-694, 1999

Sakai Y, Abo W, Fukushi M, Tanaka T, Hori T, Tagawa M, Kohsaka T.

Two Cases of Acute Pancreatitis in Infants Less Than One Year Old.

J Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 30:99-101, 2000

Oki S, Noriko O, Kohsaka T, Azuma M.

Stat6 activation and Th2 cell differentiation driven by CD28 signals.

Eur. J. Immunol. in press

Oki, S., Kohsaka T, M. Azuma.

Augmentation of cell surface expression of CTLA4 by wortmannin: Involvement of lysosomal sorting properties of CTLA-4.

Int. Immunol.11: 1563-1571, 1999

Sakurai J, Ohata J, Saito K, Miyajima H, Hirano T, Kohsaka T, Enomoto S, Okumura K, Azuma M.

Blockade of CTLA-4 signals inhibits Th2-mediated murine chronic graft-versus-host disease by an enhanced expansion of regulatory CD8+ T cells.

J. Immunol.164: 664-669, 2000

香坂 隆夫 出血性大腸炎と溶血性尿毒症に対する手引き、医学書房 1999

### 2. 学会発表

香坂 隆夫、Yuan Zeng Rong、郭 淑霞、宮内潤、樋口 智江、鈴木 輝明、胆道閉鎖症における Jagged 1 遺伝子異常アラジール症候群との移行型は存在するか-病理学的遺伝子的検討、第 102 回小児科学会学術集会 1999

田川 学、樋口 智江、鈴木 輝明、香坂 隆

夫、宮内 潤、石澤 瞭、先天性チアノーゼ性心疾患に見られる腎症の臨床的病理的検討、第102回日本小児科学会学術集会 1999

樋口 智江、田川 学、星川 欣明、鈴木 輝明、稲葉 秀子、香坂 隆夫、小児期潰瘍性大腸炎の予後に関する検討、第102回小児科学会学術集会 1999

大谷 行春、田川 学、樋渡 光輝、峯 夏子、鈴木 輝明、香坂 隆夫、長期CAPDの後に腎移植を施行し腸管合併症を生じた一例、第4回国立移植研究会、大阪 1999

峯 夏子、大谷 行晴、田川 学、樋渡 光輝、鈴木 輝明、香坂 隆夫、移植後 Lymphoproliferative disease を生じ control に難渋した例、第4回国立移植研究会、大阪 1999

香坂 隆夫、郭 淑霞、樋口 智江、稲葉 秀子、田川学、鈴木 輝明、伊藤 拓、WT1 遺伝子異常を示す腎疾患の特徴、第42回日本腎臓学会学術集会、横浜 1999

大谷 行春、田川 学、鈴木 輝明、宮内 潤、

香坂 隆夫、蛋白喪失性胃腸症の病因による予後の相違、第26回日本小児栄養消化器病学会、倉敷 1999

香坂 隆夫、郭 淑霞、Yuan Zeng Rong、田川学、鈴木 輝明、佐伯 守洋、本名 敏郎、宮内 潤、第26回日本小児栄養消化器病学会、倉敷 1999

郭 淑霞、香坂 隆夫、樋口 智江、稲葉 秀子、田川 学、鈴木 輝明、伊藤 拓、先天性ネフローゼの原因としてのWT1 異常症、第34回日本小児腎臓病学会学術集会、新潟 1999

田川 学、鈴木 輝明、伊藤 拓、香坂 隆夫、吉田 朋子、郭 淑霞、長田 道夫、ペロ毒素による糸球体障害、第34回日本小児腎臓病学会学術集会、新潟 1999

厚生省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

HUSモデルにおける酸化ストレスの検討

分担研究者 池田昌弘、 本田雅敬 都立清瀬小児病院腎内科

研究要旨 前年度の本研究において作成したマウスモデルを用い、HUSの病態における活性酸素の関与を検討した。HUSモデルでは、活性酸素による組織障害のマーカーとされる過酸化脂質が、血中および腎組織中で増加していた。また腎皮質活性酸素消去酵素活性(Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase)の増加も認められ、酸化ストレスに対する生体の防御反応と考えられた。以上より、本モデルにおける活性酸素の関与の可能性が示唆された。

A.研究目的

0157 感染に続発する溶血性尿毒症症候群(HUS)はペロ毒素により惹起されると考えられているが、その発症進展に活性酸素の関与が指摘されている。

我々は、前年度の本報告でLPS感受性マウスを用いペロ毒素とLPSの投与によるHUSモデルの作成を報告した。本年度はこのモデルにおける活性酸素の関与を過酸化脂質、活性酸素消去酵素活性の面から検討した。

B.研究方法

LPS感受性マウス(C3H/HEN、雄性、6週齢)を以下のように3群にわけた。

1群:コントロール:生食腹腔内投与(n=8)

2群:LPS単独群:LPS250 $\mu$ gを2日間腹腔内投与(n=8)

3群:VT、LPS併用群(HUS群):1日目VT 200ng、2日目VT 200ngおよびLPS250 $\mu$ gを投与(n=10)

いずれのマウスも4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および過

酸化脂質(TBA法)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。

また、超音波にてホモジナイズした腎皮質組織中のCuZn-SOD(super oxide dismutase)、Mn-SOD活性を亜硝酸法で、GSH-PX(glutathione peroxidase)活性をBeutlerの方法で、過酸化脂質をTBA法で測定した。

C.結果:

・検査データ

3群(HUS群)のみに有意な血小板減少(1群, 2群, 3群;  $72.0 \pm 10.6$ ,  $36.9 \pm 12.1$ ,  $17.0 \pm 3.25$  ( $\times 10^4/\text{cmm}$ ); mean  $\pm$  SE: 1群 VS 3群  $P < 0.01$ )、BUN上昇(1群, 2群, 3群;  $42.8 \pm 2.41$ ,  $38.3 \pm 1.86$ ,  $195 \pm 43.1$  ( $\times 10^4/\text{cmm}$ ); mean  $\pm$  SE: 1群 VS 3群  $P < 0.01$ , 2群 VS 3群  $P < 0.05$ )が認められた。LDH値、WBC、Hb、Htはいずれの群間にも有意差はみられなかった。

蛋白尿、血尿は3群が最も顕著だった。

・組織所見

3群 (HUS 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が認められた。

・活性酸素消去酵素活性

1)腎皮質 SOD 活性

3群 (HUS 群) では腎皮質総 SOD 活性の有意な増加が認められた。

(1 群, 2 群, 3 群;  $45.8 \pm 8.99$ ,  $56.0 \pm 7.83$ ,  $91.0 \pm 16.1$  mU/mg prot. : mean  $\pm$  SE : 1 群 VS 3 群  $P < 0.05$ , 2 群 VS 3 群  $P < 0.05$ )

CuZn-SOD 活性も 3 群 (HUS 群) で有意な活性増加が認められた。

(1 群, 2 群, 3 群;  $9.90 \pm 3.26$ ,  $16.1 \pm 2.36$ ,  $32.1 \pm 4.76$  mU/mg prot. : mean  $\pm$  SE : 1 群 VS 3 群  $P < 0.01$ , 2 群 VS 3 群  $P < 0.01$ )

Mn-SOD 活性も 3 群で上昇傾向が見られたが有意差はなかった。

(1 群, 2 群, 3 群;  $35.9 \pm 7.77$ ,  $39.8 \pm 8.10$ ,  $62.1 \pm 13.3$  mU/mg prot. : mean  $\pm$  SE : n. s.)

(2)腎皮質 GSH-PX 活性

正常マウスに比し、3群 (HUS 群) は有意に腎皮質 GSH-PX 活性の増加が認められた。

(1 群, 2 群, 3 群;  $0.10 \pm 0.02$ ,  $0.15 \pm 0.02$ ,  $0.22 \pm 0.02$  U/mg prot. : mean  $\pm$  SE : 1 群 VS 3 群  $P < 0.01$ , 2 群 VS 3 群  $P < 0.05$ )

・血中過酸化脂質

3群 (HUS 群) で有意な増加が認められた。

(1 群, 2 群, 3 群;  $2.59 \pm 0.35$ ,  $3.03 \pm 0.26$ ,  $6.40 \pm 0.97$  nmol/ml : mean  $\pm$  SE : 1 群 VS 3 群  $P < 0.005$ , 2 群 VS 3 群  $P < 0.005$ , 1 群 VS 2 群

n. s.)

・腎皮質過酸化脂質値

3群 (HUS 群) にて腎皮質過酸化脂質値の増加が認められた。

(1 群, 2 群, 3 群;  $7.47 \pm 1.03$ ,  $5.67 \pm 1.06$ ,  $12.3 \pm 2.66$  nmol/mg prot. : mean  $\pm$  SE : 2 群 VS 3 群  $P < 0.05$ )

D. 考察

3群では血小板減少、BUN 上昇、血尿蛋白尿、組織上糸球体内皮細胞障害の所見を認め、ヒト溶血性尿毒症症候群 (HUS) 類似の病態を呈していると考えられた。

SOD、GSH-PX はともに生体内での重要な抗酸化酵素であり、前者はおもに過酸化水素や過酸化脂質、後者はおもにスーパーオキシドのスクャベンジャーとして、生体を活性酸素の毒性から防御している。

3群 (HUS 群) に認められた腎皮質 SOD および GSH-PX 酵素活性増加は、生体の酸化ストレス増大に対応した酵素誘導の可能性が考えられる。

活性酸素による組織障害は、活性酸素産生と抗酸化酵素などのアンチオキシダントのバランスにより決定される。活性酸素による組織障害のマーカーとされる過酸化脂質が、3群 (HUS 群) の血中および腎皮質組織中で増加を認めたことは、HUS モデルにおいて生体の防御系を上まわる酸化ストレスが加わった結果と考えられ、このモデルにおける活性酸素の関与を示唆するものと考えられた。

E. 結論

HUS の病態における活性酸素の関与が示唆



された。

F. 研究発表

1、論文発表

M. Ikeda, S. Ito, M. Honda.

Experimental hemolytic uremic syndrome  
induced by coadministration of  
lipopolysaccharide and verotoxin.

(submission)

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

溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発症病理に関する研究

分担研究者：筑波大学臨床医学系病理部助教授 長田道夫

研究協力者：岡山大学医学部保健学科教授 倉園久生

マヒドン大学大学院熱帯病理学 Urai Chairi

研究要旨

0-157 感染による HUS の発症は、0-157 から産生されたベロ毒素 VT1, VT2 が組織に存在する受容体に結合し、それにより引き起こされる細胞障害を基本としている。本分担研究グループは、VT1, VT2 の腎組織障害機構を検討するために、1) VT1, VT2 マウス投与による腎病変の作成、2) VT1, VT2 の DNA から抗体の作製、3) HUS 患者における VT1, VT2 の局在と腎組織病理学的変化について検討した。その結果、VT2 投与によりマウスに腎不全を作成でき、その原因は尿細管での細胞死による尿細管壊死であると考えられた。さらに腎組織酵素抗体法に使用できる VT1, VT2 特異抗体の作製に成功し、この発現を 0-157 感染が確認された HUS 例での剖検腎において確認したところ、VT2 は障害の見られた尿細管に局在した陽性所見が得られた。さらに、若年齢の症例では糸球体メサンギウム細胞にも発現が見られた。一部では小血管内皮細胞にも発現が見られたが、血管障害は認められなかった。以上から、0-157 感染症による腎障害はベロ毒素による尿細管の細胞死によるものと推察された。今後の重要な課題として、腎におけるベロ毒素の代謝経路と障害細胞の再生の機構があげられ、これらは本研究により明らかにされた新しい研究方向であり、同時に治療的意義を含んでいる。

A. 研究目的

0-157 感染症による臓器障害、とりわけ小児においては腎不全と脳症は死因と後遺症に関わる重大な合併症である。これまでの HUS の研究はベロ毒素の同定とその細胞障害性について *in vitro* の研究が主体であった。実際にベロ毒素がどのように生体内に分布し、臓器障害を引き起こすかについては、明らかではなかった。本研究の目的は、まず、マウスに対して VT1, VT2 による腎不全の惹起とその病理組織学的検索、VT1, VT2 の特異抗体作製とヒト HUS 患者における VT1, VT2 の分布および組織病変との一致性の検討を行い、ベロ毒素がどのように腎機

能障害に関与するかについて検討することである。

B. 研究方法

1) VT1, VT2 に対する特異抗体の作製

VT1 は DNA を pUC118 をベクターとして、VT2 は、ベクターを pCHR404 に変えて 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 を用いて純品を得た。この毒素をトキシノイド化し家兔の皮内に免疫し VT1, VT2 抗血清を得た。これらの抗体は免疫沈降法で特異性が認められた。この抗体を免疫組織化学に応用するべく基礎検討を

行った。すなわち、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する。

2) 正常組織および HUS 患者剖検腎における発現。

上記抗体およびタイマヒドン大学において作製された VT1 の  $\alpha$ ,  $\beta$  subunit に対するモノクローナル抗体、国立小児病院で作製された VT1, VT2 に対する抗体 (1H12-HRP, 2B12-HRP) を用いて、a) 正常マウス、ヒト腎組織結合試験、b) VT1, VT2 投与マウス腎組織、c) HUS 患者腎組織 (2例) について酵素抗体法を用い、免疫染色を行なった。

3) VT1, VT2 投与マウスにおける腎障害の検討。

Neuraminidase 前処理を行い、VT2 100ng を腹腔内投与した 5 日後 VT2 を 10 ng 静注し、一週間後 sacrifice したマウスにおいて血清 BUN, クレアチニンを測定し、腎組織学的検索をする。

### C. 研究結果

1) VT1, VT2 に対する特異抗体の作製

上記の方法で抗 VT1, VT2 ポリクローナル抗体が得られた。

2) 正常組織および HUS 患者剖検腎における発現。

a) 抗 VT1, VT2 抗体の腎組織結合試験

抗 VT1  $\alpha$  subunit は凍結切片にのみ有効である。本研究で作製した抗 VT2 抗体は種を越えて、パラフィン切片にも使用できることが

分かった。その他の抗体は免疫組織化学に適応することは難しいと考えられた。b) VT1, VT2 投与マウス腎組織においては VT1  $\alpha$  subunit のみが凍結切片において尿細管にわずかに局在が認められた。c) HUS 患者腎組織 (2例) における VT2 の発現。VT2 抗血清を 6 才男児と 8 1 才女性の 2 例の 0-157 感染 HUS 剖検例の腎組織について免疫染色を行った結果、前者においては VT2 がメサンギウム細胞、および尿細管上皮細胞に陽性にみられた。後者ではメサンギウムでの発現はみられなかったが、拡張し障害のある尿細管上皮細胞に一致して VT2 の局在が認められた。このことは、VT2 は尿細管に取り込まれここにおいて尿細管上皮細胞障害 (アポトーシス) を惹起することを示している。また、小児例でメサンギウム細胞への局在が見られたことは、小児では VT2 受容体がメサンギウムに多く存在することに一致すると思われた。

3) VT1, VT2 投与マウスにおける腎障害の検討

VT2 100ng を腹腔内投与した 5 日後 VT2 を 10 ng 静注し、一週間後 sacrifice したマウスにおいて著しい BUN, Cr の上昇が認められ、同時に尿細管上皮細胞の変性とアポトーシス、傍尿細管血管における好中球浸潤と同部尿細管炎がみられることが判明した。このことは 200 ng 一回腹腔内投与群や 100ng 一回静脈内投与群では認めなかった。

### D. 考案

本研究から、VT2 投与によりマウスに投与量依存性に尿細管病変が惹起され、これは腎不全の背景となる組織変化と考えられる。すなわち VT2 投与マウスにおける腎障害は尿細管壊死が一つの原因である可能性が考えら

れる。一方で、このマウスモデルにおいてヒト HUS でみられる典型的な糸球体病変あるいは内皮細胞障害などが認められなかったことについて毒素に対する細胞反応の種差など解析をさらに進める必要があるものと考えられる。

また、本研究により、目的としていた VT1, VT2 に対するポリクローナル抗体の作製に成功した。このうち VT2 はヒト腎組織パラフィン包埋標本に使用可能であることが分かった。HUS 症例剖検腎において VT2 は形態学的に明らかな障害を示す尿細管にその局在を認めた。この所見から2つの可能性が考えられる。すなわち、VT2 の細胞内集積の結果として細胞障害が起こった可能性と、細胞障害はベロ毒素によるか否かに関わらず、VT2 は傷害された尿細管上皮細胞においてその代謝が低下しているために細胞障害の結果として集積を認めた可能性である。この問題は、腎におけるベロ毒素の代謝を検討する必要があることを如実に表している。この問題は治療的必要性という面からも今後の検討を要する。

さらに、ベロ毒素による尿細管上皮細胞の細胞死についても、その時間的経過、再生性などについて今後の検討が必要である。

#### E. 結論

独自で開発した VT2 に対する抗体を用いてヒト HUS 患者の腎組織病変の解析を行った。さらに、VT2 投与によるマウス腎病変の検討を行った。この二つの研究から、ベロ毒素 VT2 は尿細管上皮細胞への細胞死を誘導することによる腎不全を惹起する可能性が推察された。

#### F. 研究発表

##### 1) 論文発表

1:Urai Chaisri, Michio Nagata, Hisao Kurazono, Hideo Hayashi, Hiroshi Horie, Wanpen Chaicumpa: Immunohistochemical

detection of VT2 in the kidneys of patients with O-157 infection (in submission).

G. 知的所有権の取得状況  
なし。

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症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（日齢 14 日）にペロ毒素 2(VT2)を投与し、四肢麻痺・痙攣を惹起させ 36-48 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。VT2 蛋白の 70 倍量以上の抗 VT2 ポリクローナル抗体と VT2 とを混合してマウスの腹腔内に投与すると、VT2 の致死効果を除去することができた。しかし、VT2 投与 1 時間後に抗 VT2 ポリクローナル抗体を投与してもマウスは下痢、四肢麻痺、運動失調を来して死亡した。抗 VT2 抗体には中枢神経障害発症予防効果があるが、VT2 暴露 1 時間後の投与では中枢神経障害発症予防効果がないことが明らかとなった。

人は抗 VT2 抗体を作ることができない。VT2 あるいは VT2+LPS をマウスに投与し、免疫能への影響を検討した。その結果、マウスにおいても 1) VT2 は幼若 T cell、helper T cell、B cell をすべて抑制し、2) 脾臓リンパ球の増殖の卵を抑制し、3) 抗異種蛋白抗体産生能を抑制することが明らかとなった。以上から、VTEC 感染症では VT2 が幼若 T cell と B cell の生存と増殖反応を抑制して、抗体産生能を低下させる機序が推定された。

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と抗 VT2 抗体の中枢神経障害防止効果について明らかにすることを目的とした。また、VT2 の免疫系への影響をマウスを用いて解析した。

B. 研究方法

幼若マウスにペロ毒素 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した。マウスに VT2 投与前あるいは投与後に抗 VT2 抗体を

とうよすることにより、VT2 による中枢神経障害の発症に差が見られるかを検討した。

また、VT2 投与後の末梢血、脾臓におけるリンパ球サブセット、抗体産生能について検討した。

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。

抗 VT2 ポリクローナル抗体と VT2 とを混合してマウスの腹腔内に投与すると、VT2 タンパクの 70 倍量以上の抗 VT2 ポリクロー

ナル抗体を用いることにより VT2 のマウス致死効果を除去することができた。また、ウサギ静脈内に抗 VT2 ポリクローナル抗体 19  $\mu$ g を投与後に 300 ng の VT2 を投与した場合にはウサギは下痢、四肢麻痺、運動失調を呈することなくまた死亡もしなかったが、VT2 投与 1 時間後に抗 VT2 ポリクローナル抗体を投与した時にはマウスは下痢、四肢麻痺、運動失調を呈して死亡した。

2) 4 週齢の C57BL/6 マウスに 50 ng/kg の VT2 を投与すると、24 時間以内に T 細胞が減少した。LPS と VT2 とを共投与すると、LPS のみ投与したときに認められた B220+細胞の上昇が見られなかった。さらに、LPS のみ投与したときに認められた脾臓細胞の増加は、VT2 投与では脾臓細胞は約半分では増加しなかった。VT2 投与後の脾臓細胞の抗ヒツジ赤血球抗体産生能も低下した。

#### D. 考察と結論

1) 抗 VT2 抗体には VT2 による中枢神経障害を予防する効果があるが、VT2 が経静脈的に体内に到達後 1 時間後に抗 VT2 抗体を投与しても VT2 による中枢神経障害の発症を予防することができない。

2) VTEC 感染症では VT2 の作用により CD4+, CD8+ T 細胞と B 細胞の生存と増殖反応を抑制して、抗体産生能を低下させる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Igarashi T, Inatomi J, Wake A, Takamizawa M, Katayama H, Iwata T: 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

2) 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

3) 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

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

5) 五十嵐隆: 腸管出血性大腸菌感染症とその合併症 日本臨床栄養学会誌 21: 29-32, 1999

6) Sugatani J, Igarashi T, Miwa M, et al: Disorders of immune responses of T and B cells in mice given intravenous Verotoxin 2. *Life Sciences* (submitted)

7) Sugatani J, Igarashi T, Miwa M, et al: Activation of coagulation in C57BL/6 mice given Shiga toxin 2 (Stx 2) and the effect of co-administration of LPS with Stx 2. *Thromb Res* (submitted)

8) Sugatani J, Igarashi T, Miwa M, et al: Elevated urinary excretion of aquaporin 2 associated with disorders of renal water transport in rats given Shiga toxin 1 (Stx 1) and Stx 2. *Am J Physiol* (submitted)

##### 2. 学会発表

1) 稲富淳、和気彰子、五十嵐隆、片山啓: 下痢発症前日の抗生物質の投与にて便中の O157 の消失をみたにもかかわらず HUS を発症した一例: HUS を発症させる細菌毒素はいつ腸管から吸収されるか? 第 4 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、1999 年 6 月 (大阪)

2) 五十嵐隆: 腸管出血性大腸菌感染症と溶血性尿毒症症候群: 病態生理解明の進歩、第 42 回日本腎臓学会ワークショップ 3, 1999 年 6 月 (横浜)

3) 五十嵐隆: 腸管出血性大腸菌感染症と溶

血性尿毒症症候群、第 31 回日本小児感染症学会シンポジウム、1999 年 10 月 (福島)

4) 五十嵐隆：腸管出血性大腸菌感染症：最近の知見、第 92 回日本小児科学会福島地方会、1999 年 11 月 (郡山)

5) 菅谷純子、五十嵐隆、三輪匡男、他：ペロ毒素 2 と LPS 共投与により惹起される重篤な腎組織細胞障害、第 119 回日本薬学会、1999 年 4 月 (徳島)

6) 前田利男、菅谷純子、五十嵐隆、三輪匡男、他：ペロ毒素による腎障害作用、第 119 回日本薬学会、1999 年 4 月 (徳島)

7) 菅谷純子、五十嵐隆、水口雅、三輪匡男、他：マウス血液凝固系への VT2 の影響とリポ多糖 LPS による相加的亢進、第 63 回日本生化学会虫部支部例会、1999 年 5 月 (三重)

8) 菅谷純子、五十嵐隆、三輪匡男、他：腸管出血性大腸菌 O157 産生毒素 STX2 のマウス免疫機能抑制作用、第 4 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、1999 年 6 月 (大阪)

9) 小宮山直子、菅谷純子、五十嵐隆、水口雅、三輪匡男、他：三輪匡男、他：腸管出血性大腸菌 O157 産生毒素による急性脳症の病態解析、第 45 回日本薬学会東海支部総会、1999 年 7 月 (名古屋)

10) 菅谷純子、小宮山直子、五十嵐隆、三輪匡男、他：病原性大腸菌(STX2)の暴露による抗体産生抑制機序の解析、第 72 回日本生化学会大会、1999 年 10 月 (横浜)

11) 小宮山直子、菅谷純子、五十嵐隆、三輪匡男、他：病原性大腸菌(STX2)の暴露による腎組織細胞の水チャネル (アクアポリン) 障害、第 72 回日本生化学会大会、1999 年 10 月 (横浜)

12) Chandler WL, Ciol M, Cornick N, Habeeb RL, Igarashi T, et al: Pathophysiology of

childhood hemolytic uremic syndrome following *Escherichia coli* O157:H7 infection - interim analysis. US-Japan Cholera Conference, 1999 年 12 月 (Baltimore, U.S.A.)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総合研究報告書

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年度大流行時症例の臨床経過を解析し、重症化危険因子、適切な治療法などを明らかにした。  
更に長期予後の検討、平成9年以降の通年時発症例の検討を行ない、得られた成績より診断・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 Stx 脳症の研究で、マウス Stx 脳症を用い幼弱個体の脳症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。
- 4) 動物実験での HUS 腎症については Stx 投与による腎症を作成し、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 腎症における腎障害機転の詳細を明らかにするためには、ヒト HUS 腎症に合致する糸球体病変を作成する必要がある、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