

腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染症における 溶血性尿毒症症候群と thrombomodulin, tumor necrosis factor- α の変動

山本 隆 磯川 貞之 宮田 曠* 吉岡加寿夫*

Evaluation of thrombomodulin and tumor necrosis factor- α levels
in patients with hemolytic uremic syndrome caused
by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection

Takashi YAMAMOTO, Sadayuki ISOKAWA, Hiroshi MIYATA*, and Kazuo YOSHIOKA*

Department of Pediatrics, National Sengokusou Hospital, Osaka, Japan

* Department of Pediatrics, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

To investigate the role of thrombomodulin(TM) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in hemolytic uremic syndrome(HUS), serum and urinary levels of TM and TNF- α were determined in patients with hemorrhagic enterocolitis(HC) of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 infection. These patients were divided into two groups : an HUS group consisting of patients with HUS; an HC group consisting of patients without HUS. In the 10 days after the onset of diarrhea, the serum TM and TNF- α levels in the HUS group were significantly elevated compared with those in the control group but decreased after 11 days. The serum TM and TNF- α levels in the HC group were not elevated compared with those in the control group except for one case of TNF- α . It is suggested that the serum TM elevation showed the severity of endothelial cell damage. Urinary TM and TNF- α levels in the HUS group were significantly elevated in the first 10 days. The urinary TNF- α levels rapidly decreased after 11 days, while the urinary TM levels were persistently high.

From these results, the sustained elevation of the urinary TM levels suggested the persistent presence of renal endothelial cell damage, and the decrement of urinary TNF- α levels suggested that TNF- α acted as a trigger of the renal endothelial cell damage in the first 10 days.

Jpn J Nephrol 1999 ; 41 : 60-64.

Key words : hemolytic uremic syndrome, *Escherichia coli* O157:H7, thrombomodulin, tumor necrosis factor- α

緒 言

腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 感染症は、1996 年 7 月の堺市における学童集団感染以来¹⁾、今日に至るも小規模ながら多くの発生が報告されている。O157 感染は幼児や高齢者に溶血性尿毒症症候群(HUS)を発症させ、これによって致命的な経過をとることがある。HUS は赤血球

の破碎を伴う溶血性貧血、血小板減少および急性腎不全を 3 主症状とする症候群^{2,3)}であるが、主病変は血栓性微小血管障害にあると考えられ、血管内皮細胞障害のマーカーとして thrombomodulin(TM)の変動と、組織障害因子として tumor necrosis factor- α (TNF- α)の病態への関与が注目されている⁴⁾。そこで、われわれは堺市における O157 集団感染例から経日的に採取しえた血液および尿を

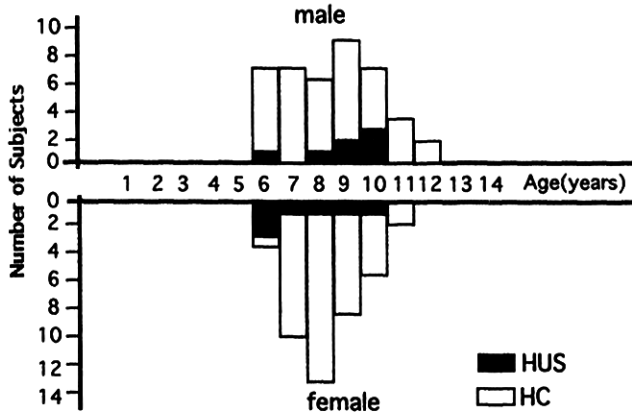


Fig. 1. Distribution of patients, age and sex

用いて、HUS 合併の有無および経過に伴う TM と TNF- α 値の変動を解析した。

対 象

1996 年、堺市において EHEC, O157:H7 の学童集団感染によって出血性腸炎 (HC) を発症した患児 87 名 (男子 42 名, 女子 45 名) を対象とした³⁾。これらの患児は、HUS を合併した HUS 群 (14 名) と、HUS を合併しない HC 群 (73 名) の 2 群に分けて検討した (Fig. 1)。なお、HUS の診断は小児腎臓病学会の「腸管出血性大腸菌感染に伴う溶血性尿毒症症候群の診断、治療ガイドライン」(破碎赤血球を伴う溶血性貧血で Hb 10 g/dl 以下。血小板数 10 万/ μ l 以下。乏尿、無尿あるいは年齢相当の血清クレアチニン基準値の 1.5 倍以上の上昇を示す腎障害) に従って行い、HUS 群の全例が消化器症状の発現から 7 日以内に HUS を発症していた。さらに、対象を消化器症状発現からの病日によって、第 1~10 病日、第 11~20 病日、第 21~30 病日の 3 群に分けて比較した。また対照として、低身長や肥満の精査で受診し、器質的疾患が除外できた患児と同年齢の 18 名の児童を正常 control とした。

方 法

患児の病状把握を目的とする検査時に採取した、血清および尿の余剰部分を検討に用いた。新鮮尿は 2,500 rpm, 10 min 遠心した後、上清を System 500 Microdialyzer (Pierce, Rockford, USA) を用いて Dulbecco's phosphate buffered saline (Flow Lab., Oxford, UK) で 4°C, 2 時間透析した。これを測定まで血清とともに -30°C で凍結保存

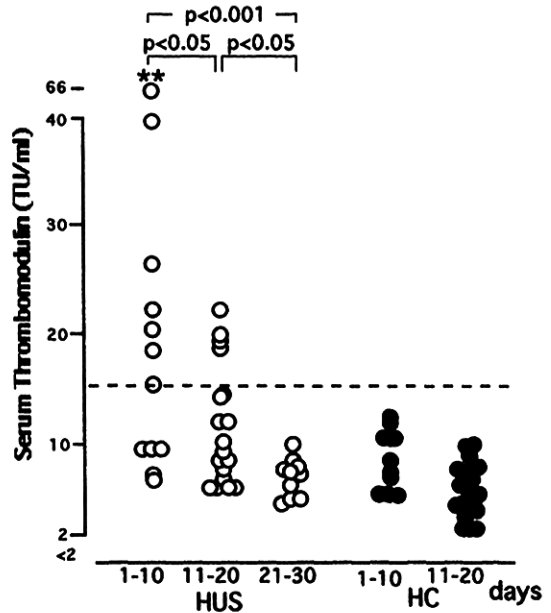


Fig. 2. The serum levels of thrombomodulin in patients

Dot line indicated the mean + 2SD of the control subjects. Asterisks (*) represent significant difference from the normal control (**p < 0.01).

した。TM と TNF- α の定量は、それぞれ TM-Test Teijin (Teijin Diag, Osaka, Japan), TNF- α EASIA (Medgenix, Fleurus, Belgium) を用いて免疫酵素抗体法で測定した⁴⁾。なお、尿中排泄値は同時に測定した尿中 creatinine 比に換算し、すべての平均値の群間差の検定は対応のない Student-test で算出した。

結 果

1. HUS および HC 患児の血清中の TM と TNF- α 値の経日的変動 (Fig. 2, 3)

HUS 群の第 10 病日までの病初期の TM の平均値は、control 値 (mean \pm 2SD, 10.5 \pm 6.3 TU/ml) に比較して有意に高値 (p < 0.01) を示したが、経過とともに低下傾向を示し、第 21 病日以後には全例が control 値まで低下した。TNF- α 値も TM 値とほぼ同様の変動を示し、第 10 病日までの病初期には平均値は有意に高値 (p < 0.01) を示し、第 21 病日以後は全例が control 値 (mean \pm 2SD, 6.8 \pm 5.4 pg/ml) まで低下した。他方、HC 群は HUS 群と異なり、TM 値は病日に関係なく全例が control 値内の変動で、TNF- α 値も第 10 病日までの 1 例を除き全例が control 値内であった。なお、HUS 群で、血清中の TM 値と

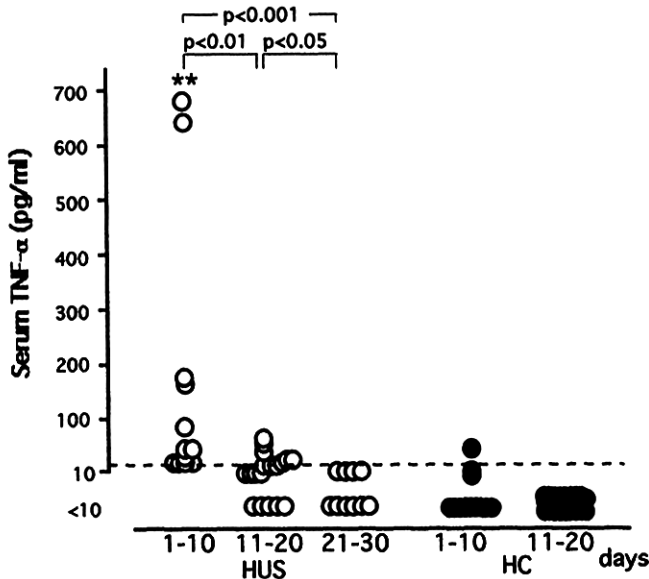


Fig. 3. The serum levels of TNF- α in patients
Dot line indicated the mean+2SD of the control subjects.
Asterisks(*) represent significant difference from the normal control (** $p < 0.01$).

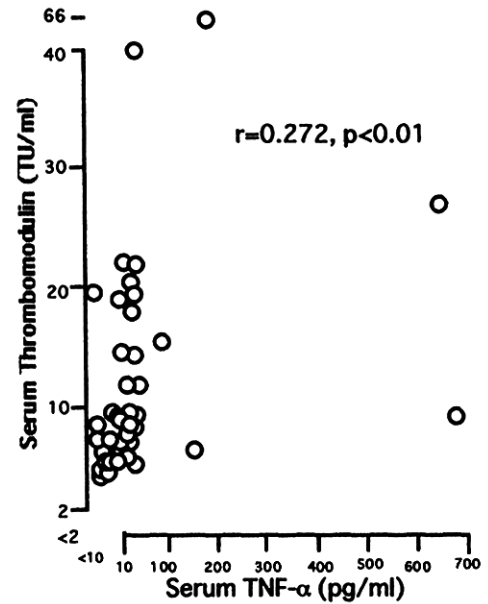


Fig. 4. The relationships between serum levels of thrombomodulin and TNF- α

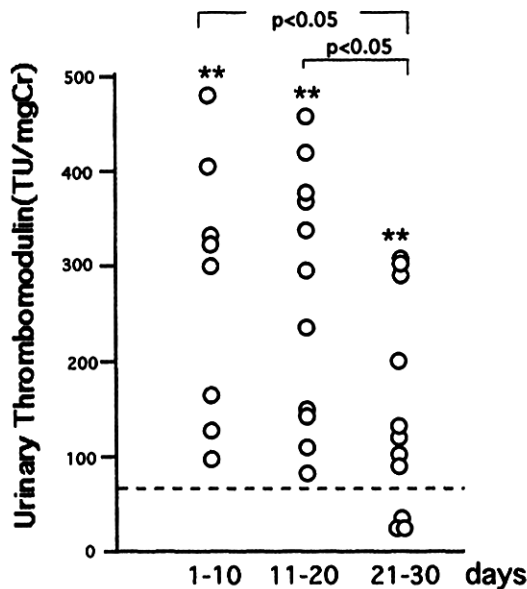


Fig. 5. The urinary levels of thrombomodulin in patients with HUS

Dot line indicated the mean+2SD of the control subjects. Asterisks(*) represent significant difference from the normal control (** $p < 0.01$).

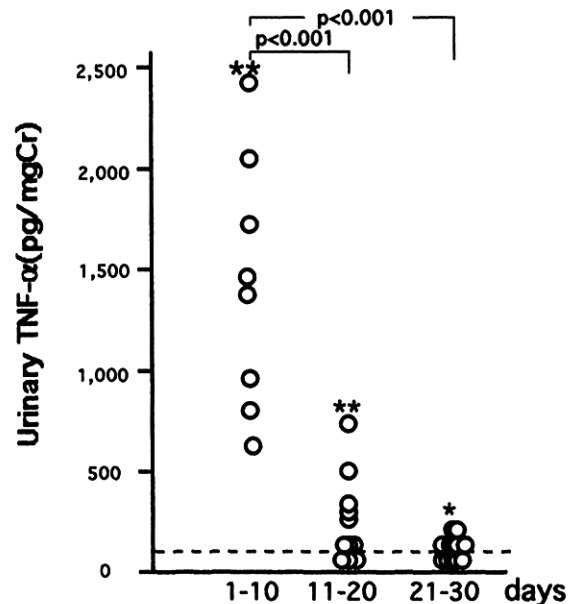


Fig. 6. The urinary levels of TNF- α in patients with HUS

Dot line indicated the mean+2SD of the control subjects. Asterisks(*) represent significant difference from the normal control (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

creatinine 値との間($r = 0.402$, $p < 0.05$), および TNF- α 値との間(Fig. 4, $r = 0.272$, $p < 0.01$)には有意な相関関係は認めなかった。

2. HUS 患児の尿中 TM と TNF- α 排泄値の経日的変動(Fig. 5, 6)

HUS 群の第 10 病日までの病初期での尿中 TM 排泄の平均値は, control 値(mean \pm 2SD, 30.2 ± 32.5 TU/mgCr)

に比較して有意に高値を示し($p < 0.01$), 同時に測定した TNF- α 排泄の平均値も同様に control 値 (mean \pm 2SD, 11.4 \pm 25.6 pg/mgCr) に比較して有意に高値 ($p < 0.01$) を示した。尿中 TM 排泄値は第 11~20 病日においても高値を持続し, 第 10 病日までの平均値に比較して有意な低下は認めなかったが, 尿中 TNF- α 排泄値は第 11 病日以後に急速な低下傾向を示した。さらに, 第 21~30 病日以後は両者ともに低下傾向を示すものの, control 値に比較して依然として高い排泄値を持続する例を多く認めた。なお第 31 病日以後も蛋白尿が 420~740 mg/day と持続した症例を 3 例認めたが, これらの第 21~30 病日での尿中 TM 排泄値は 310, 290, 120 TU/mgCr と比較的高値を示していた。

考 察

O157 感染に続発した HUS に伴う急性腎不全は血管内皮細胞障害に起因すると考えられ^{7~9)}, このことは回復期に実施された腎生検所見からも確認されている¹⁰⁾。われわれはこれまで HUS において, 血管内皮細胞障害のマーカーである TM と炎症・免疫系のメディエーターとしての各種サイトカインの血液・尿中での変動に注目して, 腎病変の病態解析を試みてきた。そして, 少数例の検討ではあるが, HUS の経過に伴い血中および尿中の TM や TNF- α 値が特徴的な変動を示すことを報告してきた⁴⁾。そこで, これらの結果を参考に, 今回は堺市の O157 集団感染例を対象として TM と TNF- α の変動と HUS 発症の機序との関係について再検討した。

今回の検討で, HUS 患児の血清および尿中の TM 値は第 10 病日までの病初期では有意に高値を示し, 同時に測定した TNF- α 値も同様に高値を示した。TM は可溶性 TM として血液や尿中に存在し, この血中での増加は血管内皮細胞障害の程度を反映するといわれている^{6,11,12)}。ただし, ある種の腎機能障害では, 尿中 TM 排泄値の減少に伴い血清 creatinine 値の上昇とともに血中 TM 値が増加することが報告¹³⁾ されており, 血中値の解釈には注意が必要であるが, 今回の検討では血清中の TM 値と creatinine 値の間には相関関係はみられず, 尿中排泄値の低下も認めなかった。

他方, TNF- α は生体の防御と組織障害の 2 面性を保持している炎症性サイトカインであるが, O157 感染において血管内皮細胞表面にペロ毒素 B subunit の receptor である globotriaosylceramide (Gb3) を誘導することが知られており^{14,15)}, これによって毒素感受性が亢進して血管内皮細

胞障害が惹起されると推察される。したがって, 病初期の血清中 TM の高値は高度の血管内皮細胞障害の存在を示唆しており, TNF- α の高値はペロ毒素に対する高い感受性が推察された。さらに, 第 11 病日以後は両者ともに減少傾向を示し, TNF- α の障害因子としての作用と TM が反映する血管内皮細胞障害とは平行して推移すると考えられた。他方, HC 群の血清 TM 値は全例が control 値内で, 血清 TNF- α 値も病初期の 1 例を除き control 値内であった。これらの結果は, 血管内皮細胞障害の軽さを反映していると考えられた。HUS における血清 TNF- α の変動については, López ら¹⁶⁾ も同様に高値を示したと報告している。しかし, 出血性腸炎については今回の検討結果と異なり, 第 10 病日以内では HUS と同様に高値を示したと報告している。彼らの検討結果では発症早期の例でより高値を示す傾向がみられ, 今回の検討が彼らに比較して同じ第 10 病日以内でも早期例の少なかったことが両者の差として表れたとも考えられる。しかし, 血清 TM も低値を示していることから, 血管内皮細胞障害の程度と平行して TNF- α も低値であったと推論することがより妥当と考えられた。

尿中 TM や TNF- α の由来については循環血液や腎局所での産生に求められるが, これまでに行ったわれわれの検討結果⁴⁾ から, 腎局所での産生が尿中排泄値におおに関係していると考えられる。したがって, 尿中 TM や TNF- α 排泄値は腎局所病変を直接反映していると考えられ, 発症初期の TM 排泄高値の持続は腎の血管内皮細胞障害を示唆していると考えられた。さらに, 尿中 TNF- α 排泄値は発病 11 日以後, 急速に低下傾向を示したが, TM 排泄値の低下は TNF- α 値に比較して緩徐であった。この経日的な変動の差について, TNF- α は HUS 発症の初期に腎の血管内皮細胞障害の強力な trigger として作用して, その後はそれ自体の分泌は沈静化するもののサイトカインネットワークが活性化⁴⁾ され, これに基づいて血管内皮細胞が障害され, 腎での HUS 病態の継続とともに TM の排泄持続につながったと推察された。すなわち, 血清 TM に比較して尿中 TM の高排泄が持続したことは, HUS において主たる標的である腎の持続性病変に関連していると考えられた。

結 語

EHEC, O157:H7 感染児を対象に TM と TNF- α の血清中と尿中の変動を検討した。

1) HUS患児の血清および尿中のTMとTNF- α は発症10病日までの値は高値を示したが、HUS非合併患児では血清TMは全例が低値で、TNF- α も1例を除き低値であった。したがって、TMの変動は血管内皮細胞障害の程度を反映していると考えられた。

2) HUS患児において、経過に伴う尿中TMの低下は比較的緩徐であったが、TNF- α は急速に低下し、TNF- α は腎局所の血管内皮細胞障害のtriggerとして作用すると考えられた。

以上、血清および尿中のTMとTNF- α 変動の検討は、HUSの病態の解析に有用であった。

稿を終えるに当たり、患者血液の採取にご協力を賜った近畿大学医学部附属病院小児科、泉北記念病院小児科の諸先生、ならびに研究の施設をご提供いただいた近畿大学ライフサイエンス 大場康寛教授に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第41回日本腎臓学会学術総会(平成10年)において発表した。

文 献

1. 堺市学童集団下痢症対策本部：堺市学童集団下痢症報告書(腸管出血性大腸菌O157による集団食中毒の概要)。平成9年8月
2. Griffin PM, Tauxe RV : The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991 ; 13 : 60-98.
3. 山本 隆, 桑島宏彰, 八木和郎, 森口直彦, 吉岡加寿夫, 秋山利行 : 溶血性尿毒症症候群における血小板数の変動について。 *小児科臨床* 1997 ; 50 : 1853-1856.
4. 山本 隆, 宮田 曠, 道旗 巖, 牧 淳 : 溶血性尿毒症症候群におけるthrombomodulinとサイトカインの変動について。 *小児感染免疫* 1995 ; 7 : 103-109.
5. 山本 隆, 八木和郎, 森口直彦, 宮田 曠, 吉岡加寿夫 : 腸管出血性大腸菌O157感染症における血中抗体価測定の有用性—1996年7月堺市での学童集団感染における検討—。 *SRL宝函* 1997 ; 21 : 223-226.
6. Yamamoto T, Miyata H, Moriguchi N, Yoshioka K : Evaluation of plasma and urinary thrombomodulin, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α levels in patients with Henoch-Schönlein purpura. *Jpn J Pediatr Hematol* 1997 ; 11 : 14-19.
7. Tesh VL, Burriss JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolowski EA, O'Brien AD, Samuel JE : Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins I and type II for mice. *Infect Immun* 1993 ; 61 : 3392-3402.
8. Lingwood CA : Verotoxin-binding in human renal sections. *Nephron* 1994 ; 66 : 21-28.
9. Richardson SE, Rotman TA, Jay V, Smith CR, Becker LE, Petric M, Olivieri NF, Karmali MA : Experimental verocytotoxemia in rabbits. *Infect Immun* 1992 ; 60 : 4154-4167.
10. Richardson SE, Karmali MA, Becker LE, Smith CR : The histopathology of HUS associated with verocytotoxin-producing *E. coli* infections. *Human Pathol* 1988 ; 19 : 1102-1108.
11. Ishii H, Majerus PW : Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 1985 ; 76 : 2178-2184.
12. Ohdama S, Takano S, Miyake S, Kubota T, Sato K, Aoki N : Plasma thrombomodulin as a marker of vascular injuries in collagen vascular disease. *Am J Clin Pathol* 1994 ; 101 : 109-113.
13. Tomura S, Deguchi F, Ando R, Ida T, Chida Y, Uchiyama T, Matsuda O, Marumo F : Plasma thrombomodulin in primary glomerular disease and lupus glomerulonephritis. *Nephron* 1994 ; 67 : 185-189.
14. Louis CB, Obrig TG : Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome : combined cytotoxic effects of Shiga toxin, IL-1 β and TNF- α on human endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 1991 ; 59 : 4173-4179.
15. Tesh VL, Samuel JE, Perera LP, Sharefkin JB, O'Brien AD : Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J Infect Dis* 1991 ; 164 : 344-352.
16. López EL, Contrini MM, Devoto S, DeRosa MF, Grana MG, Genero MH, Canepa C, Gomez HF, Cleary TG : Tumor necrosis factor concentrations in hemolytic uremic syndrome patients and children with bloody diarrhea in Argentina. *Pediatr Infect Dis J* 1995 ; 14 : 594-598.