

- Marat, S., 半田直史、麻見安雄、田之倉優、板谷光泰、小林一三 (2001.10.14-17)
染色体上の制限酵素修飾酵素遺伝子の自己増幅
第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 3P-238 854、大阪
- 櫻井雅弘、善野修平、西郷薫、田之倉優 (2001.10.14-17)
大腸菌ニトロ還元酵素 NfsA のランダム変異導入による反応特異性の解析
第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 3P-528 897、大阪
- 加茂昌之、金子直美、善野修平、西郷薫、田之倉優 (2001.10.14-17)
発光細菌 *Photobacterium luminescens* ルシフェラーゼの精製と結晶化
第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 4P-055 953、大阪
- Sawano, Y., Hatano, K., Muramatsu, T., Nagata, K., and Tanokura, M. (2001.10.31-11.4)
Cloning, Expression and Processing Mechanism of Bromelain Inhibitors.
2nd General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS), Munich
- 湯本史明、永田宏次、岩崎わかな、足立恭子、小林由枝、根本暢明、尾島孝男、西田清義、田之倉優 (2001.11.14-16)
アカザラガイ閉殻筋トロポニンCのC末端半分子の溶液構造解析
第 40 回 NMR 討論会講演要旨集 362、京都
- Yumoto, F., Nagata, K., Iwasaki, W., Adachi, K., Kobayashi, Y., Nemoto, N., Ojima, T., Nishita, K., and Tanokura, M. (2001.11.16-18)
Structural analysis of the C-terminal half of Akazara scallop troponin C in solution
Abstract of International Workshop, Actin filament from structure to mechanism19、兵庫
- Sadykov, M., Handa, N., Asami, Y., Tanokura, M., Itaya, M., and Kobayashi, I. (2001.12.9-12)
Amplification of a selfish restriction-modification gene complex
第 24 回日本分子生物学会年会プログラム 1P-160(62)、横浜
- 伊藤三恵、永田宏次、加藤有介、山越智、山本健二、鈴木和男、田之倉優 (2001.12.9-12)
サイトカイン LECT2 の高次構造解析
第 24 回日本分子生物学会年会プログラム 3P-113(146)、横浜
- Dawson, W., Ishida, M., Kameoka, Y., Yamagoe, S., Futamura, Y., Yamamoto, K., Suzuki, K., and Tanokura, M. (2001.12.9-12)
A combined study of the LECT2 protein using molecular dynamics simulation

and NMR chemical shift data

第 24 回日本分子生物学会年会プログラム
4P-102(191)、横浜

田之倉優、伊藤三恵、永田宏次、山越智、
山本健二、鈴木和男、(2001.12.21)
LECT2 の高次構造解析
第 4 回肝臓生物学会プログラム、千葉

Dawson, W., Ito, M., Nagata K., Yamagoe
S., Tanokura, M., Yamamoto, K.,
Suzuki, K.(2001.12.9-12)
Analysis of 3D-Structure of LECT2
第 4 回肝臓生物学会プログラム、千葉

E. 知的所有権の取得状況

- 1)特許取得 なし
- 2)実用新案登録 なし
- 3)その他 なし

厚生省科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)

分担研究報告書

心筋炎におけるサイトカインの意義と遺伝子治療および多臓器不全をきたす予後不良の予測

分担研究者 相澤義房 新潟大学大学院・循環器学分野

研究要旨:重症心筋炎では循環不全からMOFを経て早期に死亡する重篤な疾患である。ここでは実験およびヒト心筋炎における遊走因子 MCP-1 の役割を検討し、IL10 の遺伝子導入の効果を検討した。ラット自己免疫性心筋炎モデルは心筋ミオシンによる感作によって100%に誘導できる。感作15-27日で、ラット心筋の MCP-1 の mRNA は有意に増加した。間質に出現した単核球は MCP-1 の抗体で染まり、同時期に血清の MCP-1 も上昇した。IL10 の遺伝子導入で心筋炎を軽減した。

24例のヒト心筋炎例でも、入院時の血清 MCP-1 は増加し、循環不全のため MOF や不整脈をきたし死亡した8例で最も高値であった。MCP-1 は実験モデルでもヒトの急性心筋炎でも病態の進展にかかわり、MOF に至る重症例の予知因子になると考えられた。

であることも報告されている。

A. 研究目的

重症心筋炎は心不全や不整脈により循環不全に至り、MOF を経て早期に死亡する。我々はこれまでラット自己免疫性心筋炎モデルを作製してきた。この心筋炎モデルは、急性期にはヒトの巨細胞性心筋炎モデルともなり得るもので死亡率も高い。慢性期以降できた例では慢性心不全をきたし、拡張型心筋症モデルとみなすことができる。

この心筋炎はブタ心筋ミオシンの感作で誘発される自己免疫性の心筋であり、感作されたラットのリンパ球の輸注により心筋炎を発生させることもできる。

発症以後の炎症の進展と終息には、これまで各種サイトカインの経時的変動を明らかにしてきており、また Th1/Th2 バランスが重要であることも明らかにしてきた。

ここでは発症と急性期の炎症の進展に関わると考えられる、血中からの単核球や T 細胞の遊走が重要と想定されていることから、ラット自己免疫性心筋炎モデルにおける遊走因子である MCP-1 の意義の心臓での発現とその局在を免疫染色法により検討した。

さらに、IL10 はヘルパーT細胞の抑制や、炎症性サイトカインの産生を修飾し、移植時の拒絶反応の抑制に有効

このことから自己免疫心筋炎を作製し、IL10 の遺伝子導入を行うことで持続的な IL-10 の上昇した状態を作り出し、これが心筋炎の病態を修飾するかどうかを検討した。

最後に臨床例での急性心筋炎において、血清の MCP-1 を測定し、健常者と比較するとともに、病態や予後との関連についても検討した。

B. 研究方法

1) MCP-1 の実験的検討。

既に我々は Lewis rat を用いて、心筋ミオシン感作によって自己免疫性心筋炎を100%誘導できることモデルと確立し報告してきた。これまでと同様の方法で、自己免疫性心筋炎を惹起した。即ちブタ心筋ミオシン感作により自己免疫性心筋炎を作製した。このモデルでは約15日目をピークに心筋炎の病像を示し、急性期に高率に死亡するモデルである。

心筋ミオシンによる感作後15-27日に、ラット心臓の MCP-1 の mRNA を検討した。

RNA 抽出および逆転写

RNA は AGPC 法を用いて心臓から 5 μg 抽出し、oligo dT プライマーと Avian Myeloblastosis Virus 逆転写酵素

を用いて反応させ、cDNA を合成し、最終 20 μ l に調整した。

クローニングおよびシーケンス解析

定量的 RT-PCR を行うためのポジティブコントロールを作成するために、MCP-1 がインサートされたプラスミドを合成した。MCP-1 の PCR 産物を Taq DNA polymerase と 10 pmol の 5'-GTGCTGTCTCAGCCAGATGCA-3', 5'-CTCTGTCACTACTGGTCACTTC-3'プライマー、を用いて、21 日目のラットの心筋炎心臓から作成した。それらを microcon-100 を用いて精製し、直接 pGEM-T vector に挿入した。リコンビナント plasmid は JM109 コンピテント細胞にトランスフォーメーションし、アンピシリン耐性の大腸菌コロニーを分離し、そのシーケンスは TaqDyeDeoxy terminator cycle sequencing kit と DNA sequencer (model 310 Applied Biosystems)を用いて確認した。Plasmid DNA は定量的 RT-PCR のテンプレートのポジティブコントロールとして用い、その濃度は 260 nm 吸光度で測定した。

定量的 RT-PCR による MCP-1 mRNA 量の測定

定量的 RT-PCR は Light Cycler(ロッシュ社製)を用いて行った。2 μ l の LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Hybridization Probes (Taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mixture, 10 nmol/l MgCl₂), 2.4 μ l の 25 nmol/l MgCl₂, 0.5 μ mol/ のプライマー 5'-CTGTCTCAGCCAGATGCAGTTAAT-3' (センスプライマー)、

5'-TATGGGTCAAGTTCACATTCAAAG-3'(アンチセンスプライマー)を用いて、2 μ l の 100 倍希釈の cDNA および 10 倍ずつ希釈された MCP-1 ポジティブコントロールプラスミドをテンプレートとして、定量的 RT-PCR を行った。

サイクルプログラムは 95°C10 分をはじめに行い、それから 95°C瞬時、60°C10 秒、72°C12 秒、トランジションレ

ートは 20°C/秒で合計 40 サイクル行った。定量的データの解析は Light Cycler 解析ソフトウェア-version 3 を用いて行った。MCP-1 プラスミドの標準曲線はエラーポイントが 0.001 以下であった。

MCP-1 の局在は、抗 MCP-1 抗体(Pharmingen, San Giego, CA, USA)を用いて心臓を染色した。この間、同時期に採血を行い、血清の MCP-1 レベルを検討した。MCP-1 はラット MCP-1 キット(Biosource International, Camarillo, CA USA)を用いて ELISA 法により測定した。

2) IL-10 の遺伝子導入

次いで同様の自己免疫心筋炎を作製し、IL10 プラスミドベクターを作製し、electroporation 法により下腿骨格筋に導入した。

IL10 ベクターの作製

PCR 法によりクローニングしたマウスの IL-10 cDNA を、pCAGGS の Xho I site に挿入し、大腸菌で増殖、純化した。まず、ラットをエーテルにて麻酔後、4 μ g/ μ L とし 50 μ L を両側の下腿骨格筋に 27 ゲージ針にて注射した。注射部位を挟む様に電極を筋肉下 5mm に挿入し、電気パルスを与え(Electro Porator CUY 21;TR, Tech)、IL-10 発現プラスミドを導入した後、経時的に血中での IL-10 の上昇を検討した。この予備実験から、遺伝子導入後10日後には、IL-10 の血中濃度は 50pg/mL に上昇することを確認した。

遺伝子導入の予備実験に基づき、IL-10 遺伝子導入の治療プロトコールを作製した。即ち IL-10 発現プラスミドはミオシンによる感作5日前と、感作後7日目および14日目の3回下腿骨格筋内に投与し、エレクトロ・ポレーションで導入した。コントロールは自己免疫心筋炎に IL-10 遺伝子を含まない pCAGGS のみを筋肉内への遺伝子導入を行った群と、非心筋炎からなる対象群とした。

L10 の遺伝子導入の有無で、心筋炎発症21日目時点

での生存率、心体重比、および病理組織を対照群と比較した。また経時的に血清の IL-10 の濃度もチェックした。

3) ヒトにおける心筋炎の検討

臨床的には24例のヒト心筋炎例で血清 MCP-1 を検討した。対象は新潟大学医学部第一内科の関連病院で循環器医が勤務している全施設で経験した症例である。全例入院後の心内膜心筋生検または死亡時の剖検所見から、組織学的に診断が確認された例のみである。

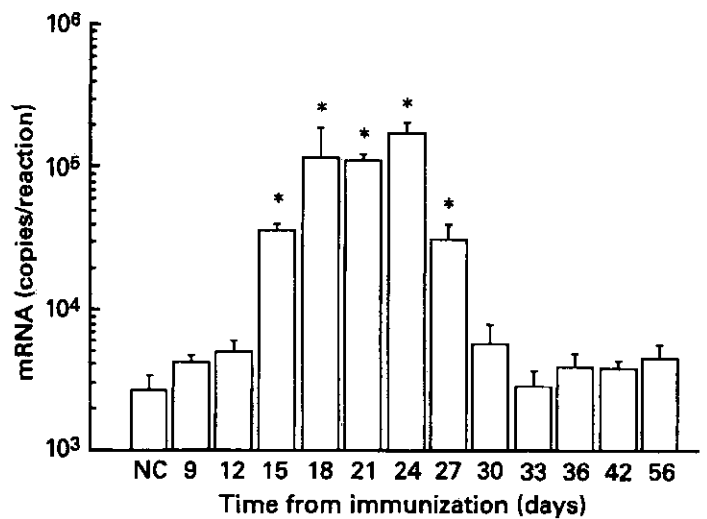
入院時の臨床像、血行動態、予後を検討するとともに、ここではヒト MCP-1 キット (Biosorce International, Camarillo, CA USA) により測定を重点的に行った。

数値は平均±SEM で表した。推計学的検討は、群間比較は one-way ANOVA 法を用いた。P 値が 0.05 以下を推計学的に有意とした。

C. 研究結果

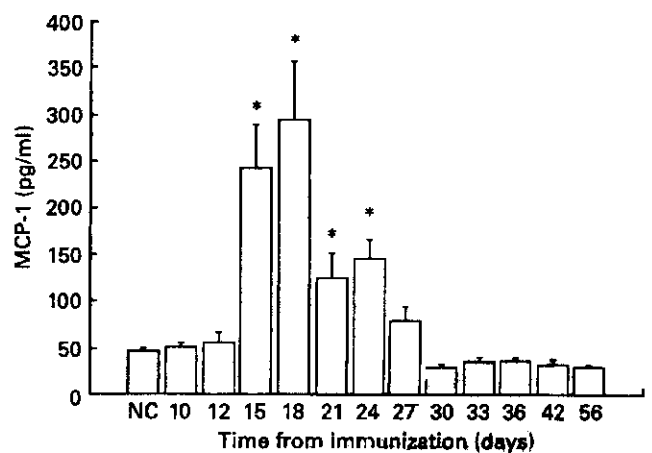
1) 実験

心筋ミオシンによる感作によって100%誘導できた。感作後15-27日の時点で、ラット心臓に MCP-1 の mRNA の上昇を認めた。ピークは18-24日にあった(図—1)。



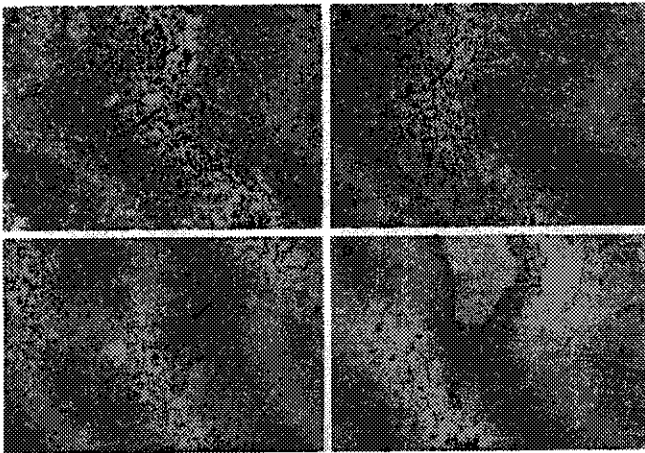
(図—1: 横軸は感作後の日数。心臓の mRNA は15日より有意に上昇し、27日まで高値であった)

血中の MCP-1 は、12日の時点まで上昇は認めなかったが、免疫後15日で約5倍上昇し、18日をピークに24日まで有意な上昇が認められた。27日以降はコントロールと同レベルであった(図—2)。



(図—2: 横軸は感作後の日数。MCP-1 の血清レベルは、15日より上昇し、24日まで減少するものの有意に高値を保っているのが分かる)

心筋を抗 MCP-1 の抗体で染めると、間質に出現している大きな単核球が染まった。42日目ではまだ単核球浸潤は認められたが、MCP-1 は僅かに染まるのみであった(図—3)。正常の心筋や血管平滑筋および内皮にはMCP-1は全く染まらなかった(図—3)。



(図—3: 感作21日(A)および24日(B)での大単核球が抗 MCP-1 抗体で濃く染まった。42日(C)になると、染色も薄くなるが、単核球の浸潤は認めら得る、正常の心臓では、心筋、血管いずれも染色されない)

2) 遺伝子導入実験

単回の IL10 プラスミド導入後、血清 IL-10 レベルは導入直後は測定できなかったが、2日で $126 \pm 14 \text{ pg/mL}$ 、4日で $308 \pm 16 \text{ pg/mL}$ 、6日で $320 \pm 23 \text{ pg/mL}$ 、8日で $192 \pm 34 \text{ pg/mL}$ 、10日で $82 \pm 9 \text{ pg/mL}$ 、14日で $35 \pm 8 \text{ pg/mL}$ と経時的な変動を示した。初回導入後10日目および20日目に遺伝子導入を繰り返すと、IL-10 レベルは 200 pg/mL 以上に保たれた。この成績に基づき、心筋炎群での遺伝子導入の治療プロトコルを決定した。

心筋炎群における遺伝子導入と心所見

遺伝子導入群の生存率は 100% で非遺伝子導入群では 15% であった。心筋重量/体重比は心筋炎で非遺伝子

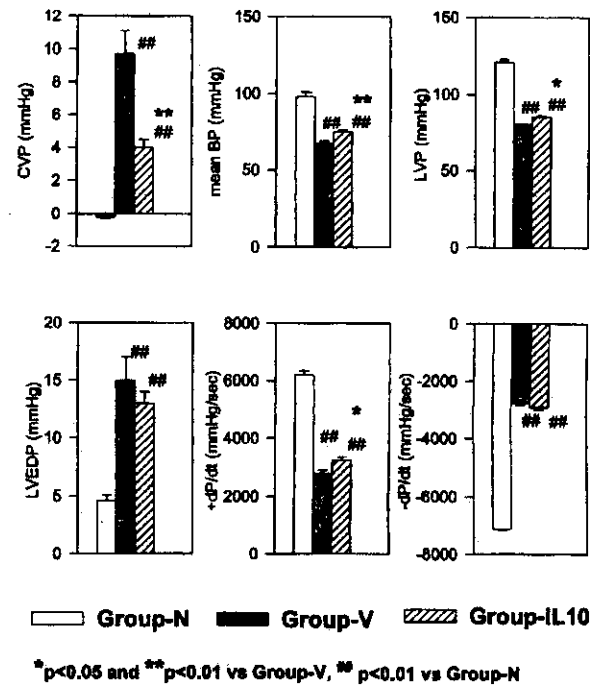
導入群で $6.50 \pm 0.23 \text{ g/Kg}$ で、これは導入群の $4.80 \pm 0.10 \text{ g/Kg}$ より有意に大であった。しかし導入群でも非心筋炎群の $2.45 \pm 0.06 \text{ g/Kg}$ に比べ、心筋重量/体重比は有意に大であり、発症の抑制までには至らなかった。

血清 IL-10 は遺伝子導入群で21日で 12516 pg/mL と上昇したが、非導入群および非心筋炎群では測定感度以下であった。

心臓の径も、心筋炎群で IL-10 遺伝子導入群で有意に縮小したおり、病勢の改善を示した。

血行動態

図—4は血行動態のまとめを示す。



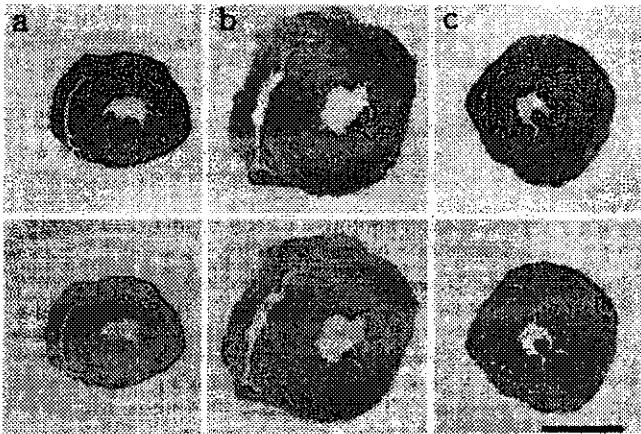
(図—4: 血行動態の比較。Group-N: 非心筋炎群 Group-V: 心筋炎で非遺伝子治療群。Group-IL10: 心筋炎で遺伝子導入群。CVP: 中心静脈圧、mean BP: 平均血圧、LVP: 左室内圧、LVEDP: 室拡張末期圧。収縮能として dP/dt 、拡張能として $-dP/dt$ も検討した)。

中心静脈圧は心筋炎で上昇したが IL-10 遺伝子導入群で有意に低値であった。また平均血圧と左室内圧の低

下は遺伝子導入群で有意に軽度となり、左室拡張末期圧の上昇も有意に抑えられて。収縮能としての dP/dt は遺伝子導入群で非導入群に比べ改善を示した。拡張能としての $-dP/dt$ には差異がみとめられなかった。

組織病理所見

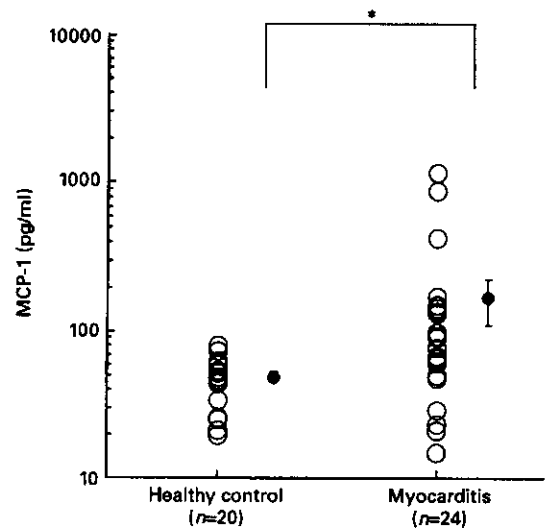
心筋炎群での急性期の炎症像も遺伝子導入による軽減し、慢性期における線維化も軽度であった(図—5)。心臓の拡大も軽度であった。



(図—5:心筋の横断切片の染色、a:正常のコントロールラット。b:心筋炎で非遺伝子治療群。c:心筋炎でIL-10 遺伝子の導入群。青く染まる線維化部分は、遺伝子導入群で明らかに小さくなっており、また内腔も遺伝子導入群で小さいことが分かる。)

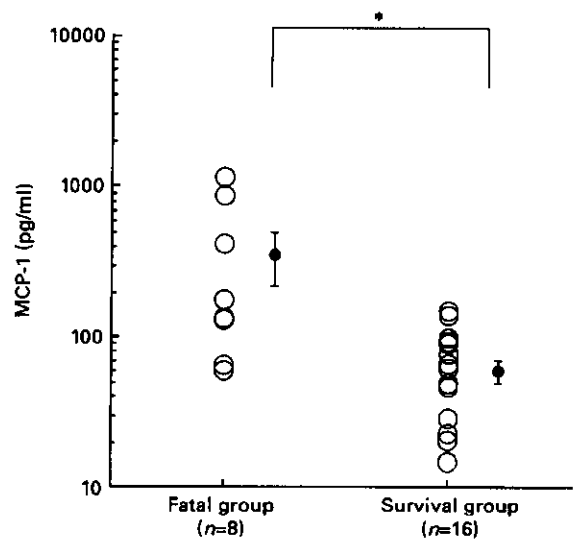
3) 臨床的検討

対象として全24例で生検または剖検で心筋炎が確認された。入院時の血清 MCP-1 は $165 \pm 56 \text{ pg/ml}$ で、これは健常者20例の $62 \pm 11 \text{ pg/ml}$ に比べ有意に高値であった(図—6)。



(図—6:血清 MCP-1 の健常者との比較で、心筋炎患者で有意に高値であった($P < 0.003$))。

重症心筋炎で、間もなく死亡した8例での血清 MCP-1 は $372 \pm 145 \text{ pg/ml}$ と最も高値であった(図—7)。これらの死因は循環不全による MOF であった。



(図—7:死亡群(fatal group)と生存群の MCP-1 の比較。有意に死亡群で高値であった($P < 0.0058$))

D. 考察

ヒトの心筋炎の中には無症状で経過すると言えるものから、発症早期に心不全に陥り、MOFで死亡する例がある。これらの症例は劇症心筋炎としても知られている。しかしこれまで急性期の炎症にかかわる病態の解明もなされておらず、重症度を規定する因子や要因も不明であった。

我々は、ブタ心筋ミオシンの感作によって、100%に自己免疫性の心筋炎を作製することができるモデルと開発し、多様な面からの検討を行いこれまで報告してきた。このモデルは、急性期は心筋炎として、また慢性治癒期に至っても慢性心不全モデルを呈するもので、ヒトの心筋炎や拡張型心筋症の解析には極めて有用な情報を提供してくれる。

このモデルは心筋ミオシンによる自己免疫性の心筋炎であり、ミオシンに感作されたリンパ球の移注によって他のラットに発症させることができることも判明している。心筋炎の発症には、心臓への単核球やリンパ球の遊走が関わり、MCP-1などの因子の関わりが推定されるがまだ心筋炎で実証されていない。

さらに発症初期から炎症に関与するサイトカインや神経体液因子が関与するが、急性期には proinflammatory なサイトカインが関わり、やがて治癒期には線維化を促進するいくつかのサイトカインの発現を心臓に求めることを明らかにしてきた。このときリンパ球の TH1/TH2 バランスも Th1 優位から Th2 優位と移行する。この時 IL-10 はリンパ球の TH1/TH2 バランスを変え、炎症の終息に向かわせる様に作用し、治療としての意義推定される。

MCP-1 の意義については、mRNA は炎症性のサイトカインの発現とともに、自己免疫性心筋炎の初期から認められ、血中にも増加していた。MCP-1 は血中からの単核球やT細胞が遊走させ、炎症像の形成きたすと考えられるが、その他 MCP-1 は intracellular adhesion molecule-1 を高めたり、炎症巣に好中球を呼び込む可能性も報告さ

れている。また MCP-1 は CD4 のスイッチングや IL10 の産生などにも関わる可能性がある。

MCP-1 の産生細胞は、自己免疫心筋炎では間質に出現した単核球が抗体で染まることから、これらが産生細胞と考えられる。しかしその数は少ないことから、他の細胞による MCP-1 産生も否定できない。この点は更に検討課題である。

診断が確実な24例のヒト心筋炎例でも、血清 MCP-1 は増加し、特に循環不全および MOF で死亡した8例で最も高値であった。このことは、MCP-1 レベルから心筋炎の重症例が予測できることになり、循環不全や不整脈などの合併症に対する処置の必要性を示しており、ベッドサイドでの治療に極めて有用な情報となる。

IL-10 の作用や心筋炎における経時的変化から IL-10 の治療として意義が想定される。実際、この心筋炎モデルでは発症2週目をピークに治癒に向かうが、その際線維化に関係する遺伝子の発現とともに、Th1 有意の状態から Th1 有意の状態へ変化を認めかつ、IL10 も上昇するという実験からも裏づけられる。

IL10 遺伝子のベクターを作製し、骨格筋である下腿の脛骨筋にエレクトロポレーションにより導入をした。1回の導入でも血清の IL-10 の有意の上昇が認められたが、一過性であった。3回の遺伝子導入を繰り返すと、1週間以上の血中の IL-10 の上昇がみとめられた。

このことから、IL-10 遺伝子治療を、心筋炎の発症前から導入を開始し、発症後も導入を繰り返した。血中での IL-10 の上昇が確認され、炎症の進展阻止が明らかに認められた。

発症早期からの IL-10 の遺伝子導入による治療の有効と考えられた。IL-10 の遺伝子導入は劇症心筋炎のため MOF で死亡する例で、より早期に投与することは救命手段のひとつになり得ると考えられる。また実験モデルや臨床でのこのような遺伝子治療の有用性が、炎症の発症と

進展におけるサイトカインや細胞性免疫の重要性や役割を明らかにすることにも寄与する。

今後 MOF をきたす心筋炎の予知、不整脈や循環不全をきたす主な原因、また遺伝子治療のタイミングと有効性など検討が必要である。

E. 結論

MCP-1 は心筋炎の発症から回復期全般に心臓に増加し、病勢を修飾していると思われる。臨床例では、MCP-1 の血中レベルは重症度の予測因子となり、循環不全および MOF の回避のため治療選択に有用な指標になる。心筋炎における IL10 遺伝子の導入は、実験的には有効で、他に治療法のない劇症例などを中心にやがて臨床でも検討すべき課題である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 論文発表

- 1) Kodama M et al. *Clin Immunol Immunopathol* 57:250-62,1990
- 2) Kodama M et al. *Circulation* 85:1992:1918-1926,1992
- 3) Kodama M et al. *Cir Res* 75:278-284, 1994
- 4) Watanabe K et al. *Circulation* 104:1098-1100, 2001
- 5) Fuse K et al. *Clin Exp Immunol* 124:346-352, 2001
- 6) Kodama M et al. *J Cardiac Failure* 7:138-145,2001
- 7) Taneda K et al. *PACE* 24:1604-1606,2001
- 8) Watanabe K et al. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:S55-S58,2001

H. 知的財産権の出願。登録状況

なし

低酸素性脳症動物モデルにおける cytochrome C 測定

分担研究者 布井 博幸

宮崎医科大学小児科教授

研究協力者 池ノ上 克、池田 智明

宮崎医科大学産婦人科

研究要旨 多臓器不全を発症から短期間の間に引き起こすインフルエンザ脳炎脳症患者のサイトカインや血清 cytochrome C 値について検討し、脳炎脳症の初期から上昇し、重症度と有意な相関を示すことを明らかにした。このことからインフルエンザ脳炎脳症患者では全身臓器の apoptosis が誘導されていることを指示していると考えられた。今回、低酸素性脳症動物モデルで、髄液および血中 cytochrome C の上昇を確認できたこと、また低酸素性脳症患者でも同様に血中 cytochrome C が上昇することから、この動物モデルが、インフルエンザ脳炎脳症や新生児の低酸素性脳症患者の治療へも応用できるのではないかと考えている。

A. 研究目的：インフルエンザウイルス感染症で、高熱、熱性痙攣患者と脳炎脳症を伴った症例について血管内皮マーカー、サイトカインマーカー、血中 cytochrome C の測定を行った。その結果、血清 cytochrome C 値は脳炎脳症の初期からその重症度と有意な相関を示し、他のマーカーについてはインフルエンザ脳炎脳症の症例とそうでない患者との間で有意の相関を得られなかった。このことから、インフルエンザ脳炎脳症では血清 cytochrome C が早期に検出されること、また apoptosis が誘導されていることを指示していると考えられた。そこで、apoptosis が病因と考えられる低酸素性脳症動物モデルを用いて、cytochrome C の上昇の確認と、低酸素性脳症患者の cytochrome C 測定を行った。

【方法】

1) 7 生日のウイスター系ラットの総頸動脈を結紮後、2 時間の 8% 低酸素状態にし、その後平常の飼育を行った (Ligation Hypoxia model)。これまでの報告から、低酸素状態から解放後 1, 6, 24, 48 時間後に髄液を採取し、72 時間後には髄液と同時に採血も同時に行った。同時に脳組織染色により、虚血性脳障害の程度を確認した。

髄液と血清の cytochrome C は ELISA 系を用いて行

った。

2) 過熟児（生下時体重 4890g、在胎 41 週）で吸引分娩となり、仮死状態で生まれた患児について、インフォームドコンセントを得てから、検査採血の一部で cytochrome C 測定を行った。

【結果】

1) 総頸動脈結紮—低酸素マウスモデル
コントロール群との髄液での cytochrome C (ng/ml) の測定を行った。

採取時	コントロール(n)	梗塞モデル(n)
1 時間	8.4±2.7 (4)	13.2±6.1 (4)
6 時間	16±14 (4)	13.1±4.8 (7)
24 時間	6.3±0.7 (2)	23.5±4.8 (4)
48 時間	12.8±8.9 (7)	52.9±22.5 (9)
72 時間	18.1±7.9 (6)	25.2±21.6 (9)

その結果、24 時間と 48 時間後 (p<0.001) の髄液でコントロールとの間に student's t-test にて有意さが認められた。

2) 新生児仮死患者の臨床検査データ

生日	1日	2日	3日	4日	5日	6日
Cyt-C (ng/ml)	22	30	20	9	5.4	4.3
WBC X 10 ⁶ /μl	31400	27000	14900			
Hb g/dl	17.5	19.4	15.8			
Plt X 10 ⁶ /μl	7.2	12.1	8.7			
Ca (mg/dl)	10.8	8	6.4			
Cr (mg/dl)	0.9	1.4				
ASK (IU/dl)	269	725				
ALK IU/dl)	117	211				
LDH (IU/dl)	3380	10510				
CPK (IU/dl)	2176	12010				
Amyl (IU/dl)	29					
Glu (mg/dl)	583					

患児は血小板減少、肝機能障害、CPKの上昇や後日施行されたMRI所見から重度の新生児仮死状態であると診断された。患児ではcytochrome Cが生下時直後より上昇していた。

D. 考察 新生児相当のウイスター系ラットの低酸素性脳症モデルで24時間と48時間後の髄液でのcytochrome Cが有意に上昇していた。また、72時間後の末梢血でも同様にcytochrome Cの上昇傾向が認められた。同時に行った脳組織障害とcytochrome Cの上昇の程度は良く比例していた。

インフォームドコンセントに同意を得た低酸素性脳症患者の血清についても検討し、cytochrome Cの上昇を確認した。

Cytochrome Cの上昇についてはApoptosisとnecrosisでも認められることになっている。前者がミトコンドリアからのより選択的な機構(BaxチャンネルやVDAC-Baxチャンネルなど)を介して、後者は非選択的なミトコンドリア外膜破壊によりcytochrome Cの漏出が起こるのではないかと考えられているが、両者の本質的な病態の区別はよくわかっていない。

インフルエンザ脳炎脳症では多臓器不全に至る前に(早期に)しかも他のマーカーより、有意に血清cytochrome C値の上昇が認められることから、apoptosisが誘導されているのではないかと考えている。今回検討した新生児低酸素性脳症動物モデルでは

これまで遅発性の細胞死(apoptosis)が起こっていると報告されているが、cytochrome C測定によっても24時間と48時間後に上昇が認められ、これまでの結果を指示するものではないかと考えられた。

E. 結論

低酸素性脳症動物モデルで髄液cytochrome Cを指標にその治療法を開発することは、インフルエンザ脳炎脳症などの激しいapoptosisを起こしている疾患の治療法を確立する上でも重要であろうと思われた。

参考文献

1. F, Shibasaki et al.,: Suppression of signaling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* 386, 728-731, 1997
2. F, Shibasaki et al.,: Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 382, 370-373, 1996
3. Gogvadze V, Richter C: Cyclosporine A protects mitochondria in an in vitro model of hypoxia/reperfusion injury. *FEBS Lett.* 333:334-8, 1993
4. Wako Nakajima, et al.: Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neuroscience* 20: 7994-8004, 2000
5. Puka-Sundvall M, et al.: Cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: Involvement of mitochondrial permeability transition? *Dev Neurosci* 23: 192-197, 2001

F. 研究発表

A) 学会発表

第33回日本小児感染症学会(山口県)インフルエンザ脳炎脳症の病態解析 平成13年11月

B) 発表誌名巻号・頁・発行年

- 1) Ishibashi F, Mizukami T, Kanegasaki S, Motoda L, Kakinuma R, Endo F, Nunoi N. Improved superoxide generating ability by interferon-gamma due to splicing

pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in *CYBB* gene. *Blood* 98:436-441(2001)

2) Nunoi H, Yamazaki T, Kanegasaki S. Neutrophil cytoskeletal disease. *Int J Hematol.* 74:119-24 (2001)

3) Cui SH, Tanabe F, Terunuma H, Iwatani Y, Nunoi H, Agematsu K, Komiyama A, Nomura A, Hara T, Onodera T, Iwata T, Ito M. A thiol proteinase inhibitor, E-64-d, corrects the abnormalities in concanavalin A cap formation and the lysosomal enzyme activity in leucocytes from patients with Chediak-Higashi syndrome by reversing the down-regulated protein kinase C activity. *Clin Exp Immunol.* 125:283-90 (2001)

4) Yamauchi A, Yu L, Potgens AJ, Kuribayashi F, Nunoi H, Kanegasaki S, Roos D, Malech HL, Dinauer MC, Nakamura M. Location of the epitope for 7D5, a monoclonal antibody raised against human flavocytochrome b558, to the extracellular peptide portion of primate gp91phox. *Microbiol Immunol.* 45:249-57 (2001)

5) 布井博幸、水上智之、イジナ・マルカド、三淵浩、西原重剛、後藤善隆、緒方敬之、森島恒雄、中山慎一、森信二、坂田宏、森裕美、真鍋孝治、足立尚登、遠藤文夫、渡辺啓祐：インフルエンザ感染症における重症度判定のためのマーカーの検討：小児感染免疫 13：225-232, 2001

厚生科学研究費助成金（特定疾患対策研究事業）
血管炎に伴う多臓器不全に係わる病態の解明及び治療法の開発に関する研究班）
分担研究報告書

川崎病における血管炎の病態解明に関する研究を治療法の検討

分担研究者 竹下誠一郎（防衛医科大学校 小児科講師）

研究要旨

川崎病(KD)急性期における末梢血好中球の自発的アポトーシスは抑制されていることを我々は既に報告した。今回の研究では、免疫グロブリン療法(IVIg)がKD急性期の好中球のアポトーシスを誘導するかどうかを検討した。その結果、IVIg後に末梢血好中球数は有意に減少し、自発性アポトーシスは促進した。さらに、*in vitro*においてIVIgは治療前の好中球のアポトーシスを量依存性に誘導した。そのアポトーシス誘導作用はFas抑制抗体によって阻害されなかったため、Fas非依存性の経路を介することが示唆された。

はじめに

我々は既に、川崎病(KD)急性期における末梢血好中球の自発的アポトーシスは抑制され、活性化された好中球の寿命が延長することがKD血管炎の病態に関与している可能性を報告した(*Clin. Exp. Immunol.* 126, 355-364, 2001)。KDの治療にはアスピリンの内服と免疫グロブリン製剤(IVIg)の超大量療法の組み合わせが有効であることが一般的に知られている。IVIgの作用機序として、①毒素の中和 ②抗イディオタイプ抗体による調節 ③貪食細胞のFc γ レセプター(Fc γ R)のブロック ④免疫細胞によるサイトカイン産生の抑制 ⑤B細胞による抗体産生の抑制 ⑥内皮細胞による自己抗体の消化の促進などが考えられている(*N. Engl. J. Med.* 326, 107-116, 1992)が、その作用のメカニズムは完全に解明されたわけではない。Prasadらは最近、IVIgがFas受容体を介したシグナル経路によって、ヒトリンパ球と単球のアポトーシスを誘導することを報告した(*J. Immunol.* 161, 3781-3790, 1998)。しかし、好中球のアポトーシスに対するIVIgの影響に関して検討した報告はない。経験的にはIVIgが有効であったKD患者では、IVIg治療前に高値を示す末梢血好中球数はIVIg治療後に明らかに低下することが知られている。我々は、“IVIgはKDにおける末梢血好中球のアポトーシスを誘導する”という仮説の下に、以下のような実験を行った。

A. 目的

*in vitro*において、KDにおけるIVIg前後の末梢血好中球の自発的アポトーシスをKD回復期及び健常児と比較検討する。さらに、IVIgがIVIg療法前の末梢血好中球のアポトーシスを誘導するかを検討する。

B. 対象および方法

(1) 対象

防衛医科大学校病院小児科に入院又は通院したKD33例と健常児25例を対象とした。KDの全例に対してアスピリン(30mg/kg/day)内服とIVIg(1g/kg/回又は2g/kg/回)を施行し、冠動脈病変を認めなかった。各サンプルはIVIg前(第3病日-7病日)、IVIg終了後24時間以内(第7病日-11病日)及び回復期(第21病日-36病日)のCRPが陰性化した時期にそれぞれ採取された。健常児は血液型検査等を希望して防衛医科大学校病院小児科に来院し、基礎疾患がない児とした。サンプル採取に関しては、父もしくは母に同意(informed consent)が得られた。

(2) 試薬

三菱ウエルファーマ株式会社からポリエチレングリコール処理ヒト免疫グロブリン(ヴェノグロブリンIH[®]、IgG 50mg/ml、IgG 92mg/ml製造番号E001VHT)及びF(ab')₂分画(50mg/ml)、Fc分画(50mg/ml)の供与を受けた。

(3) 末梢血好中球の分離と調整

KD及び健常児から採取したEDTA加全血を1

step polymorphs で好中球層を分離後、flow cytometry 法における前方散乱と側方散乱により好中球の純度を、trypan blue 染色により生存率を検討した。その結果、純度は95%以上で生存率は98%以上だった。

(4) 好中球のアポトーシス検出法

1) annexin V による蛍光標識法

培養0, 12, 24時間後の好中球をPBSにて1回洗浄し、300g、5分間遠心後に上清を除去し、4°Cにて結合バッファーに再浮遊した。これにannexin V-FITC を5 μ l 加えて穏やかに混和し、4°C、暗所で10分間染色後、直ちにflow cytometer で測定した。

2) flow cytometry 法によるDNA断片化細胞(sub-G₁細胞)の検出法

1)と同様に培養後、洗浄遠心した好中球の上清を除去し、0.1%クエン酸ナトリウム、0.2%Triton-X100、RNase A(20 μ g/ml)水溶液で500 μ lに再浮遊した。浮遊液にPIを添加(最終濃度50 μ g/ml)し、氷上で2時間解置後にFACSCalibur flow cytometer で測定した。

3) 蛍光顕微鏡による観察

培養した好中球を1%BSA加PBSに再浮遊し、サイトスピンにて800rpm、5分で塗沫標本を作成した。風乾後、3.7%formaldehydeにて固定した。PBSにて洗浄後、0.1%Triton-X100を添加し、Hoechst 33342(10 μ g/ml)で染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

(5) IVIg 及び抗Fas mAb 処理によるアポトーシス誘導作用の検討

分離後の好中球に対しIVIgをそれぞれ1, 5, 10, 20mg/mlの各濃度で培養液中に添加して12時間培養した。また誘導型抗Fas mAb(clone CH-11)及び抑制型抗Fas mAb(clone ZB4)をそれぞれ500ng/mlの濃度で同様に添加して培養した。なお、ブロッキング(抑制)型抗Fas mAb(ZB4)添加1時間後にIVIgまたは誘導型抗Fas mAb(CH-11)を培養液中に添加した。

(6) 好中球のアポトーシス誘導作用に対するIVIg、F(ab')₂分画、Fc分画、albuminの作用の比較検討

培養0時間の好中球に対し、それぞれIVIg(20mg/ml)、F(ab')₂分画(13mg/ml)、Fc分画

(7mg/ml)、albumin(9mg/ml)を培養液中に添加し、最終濃度をいずれも0.12mMに統一して12時間培養後、(5)と同様にアポトーシス細胞の測定を行った。

(7) flow cytometry 法による好中球細胞表面のFas陽性率の測定

PE標識抗Fas mAb(clone UB2)にて4°Cで30分間染色後、flow cytometer で解析した。(8)好中球のアポトーシス誘導作用に対する抗FcyR mAb 処理の影響に関する検討

分離後の好中球に対し抗FcyR I mAb、抗FcyR II mAb、抗FcyR III mAbをそれぞれ10 μ g/mlの濃度で培養液中に添加した後にIVIgを20mg/mlの濃度で好中球の培養液中に添加して12時間培養し、(5)と同様にアポトーシス細胞の測定を行った。

(9) 統計学的解析

結果は全てmean \pm SEで示した。2群間の有意差検定はMann-Whitney U-test、相関関係についてはSpearman順位係数で検定した。p<0.05をもって有意差ありと判定した。

C. 結果

(1) KDの臨床データ

KDと健常児の臨床データのまとめを表1に示した。

対象	川崎病		健常児	
	IVIg療法前	IVIg療法後	IV治療	健常児
年齢(歳)	21.5(月)			21.5(月)
年齢(分)	0.5(月 - 1.5歳)			0.5(月 - 6歳)
n	34			25
男/女	12/20			12/13
CRP(mg/dl)	41.8 \pm 1.4*	2.7 \pm 0.1*	<0.1	<0.1
白血球数($\times 10^3$)	15123 \pm 746*	8948 \pm 262	10659 \pm 229	8642 \pm 542
好中球数($\times 10^3$)	11063 \pm 937*	4016 \pm 313	1022 \pm 268	1361 \pm 326
好中球中法数($\times 10^3$)	2812 \pm 362*	843 \pm 132*	497 \pm 74	77 \pm 13
好中球数($\times 10^3$)	681 \pm 112	921 \pm 85	453 \pm 32	431 \pm 58
血小板数($\times 10^3$)	771 \pm 11	2303 \pm 67**	1225 \pm 45**	849 \pm 52

* 1.5歳以上、11歳以下、95%ile以上、95%ile以下、2.5%ile以下、2.5%ile以上、
* 1.5歳以上、11歳以下、95%ile以上、95%ile以下、2.5%ile以下、2.5%ile以上

白血球数と好中球数はIVIg療法後に有意に低下したが、リンパ球数と単球数には有意な変化を認めなかった(図1)。

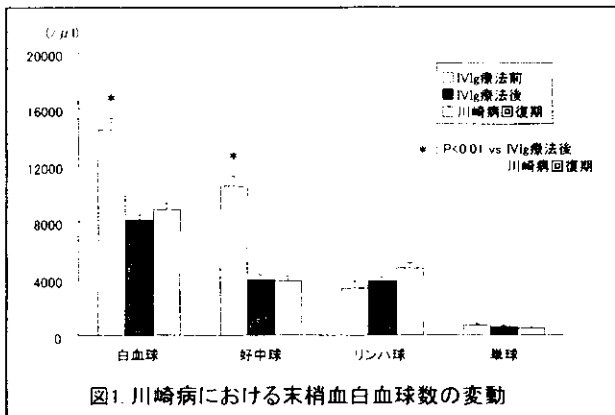


図1. 川崎病における末梢血白血球数の変動

(2) 好中球の自発的アポトーシスの検出
 分離した好中球を *in vitro* で 12~24 時間培養した後、flow cytometer にてアポトーシス細胞の測定を行った(図2)。

IVIg 療法前における annexin V 陽性細胞と DNA 断片化細胞の平均出現率は、IVIg 療法後、KD 回復期及び健常児と比較して有意(p<0.01)に低値を示した。一方、IVIg 療法後のアポトーシス細胞の平均出現率は、IVIg 療法前、KD 回復期及び健常児と比較して有意(p<0.01)に高値を示した。

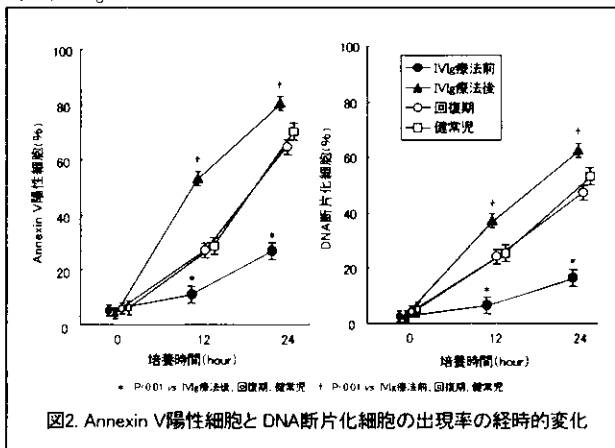


図2. Annexin V陽性細胞とDNA断片化細胞の出現率の経時的変化

(3) IVIg 後の好中球数低下率とアポトーシス細胞出現率との相関

IVIg 後の好中球数低下率(IVIg 療法前の好中球数 - IVIg 療法後の好中球数 / IVIg 療法前の好中球数)と培養 24 時間におけるアポトーシス細胞出現率の間には、有意(p<0.01)な正の相関が認められた(図3)。このことから、KDにおいて IVIg 超大量療後の末梢血好中球数の低下と好中球のアポトーシスの促進とは関連があることが示唆された。

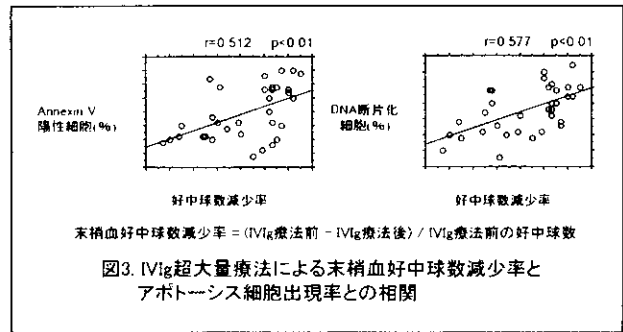


図3. IVIg超大量療法による末梢血好中球数減少率とアポトーシス細胞出現率との相関

(4) *in vitro*における IVIg 及び抗 Fas 抗体による好中球のアポトーシス誘導作用

好中球を IVIg または抗 Fas 誘導抗体(CH-11)、抗 Fas 抑制抗体(ZB4)とともに *in vitro* で 12 時間培養した時のアポトーシス細胞(annexin V 陽性細胞)の出現率を検討した(図4)。

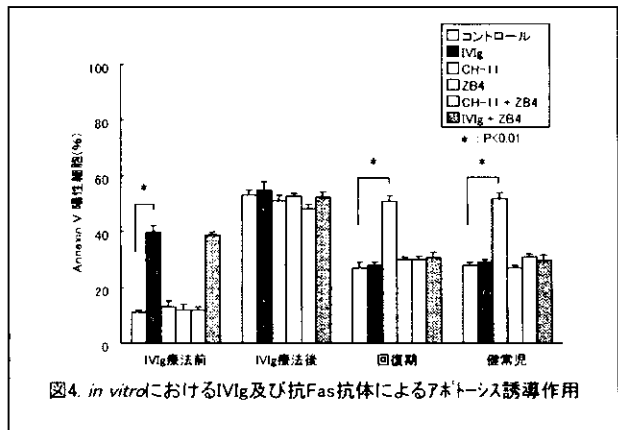


図4. *in vitro*におけるIVIg及び抗Fas抗体によるアポトーシス誘導作用

IVIg は KD において IVIg 療法前の好中球のアポトーシス細胞出現率をコントロール(mediumのみ)と比較して有意(p<0.01)に増加させたが、IVIg 療法後と KD 回復期、健常児の好中球のアポトーシス細胞出現率には影響しなかった。CH-11 は KD 回復期と健常児の好中球のアポトーシス細胞出現率を有意(p<0.01)に増加させたが、IVIg 療法前と IVIg 療法後の好中球のアポトーシス細胞出現率には影響しなかった。また、ZB4 は KD 回復期と健常児において CH-11 による好中球のアポトーシス誘導作用を完全に阻害したが、IVIg 療法前の好中球の IVIg によるアポトーシス誘導作用は全く阻害しなかった。さらに、IVIg による IVIg 療法前の好中球に対するアポトーシス誘導作用は濃度依存性であった(図5)。

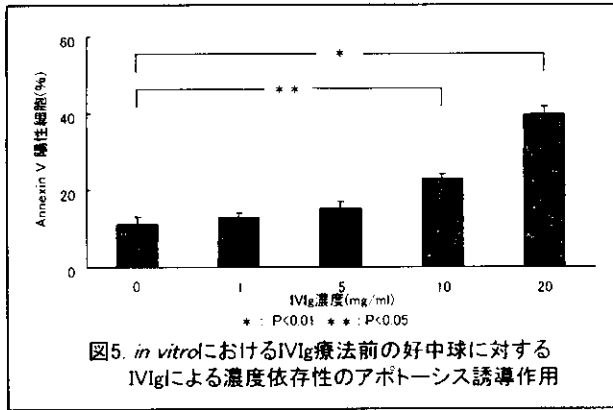


図5. *in vitro*におけるIVIg療法前の好中球に対するIVIgによる濃度依存性的アポトーシス誘導作用

(5) 好中球のアポトーシス誘導作用におけるIVIg, F(ab')₂分画, Fc分画, albuminの作用

IVIgのアポトーシス誘導作用がIgGのFc依存性かどうかを検討するために、F(ab')₂分画とFc分画を添加して*in vitro*で12時間培養した時のアポトーシス細胞の出現率を算出した。さらにコントロールとしてalbuminを添加した。

IVIg療法後とKD回復期、健常児の好中球においては、いずれの薬剤による処理によっても有意なアポトーシス細胞出現率の変化は認められなかった。一方、IVIg療法前の好中球においてはIVIg, F(ab')₂, Fc, F(ab')₂+Fc処理とともにコントロール(mediumのみ)と比較して有意なアポトーシス細胞出現率の増加が認められたが、albuminは影響を及ぼさなかった(図6)。

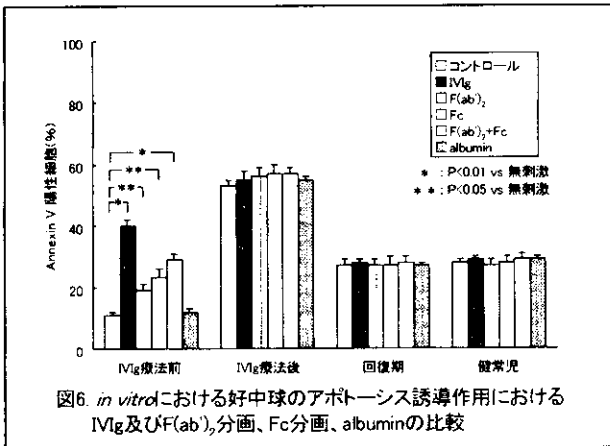


図6. *in vitro*における好中球のアポトーシス誘導作用におけるIVIg及びF(ab)₂分画, Fc分画, albuminの比較

なお、F(ab')₂, Fc, F(ab')₂+Fc処理によるアポトーシス細胞出現率は、いずれもIVIg処理よりも低い傾向が認められ、このことから、intact Igによるアポトーシス誘導作用が最も強力であると考えられた。その他に今回使用したIVIgの主な安定剤であるD-sorbitolの添加による検討も行ったが、すべての群の好中球の

アポトーシス細胞出現率に有意な影響を与えなかった(データ非提示)。

(6) アポトーシス細胞の顕微鏡学的観察

KDの好中球におけるアポトーシス細胞の出現をHoechst33342染色を用いて蛍光顕微鏡で観察した(図7)。好中球をIVIgとともに12時間培養したところ、IVIg療法後やKD回復期と比較してIVIg療法前の好中球では核が濃青の蛍光を発して断片化し、クロマチンの凝集を認めるアポトーシス細胞の増加が認められた。

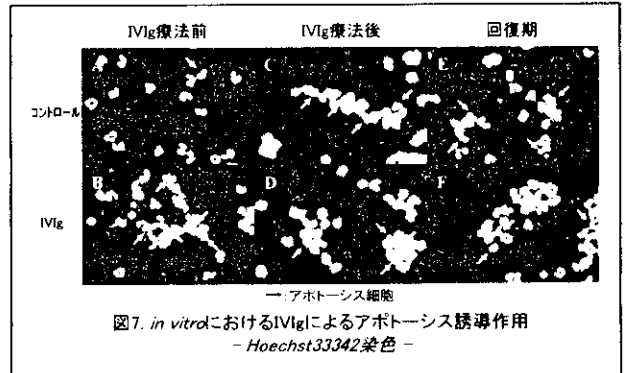


図7. *in vitro*におけるIVIgによるアポトーシス誘導作用 - Hoechst33342染色 -

(7) 好中球細胞表面におけるFasの発現

IVIg療法前の好中球におけるFasの発現は、IVIg療法後やKD回復期、健常児と比較して有意(p<0.01)に低下していた。またIVIg療法後はFas発現の増加が認められたが、KD回復期及び健常児と比較して有意差は認められなかった(図8)。IVIg療法前の好中球を*in vitro*でIVIg(20mg/ml)処理した後1~24時間培養し、経時的にFasの発現を測定したが、Fasの発現の有意な増加は認められなかった(データ非提示)。従って、IVIgは好中球のFasの発現に直接影響を与えないと考えられた。

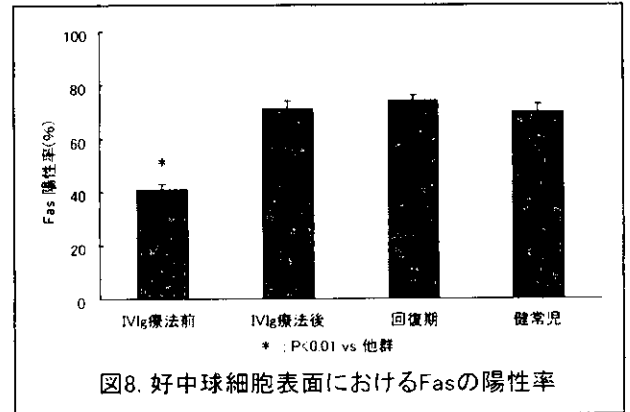
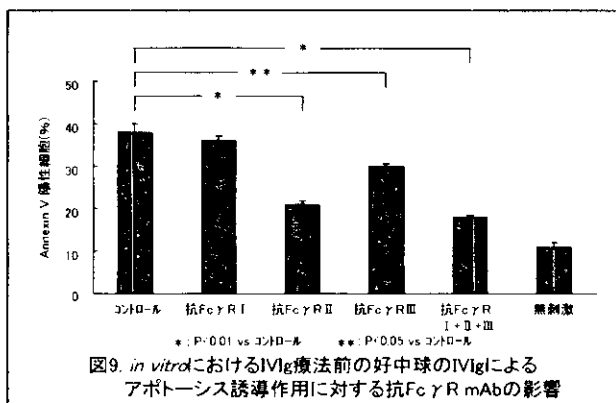


図8. 好中球細胞表面におけるFasの陽性率

(8) IVIgによる好中球のアポトーシス誘導作用に対する抗FcγR mAb処理の影響

IVIgによるアポトーシス誘導作用がFcγRを介しているかを検討するために、IVIg療法前の好中球をFcγRのブロック抗体で前処理し、その後IVIgを添加して*in vitro*で12時間培養した時のアポトーシス細胞の出現率を算出した(図9)。IVIg療法前の好中球に対するIVIgによるアポトーシス細胞出現率は、コントロール(IVIg処理のみ)と比較して抗FcγR II mAb及び抗FcγR III mAbの前処理によって有意に低下し、抗FcγR II mAb処理の抑制作用の方が強い傾向を認めた。なお、抗FcγR I mAb処理では有意なアポトーシス細胞出現率の変化は認められなかった。このことから、IVIgのアポトーシス誘導作用の一部はFcγRを介していることが示唆された。



D. 考察

KD急性期において、末梢血白血球数、特に好中球数は増加し、機能的にも活性化されている。また、病理学的検討ではKD早期において好中球が冠動脈病変に浸潤していることが明らかにされている(*Acta Pathol. Jpn.* 30, 681-694, 1980)。KDにおいて末梢血好中球数の増加は、臨床的に冠動脈病変の危険因子の一つと報告されている(*J. Pediatr.* 137, 177-180, 2000)。KD急性期において、好中球は各種プロテアーゼや活性酸素種(ROS)、アラキドン酸代謝物といった大量の自己傷害性の mediator を放出している、これらの炎症性 mediator は血管内皮細胞傷害を引き起こすと考えられている(*J. Clin. Invest.* 77, 1233-1243, 1986)。従って、過剰に活性化された好中球による内皮細胞傷害がKD血管炎の病態に関与していることが示唆さ

れる。今回の検討で、IVIgはKDにおいて末梢血好中球数を低下させることが明らかとなった。また、IVIgはKDにおける冠動脈病変の発生率を低下させることが報告されている(*Lancet* 2, 1055-1058, 1984)。よって、KDにおいてIVIgが冠動脈病変発生危険を低下させるメカニズムの一つとして、末梢血中の活性化した好中球をアポトーシスさせることによってその数を減少させることが考えられる。

最近、YiらはKD急性期においてリンパ球のアポトーシスは抑制され、IVIg療法は正常人のリンパ球のアポトーシスと同じレベルまで回復させることを報告している(*Acta Paediatr.* 90, 623-627, 2001)。今回の検討で、KD急性期の好中球のIVIg処理によるアポトーシス細胞出現率は、健常児の好中球におけるアポトーシス細胞出現率よりも大きいことが明らかとなった。このことはIVIgが好中球のアポトーシスを促進させる可能性があることを示唆している。また、IVIg後のKD患児の血清IgGレベルは15~25mg/mlに達するので、今回*in vitro*において使用したIVIg濃度(1~20mg/ml)は薬理学的にも妥当な濃度と考えられた。また、*in vitro*においてFc分画も好中球のアポトーシスを促進させたが、その促進作用はintact IVIgと比較すると軽度であった(図6)。さらに、好中球細胞表面のFcγRをブロックすることでIVIgのアポトーシス誘導作用の低下が認められたことから、FcレセプターはIVIgによる好中球のアポトーシス誘導作用の一部に関与していると考えられる。なお、今回の検討で抗FcγR I抗体はIVIgによるアポトーシスに影響を与えなかったが、これは好中球におけるFcγR I自体の発現が、FcγR IIやFcγR IIIと比較して少ないことによるものと考えられた。

近年の研究によって、好中球のアポトーシスはFas-FasL系やカスパーゼ、Bcl-2ファミリー蛋白など、いくつかのdeath-regulating factorによって調整されていることが明らかとなっている(*FEBS Lett.* 453, 67-71, 1999)。我々は以前、KD急性期における好中球のアポトーシスはFasを介する死のシグナル伝達に対して抵抗性であることを報告した(*Clin. Exp. Immunol.*

126, 355-364, 2001)。さらに、Fas 抑制抗体 (ZB4) が IVIg によって誘導されたアポトーシスを阻害しなかったことから (図 4)、IVIg は KD 急性期における好中球のアポトーシスを Fas 非依存性経路を介して誘導すると考えられた。今後は IVIg によるアポトーシス誘導作用の直接的なメカニズムの検討がさらに必要である。

興味深いことに、IVIg は KD の IVIg 療法前における好中球のアポトーシスのみを誘導し、IVIg 療法後や KD 回復期、健常児における好中球のアポトーシスは誘導しなかった。これらの結果から、KD 早期において末梢血好中球は単独あるいは複数の特定因子によって活性化されており、そのため IVIg によって誘導されるアポトーシスに対する感受性が高まっている可能性がある。KD 急性期には様々な血清中のサイトカインが増加していることが報告されており (*Eur. J. Pediatr.* 151, 44-47, 1992)、末梢血好中球はこれらのサイトカインによって priming されていると考えられる。我々はまた、KD 急性期における末梢血好中球に lipopolysaccharide (LPS) が結合していることを報告している (*J. Infect. Dis.* 179, 508-512, 1999)。以上のことから、アポトーシスのシグナル伝達におけるサイトカインや LPS と IVIg との agonistic または antagonistic な相互作用を今後は検討していく予定である。

エリスロマイシンやサルファサラジン、テオフィリン、ドパミン等の薬剤は好中球のアポトーシスを促進し、抗炎症作用を有すると考えられている。今回の結果から、IVIg は好中球のアポトーシスを誘導する薬剤の 1 つと考えられる。Okada らは KD において IVIg は好中球機能を濃度依存性に抑制することを zymosan 刺激好中球の chemiluminescence による解析から報告している (*Acta Paediatr. Jpn.* 33, 785-790, 1991)。以上より、KD における活性化好中球は IVIg 療法の標的の 1 つとなっている可能性が示唆された。

E. 結論

- (1) KD の IVIg 療法後の末梢血好中球数は有意に低下した。
- (2) KD の IVIg 療法後の末梢血好中球の自発的

アポトーシスは、有意(に)促進していた。

- (3) KD の IVIg 療法前の好中球は、*in vitro*において IVIg 処理により濃度依存性にアポトーシスを誘導した。さらにこの作用は Fas 抑制抗体 (ZB4) によって阻害されなかったが、Fc γ R のブロッキング抗体によって部分的に阻害された。
- (4) 以上より、KD において IVIg は末梢血好中球のアポトーシスを誘導することによって好中球を減少させる可能性が示唆された。そのアポトーシスのメカニズムは不明であるが、Fas 非依存性で、Fc レセプター依存性の経路を一部介することが示唆された。

謝辞 本研究に多大なご協力を賜りました防衛医大小児科、辻本 拓、中谷圭吾、川村陽一、徳富智明、関根勇夫先生に深謝致します。

F. 研究報告

1. Intravenous immunoglobulin therapy induces neutrophil apoptosis in Kawasaki disease.
Clinical Immunology (in submission)
2. 静注用免疫グロブリン製剤 (IVIg) は川崎病末梢血好中球のアポトーシスを誘導する。
第 105 回日本小児科学会学術集会、名古屋、平成 14 年 4 月 20 日

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業

難治性血管炎に伴う多臓器不全に係る病態の解明および治療法の開発に関する研究班会議

会 期： 14年1月11日（金）12：00－18：30

会 場： 国立感染症研究所 共用第二会議室（守衛所上）

プログラム

12：00－12：30 昼食および打ち合わせ会

12：30－12：45

1. はじめに

鈴木和男（主任研究者） 13年度の研究概略

2. あいさつ

名越 究 代：日下英司（厚生労働省・疾病対策課）

12：45－14：30

3. 分担者の研究進捗状況

1) 発症機構解析班（座長：布井博幸）

(1) 鈴木和男（感染研）

血管炎に関与する好中球機能

(2) 笹田昌孝（京都大、代理：小林 進）

好中球機能亢進とアポトーシスによる血管炎惹起機序の解析

(3) 岡田秀親（名古屋市大）

多臓器不全を誘発する補体反応の役割

(4) 木村暢宏（福岡医大・一内）

多臓器不全の発症機構におけるT細胞抗原受體(TCR)多様性からの分子生物学的検討

2) モデル動物および分子構造・プローブ班（座長：高橋 啓）

(1) 岩倉洋一郎（東京大・医科研）

多臓器不全に関与するサイトカインモデルマウス

(2) 山越 智（感染研）

肝機能不全解析：LECT2ノックアウトマウス

(3) 山本健二（国際医療センター）

ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析

(4) 田之倉 優（東京大・院農、代理：伊藤三恵、W. Dawson）

多臓器不全因子の構造解析

14：30－14：45 … 休憩

14 : 45 - 16 : 00

3) 病態解析・臨床班 (座長 : 木村暢宏)

(1) 相澤義房 (新潟大・一内)

多臓器不全に伴う心筋炎、動脈炎、不整脈の解析

(4) 布井博幸 (宮崎医大・小児科)

多臓器不全を伴うインフルエンザ脳炎脳症患者の血中チトクローム c 測定による病態解析と治療法の開発

(5) 関塚永一 代 : 宮崎耕司 (国立埼玉病院)

超高速高感度ビデオカメラシステムを用いた微小循環研究

(6) 竹下誠一郎 (防衛医大・小児科)

川崎病における血管炎の病態解明に関する研究と治療法の検討

(7) 高橋 啓 (東邦大・病理)、亀岡洋祐 (感染研)

川崎病モデルマウスによる血管障害遺伝子の染色体マッピング

16 : 00 - 18 : 15

5. 協力者の研究概要 (座長 : 岡田秀親)

(1) 野島 博 (阪大・微研)

血管炎特異的に転写誘導 (抑制) される遺伝子群の包括的単離と機能解析の試み

(2) 住本英樹 (九大・生体防御研)

血管内皮細胞の NOX4 発現

(3) 荒谷康昭 (横浜市大・木原生物研)

組織傷害への MPO の関与

(4) 大野尚仁 (東京薬大・薬)

血管炎・免疫異常を起こす分子

(8) 澤田 誠 (藤田保健衛生大・総医研・難病治療)

血管炎に関連した脳機能障害とミクログロアの機能

(5) 赤川清子 (感染研・免疫)

免疫不全に関わるマクロファージの関与

(9) 中山俊憲 (千葉大・院医)

アレルギー・免疫不全に関わる Th2 細胞の分化と維持機構

18 : 15 - 18 : 30

6. 13年度の成果まとめ

相澤義房、鈴木和男

コメンテータ : 直江史郎、岡崎富男、仁保喜之