

るのではないかと考え、血管内皮細胞より産生・分泌される血管作動性物質である Endothelin-1(ET-1)に注目し、免疫グロブリン療法前後の血漿濃度と冠動脈障害の有無およびその程度を検討し、高い感度、特異度を持って冠動脈病変の合併を予知することが可能であることを報告した(Ogawa S, et al. J Cardiovasc Pharmacol. 22:S364-S366,1993)。また、冠動脈炎に深く関わる免疫系バイオマーカーである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)も免疫グロブリン不応例では有意に高値を呈することを報告した(Asono T, Ogawa S. Scand. J. Immunol. 51:98-103, 2000)。さらに最近になり、血管炎症性マーカーとして注目されはじめている pentraxin 3 (PTX-3)が免疫グロブリン不応例および冠動脈拡張病変症例において有意に高値を呈し、PTX-3 がこれらの予知バイオマーカーとして極めて有用であることも報告してきた(Katsube Y, Ogawa S, et al. Eur Heart J 29:652, 2008)。ET-1 や PTX-3 のデータは免疫グロブリン治療不応例、冠動脈病変合併症例において有意に高値を呈し、これら単独でも治療不応例や冠動脈病変合併例を予知することが可能であると考えてきたが、これらの検討はそれぞれ異なった患者を用いて行われた結果のデータであり、また症例数も 100 例以下の小規模な検討である。従って、より川崎病の血管炎に特化した多くのバイオマーカーを用いて初期治療不応例や冠動脈病変合併例を検討することによりその感度、特異度は極めて高いものとなることが予想される。今までの我々が検討してきたデータを基盤に、今回さらに血管炎を広く評価しうると思われるバイオマーカーを加え、また対象数を増やし検討することとした。

## B. 研究方法

対象は川崎病入院患者で、年間で約 100 例を予定している。対照は年齢をマッチさせた発熱性疾患患者とし、研究内容を十分に説明し、承諾が得られた患者に対し行う。検体は川崎病のルチンの血液検査を施行する際に採血した残余血液を使用する。川崎病の初期治療法は大量免疫グロブリン(2g/kg/1 回)点滴静注を行う。免疫グロブリン不応例に対してメチプレドニルによるパルス療法ないしはハーフパルス療法を行う。以下の 6 種類の血管炎に関与すると考えられるバイオマーカーの血清・血漿濃度を測定し、それぞれの閾値を決定する。

1. 血管内皮細胞障害マーカーである CD144(VEカトヘリン)陽性血管内皮由来微小粒子(endothelial microparticles:EMP) : microperticles(MPs)は各種サイトカインやトロンビン刺激による細胞の活性化、シェアストレス(ずり応力)や低酸素などの生理学的刺激やアポトーシスにより血小板、単球、赤血球、血管内皮細胞などから血中に放出される。細胞障害の重症度に比例して血中濃度は増加する。一方、VEカトヘリン(CD144 抗原)は血管内皮細胞に特異的な蛋白である。また、血管内皮細胞由来の MPs のみ CD144 を発現しており、今回の検討では CD144 を有する MPs が内皮細胞由来の MPs を同定するのに最適であると考え、CD144-EMP を血管炎に伴う血管内皮細胞障害バイオマーカーとして検討することとした。
2. 血管炎マーカーである可溶性接着因子 sICAM-1(soluble intercellular adhesion molecule-1) : 血管内皮細胞表面に接着分子が増加してくるような病態で増える。白血球や単球の冠動脈内皮への接着が血管炎の初期段階と考える。ICAM-1 は interleukin-1

(IL-1)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interferon- $\gamma$  (IF- $\gamma$ )などの炎症性サイトカインにより血管内皮細胞での発現が増強する。従って sICAM-1 は血管炎の初期段階でのバ イオマーカーとなりうる。3. 血管作動性物質である Endothelin-1(ET-1): endothelin(ET)は 21 個のアミノ酸残基からなる生理活性ペプチドであり、強力で持続的な血管収縮作用を有する。ETファミリーの中で ET-1 は血管内皮細胞より産生され、血管平滑筋細胞に発現している ET<sub>A</sub> 受容体を介して血管収縮に、また血管内皮細胞に発現している ET<sub>B</sub> 受容体を介して NO やプロスタグリンなどの血管拡張因子の遊離作用に関係している。従って、血漿 ET-1 濃度は血管内皮の情報を掴むのに良い指標となる。血管炎に伴い血管内皮細胞障害が惹起され、ET-1 の産生が増加し、血漿 ET-1 濃度が増加する。4. 血管炎に伴う免疫系バ イオマーカーである monocyte chemoattractant pretein-1(MCP-1): MCP-1 は単球・マクロファージの活性化に関わるバ イオマーカーであり、単球の強力な走化性活性を有し、単球を活性化する。活性化された単球は血管内皮細胞に接着し、内皮細胞間隙より内皮下に迷入し、マクロファージに変わり組織破壊を起こす。従って血管炎の初期段階を律速しており、血漿 MCP-1 濃度は血管炎の重症度を反映するバ イオマーカーとなる。5. 血管炎症のバ イオマーカーである PTX-3: PTX-3 は pentraxin super family に属する急性炎症性反応蛋白である。同ファミリーには CRP も含まれるが PTX-3 は CRP とは違い血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ、好中球などに発現する。血漿 PTX-3 は血管炎に伴う血管内皮細胞障害の程度と相関し、血管炎の重症度を評価しうるバ イオマーカーである。6. 炎症性ケモカインである interleukin-8

(IL-8): IL-8 は主として好中球に作用し、その炎症局所への遊走や浸潤を刺激する代表的なケモカインであり、単球・マクロファージや血管内皮細胞、血管平滑筋細胞から産生される。血漿 IL-8 濃度の増加は血管炎の強さを表す指標となる。川崎病の血管炎においてもその重症度と比例して血漿 IL-8 濃度が上昇することが予想される。

我々は今まで単独の血管バ イオマーカーを用いて、川崎病の初期治療の不应例、冠動脈病変合併例を検討してきたが、より高い感度、特異度を持ってそれらを予知出来るシステムの構築の必要性に迫られ本研究を想起した。現在ではこれらの血管バ イオマーカーの結果が出るまでには時間がかかり、迅速に臨床に対応できていない。そこで本研究では今回検討予定の 6 種類の結果から統計学的に 4 種類程度のバ イオマーカーを抽出し、早期に診断可能な迅速キットの作製も試みる予定である。また、臨床経過、冠動脈所見と比較検討する。各バ イオマーカー測定方法は以下の方法を予定している】

1. CD144-EMP:フローサイトメリーにて測定する。EMP は大きさ 15 $\mu$ m 以下で、CD144 陽性、CD42b 陰性のものとする。血中の CD144-EMP、CD42b-PMP レベルは standard beads を用いてその血中濃度を算出する。
2. sICAM-1:ELISA キット (Ray-Bio)を用いて血清濃度を測定する。
3. ET-1: ELISA キット (An ENZO Life Science Inc)を用いて血清濃度を測定する。
4. MCP-1:ELISA キット (human MCP-1 Cytoscreen<sup>TM</sup>, Biosouce International)を用いて血漿濃度を測定する。
5. PTX-3: ELISA キット(Perseus Proteomics

Inc.)を用いて血漿濃度を測定する。

6. IL-8 : ELISA キット (human IL-8Quantikie™; R&D System)を用いて血漿濃度を測定する。

### C. 研究結果

1. 血漿 ET-1 濃度による免疫グロブリン不応症例・冠動脈病変症例の出現予測

血管内皮細胞より産生・分泌される血管作動性物質である Endothelin-1(ET-1)の免疫グロブリン療法前後の血漿濃度を用いて免疫グロブリン不応症例・冠動脈病変症例の出現予測を行った(n=30)。4.5ng/ml が閾値であり、この値を用いると感度 100%、特異度 96.1% と言う極めて高い確率を持って、免疫グロブリン不応症例、および冠動脈病変出現症例を検出することが可能であった (Ogawa S, et al. J Cardiovasc Pharmacol. 22:S364-S366, 1993)。

2. 血漿 MCP-1 濃度による免疫グロブリン不応症例・冠動脈病変症例の出現予測

冠動脈炎に深く関わる免疫系マーカーである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の免疫グロブリン療法前後の血漿濃度を用いて免疫グロブリン不応症例・冠動脈病変症例の出現予測を行った(n=15)。

なお、この系には冠動脈病変症例は含まれていない。400-pg/ml を閾値とした場合の免疫グロブリン不応例検出のための感度、特異度共に 100%であった (Asono T, Ogawa S. Scand. J. Immunol. 51:98-103, 2000)。

3. 血漿 PTX-3 濃度による免疫グロブリン不応症例・冠動脈病変症例の出現予測

PTX-3 は血管炎に伴う血管内皮細胞障害の程度と相関し、血管炎の重症度を評価しうるとしている。PTX-3 の免疫グロブリン療法

前後の血漿濃度を用いて免疫グロブリン不応症例・冠動脈病変症例の出現予測を行った (n=46)。この系には 4 例の免疫グロブリン不応例が、また 4 例中 2 例に冠動脈病変が出現した。現在までのデータでは 40ng/ml を閾値とした場合の免疫グロブリン不応例および冠動脈病変症例の出現率は感度 100%、特異度 100%を持って識別可能である (Katsube Y, Ogawa S, et al. Eur Heart J 29:652, 2008)。

4. 血漿 IL-8 濃度による免疫グロブリン不応症例・冠動脈病変症例の出現予測

血漿 IL-8 は免疫グロブリン投与前にもコントロールに比し増加するがその差は有意ではない。一方、免疫グロブリン投与後には有意に増加する (Asano T, Ogawa S. Clin Exp Immunol, 122:514-519, 2000)。現在症例数を増やして更なる検討中。

5. その他のマーカーによる免疫グロブリン不応症例・冠動脈病変症例の出現予測

sICAM-1 および CD144-EMP については現在検討中である。

### D. 考案

今まで得られたデータから分析すると、ET-1、PTX-3 および MCP-1 それぞれ単独でも高い感度および特異度を持って免疫グロブリン不応例、ひいては冠動脈病変出現症例の出現を予測可能と考える。現在は同じ症例にての 6 つの因子を同時に測定してその有用性を検討中である。結果が得られ次第、統計学的処理を行い、4 種類ほどの因子を決定し、迅速診断可能となるようなキットの作製を試みる。

### E. 結論

幾種類かの血管マーカーを用いることに

より、川崎病の免疫グロブリン不応例および冠動脈病変出現例を高い感度、特異度を持って検出することが可能と考える。免疫グロブリン両方以前に診断することにより病初期より、その患児に合った治療法を提供することが可能となることが推察された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) レオゾーから見た冠動脈の血流動態特性

小川俊一

日本小児科学会雑誌 113:1769-1778, 2009 (2009年12月1日発行)

2) 小児科臨床ビクス 9 「川崎病のすべて」  
総編集 五十嵐隆、専門編集 石井正浩

「巨大冠動脈瘤:トカウア」 小川俊一 139-141, 2009 中山書店 (2009年7月27日発刊)

3) Multicenter and retrospective case study of warfarin and aspirin combination therapy in patients with giant coronary aneurysms caused by Kawasaki disease. Suda K, Kudo Y, Higaki T, Nomura Y, Miura M, Matsumura M, Ayusawa M, Ogawa S, Matsuishi T. *Circ J.* 73:1319-1323, 2009

4) Risk stratification in the decision to include prednisolone with intravenous immunoglobulin in primary therapy of Kawasaki disease. Kobayashi T, Inoue Y, Otani T, Morikawa A, Kobayashi T, Takeuchi K, Saji T, Sonobe T, Ogawa S, Miura M, Arakawa H. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:498-502

5) Long-Term Prognosis of Patients with Kawasaki Disease at Risk for Future Atherosclerosis? Fukazawa R, Ogawa S. *J Nippon Med Sch.* 2009;76:124-133

##### 2. 学会発表

1) Symposium: Pediatric Cardiology  
“Kawasaki disease”

Hemodynamic assessment of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease

Ogawa S.

17<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Cardiology, (2009.05.23, Kyoto)

2) Reduced shear stress induces senescence of vascular wall and thrombus formation in patients with giant coronary aneurysm after Kawasaki disease. Ogawa S, et al. *European Society of Cardiology 2009* (2009. 9.1, Barcelona)

3) Results and indication of coronary artery bypass graft operation for coronary artery lesion after Kawasaki disease. Abe M, Ogawa S, et al. *5<sup>th</sup> World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery* (2009.6.24, Cairns Australia)

4) Inositol 1,4,5-Triphosphatase 3-kinase C polymorphism associated with disease severity and coronary artery lesions in Kawasaki disease. Fukazawa R, Ogawa S, et al. *The 73<sup>rd</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society* (2009.3.22)

5) ITPKC 遺伝子多型は川崎病冠動脈障害および免疫グロブリン治療の有効性と関連する 深澤隆治、小川俊一、他. 第45回日本小児循環器学会(2009.7.16)

6) 川崎病における血清サイトカイン、ケモカインの変化. 上砂光裕、小川俊一、他. 第45回日本小児循環器学会(2009.7.16)

7) 障害を有する冠動脈の流体力学的シミュレーション. 阿部正徳、小川俊一、他. 第45回日本小児

循環器学会(2009.7.16)

8) 血管炎バイオマーカー PTX-3 の川崎病への応用の有用性. 勝部康弘、小川俊一、他. 第 45 回日本小児循環器学会(2009.7.17)

9) 川崎病発症時の血小板遺伝子プロファイリングによる川崎病発症にかかわる遺伝子の検索. 深澤隆治、小川俊一、他. 第 29 回日本川崎病学会 (2009.10.17)

10) 川崎病後の冠動脈障害に対する新しい画像評価 : Fusion 画像を用いて. 阿部正徳、小川俊一、他. 第 29 回日本川崎病学会 (2009.10.17)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他

重症川崎病患者に対する免疫グロブリン・ステロイド初期併用投与の効果を検討する  
前方視的無作為化比較試験

分担研究者 竹内 一夫 埼玉大学教育学部 教授  
研究協力者 大谷 哲也 国立成育医療センター研究所 共同研究員

**研究要旨：**中間解析について、以下のように計画を策定し、中間解析に向けての準備を行った。本年度は200例に到達しなかったため来年度に中間解析を実施する予定である。

**目的と時期：**試験の途中で本試験の主たる目的が達成されたかどうかを評価する目的で1回の中間解析を行う。中間解析は研究期間中に症例登録を続けることが妥当かどうかを判断する目的で行い、試験の主たる目的が達成されていると判断された場合は試験を中止し、速やかに試験結果を学会および論文にて公表する。中間解析は200症例登録時点に行うこととする。また、原則として中間解析中も症例の登録は停止しない。

**方法：**中間解析はデータセンターが行う。試験全体の $\alpha$ エラーを5%に保つために、中間解析と最終解析における検定の多重性をLan & DeMetsの $\alpha$ 消費関数を用いて調整し、群間の比率の差について統計学有意性を調べる。 $\alpha$ 消費関数として、O'Brien & Flemingタイプを用いる<sup>(1,2)</sup>。中間解析においてIVIG+PSL療法の冠動脈病変合併頻度がIVIG療法のそれを下回り、Fisherの直接法のP値が上記方法によって規定された水準を下回った場合、統計学的に有意と判断し試験を中止する。

**結果の報告と審査：**中間解析結果は中間解析レポートとしてデータセンターより効果・安全性評価委員会に提出され、試験継続の可否および結果公表の可否について審査を行い、研究代表者に試験継続の可否および結果公表の可否を勧告する。中間解析レポートの審査により、効果・安全性評価委員会より試験の全部または一部について中止または変更の勧告がなされた場合、研究代表者は勧告内容を検討し、試験の中止または一部の変更を行うか否かを決定する。

**試験治療群における巨大冠動脈瘤多発による試験中止：**川崎病治療の最終目標は永続的な治療が必要となる巨大冠動脈瘤の発生を抑制することである。そのため試験治療群において対象治療群における一般的な巨大冠動脈瘤発生頻度を上回った場合、試験治療は巨大冠動脈瘤を抑制する効果がないと判断し、試験を中止する。巨大冠動脈瘤発生頻度は川崎病全症例の0.35%であり<sup>(3)</sup>、それらの症例がすべてリスクスコア5点以上の重症例に含まれると仮定すると、試験対象患者の1.1%に巨大冠動脈瘤を合併すると予想される。これらのデータより、試験治療群において4例以上巨大冠動脈瘤患者が発生した場合、データセンターは研究代表者に対して効果・安全性評価委員会開催を勧告し、効果・安全性評価委員会は各症例の詳細を吟味した上で試験中止の可否を決定することとする。

## A. 研究目的

ランダム化比較試験は、倫理性が担保された上での、実験的研究デザインである。倫理的であるためには、患者および家族のインフォームド・コンセントが必須であると同時に、できる限り少ない対象で、明らかな結論が導かれることが重要である。したがって、試験の途中で、新しい治療法が従来の治療法よりも明らかに勝っていることが判明すれば、その時点で試験を中止することができ、そのほうがより倫理的な試験と言える。そのため、ランダム化比較試験実施に際して、事前に中間解析を実施予定にしておくことは重要である。

本中間解析を行う目的は、(1) 免疫グロブリン (IVIG) + プレドニゾロン療法 (PSL) の優越性が疑いなく立証された場合、または (2) 許容できない有害作用として、本試験では、IVIG+PSL 群における巨大冠動脈瘤多発が明らかになった場合に、試験を早期に中止することである。

## B. 研究方法

以下は、上記 (1) の方法である。(2) については【研究要旨】に示すとおりである。本試験の予定登録数は 392 例である。予定登録期間は 3 年を見込んでいる。約半数の 200 例時点での中間解析を予定する。200 例目の追跡が終了し、データ入力終了した時点で、データクリーニングを行い、プロトコル違反やエンドポイント測定不適切などの不適格症例を除く。

PROBE 法で中央解析を行った心エコー結果をエンドポイントとして解析する。1 症例につき 4 時点 (登録前、1 週後、2 週後、4 週後) のエコー検査が実施され、そのい

ずれかで冠動脈病変があった場合をエンドポイント陽性とする。試験参加者の IVIG 群 (G 群: 対照群) と IVIG+PSL (P 群: 試験群) の情報と、エンドポイントの有無の情報をもとに 2×2 の分割表にまとめ、Fisher の正確確率検定を実施し、有意確率を得る。

中間解析時の有意水準は、Lan & DeMets の  $\alpha$  消費関数を用いて求める。中間解析までの情報量として、症例数を用いる。全必要サンプルサイズ 352 例に対する解析時点の適格症例の割合を用いて、O'Brien-Fleming タイプでその時点の有意水準を求める<sup>(1,2)</sup>。200 例集積したところで、適格症例が 180 例だったとすると (必要サンプル 352 例に対して、不適格症例を見積もり 392 例とした比と同じ) 180/352 が情報量となり、その時点の有意水準は、0.0034 である。その時点で、対照群 (G 群) 90 例中冠動脈病変が 18%つまり 16 例だとすると、治療群 (P 群) 90 例中病変ありが 3%つまり 3 例であれば、Fisher の正確確率検定により有意確率 0.0027 が得られ、上記有意水準より小さい。よって、この場合は、治療群が対照群に対して有意に病変割合が小さいと判断する。その結果が得られたところで、主任研究者および研究事務局へ試験中止の可能性を知らせ、エコー所見の中央解析を勧奨する。中央解析結果が得られた時点で再び同様の解析を行う。中間解析結果は、中間解析レポートとしてまとめ、効果・安全性評価委員会に提出する。以降の手順は、上記【研究要旨】の通りである。

## C. 研究結果

昨年度策定した中間解析方法論に若干の

変更を加えた。主たる点は中間解析時点で中央解析を実際に行う事である（昨年度立案した計画では主治医が判断した暫定的エンドポイントで行う）。そのため、研究事務局と共同で画像データの処理、計測方法の詳細確定などの作業も同時に行った。

平成22年2月28日現在で149症例が登録された。残念ながら今年度は200例まで症例が集積されなかったため、中間解析は次年度に行うこととなった。

#### D. 考案

中間解析の方法として、古典的な Pocock の方法（どの解析時点も同じように有意水準を設け、全体で5%の有意水準を保つ方法）や O'Brien-Fleming の方法（開始直後の解析時点は、小さな有意水準とし、徐々に有意水準を上げていき、最終的に全体で5%の有意水準を保つ方法）があるが、これらは、解析時点を事前に決定する必要があり、自由度が低い。近年一般的に用いられる方法は $\alpha$ 消費関数を用いる方法である。この方法は、事前に解析時点を決定しておかなくてもよい点で、自由度が高い。 $\alpha$ 消費関数を用いる方法にも Pocock 型の方法と O'Brien-Fleming 型の方法があるが、O'Brien-Fleming 型のほうが、より倫理性が高い。すなわち試験直後に有意差を判断するためには、かなりの差が観察されねばならないという条件にするほうが最終的な判断を誤るリスクが減ることが想像されるからである。したがって、本試験で採用予定の $\alpha$ 消費関数を用いた中間解析は、妥当であると考えられる。

#### E. 結論

本ランダム化比較試験において、中間解析は、Lan-DeMets の $\alpha$ 消費関数（O'Brien-Fleming 型）を用いて、200症例程度集積された時点で行う。現在、症例の集積が続けられている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

#### 参考文献

1. Lan KKG, DeMets DL: Discrete sequential boundaries for clinical trials. *Biometrika* 1983; 70:659-63.
2. 丹後俊郎:  $\alpha$ 消費関数. 無作為化比較試験. 東京: 朝倉書店; 2003. p. 130-6.
3. 第19回川崎病全国調査成績. [Cited; Available from: [http://www.jichi.ac.jp/dph/kawasakibyou/20070904/kawasaki19\\_report.pdf](http://www.jichi.ac.jp/dph/kawasakibyou/20070904/kawasaki19_report.pdf)]



重症川崎病患者における免疫グロブリン大量療法不応例予測スコアの  
外的妥当性の検討

- 臨床評価（血液・免疫） -

分担研究者 荒川浩一 群馬大学大学院小児科学分野 教授

**研究要旨：**我々は免疫グロブリン大量療法 (IVIG) 抵抗例を診断時に予測することが可能なリスクスコアを開発し、IVIG 抵抗例に対する初期治療の検討を行ってきた。しかし、我々が検討した症例の治療レジメでの IVIG 投与法は 1g/kg/日×2 日間投与であり、2g/kg 単回投与による妥当性は確かではない。今回、2000 年 8 月～2007 年 3 月までの期間に群馬大学関連病院および日本大学板橋病院、日本赤十字医療センターにて IVIG を含む初期治療を受けた川崎病患者 1448 例 (962 例:IVIG 1g/kg/日×2 日間投与、486 例:IVIG 2g/kg×単回投与) を対象として、本リスクスコアの 2g/kg 単回療法における妥当性を検討した。IVIG 不応・再燃、一過性冠動脈拡張、冠動脈瘤合併を予測する ROC 曲線下の面積は両群間でいずれも差を認めなかった。また、2g 群においてリスクスコアのカットオフ値を 5 以上として IVIG 不応例の予測を検討したところ、1g 群と同等の予測確率であった。我々のリスクスコアが 2g/kg 単回投与の治療レジメに対しても適応可能であることが示された。

**A. 研究目的**

川崎病は小児期に好発する原因不明の血管炎症候群であり、無治療では高率に冠動脈病変 (CAL) を合併することが知られている。また、治療抵抗例や冠動脈病変合併例では冠動脈病変合併頻度が上昇することが知られている。

我々は免疫グロブリン大量療法 (IVIG) 抵抗例を診断時に予測することが可能なリスクスコアを開発 (表 1) し、IVIG 抵抗例であることが予想される重症川崎病患者に対し初期治療としての IVIG+プレドニゾロン (PSL) 療法が臨床経過や冠動脈を改善する

可能性を IVIG+PSL 療法が冠動脈病変の抑制、有熱時間の短縮、CRP の早期陰性化に有用である可能性がある事を報告してきた。しかし、我々が検討した症例の治療レジメでの IVIG 投与法は 1g/kg/日×2 日間投与であり、米国をはじめとした諸外国での推奨されている 2g/kg 単回投与とは異なる。従って、本リスクスコアが 2g/kg/日投与にて治療を受けた川崎病患者群において適応可能かどうかは確かではない。

今回、この問題を解決すべく、本リスクスコアの IVIG 2g/kg 単回投与レジメにおける外的妥当性を検討することを本研究の

目的とした。

## B. 研究方法

対象患者は 2000 年 8 月～2007 年 3 月までの期間に群馬大学関連病院および日本大学板橋病院、日本赤十字医療センターにて IVIG を含む初期治療を受けた川崎病患者 1448 例とした。1448 例中 962 例が IVIG 1g/kg/日×2 日間投与(1g 群)、486 例が IVIG 2g/kg/日×単回投与(2g 群)をうけた。1g 群は全例が IVIG 開始後 36 時間以内に投与が終了していた。アスピリンは 30mg/kg/day で併用投与を行い、CRP 陰性化後に 5mg/kg/day へ減量とした。

初期治療開始前に冠動脈病変を合併していた症例、および初期治療時にステロイド投与が併用されていた症例は除外した。IVIG 不応例は 24 時間以上持続する発熱のために追加治療が必要になった症例または無熱期間後の川崎病症状を伴った発熱を認めた症例と定義した。冠動脈病変の診断基準は 5 歳未満の症例では冠動脈径 3mm 以上、5 歳以上の症例では冠動脈径 4mm 以上、あるいは初回診断時の 1.5 倍以上の冠動脈径となった場合とした。

1g 群、2g 群においてエンドポイントを IVIG 治療に対する不応・再燃、冠動脈一過性拡大、冠動脈瘤形成とし、これらのエンドポイントとリスクスコアを変数として ROC 曲線を用いて検討した。

## C. 研究結果

1g 群、2g 群間での患者背景・臨床症状は治療開始病日と血小板数を除いて有意差は認めなかった。また、各群間の IVIG 不応・再燃例、治療開始後 1 ヶ月以内に認めた一

過性冠動脈拡張例、治療開始後 1 ヶ月以降に残存した冠動脈瘤合併例の割合に有意差は認めなかった。

IVIG 不応・再燃、一過性冠動脈拡張、冠動脈瘤合併を予測する ROC 曲線下の面積は両群間でいずれも差を認めなかった。リスクスコアのカットオフ値を 5 以上として IVIG 不応例の予測を検討したところ、2g 群は 1g 群とほぼ同等の予測確率であった(表 2)。

## D. 考案

本検討により、我々のリスクスコアが 2g/kg 単回投与の治療レジメに対しても適応可能であることが示された。1g 群と 2g 群で同様の結果が得られた背景として、1g/kg×2 日間投与のほぼ全ての症例が投与開始後 36 時間以内に投与終了となっていることが挙げられる。

IVIG 不応例では IVIG への反応が良好な症例と比較し、CAL の発生頻度が高く、すなわち治療抵抗例の予測が CAL 発生の予測となる。リスクスコアを用いて IVIG 不応例を予測することにより病初期より重症度に応じた治療を選択することが可能となろう。また、本リスクスコアは治療開始前の患者背景、血液検査結果より簡便に算出することができ、治療早期介入により、さらに CAL の発生頻度を減少させることができると考えられる。

本リスクスコアを用いて治療抵抗例を早期に抽出し、その上でどのような治療戦略をとるべきかが問題となる。川崎病治療においては IVIG 投与がゴールドスタンダードであるが、不応例に対しては様々な追加治療が検討されている。IVIG の追加投与、

コルチコステロイド投与、メチルプレドニゾロンパルス療法、シクロフォスファミド療法、インフリキシマブ療法などが挙げられる。IVIG 不応と予測される重症川崎病患者に対しては初期治療としてこれらの治療を含め、強化療法を行う必要があると考えられる。つまり、重症度に応じたよりきめ細やかな治療方法の選択をおこなうこと、テーラーメイド医療の実現が今後の目指す方向性であろう。

#### E. 結論

IVIG 大量療法不応例の予測スコアの外的妥当性の検討を行い、2g/kg 単回投与でも同等の予測確率が得られることが示された。今後、冠動脈病変の合併を予防するために重症度を予測した上で治療戦略を立てることが必要であり、重症例に対する治療法の確立が望まれる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kobayashi T, Inoue Y, Otani T, Morikawa A, Kobayashi T, Takeuchi K, Saji T, Sonobe T, Ogawa S, Miura M, Arakawa H. Risk stratification in the decision to include prednisolone with intravenous immunoglobulin in primary therapy for Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:498-502.

2. 小林徹、小林富男、荒川浩一 免疫グロブリン治療抵抗例の予測スコア 小

児科臨床ピクシス 9 川崎病のすべて 2009: 116-119.

##### 2. 学会発表

1. Tohru Kobayashi, Tomio Kobayashi, Akihiro Morikawa, Tstsuya Otani, Mitsuru Seki, Keiji Tsuchiya, Tomohiro Takeda, Hirokazu Arakawa. External validation of a risk score to predict intravenous immunoglobulin resistance in patients with Kawasaki disease. 5th World congress of pediatric cardiology and cardiac surgery. Cairns, Australia, June 23 2009
  2. 小林徹、佐地勉、森川昭廣、市田露子、小川俊一、野村裕一、三浦大、荒川浩一. 小児大規模臨床試験実施に当たつての課題—RAISE Study での準備を通して— 第 112 回日本小児科学会学術集会. 2009. 4. 19. 奈良
  3. 小林徹、佐地勉、菌部友良、森川昭廣、濱岡建城、原寿郎、小川俊一、市田露子、阿部淳、野村裕一、三浦大、井上佳也、荒川浩一. 重症川崎病患者に対する免疫グロブリン・プレドニゾロン初期併用療法の有用性を検討する RAISE Study. 第 24 回関東川崎病研究会 2009. 6. 27
  4. 小林徹、阿部淳、尾内善広、小川俊一、深澤隆治、原寿郎、池田和幸、荒川浩一、佐地勉. 川崎病遺伝コンソーシアムの設立にむけて. 第 29 回日本川崎病学会. 2009. 10. 18. 名古屋
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を

含む)

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

表1：リスクスコアの項目と点数

	カットオフ値	点数
Na	133 mmol/L以下	2点
AST	100 IU/L以上	2点
治療開始（診断）病日	4病日以前	2点
好中球%	80%以上	2点
CRP	10 mg/dL以上	1点
月齢	12ヶ月以下	1点
血小板数	30万/mm <sup>3</sup> 以下	1点

表2：両群での予測確率の比較

	ROC曲線下面積 (95% 信頼区間)	感度 (%)	特異度 (%)
IVIG 1g/kg×2日間 (1g群)			
不応例	0.81 (0.78 – 0.85)	73.2	78.6
一過性冠動脈拡張例	0.78 (0.71 – 0.84)	76.6	69.9
冠動脈病変合併例	0.81 (0.72 – 0.89)	81.2	68.3
IVIG 2g/kg 単回 (2g群)			
不応例	0.80 (0.75 – 0.85)	69.3	81.0
一過性冠動脈拡張例	0.78 (0.72 – 0.85)	68.4	72.5
冠動脈病変合併例	0.82 (0.74 – 0.89)	83.3	71.1

急性期川崎病における血小板由来マイクロパーティクルと  
酸化ストレス測定の将来的展望

研究分担者	濱岡 建城	京都府立医科大学小児循環器・腎臓学	教授
研究協力者	八幡 倫代	京都府立医科大学小児循環器・腎臓学	大学院生
	鈴木 千夏	京都府立医科大学小児循環器・腎臓学	研究員
	藤井麻衣子	京都府立医科大学小児循環器・腎臓学	大学院生
	濱岡亜希子	京都府立医科大学小児循環器・腎臓学	大学院生

研究要旨：川崎病急性期において、血小板活性化マーカーとして PDMP を、酸化ストレスの指標として血中ヒドロペルオキシドと血中還元力を測定した。その結果これらのパラメーターの動態は、川崎病急性期における血管炎病態と急性期治療効果の評価をよりの確に行うことを可能にすると考えられた。これにより IVIG 不応や難治例の予測、あるいは早期発見につなげ、時に致命的ともなる冠動脈障害の発症率を低下させることが可能になると考えられた。

A. 研究目的

川崎病における血管炎の正確な発生機序には不明な点が多いが、広範な血管内皮障害により種々のサイトカインを介した血小板凝集能の亢進がみられることが知られている。この血小板凝集能の亢進は冠動脈瘤の形成に関与しているほか、血管病変の血栓性閉塞や動脈硬化性病変への進展においても主要な危険因子であるため、川崎病では抗血小板療法が通常行われている。が、従来の血小板凝集能測定方法は煩雑で、抗血小板療法中の患者に対し、その血小板活性化動態や治療効果を客観的に評価することが困難であった。このため、川崎病治療における抗血小板薬の臨床的意義や治療効果に関する検討は殆ど行われていなかった。これに対し、近年注目されている血小板

由来マイクロパーティクル（以下 PDMP）を用いることで、川崎病急性期における血小板活性化動態を明らかにすることを計画した。PDMP は、血小板活性化に伴い放出される単なる粒子ではなく、それ自体がプロコアグラント活性を有し、血管炎症に関する機転に深く関わる機能粒子であり、血小板活性化マーカーとして、さらには血管炎症のマーカーとして有用であることが、成人領域では数多く報告されてきている。このため、PDMP は血小板活性化動態のみでなく、血管炎病態をも評価できる可能性が考えられた。

また、近年川崎病急性期の血管炎においては、酸化ストレスが深く関与することも報告されている。健康な体内では酸化・抗酸化バランスが保たれているが、酸化スト

レスとはこのバランスが崩れ、酸化が亢進した状態と定義される。川崎病における激しい炎症下では活性化した炎症細胞からの活性酸素種産生は亢進し、また血管内皮細胞上に存在する産生系も循環するサイトカインの刺激により亢進していることが考えられる。血管内皮細胞が産生する一酸化窒素 NO は本来血管内皮保護作用を有するが、炎症に伴う血管内皮細胞障害によりその産生は低下し、なおかつ活性酸素種過多状態の中で NO はむしろフリーラジカル産生系に転じ、酸化ストレス増大に関わるようになることも知られている。このように炎症下ではあらゆる活性酸素種生成経路の亢進が考えられ、したがって川崎病血管炎の病態を評価するにあたり、酸化ストレスの関与は無視できない因子である。

今回、川崎病の急性期において血管炎症に関わる血小板活性化動態と酸化ストレス動態を評価することにより、血管炎の病態評価を行うことを計画した。もって、急性期治療の臨床的意義とその効果を再検討し、IVIG 不応例や治療難治例の予測、あるいは早期発見につながるデータが得られると考えた。これにより冠動脈障害発症を抑制し、最大かつ最終目的である心血管イベント予防に大きく貢献することを目的とした。

## B. 研究方法

【対象】当院と研究協力機関にて川崎病と確定診断の上急性期治療（IVIG と抗血小板療法）を受けた症例で、説明の上研究協力の同意が得られた患児を対象とする。年齢・性別は問わない。

【方法】通常の採血時にあわせて本研究用の採血を行う。

治療開始（ガンマグロブリンおよびアスピリン投与）直前、および治療開始 2 日後、2 週間後、発病 1 ヶ月後、2 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後にそれぞれ採血を行い、以下の測定を行う。

- 血小板数：本大学臨床検査部に委託。
- 血小板由来マイクロパーティクル (PDMP)：EDTA-ACD 採血管（ニプロ、コード 31-601）に採取し、遠心分離後 20℃以下に凍結保存する。ある程度の検体数の集積を待ち、ELISA 法で測定。
- 血中ヒドロペルオキシド (ROM)：ヘパリン血清を用い、ウイスマー社製酸化ストレス測定機器 (FREE) の dROMs テストを用いて測定。
- 血中還元力 (BAP)：ヘパリン血清を用い、ウイスマー社製酸化ストレス測定機器 (FREE) の BAP テストを用いて測定。

（倫理的側面への配慮）

すべての研究対象者に、研究の目的を十分に説明し、検体提供者の自由意志で承諾を得るよう努め、同意を得た。研究対象者が若年でインフォームド・コンセントを得ることが困難な場合は保護者等からのインフォームド・コンセントを得た。

## C. 研究結果

1) PDMP について  
一般的な急性有熱性疾患 33 例に比べて、治療開始前の川崎病症例では PDMP が有意に高値であった (図 1)。

次に PDMP は血小板より放出されること

と急性期は血小板数が大きく変動することを考慮し、PDMPの動態評価にあたっては血小板1万あたりの値で評価した。治療に反応良好であった20例のうちIVIGを施行した16例において、PDMP (/P1t1万)はIVIG後に有意に低下傾向を示した(図2)が、IVIGを施行しなかった4症例ではむしろ上昇傾向を示した(図3)。

## 2) 酸化ストレスについて

急性期19例を対象に酸化ストレス指標として血中ヒドロペルオキシド(ROM)と血中還元力(BAP)を測定した。19例中13例がIVIG反応良好で、残6例はIVIG反応不良(RAISE STUDYで定義した不応、再燃を含む)であった。

すべての症例において(a)IVIG直前、(b)IVIG直後、(c)IVIG後1-2Wにおいて採血を行い、ROMとBAPの推移を検討した。結果は、ROMは反応良好群では(a)と(b)、(b)と(c)を比較したところともに有意に低下した( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )が、反応不良群では(a)と(b)では有意差を認めず、(b)と(c)で有意に低下した( $p<0.01$ )。BAPは反応良好群で(a)と(c)でのみ有意に上昇し( $p<0.01$ )、反応不良群では有意な変化を認めなかった(図4)。また、各採血ポイントにおいてIVIG反応良好群とIVIG反応不良群を比較したところ、(a)のBAPが反応不良群で有意に低かった( $p<0.01$ )が、その他については明らかな差は認めなかった。

## D. 考案

IVIG施行後PDMPは有意に低下傾向を示したが、IVIGを施行したにも関わらず冠動脈障害を合併した1例では、その後も高値を保っていた。このことから、PDMPは血

管炎の程度と平行に変動している可能性が示された。また、IVIGを施行し心血管後遺症がなかった16例の中で、発症より2-3か月後に急性期治療プロトコールに従い抗血小板療法を中止した後にPDMPが再上昇する症例も散見され、さらに発症後6か月においてもやや高値を示す症例も見受けられた。したがって、川崎病血管炎とそれによる血小板活性化は我々の予想をはるかに上回り長期に渡って維持している可能性が考えられる。

急性期におけるROMは健常小児と比較して異常高値を示し、活性酸素種生成が亢進していることが明らかとなった。IVIG前後でROMは有意に低下しており、IVIGによる効果が考えられた。しかしBAPはIVIG前後での有意な変化はなく、経時的に緩やかな上昇を示しており、IVIGによる効果ではなくアスピリン持続投与や体内ホメオスタシスによる緩徐な力が働いていることが考えられた。

また、IVIG前のBAPが反応不良群で有意に低かったことから、BAPがIVIGに対する反応性を予測する一助となる可能性が考えられた。

以上のことから、血管炎症に関わるバイオマーカーとして、PDMPと酸化ストレスが川崎病血管炎の病態評価に有用であることが示された。今後は、IVIG不応例や治療難治例、または冠動脈障害合併例の予測やより迅速な対応を目指した早期発見につなげるために、これら症例についてのデータをさらに収集し検討を行い、特性を把握していく必要がある。

また、小児におけるPDMPや酸化ストレスについての基礎的データは、今まで国際



的にもほとんど報告がなく、本研究のデータは、川崎病に限らず小児領域における数多くの血栓性疾患や酸化ストレス関連疾患の研究にも貢献するものであり、将来的にはそれらの臨床的意義や治療にも関わる重要なデータとなる可能性を秘めており、社会的意義は非常に大きいと考えられる。今後も症例数を増やし、基礎的データのさらなる確立を目指す。

#### E. 結論

川崎病血管炎の病態評価に PDMP と酸化ストレス測定が有用であることが示された。

今後はさらに IVIG 不応例、治療難治例、冠動脈障害合併例での評価を進めることにより、これらのより確実な予測や早期発見につなげるためのデータを収集する。もって、PDMP と酸化ストレスの川崎病急性期における血管障害バイオマーカーとしての意義を、より堅実なものとすることを目標とする。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

国際会議

・ The evaluation of platelet function in Kawasaki disease using platelet-derived microparticles, 第 9 回国際川崎病シンポジウム, 平成 20 年 4 月 10-12 日. 台湾

国内会議

・ Evaluation of platelet function in Kawasaki disease by platelet-derived microparticles, 第 44 回日本小児循環器学会, 平成 20 年 7 月 2-4 日. 福島

・ Evaluation of Platelet Activation in Kawasaki Disease by Platelet-derived Microparticles, The 17<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Cardiology, 平成 21 年 5 月 20—23 日、京都

・ 血小板由来マイクロパーティクルを用いた川崎病遠隔期例における血小板活性化の評価、第 45 回日本小児循環器学会、平成 21 年 7 月 15-17 日、神戸

・ 抗血小板療法中の川崎病遠隔期症例におけるアスピリン耐性について、第 45 回日本小児循環器学会、平成 21 年 7 月 15-17 日、神戸

・ 川崎病遠隔期症例における酸化ストレス動態、第 29 回日本川崎病学会、平成 21 年 10 月 16-17 日、名古屋

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

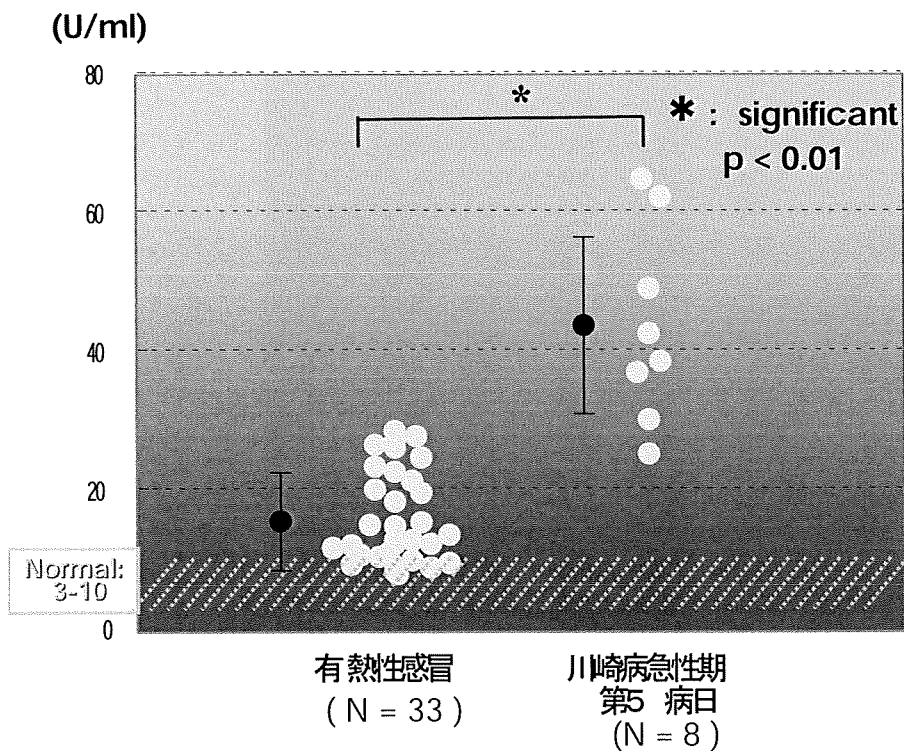
##### 2. 実用新案登録

なし

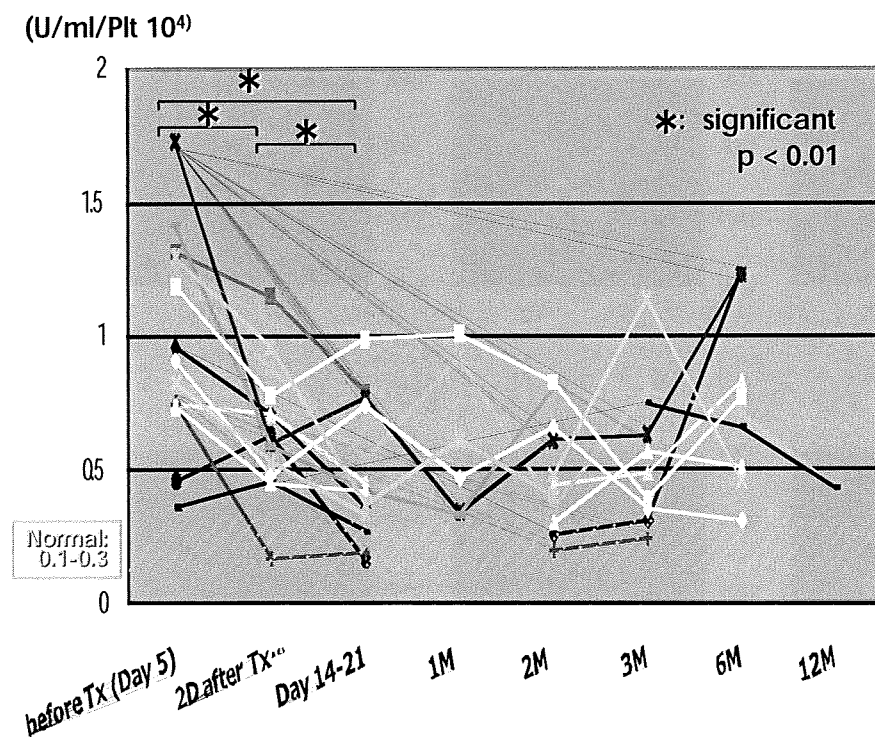
##### 3. その他

なし

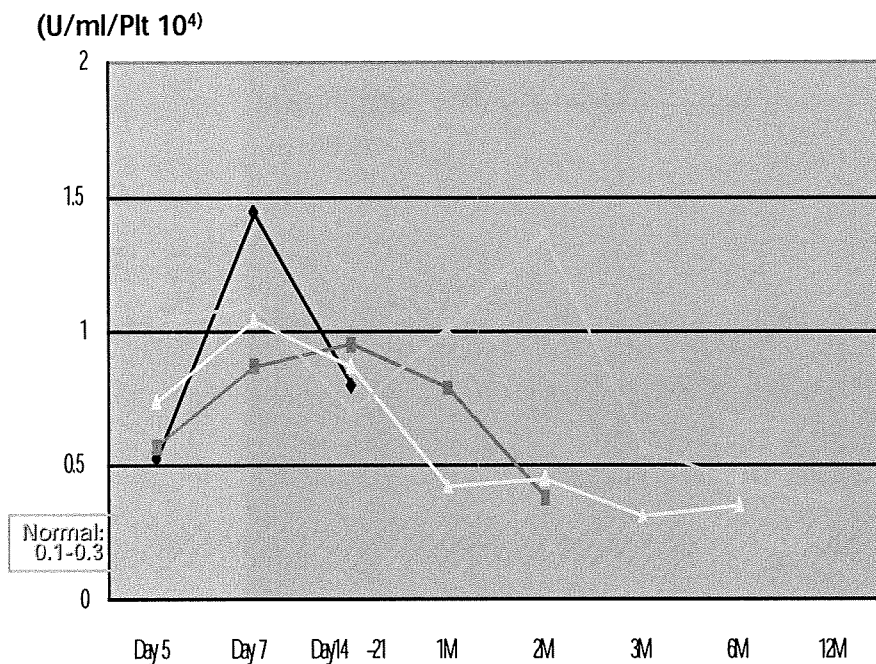
(図1) PDMP 比較 (急性有熱性疾患 vs 川崎病・治療開始前)



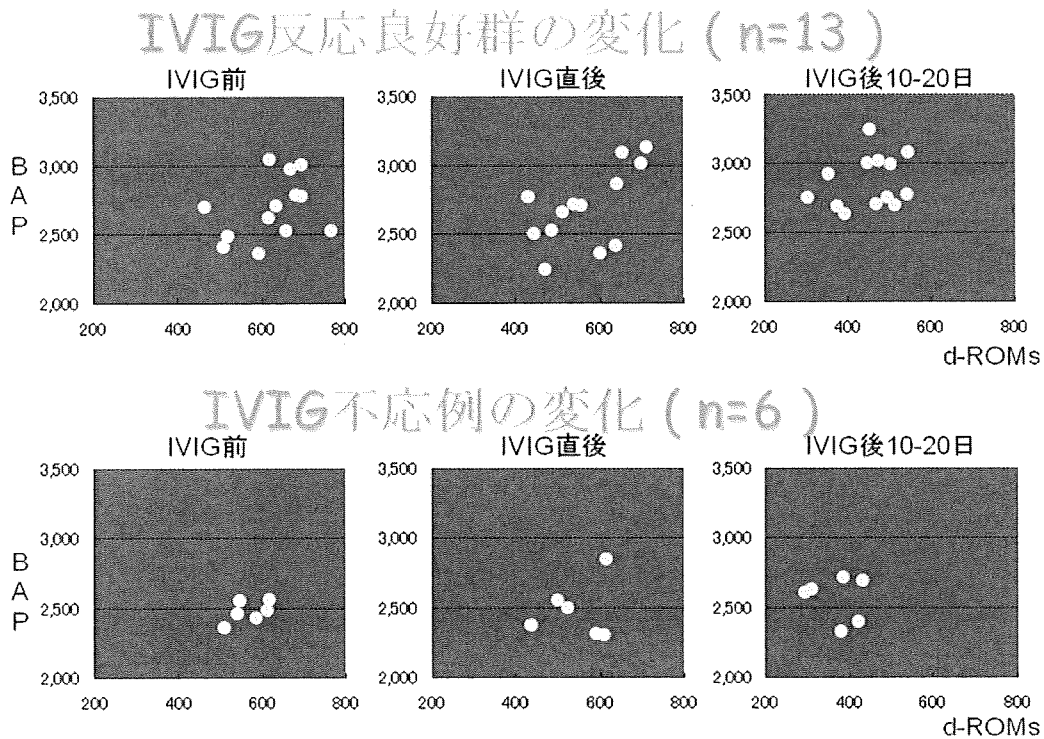
(図2) IVIG 施行例の PDMP 経時的変化



(図3) IVIG 無施行例の PDMP 経時的変化



(図4) ROM と BAP の推移



## 川崎病急性期末梢血単核球におけるユニークな活性化状態

### 研究分担者

氏名 原寿郎

所属 九州大学大学院医学研究院成長発達医学

役職 教授

### 研究協力者

氏名 池田和幸

所属 九州大学大学院医学研究院成長発達医学

役職 助教

研究要旨：川崎病急性期の病態は、血清中の炎症性サイトカインやケモカインの上昇を伴う免疫系の著明な活性化により特徴付けられるが、これら化学伝達物質の主要な産生源は、いまだ解明されていない。我々は、flow cytometry, DNA Microarray 解析, 定量的 RT-PCR 法により末梢血単核球(PBMNCs)の活性化状態について解析を行った。川崎病急性期でのNK細胞や $\gamma\delta$ T細胞のCD69陽性細胞の割合は、川崎病回復期に比較して著明に高値を示した。Microarray解析により、川崎病急性期において*NAIP*, *IPAF*, *S100A9*, *FCGR1A*, *GCA*の5遺伝子で発現が上昇しており、川崎病急性期に関連のある pathway が自然免疫系に密接に関連していた。急性期川崎病患者 PBMNC における damage-associated molecular pattern molecule (DAMP) (*S100A9*, *S100A12*)の遺伝子発現が回復期に比較して有意に上昇していたが、*TNFA*, *IL1B*, *IL6*の遺伝子発現は川崎病患者と正常対照で有意差は認められなかった。川崎病患者 PBMNC において TNF- $\alpha$ , IL-10, INF- $\gamma$ 細胞内サイトカイン染色を行ったが、検出されなかった。これらの結果から、PBMNC は DAMP 遺伝子の高発現、炎症性サイトカイン遺伝子の発現低値を特徴とするユニークな活性化状態を示し、自然免疫系が川崎病の病因、病態へ重要な役割を果たしていることが示唆された。

### A. 研究目的

本研究は、川崎病急性期における PBMNCs の活性化状態について解析することを目的とする。

### B. 研究方法

【対象】 2005年4月から2009年2月までに当院および関連病院へ入院し、川崎病と診断された51例、中央値2.0歳(3ヶ月-7.3歳)を対象とした。川崎病患者は、全例でアスピリン内服治療(30mg/kg/日)、免疫グロブリン静注療法(IVIG 1-2g/kg)を施