

Table 2 Results of association analysis with combined Japanese Kawasaki disease and control samples and TDT^a analysis of US samples

SNPs	Allele 1/2	Subjects	Japanese (case-control association analysis) ^b						United States (TDT)							
			Genotype			Allele 1 vs. Allele 2		Genotype 11 vs. 12 + 22			T:U ^c	χ^2	P	OR	95% CI	
			11	12	22	χ^2	P	χ^2	P	OR						95% CI
numbl_6	C/T	KD	378	235	23	27.4	1.6×10^{-7}	30.5	3.3×10^{-8}	1.80	1.46-2.22	64:31	11.5	0.00071	2.06	1.34-3.17
		Control	748	259	25											
adck4_14	C/T	KD	374	235	26	31.7	1.8×10^{-8}	34.6	4.0×10^{-9}	1.87	1.52-2.30	64:31	11.5	0.00071	2.06	1.34-3.17
		Control	752	254	27											
itpkc_3	G/C	KD	376	234	27	32.4	1.2×10^{-8}	35.8	2.2×10^{-9}	1.89	1.53-2.33	64:30	12.3	0.00045	2.13	1.38-3.29
		Control	756	249	29											
flj41131_3	C/T	KD	372	237	28	37.8	7.8×10^{-10}	39.9	2.7×10^{-10}	1.95	1.58-2.41	66:32	11.8	0.00059	2.06	1.35-3.15
		Control	757	250	26											
snrpa_11	T/G	KD	375	235	27	40.8	1.7×10^{-10}	45.1	1.9×10^{-11}	2.05	1.66-2.53	55:40	2.4	0.12	1.38	0.91-2.07
		Control	771	235	28											
rab4b_2	C/G	KD	376	235	26	37.3	1.0×10^{-9}	41.7	1.1×10^{-10}	1.99	1.61-2.46	66:50	2.2	0.14	1.32	0.91-1.91
		Control	766	239	28											
rab4b_3	G/A	KD	374	235	27	39.5	3.2×10^{-10}	44.3	2.9×10^{-11}	2.04	1.65-2.51	57:39	3.4	0.066	1.46	0.97-2.20
		Control	767	235	29											
egln2_8	G/A	KD	374	232	27	36.7	1.4×10^{-9}	39.6	3.2×10^{-10}	1.96	1.59-2.42	68:51	2.4	0.12	1.33	0.93-1.92
		Control	763	243	27											
intergene_15	C/T	KD	375	237	25	36.5	1.6×10^{-9}	41.0	1.5×10^{-10}	1.98	1.60-2.44	63:49	1.8	0.19	1.29	0.89-1.87
		Control	764	243	27											

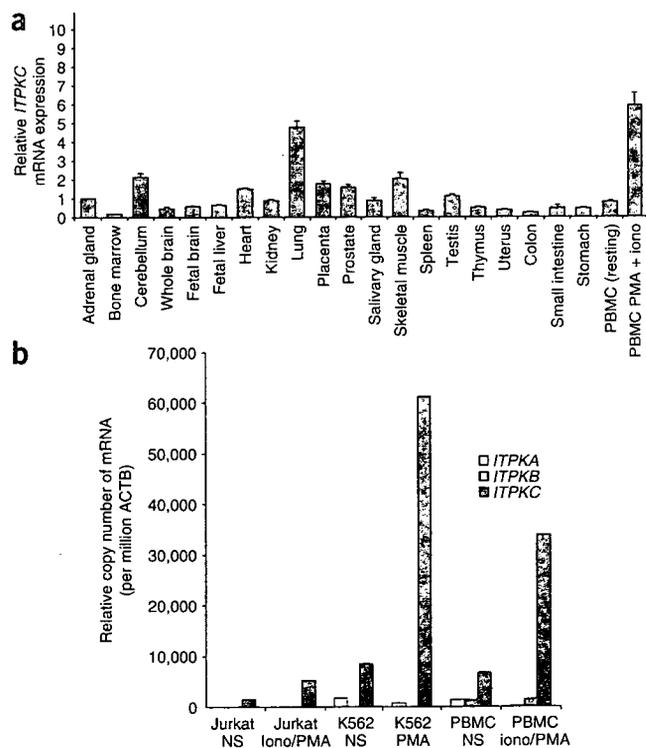
^aTransmission disequilibrium test. $n = 209$. ^b637 KD (94 + 276 + 267) and 1,034 controls (282 + 752). ^cT and U indicate transmitted and untransmitted allele 2 of each SNP, respectively.

(MIA), Ras-related GTP-binding protein 4b (*RAB4B*) and EGL nine (*C. elegans*) homolog 2 (*EGLN2*). Resequencing the 150-kb region from 12 Japanese individuals with Kawasaki disease and 12 healthy controls, we identified 109 SNPs and four deletion polymorphisms (Supplementary Table 2 online). We discovered one previously unknown and five known SNPs that were in the same LD group ($r^2 > 0.80$) with the initial three SNPs (Table 1). We confirmed the association of these nine SNPs with Kawasaki disease in an independent case-control set (267 individuals with Kawasaki disease and 752 healthy controls; Tables 1 and 2). The association of these SNPs remained significant after Bonferroni correction for multiple testing ($n = 1,222$, $P < 0.001$). Meta-analysis of these two independent sets by the Mantel-Haenszel method confirmed significance (Supplementary Fig. 1 online).

Transmission disequilibrium test (TDT) analysis of 209 US multi-ethnic trios showed asymmetric transmission of four of the nine SNPs (numbl_6, adck4_14, itpkc_3 and flj41131_3; Table 2). Of the 209 US trios, 106 were European Americans, and asymmetric transmission of these same four SNPs was again observed in this subgroup (data not shown). The results of a combined analysis of Japanese case-control and US TDT studies are summarized in Supplementary Figure 1. The significance of these SNPs in two different ethnic populations provided further evidence that genetic variation at this locus influences Kawasaki disease susceptibility.

Figure 2 Comparison of relative mRNA expression of *ITPKC* in different tissues and cell lines. (a) Quantitative RT-PCR was carried out on RNA extracted from different human tissues, and the results were normalized to β -actin transcripts. RNA from both resting PBMCs and PBMCs stimulated with ionomycin (iono) and PMA was also analyzed. Results are mean \pm s.d. of triplicate assays. (b) Expression pattern of ITPK isoforms in leukemic cell lines and PBMCs. Bars indicate relative mRNA copy number of *ITPKA* (yellow), *ITPKB* (red) and *ITPKC* (black), respectively. Expression was evaluated both in resting state and activated state. NS, no stimulation.

LD analysis of the European American subgroup ($n = 106$) showed that the 150-kb region containing the nine SNPs was separated into three LD blocks: the four significant SNPs on the *p*-terminal side, the three in the middle and the other two on the *q*-terminal side (Supplementary Fig. 2 online). Hence, the difference in haplotype structure in the European American and Japanese populations



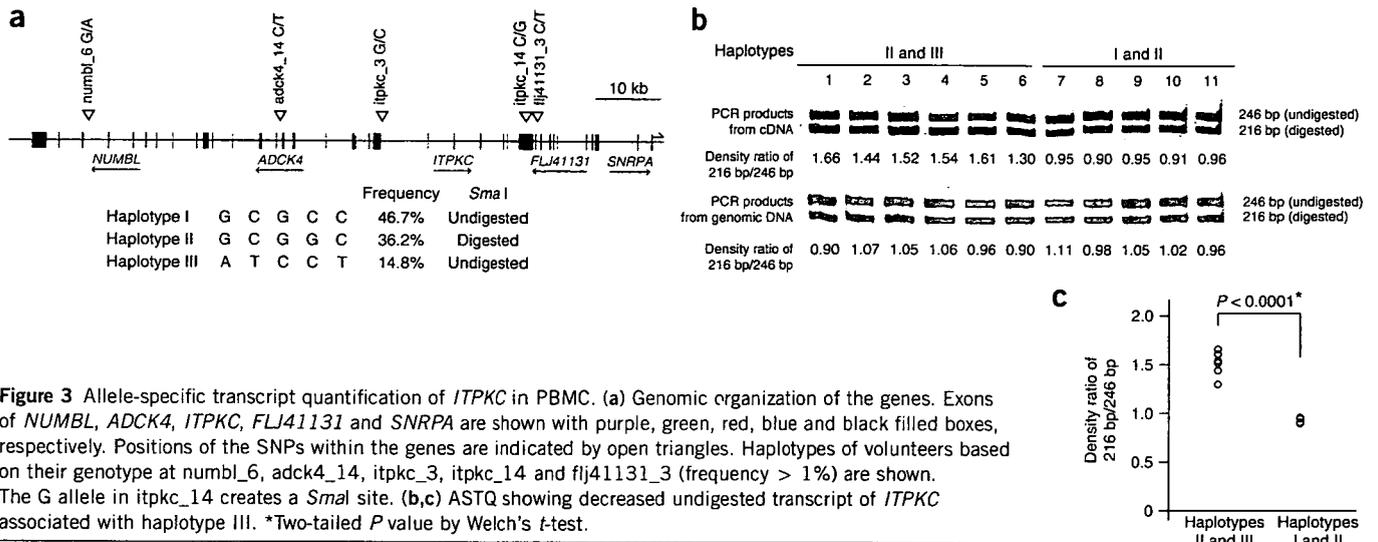


Figure 3 Allele-specific transcript quantification of *ITPKC* in PBMC. (a) Genomic organization of the genes. Exons of *NUMBL*, *ADCK4*, *ITPKC*, *FLJ41131* and *SNRPA* are shown with purple, green, red, blue and black filled boxes, respectively. Positions of the SNPs within the genes are indicated by open triangles. Haplotypes of volunteers based on their genotype at *numbl_6*, *adck4_14*, *itpkc_3*, *itpkc_14* and *flj41131_3* (frequency > 1%) are shown. The G allele in *itpkc_14* creates a *SmaI* site. (b,c) ASTQ showing decreased undigested transcript of *ITPKC* associated with haplotype III. *Two-tailed *P* value by Welch's *t*-test.

suggested that these four SNPs were the likely candidates influencing Kawasaki disease susceptibility. The SNPs were located within introns of *NUMBL*, *ADCK4*, *ITPKC* and *FLJ41131*, respectively (Fig. 1c and Supplementary Table 2).

Identification of *ITPKC* as the most plausible candidate gene

To determine the most likely candidate gene out of the four, we first carried out multivariate analysis of the four SNPs to assess whether a single causal SNP or some synergistic interaction of the SNPs within the locus conferred the disease risk. However, the likelihood ratio test applied to each single SNP showed a similar trend of association in simple contingency table analyses ($P = 0.00027, 0.000061, 0.000081$ and 0.000067 for *numbl_6*, *adck4_14*, *itpkc_3* and *flj41131_3*, respectively). Moreover, no epistasis worthy of note was shown between any two of the four SNPs or in any combination of each significant SNP and the other SNPs of the same gene region that were not independently associated with Kawasaki disease (data not shown). It seemed likely that the strong LD of the locus made the association of these SNPs equivalent. Thus, we considered that further biological evidence would be needed to identify the causal SNP and the gene responsible for the association.

We then reviewed the function of the four positional candidate genes. Although none of these had been previously recognized to have a role in immune activation, we postulated that *ITPKC* was the most likely candidate for such a role. *ITPKC* is one of the three isoenzymes of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase (ITPK) that phosphorylate inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), a key second messenger in many cell types. ITPK has been postulated to have a critical role in T-cell receptor (TCR) signaling, as IP3 kinase activity in Jurkat cells is rapidly upregulated after TCR stimulation⁹, although the relative importance of the three known isoenzymes, ITPKA, ITPKB and ITPKC, has not yet been determined. Because individuals with Kawasaki disease have marked activation of the immune system, we hypothesized that the ITPKC might have a role in regulation of the immune response.

To study the role of ITPKC, we first analyzed the tissue distribution of *ITPKC* expression by RT-PCR. We detected expression in all tissues sampled, with the highest constitutive expression in cerebellum, lung and skeletal muscle. In the latter two tissues, high expression had been shown by RNA blot analysis in a previous report¹⁰ (Fig. 2a). Low expression was detected in immune-related organs such as bone

marrow, spleen, thymus and resting peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). However, expression was notably induced in PBMCs when stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and the Ca²⁺ ionophore ionomycin (Fig. 2a). We compared the mRNA expression of the three isoenzymes in PBMCs and two leukemic cell lines (Jurkat and K562). Before stimulation, the expression of all three isoenzymes was low; after stimulation, only the expression of the *ITPKC* isoenzyme was induced (3- to 7-fold increase; Fig. 2b). This result prompted us to pursue *ITPKC* as the most likely candidate gene in the associated haplotype block.

To determine whether any of the four SNPs in *ITPKC* or adjacent loci affected transcript abundance of *ITPKC* *in vivo*, we carried out allele-specific transcript quantification (ASTQ; Fig. 3). The RT-PCR product from mRNA isolated from PBMCs of individuals with haplotype II (G allele in *itpkc_14*), but not haplotypes I and III, could be digested with *SmaI* (Fig. 3a). The *SmaI*-treated RT-PCR product from six individuals with haplotypes II and III had a higher ratio of digested to undigested forms, suggesting lower transcript abundance from haplotype III (containing alleles associated with Kawasaki disease susceptibility; Fig. 3b, lanes 1–6). Five individuals with haplotypes I and II (containing alleles not associated with Kawasaki disease susceptibility and the C- or G-allele at *itpkc_14*, respectively; Fig. 3b, lanes 7–11) had an equal ratio of digested to undigested PCR product, suggesting that the difference between haplotypes II and III was due to the SNPs. The mean ratio was 1.51 for the former group and 0.93 for the latter ($P < 0.0001$; Fig. 3c). This finding further encouraged us to consider *ITPKC* as the most plausible candidate gene in the locus.

Regulatory role of ITPKC in T-cell activation

The increase in *ITPKC* expression after cell stimulation prompted us to study the role of ITPKC in immune activation (Fig. 4). IP3 is generated by the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by phospholipase C when activated by various external stimuli¹¹. In T cells, IP3, released by stimulation of the TCR complex, increases intracellular Ca²⁺ through IP3 receptors (IP3Rs) expressed on endoplasmic reticulum¹². Subsequent Ca²⁺ influx across the plasma membrane leads to nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) and activates transcription of interleukin-2 (*IL2*) and other cytokines^{13,14}.

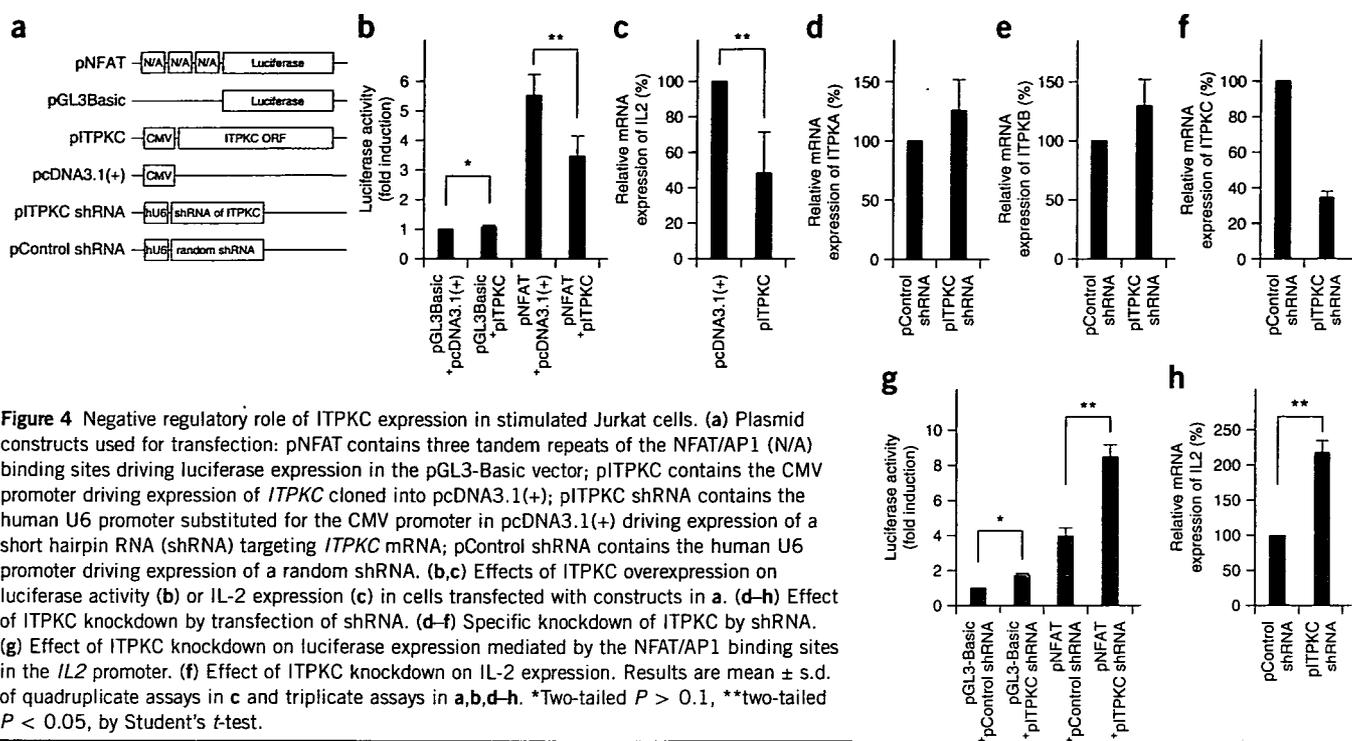


Figure 4 Negative regulatory role of ITPKC expression in stimulated Jurkat cells. (a) Plasmid constructs used for transfection: pNFAT contains three tandem repeats of the NFAT/AP1 (N/A) binding sites driving luciferase expression in the pGL3-Basic vector; pITPKC contains the CMV promoter driving expression of *ITPKC* cloned into pcDNA3.1(+); pITPKC shRNA contains the human U6 promoter substituted for the CMV promoter in pcDNA3.1(+) driving expression of a short hairpin RNA (shRNA) targeting *ITPKC* mRNA; pControl shRNA contains the human U6 promoter driving expression of a random shRNA. (b,c) Effects of ITPKC overexpression on luciferase activity (b) or IL-2 expression (c) in cells transfected with constructs in a. (d-h) Effect of ITPKC knockdown by transfection of shRNA. (d-f) Specific knockdown of ITPKC by shRNA. (g) Effect of ITPKC knockdown on luciferase expression mediated by the NFAT/AP1 binding sites in the *IL2* promoter. (h) Effect of ITPKC knockdown on IL-2 expression. Results are mean \pm s.d. of quadruplicate assays in c and triplicate assays in a,b,d-h. *Two-tailed $P > 0.1$, **two-tailed $P < 0.05$, by Student's *t*-test.

We postulated that ITPKC regulates NFAT by modulating the abundance of IP3. When *ITPKC* was overexpressed in Jurkat cells, NFAT-mediated activation after stimulation with phytohemagglutinin (PHA) and PMA was significantly reduced (Fig. 4b). Next, we assessed NFAT-mediated activation when expression of *ITPKC* was decreased. In contrast to overexpression, knockdown of *ITPKC* using plasmids expressing short hairpin RNA (shRNA) resulted in enhanced NFAT-mediated activation in response to the same stimulation (Fig. 4f,g). *ITPKA* and *ITPKB* also catalyze phosphorylation of IP3, and their expression was observed in PBMCs, even though the expression was much lower than that of *ITPKC* (Fig. 2b). Thus, we assessed mRNA expression of these two genes to exclude the possibility that the shRNA designed for *ITPKC* also silenced *ITPKA* and *ITPKB*, thereby

accounting for the effect on NFAT activation. We observed no suppression and actually saw a slight increase in transcript concentrations for both genes (Fig. 4d,e). Consistent with these results, *IL2* transcription in stimulated Jurkat cells decreased in response to *ITPKC* overexpression and increased following *ITPKC* knockdown (Fig. 4c,h). Given that NFAT mediates the expression of many proteins beside IL-2 that have important roles in T-cell regulation, *ITPKC*, and not *ITPKA* or *ITPKB*, may act as a key negative regulator of T-cell function.

Functional significance of *itpkc_3*

As none of the four significant SNPs was located in a protein coding region of *ITPKC* (Fig. 3a), we investigated the role of these SNPs in

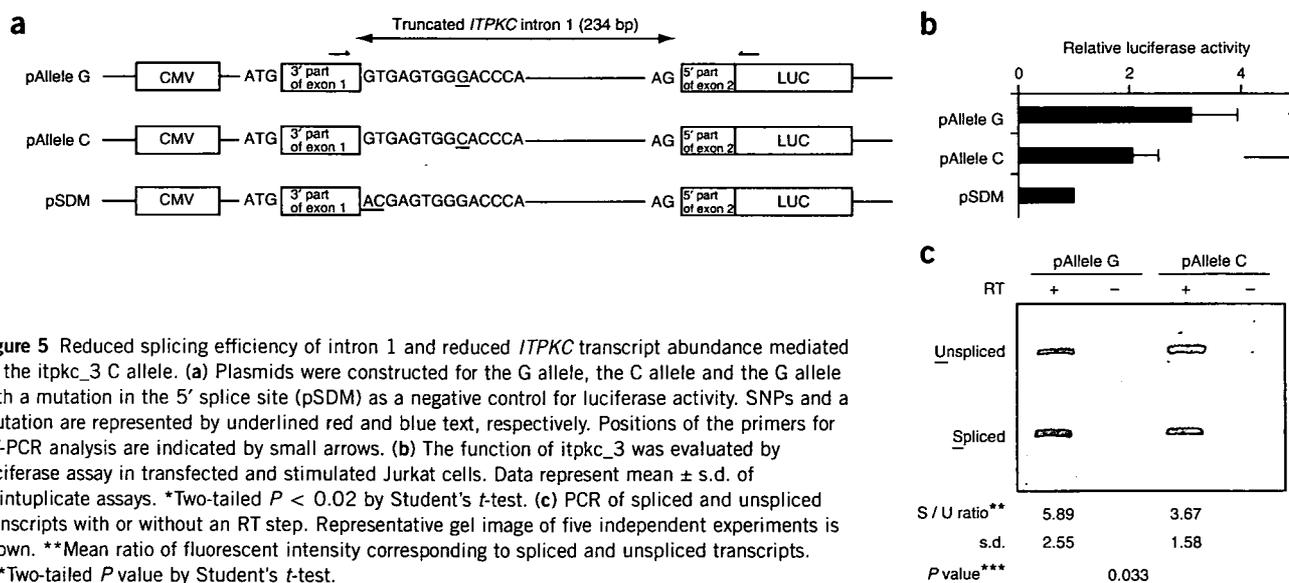


Figure 5 Reduced splicing efficiency of intron 1 and reduced *ITPKC* transcript abundance mediated by the *itpkc_3* C allele. (a) Plasmids were constructed for the G allele, the C allele and the G allele with a mutation in the 5' splice site (pSDM) as a negative control for luciferase activity. SNPs and a mutation are represented by underlined red and blue text, respectively. Positions of the primers for RT-PCR analysis are indicated by small arrows. (b) The function of *itpkc_3* was evaluated by luciferase assay in transfected and stimulated Jurkat cells. Data represent mean \pm s.d. of quintuplicate assays. *Two-tailed $P < 0.02$ by Student's *t*-test. (c) PCR of spliced and unspliced transcripts with or without an RT step. Representative gel image of five independent experiments is shown. **Mean ratio of fluorescent intensity corresponding to spliced and unspliced transcripts. ***Two-tailed P value by Student's *t*-test.

Table 3 Association analysis of *itpkc_3* with stratified samples

Samples	Japanese (case-control association analysis) ^d							United States (TDT)						
	Genotype			χ^2	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>n</i> ^e	T:U ^f	χ^2	<i>P</i>	OR	95% CI	
GG	GC	CC												
KD linked to 19q13.2 ^a	21	18	1	8.2	0.0042	2.46	1.30–4.65	–	–	–	–	–	–	
KD with family history ^b	53	44	4	19.1	0.000012	2.46	1.63–3.73	–	–	–	–	–	–	
KD with CALs ^c	61	44	2	12.4	0.00044	2.05	1.37–3.08	108	37:11	14.1	0.00018	3.36	1.72–6.59	
KD without CALs	172	94	12	13.4	0.00025	1.68	1.27–2.21	100	27:18	1.8	0.18	1.50	0.63–2.72	
Control	756	249	29											

^aProbands of 78 sib pairs in previous linkage analysis whose IBD allele number were estimated to be >1.0 at *itpkc_3* (63cM). ^bProbands of 93 affected sib pairs, 4 parent-child pairs, 1 monozygotic twin, 1 dizygotic twin, 1 first cousin pair and 1 second cousin pair. ^cKD cases having coronary dilatation or aneurysms during the acute phase. ^dGenotype frequency comparison in dominant model of inheritance. ^eNumber of affected individuals. ^fT' and 'U' indicate transmitted and untransmitted C allele of *itpkc_3*, respectively.

transcriptional regulation. Using the TFSEARCH program (see URLs section in Methods), we predicted binding of the AP-1 transcription factors to the sequence containing flj41131_3 and lowered the score with a nucleotide substitution at the SNP (from 91.8 to 79.4; **Supplementary Fig. 3a** online). The SNP is located within intron 7 of *FLJ41131*, but because of close tail-to-tail gene arrangement (**Fig. 1c**), the distance between the SNP and the 3' end of the *ITPKC* gene is only 1.2 kb. We tested the hypothesis that flj41131_3 affects the expression of *ITPKC* by altering activity of an enhancer element outside the gene. However, we observed no significant difference in luciferase assays using constructs corresponding to the two alleles of flj41131_3 (**Supplementary Fig. 3b**). Moreover, we did not observe higher concentrations of the digested transcripts in ASTQ analysis of an individual who was heterozygous at flj41131_3 and homozygous for major alleles at *itpkc_3*, *adck4_14* and *numbl_6* (data not shown). These findings led us to examine the functional significance of SNPs other than flj41131_3. No transcription factor was clearly predicted to bind to any alleles of *numbl_6*, *adck4_14* and *itpkc_3*, and luciferase assays with constructs for these SNPs showed no functional effects (**Supplementary Fig. 3c**). Thus, we explored other possible mechanisms by which these SNPs might alter *ITPKC* expression.

Differences in splicing efficiency associated with nucleotide changes within introns have previously been observed^{15,16}. Of the four significant SNPs, only *itpkc_3* was located in an intron of *ITPKC* (**Fig. 3a**). Its location near the 5' splice site further encouraged us to investigate the role of this SNP in regulating splicing. We constructed a minigene containing a truncated intron 1 with portions of exons 1 and 2 at either end and the luciferase gene fused in-frame downstream of exon 2 (**Fig. 5a**). When transfected into Jurkat cells, the plasmid containing the C allele had significantly lower luciferase activity compared to the plasmid containing the G allele (**Fig. 5b**). RT-PCR with primers designed to amplify cDNAs generated from transcripts of these plasmids yielded two bands. The lower and upper bands corresponded to spliced and unspliced transcripts, respectively. As expected, we observed a lower spliced/unspliced ratio of the transcripts for the C allele (**Fig. 5c**). Because no amplification was observed from the templates without a reverse transcriptase step, a possible plasmid DNA contamination in the cDNA templates as the source of the 'unspliced' bands was excluded. To our knowledge, no splice variants of this gene using a different 5' splice site, which could rescue splicing inefficiency¹⁷, have been reported in the literature or public databases. Furthermore, RT-PCR of the transcripts in PBMCs from individuals with the C allele did not detect such variants (data not shown). Therefore, we speculate that reduced

splicing associated with the C allele could result in lower *ITPKC* transcript concentrations that might, in turn, lead to increased T-cell activation.

Association analysis with stratified samples

To further explore the effects of the proposed risk allele, we stratified the samples by the following two factors: family history of Kawasaki disease and presence of coronary artery lesions (CALs). Among the 78 Japanese affected sib pairs, 40 pairs shared more than one allele near *itpkc_3*. In this subset, the *itpkc_3* C allele was over-represented compared to controls ($n = 40$, odds ratio (OR) = 2.46, 95% confidence interval (CI) = 1.30–4.65; **Table 3**). We observed the same trend in Japanese probands with a positive family history of Kawasaki disease ($n = 101$, OR = 2.46, 95% CI = 1.63–3.73; **Table 3**). These data strongly corroborate the association between *itpkc_3* and Kawasaki disease. This allele also seemed to confer an increased risk of developing CALs (Japanese individuals with Kawasaki disease: $n = 106$, OR = 2.05, 95% CI = 1.37–3.08; US individuals with Kawasaki disease: $n = 108$, OR = 3.36, 95% CI = 1.72–4.96; **Table 3**).

DISCUSSION

We identified a SNP that contributes to Kawasaki disease susceptibility and disease outcome, starting from an LD mapping strategy for the chromosome 19q13.2–13.3 region for which evidence of linkage was observed in a previous sib-pair analysis⁸. We showed for the first time that *ITPKC* in humans is inducible in PBMCs and modulates NFAT activation. We further defined a role of *ITPKC* as a negative regulator of T-cell activation by showing that the *itpkc_3* C allele results in increased *IL2* transcript abundance.

To our knowledge, alteration of splicing efficiency as a result of a single base substitution at nine nucleotides from the 5' splice site has been rarely observed¹⁸. The SNP position was outside the limit of the consensus donor site sequence (+6)¹⁹, and no cryptic splice site was generated by the nucleotide change. One possible explanation for this finding could be that a GGG motif might act as an intronic splicing control element, and the alteration of the motif to GGC reduced this activity. In an analysis of mammalian genomes, G nucleotides and G triplets were over-represented at the ends of introns^{20,21}. Cumulative evidence suggests that these G-rich sequence elements have an important role in pre-mRNA splicing^{15,16,22,23}. Change in the secondary structure of the pre-mRNA by a nucleotide substitution outside the consensus sequence^{24,25} is another possible mechanism that could influence splicing. When the structure of pre-mRNAs in this region was predicted using the Mfold program (see URLs section in

Methods), the C-allele transcript was found to be likely to form a more stable stem-loop structure than the G-allele transcript (Supplementary Fig. 4a online).

An electrophoresis mobility shift assay (EMSA) using RNA oligonucleotides including *itpkc_3* and nuclear extracts from either HeLa or Jurkat cells showed specific binding of an unknown protein to the G allele (Supplementary Fig. 4b). Identification of the RNA-binding nuclear factor may reveal the precise mechanism through which this SNP alters transcript abundance.

The biological impact of this SNP in Kawasaki disease pathogenesis requires further study. The weaker negative regulatory effect of *itpkc_3* C allele on *IL2* is consistent with the significant elevation of IL-2 in acute Kawasaki disease compared to other febrile illnesses²⁶. Autopsy studies in children who die during the acute phase of Kawasaki disease show infiltration of T cells, particularly CD8⁺ cytotoxic T cells (CTL), into the coronary artery wall²⁷. This suggests that T-cell activation and infiltration into selected compartments are critically involved in the pathogenesis of Kawasaki disease. Increased activation of T cells influenced by the *ITPKC* polymorphism may be responsible for a greater and more prolonged expansion of pro-inflammatory T cells during the acute phase, thus affecting Kawasaki disease susceptibility and leading to greater disease severity.

The association of the *itpkc_3* C allele with Kawasaki disease may have direct clinical implications. In both Japan and the United States, approximately 10–20% of individuals with Kawasaki disease are resistant to IVIG therapy, and these individuals are at highest risk of developing CALs. Although the sample size was limited, the C allele also conferred an increased risk of IVIG resistance in the US cohort for which information regarding IVIG response was available ($n = 37$, OR = 4.67, 95% CI = 1.34–16.24; Supplementary Table 3 online). Clinical scoring systems have been devised to identify this subgroup, but there is room for improvement in sensitivity and specificity to make them truly useful clinical tools^{28–31}. Identifying a genetic signature for the subgroup of IVIG-resistant individuals would permit the use of more intensified therapy (for example, anti-cytokine therapy or plasmapheresis) to prevent the development of CALs. Cyclosporin A (CsA) mediates immunosuppression through blocking calcineurin, which is an important downstream molecule in the Ca²⁺/NFAT signaling pathway³². A single case report describes the successful use of CsA in an individual with Kawasaki disease resistant to IVIG³³. If further study confirms the importance of the Ca²⁺/NFAT pathway in T-cell activation in acute Kawasaki disease, then a clinical trial of CsA in IVIG-resistant individuals may be warranted.

Because IP3 also acts as a second messenger in B cells, macrophages and neutrophils^{11,34}, the function of this SNP should be examined in these effector cells in Kawasaki disease. *ITPKC* is also expressed in the myocardium. The potential importance of IP3 and Ca²⁺ influx in the myocardium is also relevant to individuals with Kawasaki disease in whom subclinical myocarditis is a common feature of the acute illness. The potential role of this SNP in other inflammatory disorders of the vascular wall and myocardium, including other forms of systemic vasculitis, myocarditis and atherosclerosis, should also be considered.

METHODS

Subjects. The 564 control samples in the initial screening were members of the general Japanese population with various common diseases of adulthood unrelated to Kawasaki disease. Genotype data relating to 1,222 SNPs for this population was obtained from a database at our institute. We recruited 637 Japanese individuals with Kawasaki disease and 1,034 healthy control subjects from several medical institutes in Japan. The ethical committee of RIKEN

approved the study, and all the parents of the patients gave written informed consent. All Japanese individuals with Kawasaki disease (male/female ratio = 384:253) were diagnosed by pediatricians based on the Japanese criteria for the disease³⁵. Mean age of disease onset was 29.3 months (range 2–127 months).

Trios of Kawasaki disease-affected children and their biological parents ($n = 209$) were recruited at Rady Children's Hospital San Diego and at Boston Children's Hospital. Details regarding this cohort of US individuals with Kawasaki disease have been previously described³⁶. Genomic DNA from whole blood, lymphoblastoid cell lines or mouth wash samples was extracted according to standard procedures.

SNP genotyping. We genotyped SNPs using the Invader and TaqMan assays as described previously³⁷.

Statistical analysis. The case-control association study was analyzed using a χ^2 test. We carried out a multivariate logistic regression analysis for the association between Kawasaki disease and multiple SNPs using forward-backward stepwise procedures to select SNPs and their interactions. For each step of the forward or backward process, we carried out a log likelihood test (0.05 significance threshold) to change the set of SNPs or their interactions. Meta-analysis of data from different case-control sets was conducted by Mantel-Haenszel methodology. The transmission disequilibrium test was performed using TDT software³⁸ integrated in Haploview version 3.32 (see URLs section below). Integration of the case-control and TDT data was conducted as previously described³⁹.

RNA extraction and quantitative RT-PCR. Total RNA from normal human tissues (except PBMCs) was purchased from Clontech. We isolated PBMCs from healthy human volunteers from venous blood using the Lymphoprep reagent (Axis-Shields). To assess the induction of *ITPKC* in stimulated white blood cells, we treated Jurkat cells and PBMCs with ionomycin (1 mg ml⁻¹) and PMA (50 ng ml⁻¹) for 8 h. K562 cells were treated only with PMA (50 ng ml⁻¹) for 8 h. We extracted total RNA from cell lines and PBMCs using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel). 1 μ g of each RNA was reverse transcribed with Superscript III reverse transcriptase and oligo dT primers (Invitrogen). We quantified transcripts for *ITPKA*, *ITPKB*, *ITPKC* and *IL2* with TaqMan probe and primers (Hs00176658_m1, Hs00176666_m1 and Hs00363893_m1 for *ITPKA*, *ITPKB* and *ITPKC*, respectively, and Hs00174114_m1 for *IL2*). Amplification and detection were done using a Mx3000P thermal cycler (Stratagene). Results were normalized to the transcript levels of β -actin.

Allele-specific transcript quantification (ASTQ). ASTQ was carried out as described previously⁴⁰. Genomic DNAs and cDNAs were amplified for 31 cycles with these primers. At the last cycle, we added forward primer labeled with Alexa Fluor 488 at the 5' end. Amplicons were digested with *SmaI* according to manufacturer's instructions. Separation was conducted on 12% polyacrylamide gels in 25 mM Tris and 250 mM glycine. Quantification was carried out by using FLA-7000 analyzer (Fujifilm).

URLs. JSNPs, http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html; TFSEARCH, <http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>; Mfold, <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>; International HapMap Project, http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap_B36/; Haploview version 3.32, <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>.

GenBank accession number. Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C (*ITPKC*) mRNA, NM_025194.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the individuals with Kawasaki disease and their families who participated in this project. We are grateful to H. Aotsuka, H. Nakajima, F. Kudo, M. Miura, K. Akagi, T. Matsubara, M. Nishibatake, S. Oku, K. Sameshima, Y. Tanaka, Y. Nomura, S. Ogita, M. Sakauchi, T. Isobe, T. Sano, T. Matsushita and other physicians who contributed DNA samples. We thank J. Pancheri and A. Baker for collection of DNA samples and D. Scherrer, H. Sugiyama and M. Saito for technical assistance. This work was supported by grants from

ARTICLES

the Japanese Millennium Project, from the Japan Society for the Promotion of Science (16591069 to Y.O.) and from the National Heart, Lung, Blood Institute of the National Institutes of Health (HL69413 to J.C.B.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y.O., A.H. and Yusuke N. designed the study. Y.O., J.C.B., C.S., J.W.N., F.K., K.H., M.T., Y.S., K.O., T.S., A.N., Y.K., T.Y., K.S., Takeo T., T.N., H.C. and A.F. collected most of the samples. M.Y., Yoshikazu N., H.Y. and T.K. provided information regarding the Japanese nation-wide survey of Kawasaki disease. K.W. and Y.F. established lymphoblastoid cell lines of individuals with Kawasaki disease. Tatsuhiko T. and A.S. supported the initial SNP screening by providing genotyping data for the control population. Y.O. performed genotyping and statistical analyses. R.N. and Tatsuhiko T. performed logistic regression analyses. Y.O. and T.G. performed functional assays. Y.O., J.C.B., C.S., J.W.N. and A.H. wrote the paper.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

1. Kawasaki, T. Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes: my clinical observation (in Japanese). *Jpn. J. Allergy* **16**, 178–222 (1967). English translation by Shike, H., Burns, J.C. & Shimizu, C. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**, 993–995 (2002).
2. Kato, H., Koike, S., Yamamoto, M., Ito, Y. & Yano, E. Coronary aneurysms in infants and young children with acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome. *J. Pediatr.* **86**, 892–898 (1975).
3. Kato, H. *et al.* Long-term consequences of Kawasaki disease. A 10- to 21-year follow-up study of 594 patients. *Circulation* **94**, 1379–1385 (1996).
4. Cook, D.H. *et al.* Results from an international survey of Kawasaki disease in 1979–82. *Can. J. Cardiol.* **5**, 389–394 (1989).
5. Fujita, Y. *et al.* Kawasaki disease in families. *Pediatrics* **84**, 666–669 (1989).
6. Uehara, R., Yashiro, M., Nakamura, Y. & Yanagawa, H. Kawasaki disease in parents and children. *Acta Paediatr.* **92**, 694–697 (2003).
7. Dergun, M. *et al.* Familial occurrence of Kawasaki syndrome in North America. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **159**, 876–881 (2005).
8. Onouchi, Y. *et al.* A genome-wide linkage analysis for Kawasaki disease: evidence for linkage to chromosome 12. *J. Hum. Genet.* **52**, 179–190 (2007).
9. Imboden, J.B. & Pattison, G. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate kinase activity after stimulation of human T cell antigen receptor. *J. Clin. Invest.* **79**, 1538–1541 (1987).
10. Dewaste, V. *et al.* Cloning and expression of a cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C. *Biochem. J.* **352**, 343–351 (2000).
11. Berridge, M.J. & Irvine, R.F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315–321 (1984).
12. Harnick, D.J. *et al.* The human type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T lymphocytes. Structure, localization, and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 2833–2840 (1995).
13. Weiss, A. & Littman, D.R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263–274 (1994).
14. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 472–484 (2005).
15. Cogan, J.D. *et al.* A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 909–912 (1997).
16. von Ahsen, N. & Oellerich, M. The intronic prothrombin 19911A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood* **103**, 586–593 (2004).
17. Morisaki, H., Morisaki, T., Newby, L.K. & Holmes, E.W. Alternative splicing: a mechanism for phenotypic rescue of a common inherited defect. *J. Clin. Invest.* **91**, 2275–2280 (1993).
18. Krawczak, M. *et al.* Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum. Mutat.* **28**, 150–158 (2007).
19. Krawczak, M., Reiss, J. & Cooper, D.N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum. Genet.* **90**, 41–54 (1992).
20. Majewski, J. & Ott, J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res.* **12**, 1827–1836 (2002).
21. Yeo, G., Hoon, S., Venkatesh, B. & Burge, C.B. Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15700–15705 (2004).
22. Louie, E., Ott, J. & Majewski, J. Nucleotide frequency variation across human genes. *Genome Res.* **13**, 2594–2601 (2003).
23. McCullough, A.J. & Berget, S.M. G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4562–4571 (1997).
24. Buratti, E. & Baralle, F.E. Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10505–10514 (2004).
25. Varani, L. *et al.* Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8229–8234 (1999).
26. Yoshioka, T. *et al.* Polyclonal expansion of TCRBV2- and TCRBV6-bearing T cells in patients with Kawasaki disease. *Immunology* **96**, 465–472 (1999).
27. Brown, T.J. *et al.* CD8 T lymphocytes and macrophages infiltrate coronary artery aneurysms in acute Kawasaki disease. *J. Infect. Dis.* **184**, 940–943 (2001).
28. Fukunishi, M. *et al.* Prediction of non-responsiveness to intravenous high-dose gamma-globulin therapy in patients with Kawasaki disease at onset. *J. Pediatr.* **137**, 172–176 (2000).
29. Egami, K. *et al.* Prediction of resistance to intravenous immunoglobulin treatment in patients with Kawasaki disease. *J. Pediatr.* **149**, 237–240 (2006).
30. Sano, T. *et al.* Prediction of non-responsiveness to standard high-dose gamma-globulin therapy in patients with acute Kawasaki disease before starting initial treatment. *Eur. J. Pediatr.* **166**, 131–137 (2007).
31. Kobayashi, T. *et al.* Prediction of intravenous immunoglobulin unresponsiveness in patients with Kawasaki disease. *Circulation* **113**, 2606–2612 (2006).
32. Ho, S. *et al.* The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **80**, S40–S45 (1996).
33. Raman, V., Kim, J., Sharkey, A. & Chatila, T. Response of refractory Kawasaki disease to pulse steroid and cyclosporin A therapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**, 635–637 (2001).
34. Lewis, R. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 497–521 (2001).
35. Ayusawa, M. *et al.* Revision of diagnostic guidelines for Kawasaki disease (the 5th revised edition). *Pediatr. Int.* **47**, 232–234 (2005).
36. Burns, J.C. *et al.* Family-based association analysis implicates IL-4 in susceptibility to Kawasaki disease. *Genes Immun.* **6**, 438–444 (2005).
37. Suzuki, A. *et al.* Functional haplotypes of *PADI4*, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **34**, 395–402 (2003).
38. Spielman, R.S., McGinnis, R.E. & Ewens, W.J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 506–516 (1993).
39. Kazem, G.R. & Farrall, M. Integrating case-control and TDT studies. *Ann. Hum. Genet.* **69**, 329–335 (2005).
40. Uejima, H., Lee, M.P., Cui, H. & Feinberg, A.P. Hot-stop PCR: a simple and general assay for linear quantitation of allele ratios. *Nat. Genet.* **25**, 375–376 (2000).

平成18年 稀少疾患サーベイランス調査結果

日本小児循環器学会学術委員会

市田 露子¹⁾, 佐地 勉²⁾富山大学医学部小児科¹⁾東邦大学医学部第一小児科²⁾

Key words :

稀少疾患, サーベイランス調査

はじめに

平成17年に引き続き、「平成18年稀少疾患サーベイランス調査」を施行した。全国の小児循環器学会評議員と理事、大学附属病院小児科、および新たに重要と思われる施設にアンケートを郵送し、調査を依頼した。結果が集計されたので報告する。

対象および方法

1) 調査対象期間

2006年1月1日～12月31日。2006年の1年間に発症あるいは診断した症例。

2) 調査期間

2007年1月15日～6月11日

3) 調査対象

小児循環器学会評議員と理事、大学附属病院小児科、および新たに重要と思われる施設を加えた158施設(表1)にアンケートを郵送し、調査を依頼した。なお、同一施設で患者が重複しないように、代表者がまとめて返送することとした。

4) 対象疾患

昨年同様、拡張型心筋症(DCM)、肥大型心筋症(HCM)、拘束型心筋症(RCM)、ミトコンドリア心筋症、不整脈源性右室心筋症(ARVC)、左室心筋緻密化障害(LVNC)、心内膜線維弾性症(EFE)、Pompe病、急性(劇症型を含む)心筋炎、心臓腫瘍(結節性硬化症を含む)、原発性肺高血圧、左冠状動脈肺動脈起始症

(BWG)、リウマチ熱、先天性完全房室ブロック、心膜欠損、収縮性心膜炎、ダウン症の川崎病の17疾患とした。

5) 調査票

昨年同様、発症数のサーベイランスが第一義的であり、調査項目は生死、年齢、性別、家族内発症など必要最低限度の内容とした。各疾患において、担当医が臨床診断が適切と思われる症例を報告することとした。

結 果(表 2)

全配布施設158(評議員・理事在籍施設116, 他施設42)中、回答があったのは146施設(評議員・理事在籍施設110, 他施設36)で、回収率は92%と昨年同様であった。2006年1年間の発症頻度ではなく、これまでの全症例数の報告と思われた施設には、再度確認作業を行った。表2に示すごとく、1年間で発症10例以下の稀少疾患は、RCM、ミトコンドリア心筋症、ARVC、EFE、Pompe病、リウマチ熱、心膜欠損、収縮性心膜炎、ダウン症の川崎病の9疾患であった。平成17年と18年を比較すると、いずれの疾患も安定した報告数であり、アンケートの回収率も高く、信頼できる調査結果ではないかと思われた。

この調査結果が今後の診療・研究の一助となれば幸いである。学術委員会では、今後も、毎年継続的に稀少疾患サーベイランスを行っていく予定であり、調査対象施設に関する情報や、対象疾患や調査内容に関する忌憚のないご意見をいただければ幸いである。

別刷請求先：〒930-0194 富山市杉谷2630

富山大学医学部小児科 市田 露子

平成19年11月1日

55

表1 平成18年 稀少疾患サーベイランス対象施設

NO	都道府県	施設名	NO	都道府県	施設名	NO	都道府県	施設名
1	北海道	NTT東日本札幌病院	54	神奈川	横浜国立大学	107	大阪	大阪厚生年金病院
2	北海道	市立旭川病院	55	神奈川	北里大学	108	大阪	大阪市立総合医療センター
3	北海道	旭川医科大学	56	神奈川	昭和大学横浜市北部病院	109	大阪	大阪大学
4	北海道	北海道大学	57	神奈川	聖マリアンナ医科大学	110	大阪	府立母子保健総合医療センター
5	北海道	道立小児総合保健センター	58	神奈川	東海大学	111	大阪	仙養会北摂総合病院
6	北海道	札幌医科大学	59	山梨	山梨大学	112	大阪	近畿大学
7	青森	国立病院機構弘前病院	60	長野	長野県立こども病院	113	大阪	大阪医科大学
8	青森	青森県立中央病院	61	長野	信州大学	114	大阪	大阪市立大学
9	青森	弘前大学	62	新潟	新潟県立新発田病院	115	兵庫	兵庫医科大学
10	岩手	岩手医科大学附属循環器医療センター	63	新潟	新潟市民病院	116	兵庫	兵庫県立尼崎病院
11	秋田	秋田大学	64	新潟	新潟大学	117	兵庫	兵庫県立こども病院
12	山形	山形大学	65	新潟	立川総合病院	118	兵庫	神戸市立中央市民病院
13	宮城	東北大学	66	富山	富山大学	119	兵庫	神戸大学
14	宮城	宮城県立こども病院	67	富山	富山県立中央病院	120	兵庫	西神戸医療センター
15*	福島	脳神経疾患研究所総合南東北病院	68	石川	金沢医科大学	121	鳥取	鳥取大学
16	福島	福島県立医科大学	69	石川	金沢大学医学部附属病院	122	岡山	岡山大学
17	群馬	群馬県立小児医療センター	70	福井	福井循環器病院	123	岡山	倉敷中央病院
18	群馬	群馬県済生会前橋病院	71	福井	福井大学医学部附属病院	124	岡山	川崎医科大学
19	群馬	群馬大学	72	福井	福井愛育病院	125	島根	島根大学
20	栃木	自治医科大学	73	静岡	静岡県立こども病院	126	広島	広島市民病院
21	栃木	獨協医科大学	74	静岡	聖隷浜松病院	127	広島	広島大学病院
22	茨城	茨城県立こども病院	75	静岡	浜松医科大学	128	山口	済生会下関総合病院
23	茨城	筑波大学	76	岐阜	大垣市民病院	129	山口	山口大学
24	茨城	土浦協同病院	77	岐阜	岐阜県立岐阜病院	130	徳島	徳島大学
25	埼玉	埼玉医科大学国際医療センター	78	岐阜	岐阜大学	131	徳島	徳島市民病院
26	埼玉	埼玉県立小児医療センター	79	愛知	愛知医科大学	132	高知	高知大学
27	埼玉	防衛医科大学校	80	愛知	あいち小児保健医療総合センター	133	高知	国立病院機構高知病院
28	千葉	千葉県こども病院	81	愛知	名古屋市立大学	134	愛媛	愛媛大学
29	千葉	千葉県循環器病センター	82	愛知	名古屋第一赤十字病院	135	香川	香川小児病院
30	千葉	千葉大学	83	愛知	名古屋大学	136	香川	香川大学
31	千葉	千葉県松戸市立病院	84	愛知	名古屋第二赤十字病院	137	福岡	福岡市立こども病院
32	東京	東京女子医科大学	85	愛知	豊橋市民病院	138	福岡	福岡大学
33*	東京	東京女子医科大学八千代医療センター	86	愛知	岡崎市民病院	139	福岡	久留米大学
34	東京	東京大学	87	愛知	社会保険中京病院	140	福岡	九州厚生年金病院
35	東京	東京通信病院	88	愛知	藤田保健衛生大学	141	福岡	九州大学
36	東京	東京都清瀬小児病院	89	三重	三重大学	142	福岡	浜の町病院
37	東京	東京都墨東病院	90	三重	山田赤十字病院	143	福岡	雪の聖母会聖マリア病院
38	東京	東京都立広尾病院	91	滋賀	滋賀医科大学	144	佐賀	佐賀大学
39	東京	東京慈恵会医科大学	92	滋賀	長浜赤十字病院	145	長崎	長崎医療センター
40	東京	日本医科大学附属病院・第二病院	93	滋賀	大津赤十字病院	146	長崎	長崎大学
41	東京	日本医科大学多摩永山病院	94	奈良	天理よろづ相談所病院	147	熊本	熊本赤十字病院
42	東京	杏林大学	95	奈良	近畿大学医学部奈良病院	148	熊本	熊本大学
43	東京	国立成育医療センター	96	奈良	奈良県立医科大学	149	熊本	熊本市市民病院
44	東京	東邦大学	97	和歌山	社会保険紀南総合病院	150	大分	大分大学
45	東京	榊原記念病院	98	和歌山	和歌山県立医科大学	151*	大分	大分県立病院
46	東京	日本大学	99	和歌山	和歌山日赤医療センター	152	宮崎	宮崎大学
47	東京	帝京大学	100	京都	京都大学	153	宮崎	海老原総合病院
48	東京	順天堂大学	101	京都	京都第二赤十字病院	154	鹿児島	鹿児島生協病院
49	東京	東京医科歯科大学	102	京都	京都府立医科大学	155	鹿児島	鹿児島大学
50	東京	慶應義塾大学	103	京都	京都医療センター	156	鹿児島	鹿児島医療センター
51	東京	東京医科大学	104	京都	関西医科大学男山病院(滝井)	157	沖縄	沖縄県立中部病院
52	東京	日本赤十字社医療センター	105*	大阪	関西医科大学枚方病院	158	沖縄	琉球大学
53	神奈川	神奈川県立こども医療センター	106	大阪	国立循環器病センター			

*は平成18年の稀少疾患サーベイランス対象施設に新たに加わった施設

表2 平成18年 稀少疾患サーベイランス結果

日本小児循環器学会学術委員会 2007年6月11日

	平成17年	平成18年													
	総計	総計	年齢					性別			生存			家族内発症	
			<1	1~6	6~13	13~18	不明	男	女	不明	生存	死亡	不明	家族内有	不明
DCM	56	56	20	18	11	7	0	31	25	0	46	6	4	5	3
HCM	53	58	14	7	24	11	2	37	18	3	54	2	2	16	8
RCM	11	10	1	5	2	2	0	4	6	0	9	1	0	2	0
ミトコンドリア心筋症	11	7	1	1	4	1	0	5	2	0	7	0	0	5	0
ARVC	0	5	0	0	4	1	0	3	2	0	5	0	0	0	0
LVNC	31	37	14	9	11	3	0	23	14	0	35	2	0	6	0
EFE	1	6	5	0	0	0	1	4	1	1	2	3	1	1	1
Pompe病	3	2	1	1	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0
急性心筋炎	44	58	12	19	22	5	0	24	34	0	45	12	1	1	5
心臓腫瘍	62	51	29	8	6	3	5	27	17	7	45	1	5	1	5
原発性肺高血圧症	36	26	4	3	13	6	0	13	13	0	26	0	0	4	0
BWG	21	16	11	5	0	0	0	7	9	0	15	1	0	0	0
リウマチ熱	6	10	0	2	6	2	0	7	3	0	10	0	0	0	0
先天性完全房室ブロック	32	36	26	5	4	1	0	12	23	1	29	7	1	0	1
心膜欠損	1	4	3	0	1	0	0	3	1	0	4	0	0	0	0
収縮性心膜炎	4	4	0	0	3	1	0	4	0	0	4	0	0	0	0
ダウン症の川崎病	1	4	0	4	0	0	0	3	1	0	4	0	0	0	0

最終集計結果 (2007年6月11日)

全配布施設数 158 (評議員在籍施設: 116, 他施設: 42)

回収施設数 146 (評議員在籍施設: 110, 他施設: 36)

回収率 92%

平成19年11月1日

57

治療 ガンマグロブリン無効例への対応

蛋白合成酵素阻害薬ウリナスタチン療法

佐地 勉

Clinical utility of ulinastatin, urinary protease inhibitor in acute Kawasaki disease

Tsutomu Saji

Department of Pediatrics, Omori Hospital, Medical Center, Toho University

Abstract

Ulinastatin, a trypsin inhibitor, is useful as a first-line or a second-line treatment regimen including alternative therapy for IVIG-resistant or IVIG nonresponder Kawasaki disease (KD) patients. Mechanisms involving protections against tissue organs and endothelial cell and anti-inflammatory effects by ulinastatin, are dependent on the inhibition of PMN-derived elastase, tumor necrosis factor alpha (TNF α), and other proinflammatory cytokines/interleukins (IL-1, IL-6, IL-8). Ulinastatin also suppresses the activation of PMN cells, macrophages, and platelets.

Although almost no statistical data related to the definitive effect in acute stage of KD, ulinastatin have shown possible effects, but not always, in a part of KD patients. The indications of clinical use include shock and pancreatitis. Off-label uses of ulinastatin have been reported in hematological, hepatic, renal, OB/Gy diseases and cardiovascular diseases including vasculitis syndromes. The efficacy of ulinastatin in aKD remained to be investigated.

Key words: ulinastatin, protease inhibitor, Kawasaki disease, TNF α , elastase

はじめに

年間発症数が1万人を超す勢いで増加する川崎病(KD)の最大の治療上の克服すべき問題点は、免疫グロブリンIVIG不応例に対する、二次的治療法の選択である。

2年ごとに行われている第17回全国調査のサーベイランスでは、急性期KD(aKD)に対して初回IVIGへの不応例には、44%の施設で小児科医はIVIGの再投与を選択し、その次には17.6%の頻度でIVIG+ulinastatinが投与されてい

た¹⁾。

2003年2月に日本小児循環器学会で制定された、川崎病急性期治療のガイドラインでは、IVIG療法以外の追加治療手段の中に、ulinastatin 5,000単位/kg/日、×3-6回/日、の投与が示されている(日本小児循環器学会学術委員会、川崎病急性期治療のガイドライン。日小循誌 20: 54-62, 2004)。また第18回川崎病全国調査成績では、全体の中での追加治療薬剤はIVIGが15.6%で、次いでulinastatin 7.5%、ステロイド3.1%の順であった(川崎病研究グループ、2005

東邦大学医療センター大森病院 小児科

0047-1852/08/¥40/頁/JCLS

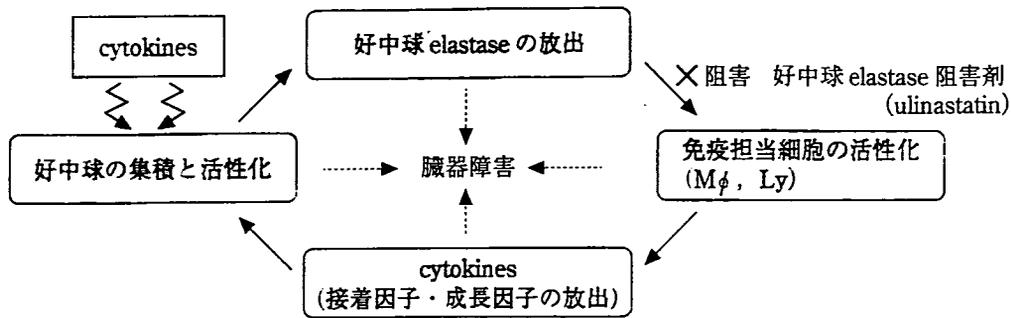


図 1 Ulinastatin の作用点

(小川道雄：消化器外科 20: 565-572, 1997 より引用)

表 1 Ulinastatin の生物学的作用

1. 種々のプロテアーゼ阻害 trypsin > α-kimotrypsin > N-elastase > N-oathepsinG > plasmin > P-elastase > Hiarulonidase > lipase > amylase > enterokinase
2. サイトカイン産生抑制 IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, 接着因子
3. NFκB 伝達経路阻止作用
4. 好中球, マクロファージ, 血小板の活性化抑制, elastase 遊離/ 活性酸素産生抑制, 細胞障害抑制
5. ライソゾーム膜安定化作用
6. 実験的炎症(肺, 肝, 腎, 脾)やショックの軽減
7. 細胞外 matrix 形成抑制

年度)。

1. Ulinastatin の作用機序

a. TNFα 抑制作用

冠動脈再灌流障害では, ulinastatin は術後の多核白血球からの elastase, TNFα, IL-6, IL-8 の遊離を抑え, また肺の再灌流障害を抑え, 肺機能を保護する^{2,3)}。

ulinastatin の単球からの TNFα 産生抑制作用は, ショックにおけるその産生か分泌を抑制するのに対し, gabexate mesilate は NFκB 活性化を強く抑制するためである⁴⁾。また TNFα により活性化されて出現する内皮細胞上の ICAM-1 の発現を抑制して, 内皮細胞を保護する機能がある⁵⁾。

b. その他の作用

リソゾーム膜の安定化作用により各種の蛋白分解酵素の遊離を抑制する。例えば TNFα を含む心筋抑制因子や毒性因子の遊離阻害作用もある。その他, 凝固阻害作用, 血管内皮細胞(EC)

成長促進などの作用もある。ulinastatin は, 特に好中球からの elastase の放出阻害と, 放出後の不活化の両方に作用し, 結果的に酸素ラジカルの除去, サイトカイン・接着因子の活性を低下させる(図 1)。そのほか, 報告されている多彩な生物学的な作用機序をまとめて列記する(表 1)。

2. 川崎病での作用点

aKD では, 多核白血球(PMN)で PGH₂ と TXA₂ の mRNA が亢進しているが, ulinastatin はこれを抑制する⁶⁾。

さらに好中球により誘導される内皮細胞障害を, 顆粒球から分泌された細胞外 elastase の不活化ばかりでなく, 好中球に直接作用して elastase の産生と分泌を抑制し防御すると考えられている^{7,8)}。

aKD に対する ulinastatin の最初の使用報告例は, 1993 年の岡田(山形大)の報告と思われる⁹⁾。その後 90 年代には症例報告が相次いだ。そ

表2 Ulinastatin 5,000 U/kg×3回/日×1日の併用例と非併用例 (IVIG+ASA) の比較

	ulinastatin の 前投与 11 例	ulinastatin の 非投与 11 例	p 値
発症病日	34±21	27±29	NS
入院病日	4.7±1.3	4.1±2.4	NS
原田のスコア	3.8±0.9	3.7±0.9	NS
入院時			
WBC(×10 ³ /μl)	15.2±7.0	17.0±5.7	NS
CRP (mg/dl)	7.7±3.5	8.5±5.1	NS
入院後発熱日数	3.9±0.9	4.8±2.8	NS
CRP 陽性日数	11.1±3.0	13.3±4.1	NS
γ-glob 投与量 (g/kg)	1.5±0.7	1.5±0.7	NS
冠動脈病変	1 例	1 例	NS

の症例研究の結果として①軽症例での単独の効果, ②併用による IVIG の減量効果, ③ IVIG 無効例・不応例・抵抗例, および再燃例への有効性, があげられる¹⁰⁾. CRP 値や WBC の増加が少ない軽症例では, ときに IVIG を使用せずアスピリン (ASA) との併用でも治療が可能である. また IVIG 投与や再投与後の再燃例, さらに IVIG に全く反応しない症例や, いわゆる不応例にもときに有効であるという意見が多数を占める.

ulinastatin を first line の治療として用いた場合, 57% (5,000 単位/kg×6) ~ 64% (5 万単位×6) は ulinastatin 使用後の IVIG を必要としなかった (IVIG 回避例), また IVIG との併用により, 重症例やいわゆる high risk 例では IVIG の使用量を減少させているとする報告がある^{11,12)}.

ほとんどの施設では急性期治療薬の第一選択として IVIG が用いられているが, 約 15-20% に存在する不応例に対して ulinastatin は追加治療薬の一つとして位置付けられている.

著者らの行った 5,000 単位/kg×3 回/日の pilot study では 14 例中 5 例に効果があり, 軽症例 3/3 例, 再燃例 2/5 例, 重症例 1/3 例と合わせると, すなわち 25 例中 11 例で有効であった¹³⁾.

ulinastatin は elastase の産生, 放出を抑制していることがうかがわれる. しかし IVIG 療法でも顆粒球 elastase は低下するため¹⁴⁾, elastase 以外のサイトカイン (IL-1, IL-6, TNFα) の産

生抑制や NO₃⁻ の低下, マクロファージ抑制などの可能性がある.

3. Ulinastatin の併用効果

著者らは, ulinastatin (5,000 単位/kg×3 回/日) + IVIG (1 g/kg/1 日) + ASA (50 mg/kg) の 3 者併用と, IVIG (1 g/kg/1 日) + ASA を比較し ulinastatin 投与 24 時間後で IVIG 投与前の臨床検査を比較した¹⁰⁾ (表 2). その結果, ulinastatin の前投与ありの IVIG+ASA では, 若干入院後発熱期間が短く, CRP も低下したが, 冠動脈拡大率も有意差は得られなかった. その結果, 投与前年齢, 入院病日, 原田スコア, WBC, CRP に有意差なく, また治療後の CRP 陽性日数, IVIG 投与量, 冠動脈病変合併率にも有意な差がみられなかった. つまり, IVIG+ulinastatin 併用 (IVIG の前投与) が IVIG 単独療法に勝るという結論は得られなかった. 他の報告でも, 冠動脈病変合併率は差がない¹⁵⁾.

しかし, ulinastatin 使用前後で, サイトカイン, superoxide dismutase, NO₃⁻, neopterin を測定し変動を観察してみると, NO_x (NO₃⁻) と IL-1β の低下作用が強い傾向がみられた (図 2). NO₃⁻ は 30.9±17.3 から使用後, 18.4±9.4 (μmol/l) (p<0.01) へと有意に低下した.

4. Ulinastatin の対象疾患

承認されている適応症は 2 つの疾患群である.

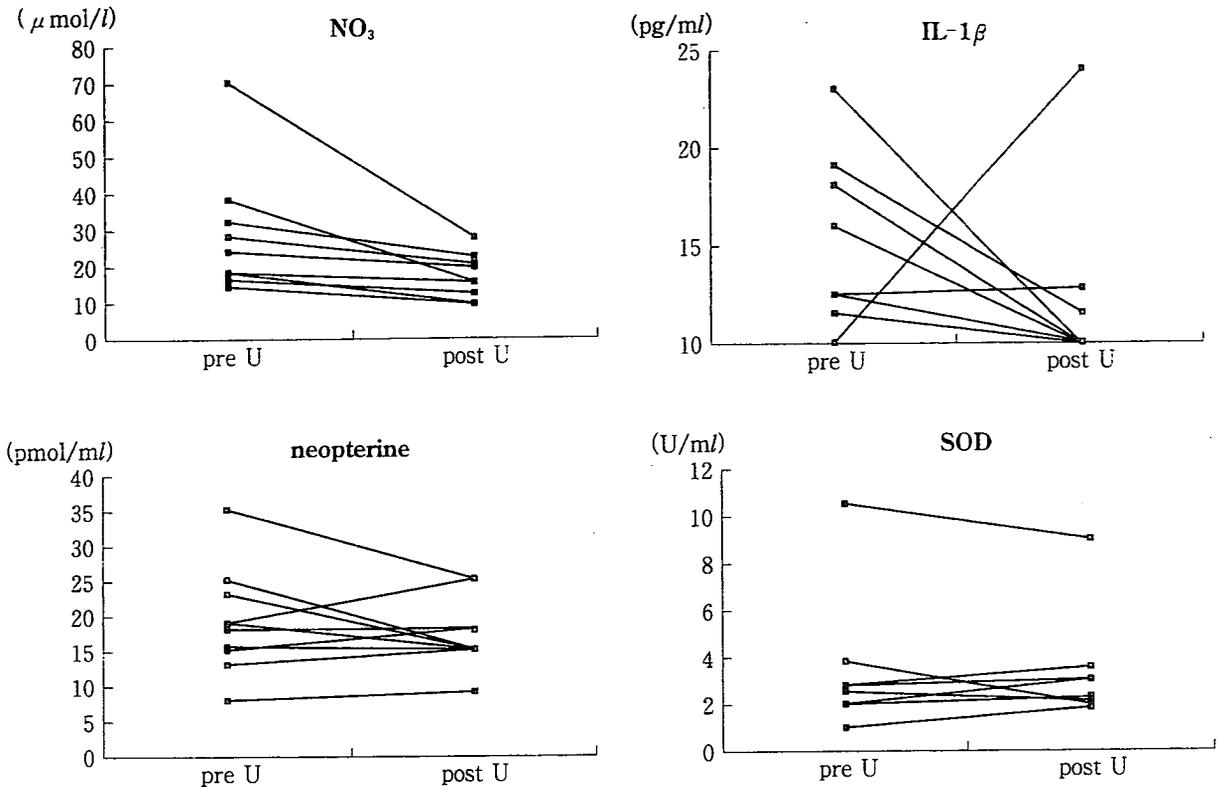


図 2 Ulinastatin 使用前後の NO₃, IL-1β, neopterin, SOD の変化

表 3 Ulinastatin(ミラクリット)の適応疾患と off-label として有効な疾患

適応疾患：

1. 急性循環不全(出血性, 細菌性, 外傷性, 熱傷性ショック)における循環動態の改善
2. 急性膵炎(術後, 外傷性, ERCP 後), 慢性再発性膵炎の急性増悪期

適応外 off-label 使用の報告：

炎症性疾患：

川崎病, 血管性紫斑病, Stevens-Johnson 症候群, 関節リウマチ, 肺アスペルギルス症

消化器疾患：

潰瘍性大腸炎, 肝切除後肝障害

腎疾患：

腎機能障害, シスプラチン腎障害, 溶血性尿毒症症候群

婦人科疾患：

切迫早産(頸管中コラーゲン分解抑制), 子宮収縮抑制, 絨毛羊膜炎, 子宮頸管炎, 膣炎, 双胎間輸血症候群, 羊水塞栓

ショック：

体外循環後循環不全, 熱傷, 癌転移抑制, 外科手術周術期管理, 出血性ショック

血液疾患：

DIC, AML, 造血器腫瘍性疾患, ベルオキシダーゼ陽性白血病

その他：

糖尿病性末梢神経傷害, ラットの実験的関節炎

適応外の off-label 使用での有用性の報告もある(表 3).

成人での使用量は, 急性膵炎: 25,000-50,000

単位/500 ml 輸液/1-2 時間×1-3 回/日で, 急性循環不全時: 10 万単位/500 ml 輸液/1-2 時間×1-3 回/日である。もう一つの抗 elastase 薬

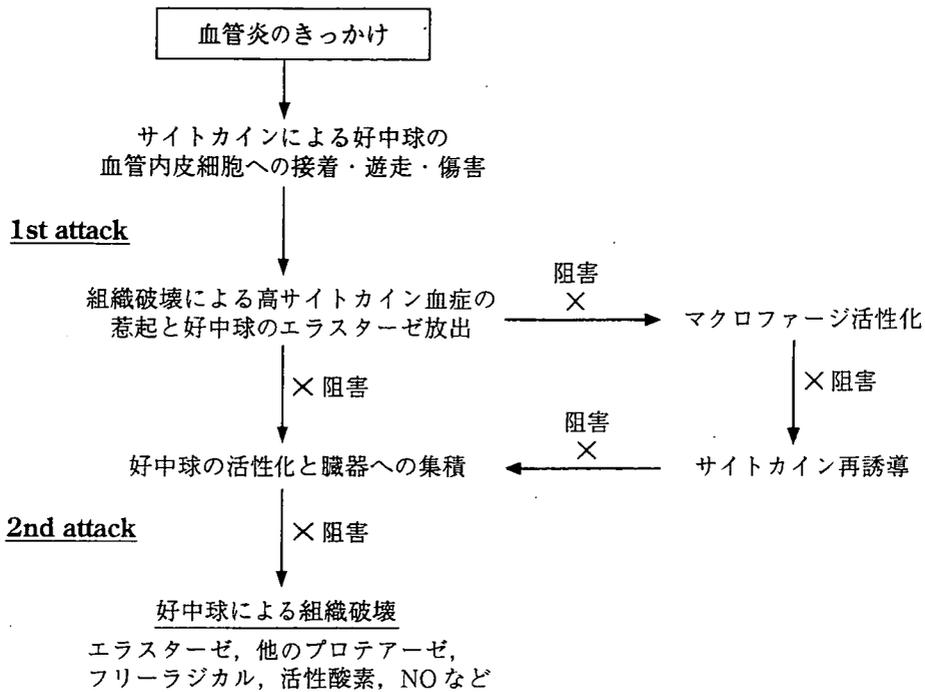


図3 組織障害における高サイトカイン血症と好中球エラスターゼ (×阻害: ulinastatin による阻害)(文献¹⁶⁾より引用)

sivelestat(エラスポール)は好中球のelastase を選択的に阻害して血管内皮細胞傷害を抑制し、蛋白漏出や出血を軽減する。ARDS/ALIでは呼吸器管理日数の短縮や呼吸状態の改善が認められる。

最近では、組織障害によって、サイトカインが放出されて first attack が起こり、それに続いて好中球が活性化される second attack が生じるという2段階の障害仮説が提唱されている(図3)。

おわりに

aKDにおけるIVIG不応例の中には冠動脈後遺症を来す頻度が極めて高い。その治療薬剤の選択には臨床医にも迷いがあり、ごく一部の症例にみられる巨大冠動脈瘤という最悪のシナリオが回避できないことがある。その中で我が国でのみ使用できる ulinastatin の可能性は、諸外国の研究者にも期待されているところが多く、このまま永遠の mystery になってほしくないと感じている。

文献

- 1) Uehara R, et al: Re-treatment regimens for acute stage of Kawasaki disease patients who failed to respond to initial intravenous immunoglobulin therapy: analysis from the 17th nationwide survey. *Pediatr Int* 49: 427-430, 2007.
- 2) Bingyang J, et al: Effects of urinary protease inhibitor on inflammatory response during on-pump coronary revascularisation. Effect of ulinastatin on inflammatory response. *J Cardiovasc Surg* 48: 497-503, 2007.
- 3) Ren B, et al: Ulinastatin attenuates lung ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting tumor necrosis factor alpha. *Transplant Proc* 38: 2777-2779, 2006.
- 4) Aosasa S, et al: Mechanism of the inhibitory effect of protease inhibitor on tumor necrosis factor alpha production of monocytes. *Shock* 15: 101-105, 2001.
- 5) Aosasa S, et al: Inhibitory effect of protease inhibitor on endothelial cell activation. *J Surg Res* 80

- : 182-187, 1998.
- 6) Zaitu M, et al: Ulinastatin, an elastase inhibitor, inhibits the increased mRNA expression of prostaglandin H₂ synthase-type 2 in Kawasaki disease. *J Infect Dis* 181: 1101-1109, 2000.
 - 7) Nakatani K, et al: Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc Biol* 69: 241-247, 2001.
 - 8) 中谷圭吾ほか: 川崎病急性期におけるウリナスタチンの作用機序と, その臨床効果について教えてください. *小児内科* 9: 1578-1581, 2003.
 - 9) 岡田昌彦ほか: ショック症状を呈した重症川崎病に対するウリナスタチンおよびアンチトロンビン III 製剤の効果. *日児誌* 97: 43-48, 1993.
 - 10) 佐地 勉ほか: 川崎病におけるウリナスタチン療法. *小児科* 40: 1049-1054, 1999.
 - 11) 吉田 茂ほか: クリニカルパスのバリエーション解析を通してみた当科の川崎病治療成績. *Prog Med* 23: 1789-1793, 2003.
 - 12) 中野正大ほか: 急性期川崎病に対するわれわれの選択的ウリナスタチン・免疫グロブリン併用療法の9年間の治療成績と新たな提言. *Prog Med* 23: 1798-1801, 2003.
 - 13) 小澤安文ほか: 川崎病急性期におけるウリナスタチン投与による炎症性マーカーの変動. *Prog Med* 18: 219, 1998.
 - 14) 島山欣也ほか: ガンマグロブリン大量療法とウリナスタチンの併用療法の効果と顆粒球エラスターゼの変動. *Prog Med* 18: 219, 1998.
 - 15) 川村陽一ほか: ウリナスタチン治療の可能性. *小児科診療* 4: 1165-1168, 2001.
 - 16) 小川道雄: 侵襲に対する生体反応と臓器障害—プロテアーゼインヒビターによる制御. *治療学* 32: 1017-1021, 1998.

「発熱」に対する薬物療法 ⑭

監物 靖* 佐地 勉*¹⁾

- 川崎病に対するアスピリンの投与方法と減量のタイミングについて教えてください。
また肝機能低下などの理由でアスピリンを使用できないときの代替薬はありますか？

はじめに

川崎病(KD)は1967年に川崎富作医師により初めて報告された疾患で、原因不明の全身性血管炎である。日本においては年間約9,500人の患者発生がある。KDにおける治療目標は可能な限り早期に炎症反応を終息させ、もっとも重要な合併症である冠動脈病変の発生頻度を最小限に抑えることである。

現在急性期KDの治療薬としては、大量免疫グロブリン静注(IVIG)療法(1~2g/kg)とアスピリン(ASA)内服の併用が世界的なスタンダードである。IVIG不応例に対しては、IVIGの追加投与やステロイド療法、ウリナスタチン静注療法が選択される。また、軽症例ではASA単独治療のみで軽快する場合もある。

アスピリンの投与方法

川崎病におけるASA治療は急性期有熱時の抗炎症作用を期待した中等量ASA療法(30~50mg/kg/日 分3投与)と、解熱後の抗血小板作用を期待した少量ASA療法(3~5mg/kg/日 分1投与)に分けることができる。

欧米では有熱時には、大量ASA療法(80~100mg/kg/日 分4投与)が一般的であるが、日本人においては肝機能障害の発生頻度が高いため、中等量ASA療法がほとんどである。ASAの抗血小板作用はアラキドン酸カスケードにおけるシクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害し、血小板凝集物質であるトロンボキサンA₂(TXA₂)の産生抑制によるが、大量ASA療法では血小板凝集抑制物質であるプロスタグランジンI₂(PGI₂)の産生も抑制するため、中・少量ASA療法に比較して抗血小板作用が減弱するといわれている。これは、アスピリンジレンマと呼ばれている。

中等量ASAは川崎病の診断がつきしだい投与を開始する。また、急性期は腸管からの吸

*東邦大学医療センター大森病院第一小児科 1)教授

収が悪く、血中濃度の上昇が不良である。

減量のタイミング

KD 急性期治療のガイドライン¹⁾では中等量 ASA の投与期間は解熱するまでとされている。米国における大量 ASA 療法では解熱後 48～72 時間、あるいは第 14 病日まで投与を継続される場合が多いが、施設により異なる。

KD 患者では炎症反応が陰性化した後も血小板凝集能は数ヵ月間亢進している。そのため、冠動脈瘤非形成例でも発症後 2～3 ヶ月間、冠動脈瘤形成例では冠動脈瘤の退縮が確認されるまで投与を継続する。米国でも冠動脈瘤非形成例では 6～8 週の継続投与が推奨されている²⁾。一方、巨大冠動脈瘤形成例では血栓形成のリスクが高く、ASA 少量単独療法のみでは不十分であるため、チクロピジンやジピリダモールなどのほかの抗血小板薬や抗凝固薬(ワルファリン)の併用が望ましい。

投与時の注意点と代替薬

ASA の副作用としては肝機能障害、消化管潰瘍、薬疹やライ症候群の発症などがあげられる。肝機能障害に関しては、重症例では KD の合併症として肝酵素が上昇している例も少なくない。しかし、KD による肝障害の場合、治療経過とともに短期間で肝酵素が正常化することが多い。ASA 投与後より肝機能障害が出現し、KD 症状が改善した後も肝機能障害が遷延する場合には、ASA による薬剤性肝障害の可能性を考慮すべきである。肝機能障害が強い場合には、代わりにフルルビプロ

フェン(3～5 mg/kg 分 3)投与が行われる。しかし、同薬剤においても肝機能障害や消化管潰瘍が起こる場合があり、注意が必要である。

消化管潰瘍合併例では粘膜保護薬や胃酸分泌抑制薬を使用する。ASA による薬疹が疑われる場合には DLST(薬剤リンパ球刺激試験)などの検査後に投与を中止する。

投与中止後に皮疹が改善した場合には薬疹が考えられるが、中止後も皮疹が持続する場合には KD の再燃の可能性もあるため、発熱の有無や眼球結膜充血などの急性期症状を注意深く観察する必要がある。

ライ症候群は肝脂肪変性を伴う急性脳症で、ミトコンドリアの代謝障害が原因であると考えられている。水痘やインフルエンザ感染時の ASA 投与が誘引とも言われており、米国においては疫学調査にてその関連性が証明されている。日本においては投与量の違いもあり、現時点で ASA 投与との関連性は証明されていないものの、15 歳未満の水痘やインフルエンザの患者にやむを得ず投与する場合には慎重に投与し、投与後の状態を十分に観察するよう警告している。すなわち、水痘・インフルエンザ発症時や感染児との接触があった場合には、一定期間 ASA の投与を中止する必要がある。

参考文献

- 1) 川崎病急性期治療のガイドライン. 日小循誌, 20: 54-62, 2003
- 2) Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: A statement for health professionals from the committee on rheumatic fever, endocarditis and Kawasaki disease, council on cardiovascular disease in the young, American Heart Association. Circulation, (110): 2747-2771, 2004

平成17年度 稀少疾患サーベイランス調査結果

日本小児循環器学会学術委員会

市田 露子¹⁾, 佐地 勉²⁾富山大学医学部小児科¹⁾東邦大学医学部第一小児科²⁾

Key words :

稀少疾患, サーベイランス調査

はじめに

これまで、わが国では小児循環器領域の稀少疾患の実態調査が行われていなかったため、正確な発症状況の把握が不可能であった。このため、日本小児循環器学会学術委員会では、「稀少疾患サーベイランス調査」を毎年継続的に行うこととした。全国の小児循環器学会評議員と理事および大学附属病院小児科にアンケートを郵送し、調査を依頼した。結果が集計されたので報告する。

対象および方法

1) 調査対象期間

2005年1月1日～12月31日。2005年の1年間に発症あるいは診断した症例。

2) 調査期間

2006年1月15日～7月末日

3) 調査対象

小児循環器学会評議員と理事、および大学附属病院小児科の155施設(表1)にアンケートを郵送し、調査を依頼した。なお、同一施設で患者が重複しないように、代表者がまとめて返送することとした。

4) 対象疾患

本学会の疫学委員会や、QT延長、Brugada症候群など不整脈研究委員会の調査と重ならないことを考慮し、拡張型心筋症(DCM)、肥大型心筋症(HCM)、拘束型心筋症(RCM)、ミトコンドリア心筋症、不整脈源性右室心筋症(ARVC)、左室心筋緻密化障害(LVNC)、心内膜線維弾性症(EFE)、Pompe病、急性(劇症型を含む)心筋炎、心臓腫瘍(結節性硬化症を含む)、原発性肺高血圧症、左冠状動脈肺動脈起始症(BWG)、リウマチ熱、先天性完全房室ブロック、心膜欠損、収縮性心膜炎、ダウン症の川崎病の17疾患とした。

5) 調査票

発症数のサーベイランスが第一義的であり、調査項目

は生死、年齢、性別、家族内発症など必要最低限度の内容とした(表2)。各疾患において、担当医が臨床上診断が適切と思われる症例を報告することとした。

結果(表3)

全配布施設155(評議員・理事在籍施設118, 他施設37)中、回答があったのは143施設(評議員・理事在籍施設113, 他施設30)で、回収率は92%であった。2005年1年間の発症頻度ではなく、これまでの全症例数の報告と思われた施設には、再度確認作業を行った。表3に示すように、1年間で発症10例以下の稀少疾患は、ARVC, EFE, Pompe病, リウマチ熱, 心膜欠損, 収縮性心膜炎, ダウン症の川崎病の7疾患であった。

今回は、初めてのサーベイランス調査であり、2005年1年間の発症頻度ではなく、これまでの全症例数の報告をした施設があることも考えられ、やや過大評価されている可能性は否定できない。しかし、アンケートの回収率は92%と極めて高く、この調査結果が今後の診療・研究の一助となれば幸いである。学術委員会では、今後も毎年継続的に稀少疾患サーベイランスを行っていく予定であり、調査対象施設に関する情報や、対象疾患や調査内容に関する忌憚のないご意見をいただければ幸いである。

別刷請求先: 〒930-0194 富山市杉谷2630

富山大学医学部小児科 市田 露子

表1

NO	都道府県	施設名	NO	都道府県	施設名	NO	都道府県	施設名
1	北海道	N T T 東日本札幌病院	53	神奈川県	北里大学	105	大阪	大阪市立総合医療センター
2	北海道	市立旭川病院	54	神奈川県	昭和大学横浜市北部病院	106	大阪	大阪大学
3	北海道	旭川医科大学	55	神奈川県	聖マリアンナ医科大学	107	大阪	府立母子保健総合医療センター
4	北海道	北海道大学	56	神奈川県	東海大学	108	大阪	仙臺会北摂総合病院
5	北海道	道立小児総合保健センター	57	山梨	山梨大学	109	大阪	関西医科大学
6	北海道	札幌医科大学	58	長野	長野県立こども病院	110	大阪	近畿大学
7	青森	弘前病院	59	長野	信州大学	111	大阪	大阪医科大学
8	青森	青森県立中央病院	60	新潟	新潟県立新発田病院	112	大阪	大阪市立大学
9	青森	弘前大学	61	新潟	新潟市民病院	113	兵庫	兵庫医科大学
10	岩手	岩手医科大学	62	新潟	新潟大学	114	兵庫	兵庫県立尼崎病院
11	秋田	秋田大学	63	新潟	立川総合病院	115	兵庫	兵庫県立こども病院
12	山形	山形大学	64	富山	富山大学	116	兵庫	神戸市立中央市民病院
13	宮城	東北大学	65	富山	富山県立中央病院	117	兵庫	西神戸医療センター
14	宮城	宮城県立こども病院	66	石川	金沢医科大学	118	兵庫	神戸大学
15	福島	福島県立医科大学	67	石川	金沢大学医学部附属病院	119	鳥取	鳥取大学
16	群馬	群馬県立小児医療センター	68	福井	福井循環器病院	120	岡山	岡山大学
17	群馬	群馬県済生会前橋病院	69	福井	福井大学医学部附属病院	121	岡山	倉敷中央病院
18	群馬	群馬大学	70	福井	福井愛育病院	122	岡山	川崎医科大学
19	栃木	自治医科大学	71	静岡	静岡県立こども病院	123	島根	島根大学
20	栃木	獨協医科大学	72	静岡	聖隷浜松病院	124	広島	広島市民病院
21	茨城	茨城県立こども病院	73	静岡	浜松医科大学	125	広島	広島大学
22	茨城	筑波大学	74	岐阜	大垣市民病院	126	山口	済生会下関総合病院
23	茨城	土浦協同病院	75	岐阜	岐阜県立岐阜病院	127	山口	山口大学
24	埼玉	埼玉医科大学	76	岐阜	岐阜大学	128	徳島	徳島大学
25	埼玉	埼玉県立小児医療センター	77	愛知	愛知医科大学	129	徳島	徳島市民病院
26	埼玉	防衛医科大学校	78	愛知	あいち小児保健医療総合センター	130	高知	高知大学
27	千葉	千葉県こども病院	79	愛知	名古屋市立大学	131	愛媛	愛媛大学
28	千葉	千葉県循環器病センター	80	愛知	名古屋第一赤十字病院	132	愛媛	愛媛県立南宇和病院
29	千葉	千葉大学	81	愛知	名古屋大学	133	香川	香川小児病院
30	東京	東京女子医科大学	82	愛知	名古屋第二赤十字病院	134	香川	香川大学
31	東京	東京大学	83	愛知	豊橋市民病院	135	福岡	福岡市立こども病院
32	東京	東京逓信病院	84	愛知	岡崎市民病院	136	福岡	福岡大学
33	東京	東京都立清瀬小児病院	85	愛知	社会保険中京病院	137	福岡	久留米大学
34	東京	東京都立墨東病院	86	愛知	藤田保健衛生大学	138	福岡	九州厚生年金病院
35	東京	東京都立広尾病院	87	三重	三重大学	139	福岡	九州大学
36	東京	東京慈恵会医科大学	88	三重	山田赤十字病院	140	福岡	浜の町病院
37	東京	日本医科大学附属病院・第二病院	89	滋賀	滋賀医科大学	141	福岡	雪の聖母会聖マリア病院
38	東京	日本医科大学多摩永山病院	90	滋賀	長浜赤十字病院	142	福岡	産業医科大学
39	東京	杏林大学	91	滋賀	大津赤十字病院	143	佐賀	佐賀大学
40	東京	国立成育医療センター	92	奈良	天理よろづ相談所病院	144	長崎	長崎医療センター
41	東京	立川病院	93	奈良	近畿大学医学部奈良病院	145	長崎	長崎大学
42	東京	東邦大学	94	奈良	奈良県立医科大学	146	熊本	熊本赤十字病院
43	東京	榊原記念病院	95	和歌山	社会保険紀南総合病院	147	熊本	熊本大学
44	東京	日本大学	96	和歌山	和歌山県立医科大学	148	大分	大分大学
45	東京	帝京大学	97	和歌山	和歌山日赤医療センター	149	宮崎	宮崎大学
46	東京	順天堂大学	98	京都	京都大学	150	宮崎	海老原総合病院
47	東京	東京医科歯科大学	99	京都	京都第二赤十字病院	151	鹿児島	鹿児島協病院
48	東京	慶應義塾大学	100	京都	京都府立医科大学	152	鹿児島	鹿児島大学
49	東京	東京医科大学	101	京都	京都医療センター	153	鹿児島	九州循環器病センター
50	東京	日本赤十字社医療センター	102	大阪	関西医科大学	154	沖縄	沖縄県立中部病院
51	神奈川	神奈川県立こども医療センター	103	大阪	国立循環器病センター	155	沖縄	琉球大学
52	神奈川	横浜市立大学	104	大阪	大阪厚生年金病院			

表2

調査用紙			
施設名	記入者名		
DCM	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
HCM	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
RCM	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
ミトコンドリア心筋症	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
ARVC	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
LVNC	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
EFE	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
Pompe病	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
急性 (劇症を含む) 心筋炎	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
心臓腫瘍 (結節性硬化症を含む)	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
原発性肺高血圧症	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
BWG	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
リウマチ熱	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
先天性完全房室ブロック	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
心膜欠損	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
収縮性心膜炎	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
ダウン症の川崎病	<input type="checkbox"/> あり (例)	<input type="checkbox"/> なし	
【ありの場合】			
疾患名	_____		
年齢	性別	転帰	家族 (家系) 内発症
<input type="checkbox"/> 1 歳未満	<input type="checkbox"/> 男	<input type="checkbox"/> 生存	<input type="checkbox"/> なし
<input type="checkbox"/> 1 歳以上 6 歳未満	<input type="checkbox"/> 女	<input type="checkbox"/> 死亡	<input type="checkbox"/> あり
<input type="checkbox"/> 6 歳以上 13 歳未満			
<input type="checkbox"/> 13 歳以上 18 歳未満			
「特記事項」			

DCM: 拡張型心筋症, HCM: 肥大型心筋症, RCM: 拘束型心筋症, ARVC: 不整脈源性右室心筋症, LVNC: 左室心筋緻密化障害, EFE: 心内膜線維弾性症, BWG: 左冠状動脈肺動脈起始症			