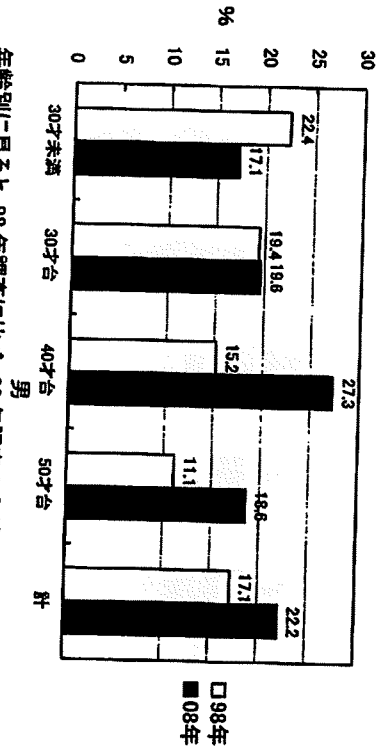


調査結果(19)過去1年のストレス

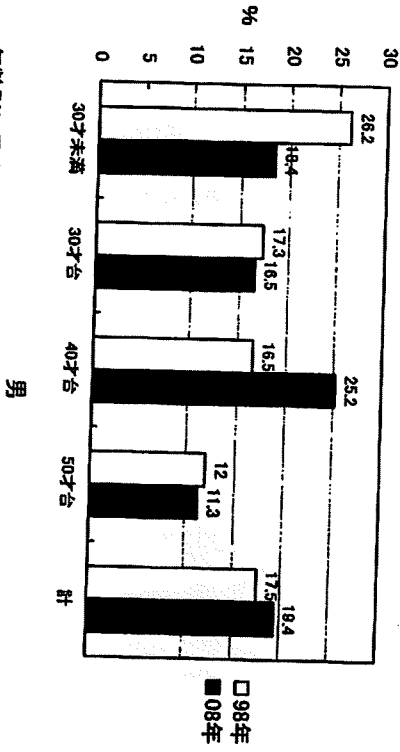
「とてもストレスを感じた」%



年齢別に見ると、98年調査に比べ、08年調査の方が、40才台・50才台で過去1年に強いストレスを感じているものが多い

調査結果(20)過去1か月のストレス

「とてもストレスを感じた」%

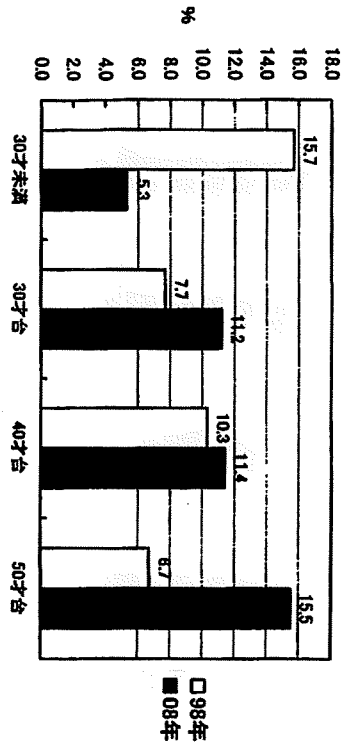


年齢別に見ると、98年調査に比べ、08年調査の方が、40才台で過去1か月に強いストレスを感じているものが多い

20

調査結果(21)離職念慮

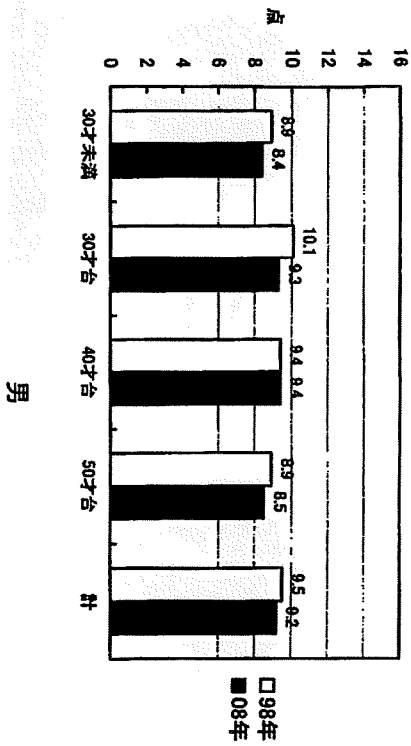
「はい」%



98年調査に比べ、若年層の離職念慮が減少、50才台では増加

調査結果(22)仕事の量的負荷

尺度得点平均値

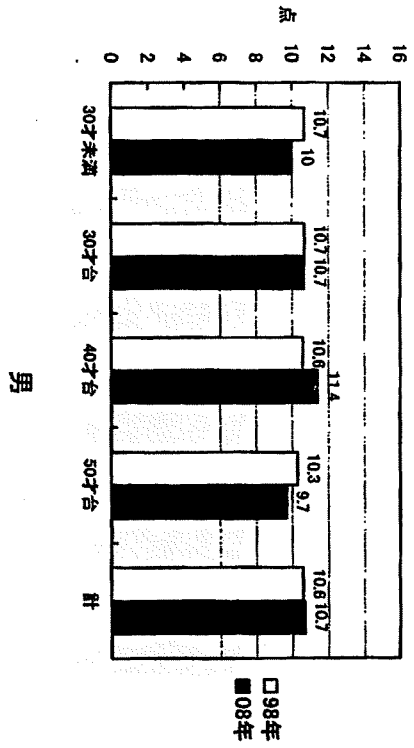


40才台以外で、量的負荷は減少傾向(特に30才台)

21

調査結果(23)仕事将来不明確

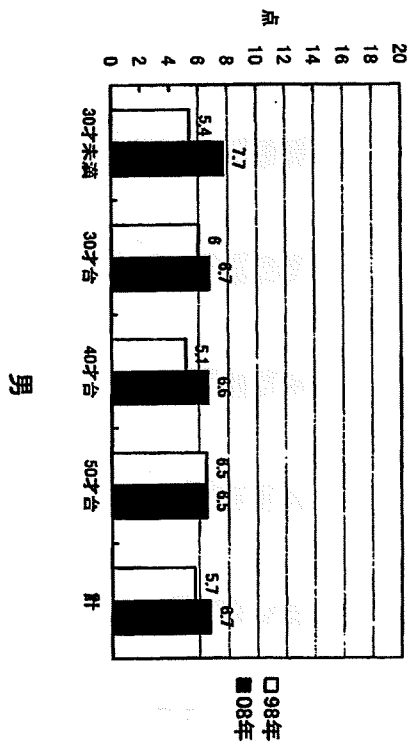
尺度得点平均値



特に40才台で、仕事将来不明確は増加している

調査結果(25)仕事役割葛藤

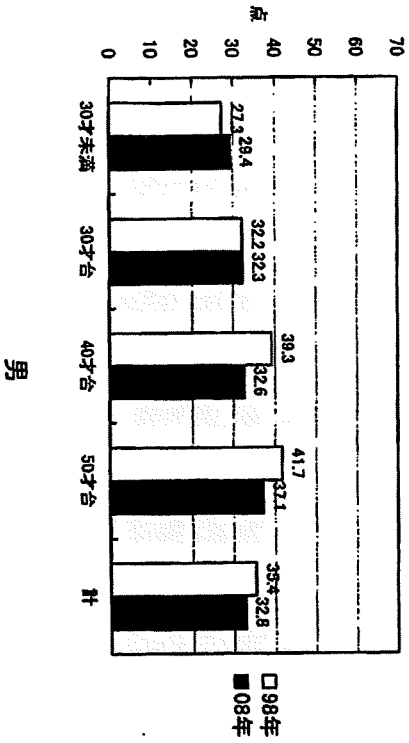
尺度得点平均値



特に30才未満と40才台で、仕事と家庭との葛藤が増加している

調査結果(24)作業制御(仕事コントロール)

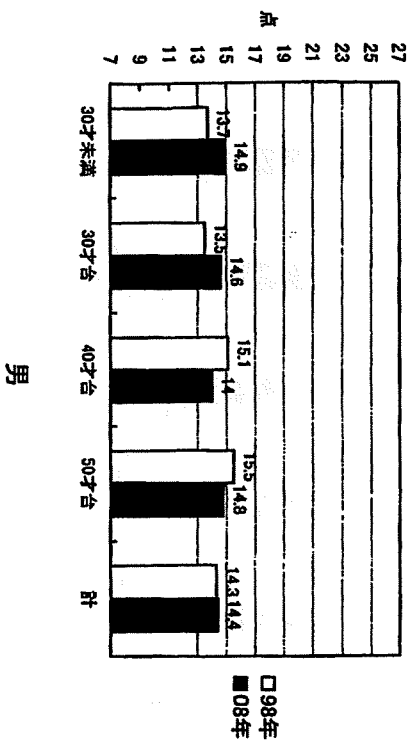
尺度得点平均値



特に40才台と50才台で裁量度は減少している

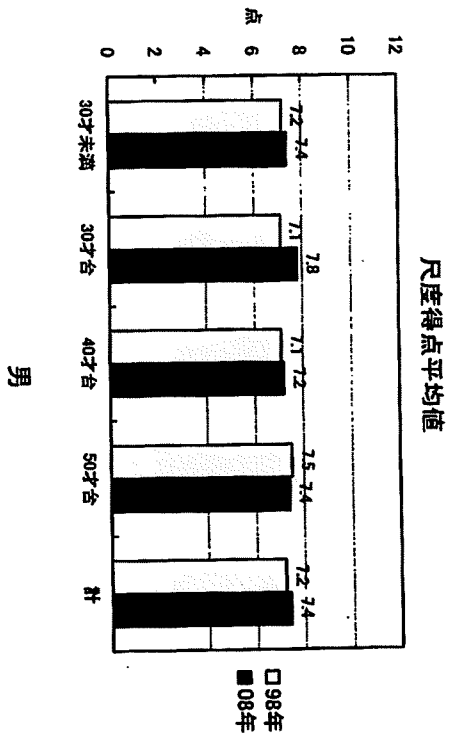
調査結果(26)やりがい

尺度得点平均値



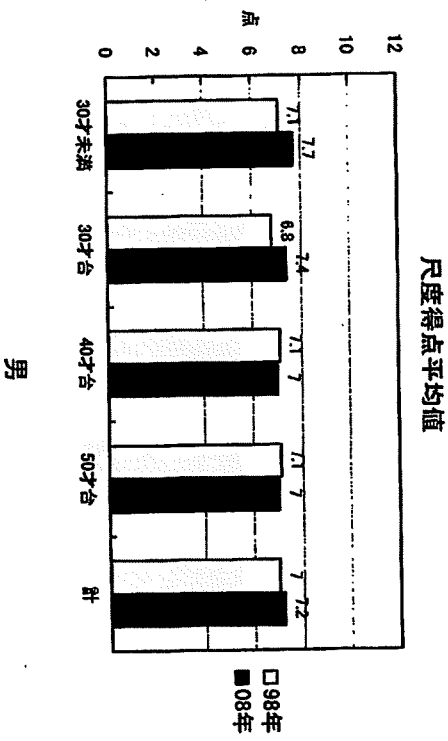
やりがいは30才台以下の層では増加、40才台以上の層で減少

調査結果(27)社会的支援：上司



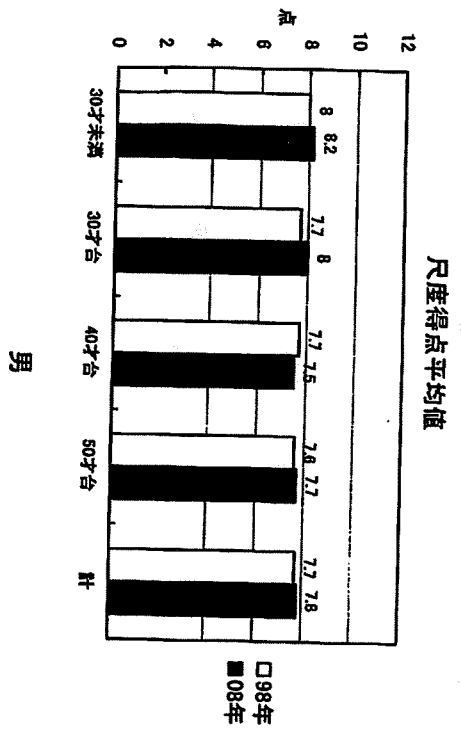
特に30才台で、上司からのサポートは増加

調査結果(28)社会的支援：同僚



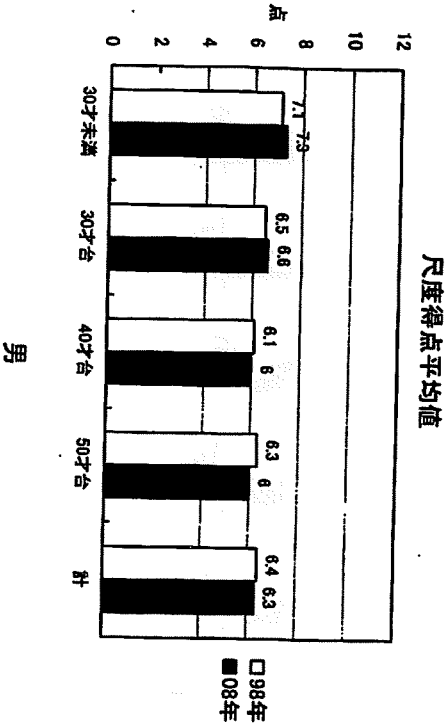
同僚からのサポートは、30才台以下の層では増加、40才台以上の層ではあまり変わっていない

調査結果(29)社会的支援：配偶者



配偶者からのサポートは、あまり変わっていない

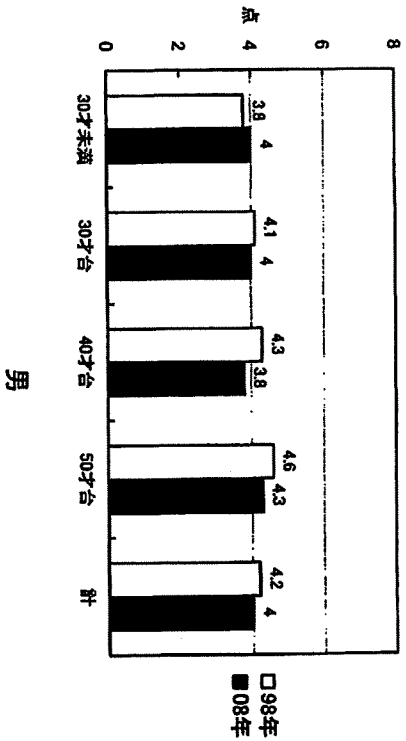
調査結果(30)社会的支援：友人



友人からのサポートは、あまり変わっていない

調査結果(31)仕事満足度

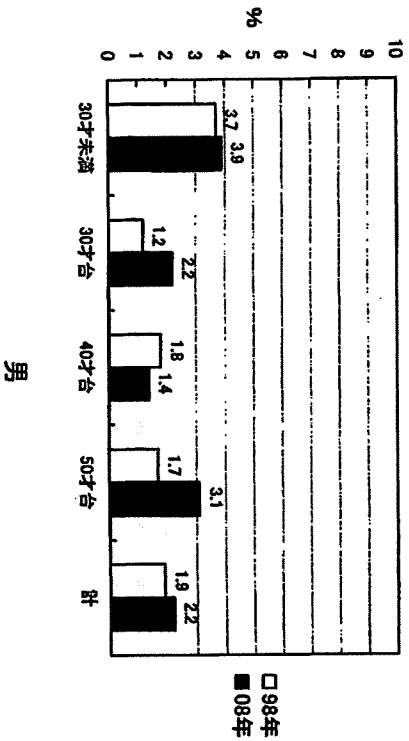
尺度得点平均値



特に40才台で、仕事への満足が減少している

調査結果(32)うつ状態判定

DSD陽性率%



統計学的に有意差ではないが、50才台でうつ状態疑いの陽性率が増加している

質問紙調査結果の比較のまとめ
平成10(1998)年と平成20(2008)年の調査を比較すると、背景となる年齢や婚姻状況などの風性が少し異なるものの：

- 1：若年層(30歳未満、30才台)に比べて中高年齢層(40才台、50才台)の自覚的健康度が低下し、ストレスの感じ方が増加している。短期的な面では(過去1ヵ月、1年間)でストレスの感じ方など40才台で顕著であり、長期的な意味合いを含む部分では(うつ状態、離職意向など)50才台で悪化している。
- 2：中高年齢層の仕事ストレスは量的なものよりも、将来の不明確さや就業度の低下などによるものが悪化。若年層はいくつかの指標で改善しているが、仕事と家庭との葛藤によるものは悪化。
- 3：若年層ではやりがいが増加しているが、逆に中高年齢層では低下しており、離職意向も増加している。
- 4：ソーシャルサポートにおいては、上司や同僚からのサポートは若年層では若干増加。
- 5：仕事への満足度は中高年でやや低下。うつ状態は50才台においてわずかながら悪化の傾向が見られる。

聞き取り調査(インタビュー)の結果

上記の質問紙調査の比較結果について、今回調査の窓口となった担当者(衛生管理者あるいは総務課あるいは人事課職員および産業医)にインタビューをしたところ、下記のようなコメントを得た(順不同)。

* (調査時)職場では急速に悪化が進められており、その実情に合った結果と見える。数値データとして今後の社内対応に活かしたい(産業医)。

* 当該の状況を見ると、個性的な人の多かった60才台(最近退職した世代)と比べて、40-50才台は管理職を含めて、たいくつな人が多いという印象があり、今回のデータは骨格(衛生管理者)。

* 中高年齢層のメンタルが悪化していることは、確かによくわかる。その一方、若い世代の人々も、これから(4月から)休業分が給与に反映されるようになるので、そうなると思入減となり、直接家計に影響世代なので置こうから大変になるのではないだろうか(衛生管理者)。

* 40才から50才にかけての層が穴あきだということとはよくわかった。40才台の方が50才台より(メンタルヘルス指標が)悪いようだが、それは、50才台は早期退職制度の対象となっていたが、40才台はその対象になっていないせいではないだろうか。辞めるにも辞められない世代なので(総務担当者)。

* この結果はよく理解できる。(世界恐慌前から)当社はこのところ急激な組織改編が進んでおり、いくつかの部門が統合された結果、人間関係がなかなかうまくいかない面が出てきた。その影響が出ているのではないだろうか(総務担当者)。

質問紙調査による、群馬県における労働者（今回の分析は男性のみ）の職場ストレス状況は、10年前と比べると、40才未満（若年層）と40才以上（中高年層）とで、さまざまな測定値で異なる結果が得られた。全般的に、若年層ではやや改善している面があるが、中高年層では悪化の兆しが見られている。

10年前は、若年層から中高年層に推移するに従って、裁量度が上がり、給与も増え、管理職者の数も増え、やりがいや仕事満足度が上がっている（パタソ）を示していたが、今回調査では、中高年層では頭打ちになるか、むしろ低下するパターンを示した。

例えば、若年層に比べ、40才台・50才台では、過去1年間や過去1か月で「ストレスを感じる」というものの比率が高くなっているが、これは10年前には見られなかった知見である。

40才台と50才台の間でも若干の違いが見られ、40才台では上記の自覚的ストレス度や各種仕事ストレスサーでも比較的 short range で変化の出やすい尺度が悪化しているのに対し、50才台では離職意欲や抑うつなどの、より長期的な指標が悪化している傾向が見られる。

これらの知見は、質問紙調査後の聞き取り調査でも確かめられたが、昨年の世界恐慌発生以降に加速されたと考えられるが、それ以前からも、現在の50才前後の世代に、裁量度などが円滑に委譲されておらず、長期に及ぶ事業再編のために、管理世代の仕事満足度などが系統的に醸成されてこなかった影響があるのではと推測された。

また、50才以降では早期退職制度の対象になる場合もあり、離職に近い、長期的メンタル指標の悪化の兆しが見られるのに対し、40才台ではその適用も受けられず、この先数年から十数年の管理面の後始末を受け持たなくてはならないことが予測され、短期的意味合いの強いメンタルヘルズ関連指標にはつきりとした悪化が見られているという解釈もできる。

一方、若年層では、唯一、仕事と家庭との両立などから生じる「仕事役割」ストレスが10年前に比べて増加しているほかは、あまり変化はなく、むしろ改善の傾向を示す指標が多かった。このことと、仕事面のソーシャルサポート尺度の中で「上司からの支援」が若年層で増加していた知見を考え合わせると、この10年間で、企業内におけるメンタルヘルズサポートシステムは、特に若年層に対しては改善傾向にあったことが推測される。もし昨年の恐慌が発生しなかった場合、あるいは全般的にも、各種指標の若干の改善が見られた可能性が示唆される。

主任研究者らは、群馬産業保健推進センターのメンタルヘルズ相談員業務活動や、群馬職域メンタルヘルズネットワークの設立などの経緯を通じ、数値的な証左は得られなかったものの、この10年間において、産業メンタルヘルズ活動が緩やかながらも改善して来ていたことを感じていたが、今回の調査から間接的ながらもその兆しを示唆する知見が得られたことは重要であると考ええる。

今回、40才台から50才台にかけての世代では、10年前の、自殺者が急増した時期の調査結果よりも悪化の現れる指標が多く、非常に憂慮すべき状況と考えられる。今回の数字だけを見た場合、10年前以上の自殺者の急増も想定できる。しかし、前述のように、10年前と比べ、産業メンタルヘルズの組織的体制は全般的には向上していることが考えられるため、前年以上の自殺・うつ病の増加が短くない可能性もある。

各事業所単位に考えれば、自殺にまで至る可能性のある重症のメンタルヘルズ要観察者はケアセンターの増加にとどまることも考えられ、その場合には、現時点の産業保健スタッフのキャパシティを大幅に超えることはなく、事業所外のメンタルヘルズ関連機関との連携と情報交換を強化することで、急激なメンタルヘルズの悪化を抑えられるのではないかと考えられる。

現実的に、この経済状況下で、各企業に今までの以上のメンタルヘルズ支援へのコスト増加を求めることは不可能に近いが、メンタルヘルズの事業場外資源の中でも、特に行政からの、経費のかからないサポートを積極的に導入することが求められるだろう。

例えば厚生労働省が昨年より開始した「メンタルヘルズ不調者等の労働者に対する相談機関による相談促進事業」などが広く周知され、各事業所が有効に利用することが望まれる。

今回の調査結果から、現時点で緊急にテコ入れするべきなのは、ストレス随早期にいる40才台から50才台にかけての男性労働者へのメンタルヘルズサポートと考えられる。この年代を中心にした予防・二次予防活動を充実させ、メンタルヘルズ不調の発現を最小限に食い止めることが優先課題と考えられる。

一方、40才未満の若年層に対しては、基本給の凍結が実施される可能性のある今春以降、メンタルヘルズ指標の系統的な悪化が短ころ可能性もあるため、充分な注意が必要となると思われる。

いずれにしても、事業場外資源からの予防医学的アプローチを、どのように円滑に、かつ有効な形で事業所内に導入していくかが今後の産業メンタルヘルズ動向の一つの鍵となると考えられる。

謝辞

このような大変な時期に、これらの調査に協力していただいた事業所の調査対象者および関係者の皆さまに心より謝意を表します。また、調査実施にあたってご尽力いただいた平原医院・平原昭夫院長および群馬産業保健推進センターの職員の方々に同じく謝意を表します。

参考文献
(和文)

- 川上源人、職場のストレス、心と社会 1992;70:21-30.
- 川上源人、職業性ストレスの職種差、ストレス科学 1998;12:145-150.
- 川上源人、原谷隆史、新しい職業的ストレスの評価法—米国立職業安全保健研究所(NIOSH)の職業性ストレス調査票、ストレス科学 1998;13:19-24.
- 久保田文雄、ほか、大学生のうつ状態について-DSD 質問票を用いて、ヘルスサイエンス研究, 2004;8:23-28.
- 椎原康史、松岡治子、竹内一夫、ほか、地域メンタルヘルスに関するカウンセラーの意識調査、日本職業・災害医学会誌, 2007;55:61-68.
- 竹内一夫、質問紙による健康判定、うつ状態評価のための自記式質問票、産業衛生雑誌, 1998;40:99-100.
- 竹内一夫、椎原康史、鈴木清美、ほか、群馬県における産業精神保健相談の現状、高崎健康福祉大学紀要, 2002;1:39-49.
- 竹内一夫、太田晶子、松岡治子、ほか、不規則時間勤務に従事する女性労働者の健康指標、群馬保健学紀要, 2002;23:25-32.
- 竹内一夫、鈴木庄英、Catherine R. Roberts、保健所・市町村保健師における仕事関連健康指標について-病院看護師との比較から、高崎健康福祉大学紀要, 2003;2:53-69.
- 竹内一夫、椎原康史、鈴木庄英、ほか、メンタルヘルス対策のための事業場外資源のあり方に関する調査研究(第2報)—事業場内産業保健担当者への質問紙調査—、日本職業・災害医学会誌, 2004;52:276-283.
- 原谷隆史、川上源人、兼記俊一、日本橋版 NIOSH 職業性ストレス調査票の信頼性および妥当性、産業医学 1993;35(臨時増刊):S214.
- (欧文)
- Caplan, R. D., Gobbs, S., French, J. R. P., Harrison, R. V., and Pinnau, S. R. Job demands and workers' health. Ann Arbor: Institute for Social Research, University of Michigan, 1980.
- Doi, Y., Tango, T., Noda, J., Morita, H., Roberts, R. E., Takeuchi, K., and Suzuki, S.

- Reliability and Validity of DSM Scale for Depression in the Non-referred Japanese Girls. International Perspectives on Child and Adolescent Mental Health Part 5: Measurement in Mental Health, Chapter 28, 1999, Hong Kong.
- Greenberger, D. B. Personal control at work: its conceptualization and measurement. Technical Report 1-1-14, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, 1981.
- Holt, R. R. Occupational stress. In: Goldberger, L., Breznitz, S., eds. Handbook of stress— theoretical and clinical aspects. New York: Free Press, 1982:419-444.
- Karasok, R. A. Job demand, job decision latitude, and mental strain: implications for job redesign. Adm Sci Q, 1979; 24:285-308.
- Quinn, R. P., Magione, T. W. and Seashore, S. E. 1972-73 Quality of Employment Survey. Ann Arbor: Institute for Social Research, University of Michigan, 1975.

平成20年11月

職場における労働態様と健康に関するアンケート

群馬県産業保健推進センター 研究班
竹内一夫 (群馬産業保健推進センター相談員/埼玉大学)
椎原康史 (群馬産業保健推進センター相談員/群馬大学)
松岡治子 (群馬産業保健推進センター相談員/群馬大学)
真下延男 (群馬産業保健推進センター所長/群馬県医師会)

この調査は、職場の労働環境と健康状態との関連を調べるため、労働者健康福祉機構の助成のもとに行われるものです。今後の労働環境の改善への提言に向けて、貴重な資料とすることを目指していますので、何とぞよろしくご協力をお願いします。

この調査に参加されるかどうかは全くの自由意思です。参加されない場合も参加される場合も、この質問票を所定の封筒に入れて、封をしてご返却ください。

封筒の中身は研究班員のみが扱い、決して職場のかたの目には触れません。この調査で得られた結果は、統計的なデータのみに使用し、どなたかどのように回答したかは一切わかりません。また、どなたか参加され、どなたか参加されなかつたかも、一切わかりません。

ご参加いただける場合にも 決して名前を記入しないで下さい。

あなたご自身の率直なご回答をうかがいたないので、記入が終わるまでどうか他の人と話し合ったりしないで下さい。

どれが正しいかで、どれがまちがった答というものはありませんので、感じたままをお答え下さい。これはテストではありません。

最もよくあてはまると思う回答に○をつけて下さい。はつきりしない場合には、いちばん近いと思うものをご回答下さい。

A00 あなたはふたたび自動車の運転をしますか？

- はい、..... ①
いいえ..... 2
というようにご回答下さい。

また、数字や意見を得る欄もありますが、その場合は質問文にそってご回答をお願いします。それではよろしくお願します。

(追記：本調査は10年前に行われた同内容の労働環境調査のフォローアップに該当します。当時、調査に参加していただいた事業所に、今回の調査依頼をさせていただきました。この10年間で職場の労働環境や働く人たちの健康がどのように変わったかを明らかにするための調査ですので、何とぞよろしくご協力いただけますようお願いいたします。結果は報告書のほか、群馬産業保健推進センターのホームページ上でも概要をご覧になれるようにいたします。企業名などについては公開いたしません。)

[A]

A01 全体としてあなたの健康状態は次のどれですか？

- きわめてよい..... 1
よい..... 2
ふつう..... 3
やや悪い..... 4
かなり悪い..... 5

A02 身長はどれくらいですか？(A01の数値以下は四捨五入して下さい)

cm

A03 体重はどれくらいですか？(A01の数値以下は四捨五入して下さい)

kg

A09 平均して一日の睡眠時間は何時間くらいですか？

時間 分

A10a あなたはお酒(アルコール飲料)を飲みますか？ お酒とは、ビール、ワイン、日本酒、ウイスキー、焼酎などです。

- 飲む..... 1
以前飲んでいましたがやめた..... 2
飲まない..... 3

上で「飲む」と答えた方にごだけお尋ねします

- A10b 平均してどのくらい飲みますか？
ほとんど毎日..... 1
週4、5回..... 2
週2、3回..... 3
週1回程度..... 4
月に数回程度..... 5
年に数回程度..... 6

A10c お酒(アルコール飲料)を飲む日は何杯くらい飲むのが普通ですか？(1杯とは、缶ビールなら1缶、ビール大びんなら半分、日本酒なら0.5合、焼酎なら1/3合、ウイスキーなら小さなグラス1杯、ワインなら大きなグラス1杯)

- 1杯より少ない..... 0
1杯(例、日本酒0.5合、缶ビール本など)..... 1
2杯(例、日本酒1合、ビール大びん1本など)..... 2
3杯..... 3
4杯(例、日本酒2合、ビール大びん2本など)..... 4
5杯..... 5
6杯(例、日本酒3合、ビール大びん3本など)..... 6
7杯..... 7
8杯(例、日本酒4合、ビール大びん4本など)..... 8
9杯..... 9
10杯(例、日本酒5合、ビール大びん5本など)..... 10
10杯より多い..... 11

A11a あなたはタバコを吸いますか？

- 吸う..... 1
以前吸っていたがやめた..... 2
吸わない..... 3

上で「吸う」と答えた方にごだけお尋ねします

A11b 何年から吸っていますか？
A11c 1日何本くらい吸いますか？
→ 年
→ 1日約 本

[B]

B01 あなたの職種は次のどれにあたりますか？

- 管理職(部長以上)..... 1
専門・技術・開発/研究..... 2
事務..... 3
販売・営業..... 4
サービス関係..... 5
保安関係..... 6
運輸・通信関係..... 7
その他(.....)..... 8

B05 あなたの現在の勤務時間体系は次のどれですか？

- 日勤のみ..... 1
夜勤のみ..... 2
交代制勤務(時間交代)..... 3
交代制勤務(2時間交代)..... 4
その他の交代制、変則勤務..... 5

B09 残業を含めなくて、平均として週何時間労働ですか？(四捨五入して、時間単位でお答え下さい)

週に 時間

B11 どのくらい残業をしますか？

- ほとんど毎日..... 1
1週間2回..... 2
1週間に1回か2回..... 3
1か月に1回か2回..... 4
1か月に1回未満..... 5
残業はない..... 6
(白と答えた方B11bにお答え下さい。)

B12 平均として、週何時間くらい残業をしますか？(はしは四捨五入して、時間単位でお答え下さい)

週に 時間

B14 残業は自発的にしていますか、それとも求められていますか？

- 自発的に..... 1
求められて..... 2
求められたいがそうになっている..... 3
その他(.....)..... 4

B16 次に、仕事についていくつうかがいます。あなたがどのくらい次のような場面を超越するが教えてください。

非常にかなり ときどき たまに まれで
よくある ある ある ある

- 7. 大急ぎで仕事をしなければ 1 2 3 4 5
- どの程度ありますか? ... 1 2 3 4 5
- 1. とても一生懸命仕事をすれば 1 2 3 4 5
- 要はどの程度ありますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. ものこまを仕上げるのに少し 1 2 3 4 5
- しか問題が覆されてないこと 1 2 3 4 5
- が、どのくらいありますか? ... 1 2 3 4 5
- とでも多いというところが、 1 2 3 4 5
- どのくらいありますか? ... 1 2 3 4 5

B17 近い将来、あなたの仕事が大きく変わることもありま

が、この点についておうかがいします。

あまり やや いくらか かなり 非常に
はつきり はつきり はつきり はつきり はつきり
しない しない している している している

- 7. あなたの仕事上の経験が将来 1 2 3 4 5
- どのようになるか、どの程度 1 2 3 4 5
- はつきりして感じていますか? ... 1 2 3 4 5
- 1. 次の数年のうちの昇進や昇給 1 2 3 4 5
- の機会、どの程度はつきり 1 2 3 4 5
- していると感じますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 今から5年間に、あなたの仕 1 2 3 4 5
- 事の技術が向上し、価値が 1 2 3 4 5
- あるかどうか、どの程度はつきり 1 2 3 4 5
- していると感じますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 今から6カ月後のあなたの仕 1 2 3 4 5
- 事上の責任が何であるか、ど 1 2 3 4 5
- の程度はつきりしていると感じ 1 2 3 4 5
- ますか? ... 1 2 3 4 5

B20 現在あなたが職場や仕事のことをどの程度自分で決め

られるか(職場の人がすることをあなたがどのくらい左右で

きるか、自由に決められるか)についてお尋ねします。

ほとんど 少ししか まあまあ かなり 非常に
できない できない できる できる できる

- 7. 自分がする仕事の範囲をどの 1 2 3 4 5
- 程度自分で決められますか? ... 1 2 3 4 5
- 1. 仕事で必要とする消耗品や道 1 2 3 4 5
- 具はどの程度自由に手にいれ 1 2 3 4 5
- ることができますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 仕事をする順序をどの程度 1 2 3 4 5
- 決められますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 自分がする仕事の量をどの程 1 2 3 4 5
- 度決められますか? ... 1 2 3 4 5

ほとんど 少ししか まあまあ かなり 非常に
できない できない できる できる できる

- 7. 仕事のペース(どのくらい速く、 1 2 3 4 5
- またはゆっくり仕事をするか) 1 2 3 4 5
- をどの程度自分で決められるか? ... 1 2 3 4 5
- 1. 自分自身の仕事の量をどの程 1 2 3 4 5
- 度決定できますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 仕事場のものの配置や飾り付 1 2 3 4 5
- けをどの程度自分で決めるこ 1 2 3 4 5
- とができますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 職場グループ内で、どの人が 1 2 3 4 5
- どの仕事をするかという決定 1 2 3 4 5
- にどの程度影響を与えること 1 2 3 4 5
- ができますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 勤務形態や勤務時間を自分で 1 2 3 4 5
- 決める程度ありますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 残業時間を決めて何時頃から 1 2 3 4 5
- 仕事をするか、自分で決める 1 2 3 4 5
- 自由はどの程度ありますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. いつ休むか休むとるか決め 1 2 3 4 5
- る自由はどの程度ありますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 職場グループとしての仕事の 1 2 3 4 5
- 制約(制約)の決定にどの程度 1 2 3 4 5
- 参加できますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 職場グループとしての方針、 1 2 3 4 5
- 仕事の手順、結果にどの程度 1 2 3 4 5
- 影響を与えられますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 仕事で必要とする材料は、ど 1 2 3 4 5
- の程度自由に手にいれること 1 2 3 4 5
- ができますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 職場グループの従業員の教育 1 2 3 4 5
- 訓練にどの程度影響を与えら 1 2 3 4 5
- れますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 職場グループでの備品や設備 1 2 3 4 5
- の配置を決める自由はどの程 1 2 3 4 5
- 度ありますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 仕事を予定より先にすめて、 1 2 3 4 5
- 勤務時間中に一旦いれること 1 2 3 4 5
- はどの程度できますか? ... 1 2 3 4 5
- 5. 一緒に、あなたがどの程度仕 1 2 3 4 5
- 事や業務の推進要因を自分で 1 2 3 4 5
- 決められますか? ... 1 2 3 4 5

B22 次の人たちは、あなたの仕事に楽になるように、どの程

度あなたのために何かをしてくれませんか?

とても いくすこし まったく 該当者
なか なく ない なし

- 7. 直属の上司 1 2 3 4 8
- 1. 上司以外の職場の人々 1 2 3 4 8
- 5. 妻または夫(またはそれに準ず 1 2 3 4 8
- る人、特別な親性の友人) 1 2 3 4 8
- 5. 友人、家族(妻や夫以外の)、 1 2 3 4 8
- 親戚 ... 1 2 3 4 8
- B23 次の人たちと、どの程度気軽に話せますか? 1 2 3 4 8
- とても いくすこし まったく 該当者 1 2 3 4 8
- なか なく ない なし
- 7. 直属の上司 1 2 3 4 8
- 1. 上司以外の職場の人々 1 2 3 4 8
- 5. 妻または夫(またはそれに準ず 1 2 3 4 8
- る人、特別な親性の友人) 1 2 3 4 8
- 5. 友人、家族(妻や夫以外の)、 1 2 3 4 8
- 親戚 ... 1 2 3 4 8

B26 次のそれぞれの文章について、あなたが自身はどのくらい

賛成あるいは反対ですか?

つよく やや どちら 反対 反対 反対
賛成 賛成 賛成 賛成 賛成 賛成

- 7. 仕事のために、結婚生活(ま 1 2 3 4 5 8
- たは内縁、同居)している人と 1 2 3 4 5 8
- 1. 関係がうまくいかない ... 1 2 3 4 5 8
- 5. 子供とよい関係を持つことが、 1 2 3 4 5 8
- 仕事のために難しい ... 1 2 3 4 5 8
- 5. 仕事のために、友人との仲が 1 2 3 4 5 8
- うまくいかない ... 1 2 3 4 5 8
- 5. 仕事以外の自由時間を減らす 1 2 3 4 5 8
- ことが、仕事のために難しい 1 2 3 4 5 8
- 5. 仕事のために、家庭での費用 1 2 3 4 5 8
- を減らすのが難しい ... 1 2 3 4 5 8
- B28 全体として、あなたはどのくらい現在の仕事に満足して 1 2 3 4 5 8
- いますか? ... 1 2 3 4 5 8
- 非常に満足 ... 1 2 3 4 5 8
- いくらか満足 ... 1 2 3 4 5 8
- あまり満足していない ... 1 2 3 4 5 8
- まったく満足していない ... 1 2 3 4 5 8
- B29 かりに、あなたの親友があなたの仕事に興味を持って 1 2 3 4 5 8
- したら、あなたはそれにどう言うでしょう? ... 1 2 3 4 5 8
- この仕事を強く勧める ... 1 2 3 4 5 8
- 勧めるのに保留を持つ ... 1 2 3 4 5 8
- この仕事についてどうも ... 1 2 3 4 5 8
- B30 かりに、あなたが今の仕事をもう一度やるかどうか決め 1 2 3 4 5 8
- なければならぬとしたら、あなたはどのようにするでしょう? ... 1 2 3 4 5 8
- たまたま同じ職業につく ... 1 2 3 4 5 8
- 何か別の考えが浮かぶ ... 1 2 3 4 5 8
- この職業には絶対につかないと決める ... 1 2 3 4 5 8
- B31 すべてを考へ入れた場合、次の一年間にあなたが別の 1 2 3 4 5 8
- 職場で新しい仕事を見つけようとするか? ... 1 2 3 4 5 8
- 積極的にありそう ... 1 2 3 4 5 8
- いくらかありそう ... 1 2 3 4 5 8
- まったくありそうにない ... 1 2 3 4 5 8
- B32 全体として、あなたの仕事は、就職した時にやりたいた 1 2 3 4 5 8
- 思っていた仕事とどの程度似ていますか? ... 1 2 3 4 5 8
- 非常に似ている ... 1 2 3 4 5 8
- まあ似ている ... 1 2 3 4 5 8
- あまり似ていない ... 1 2 3 4 5 8

S01 あなたの現在の状況において、以下の状況にどのくらい出会うことがありますか？

全然 時々 よく いつも
ない 1 2 3 4

- 7. 自分の仕事や使命を十分に感じる..... 1 2 3 4
- イ. 他の人々や性全から感謝される..... 1 2 3 4
- ウ. 家族や友人から仕事に對する良い評価を受ける..... 1 2 3 4
- エ. 上司から良い評価を受け..... 1 2 3 4
- オ. 同僚/職場の人々との強い信頼感を覚える..... 1 2 3 4
- カ. 職場や社会から必要とされたいと感じる..... 1 2 3 4
- キ. 仕事の内容そのものが面白く、興味を感じる..... 1 2 3 4

S03 現在の職業をやめたいと思つていませんか？
はい..... 1
いいえ..... 2
どちらともいえない..... 3

C25 全体的に、あなたの気持ちやこころの健康状態は...
非常によい..... 1
よい..... 2
まあまあ..... 3
悪い..... 4

C26 過去1ヶ月の間、あなたはどのくらいストレスを感じましたか？
とてもストレスを感じた..... 1
まあまあストレスを感じた..... 2
少しストレスを感じた..... 3
ほとんどストレスを感じなかった..... 4

C27 過去1年間に、あなたはどのくらいストレスを感じましたか？
とてもストレスを感じた..... 1
まあまあストレスを感じた..... 2
少しストレスを感じた..... 3
ほとんどストレスを感じなかった..... 4

[D-1]

D01 あなたの性別は？
女性..... 1
男性..... 2

D02 あなたの生年月日(西暦)は？(年と月まで)
19__年__月

D03 結婚していますか、あるいは結婚しているのと同じように住んでいますか？
結婚している..... 1
結婚していない..... 2

- 結婚している..... 1
- 結婚していない..... 2
- 別居している..... 3
- 離婚した..... 4
- 死別した..... 5
- 未婚である..... 6
- その他..... 7

D04 あなたの最終学歴は次のどれですか？

- 1 中学卒..... 1
- 2 高等学校卒..... 2
- 3 専門・各種学校卒..... 3
- 4 短期大学卒..... 4
- 5 4年制大学卒以上..... 5
- 6 その他..... 6

D05 昨年一年間の、税金を引かれる前のあなたの個人の収入(税込み収入)は、だいたいどのくらいですか？

- 1 200万円未満..... 1
- 2 200-299万円..... 2
- 3 300-599万円..... 3
- 4 600-799万円..... 4
- 5 800-999万円..... 5
- 6 1000万円以上..... 6

D06 上のあなたと個人の収入は、ほかの職業についているあなたと同年代の同姓の人の収入と比較した場合、どのように感じますか？

- 1 ほかの職業と比べて、低い感じがする..... 1
- 2 ほかの職業と比べて、だいたい平均的である..... 2
- 3 ほかの職業と比べて、高い感じがする..... 3

[D-2]

最近の2週間で、一番よくあてはまると思う数字に○をつけてください。「それに」あるいは「ない」ときは1、「とさだま」は3、「よく」は3、「ほとんどいつも」は4に○をつけてください。

- 01. とても悲しい気分でしたか..... 1 2 3 4
- 02. いららして、きげんがわるく、ちよつとしたことでもつた..... 1 2 3 4
- 03. 以前はおもひいと感じたこととさえ、何もおもひくなく感じることがありましたが..... 1 2 3 4
- 04. 何もおもひくなく感じられず、うんざりとして、ただぼろろと眠っていることがありましたか..... 1 2 3 4
- 05. 食欲がなくなりましたか..... 1 2 3 4
- 06. いつもより運動がなくなりましたか..... 1 2 3 4
- 07. いつもより眠れなくなりましたか(寝付けない、目がさえたまま、早く目がさめる)..... 1 2 3 4
- 08. いつもよりずつと長い時間寝るようになったか..... 1 2 3 4
- 09. いつもより、居たり、働き回つたりすることがだいたい少なくなりましたか..... 1 2 3 4
- 10. とても落ち込んで、歩かなくなってしまいましたか..... 1 2 3 4
- 11. かなり気分が落ち込んで、勉強や仕事をすることがつらくなりましたか..... 1 2 3 4
- 12. 身ざれにするとか、整理をすとか、自分のことをきちんとするのが難しくなりましたか..... 1 2 3 4
- 13. いつもより疲労を感じ、何もしていないはずと感づいていることがありましたか..... 1 2 3 4
- 14. いつもより元気がなく、何かをするのに勢いがいりましたか..... 1 2 3 4
- 15. いつもより自分自身を苦しく思えず、過去の出来事について自分を責めることが多くなりましたか..... 1 2 3 4
- 16. 何をやってもうまく行かなくなつたので、いつもより自分だけがな人間に思えましたか..... 1 2 3 4
- 17. 自分の外見が嫌いと思ひましたか..... 1 2 3 4
- 18. 涙ぐんだり、泣きだしたりすることがありましたか..... 1 2 3 4

E019 いつもより勉強や仕事に注意を払つたり、していることに集中したりすることが難しくなりましたか..... 1 2 3 4

E020 いつもより集中したり、はつきりすばやく考えたりすることができなくなりましたか..... 1 2 3 4

E021 物事が自分にとってまるでうまくいっていないような感じがありましたか..... 1 2 3 4

E022 いつもより物事を判断したり、決めたりするのが難しいときがありましたか..... 1 2 3 4

E023 人生に望みがなく、将来何もよいことがないような気がしましたか..... 1 2 3 4

E024 いつもより死について考えましたか..... 1 2 3 4

E025 死にたいと思ひましたか..... 1 2 3 4

E026 自殺について考えましたか..... 1 2 3 4

E027 最近の2週間に、あなたは.....
..... 1. とても体調が強つた..... 1
..... 2. 少し体調が強つた..... 2
..... 3. 同じくらしい体調であった..... 3
..... 4. 少し体調が増えた..... 4
..... 5. とても体調が増えた..... 5

[E]

E01 今やあなたはなにか仕事、活動のことなど、職場のすべての義務を考へてみて、あなたと他の部下、同僚や上司との関係はどうですか？

- 1. とても問題がある..... 1
- 2. いくらか問題がある..... 2
- 3. 少ししか問題はない..... 3
- 4. まるで問題ない..... 4

E02 いつもよりに何かしたりするなど、友人とのつきあいを考へてみて、あなたとあなたの友人たちとの関係はどうですか？

- 1. とても問題がある..... 1
- 2. いくらか問題がある..... 2
- 3. 少ししか問題はない..... 3
- 4. まるで問題ない..... 4

E03 家事をしたり、家族(あるいはいっしょに住んでいる人)といっしょに何かしたりするなど、家での生活を考へてみて、あなたとあなたの家族の関係はどうですか？

- 1. とても問題がある..... 1
- 2. いくらか問題がある..... 2
- 3. 少ししか問題はない..... 3
- 4. まるで問題ない..... 4

これで質問は終わりです。ありがとうございました。

Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease

K. Ikeda,* K. Yamaguchi,* T. Tanaka,*
Y. Mizuno,[†] A. Hijikata,[‡] O. Ohara,[‡]
H. Takada,* K. Kusuhara[§] and
T. Hara*

^{*}Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, [†]Fukuoka Children's Hospital and Medical Center for Infectious Disease, Fukuoka, [‡]Laboratory for Immunogenomics, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama, and [§]Department of Pediatrics, University of Occupational and Environmental Medicine, Kitakyushu, Japan

Accepted for publication 9 November 2009
Correspondence: K. Ikeda, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.
E-mail: ikeq@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp

Introduction

Kawasaki disease (KD) is an acute febrile illness of childhood with systemic vasculitis characterized by the occurrence of coronary arteritis. Although KD is characterized by a marked activation of the immune system with elevations of serum proinflammatory cytokines and chemokines at acute phase [1–3], no previous studies have demonstrated that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) serve as the major sources for these chemical mediators. Although the activation of monocytes/macrophages has been reported to have an important role at acute phase of KD [4], there were no significant differences in the expression levels of *IL6*, *IL8* and *TNFA* genes in separated monocytes before and after high-dose gammaglobulin therapy [5].

Activation status of PBMCs, especially T cells, at acute phase of KD is also controversial. In a previous report, it has

Summary

Although Kawasaki disease (KD) is characterized by a marked activation of the immune system with elevations of serum proinflammatory cytokines and chemokines at acute phase, the major sources for these chemical mediators remain controversial. We analysed the activation status of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by flow cytometry, DNA microarray and quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. The proportions of CD69⁺ cells in both natural killer cells and $\gamma\delta$ T cells at acute-phase KD were significantly higher than those at convalescent-phase KD. Microarray analysis revealed that five genes such as *NAIP*, *IPAF*, *S100A9*, *FCGR1A* and *GCA* up-regulated in acute-phase KD and the pathways involved in acute phase KD were related closely to the innate immune system. The relative expression levels of damage-associated molecular pattern molecule (DAMP) (*S100A9* and *S100A12*) genes in PBMCs at acute-phase KD were significantly higher than those at convalescent-phase KD, while those of *TNFA*, *IL1B* and *IL6* genes were not significantly different between KD patients and healthy controls. Intracellular production of tumour necrosis factor- α , interleukin-10 and interferon- γ in PBMCs was not observed in KD patients. The present data have indicated that PBMCs showed a unique activation status with high expression of DAMP genes but low expression of proinflammatory cytokine genes, and that the innate immune system appears to play a role in the pathogenesis and pathophysiology of KD.

Keywords: acquired immunity, cytokines, innate immunity, Kawasaki disease, peripheral blood mononuclear cells

been thought that most activated T cells moved to local tissues from peripheral blood at acute phase and returned from there at convalescent phase [3]. Although numerous immunological studies on T cells have been reported, no previous studies analysed T cells by separating them into two distinct populations, $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells, which are involved mainly in acquired and innate immunity, respectively.

To clarify the pathophysiology of KD, we analysed the activation status of PBMCs including $\alpha\beta$ T cells, $\gamma\delta$ T cells, natural killer (NK) cells and B cells by flow cytometry, DNA microarray and quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR). These analyses have shown consistently that the innate immune system might be involved in the pathogenesis and pathophysiology of KD, and that PBMCs were not a major source for proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6 and tumour necrosis factor (TNF) in acute-phase KD sera.

Materials and methods

Patients

All patients enrolled in this study were admitted to the Kyushu University Hospital or Fukuoka Children's Hospital between April 2005 and February 2009. The patient group consisted of 51 KD patients who met the criteria for the Diagnostic Guidelines of Kawasaki Disease (<http://www.kawasaki-disease.org/diagnostic/index.html>). A coronary artery was defined as abnormal if the luminal diameter was greater than 3 mm in children aged less than 5 years (greater than 4 mm in children older than 5 years), if the internal diameter of a segment was at least 1.5 times as large as that of an adjacent segment, or if the lumen was irregular [6]. All patients received oral aspirin (30 mg/kg/day) and 1–2 g/kg of intravenous immunoglobulin (IVIG) as an initial treatment.

To analyse immunological profiles in KD by flow cytometry, we recruited 38 KD patients (median age, 2.0 years; range, 3 months–7.3 years) between September 2006 and August 2008. No patients had coronary artery lesions (CAL). We first analysed the proportions of activated T, B and NK cells in the peripheral blood of both seven patients with KD and 15 age-matched healthy controls by flow cytometry. CD69, human leucocyte antigen D-related (HLA-DR) and CD25 were used as activation markers. These cells were analysed before treatment with IVIG (median day of illness, day 5; range, days 3–6) and in the convalescent phase (median day of illness, day 13; range, days 13–18). To analyse further the immunological profiles in KD, the proportion of CD69⁺ cells were investigated in $\alpha\beta$ T cells ($n = 23$), $\gamma\delta$ T cells ($n = 23$), NK cells ($n = 35$) and B cells ($n = 35$).

To analyse mRNA expression levels, blood samples were obtained prior to the treatment (on 4–5 days of illness) from three KD patients (median age, 4.7 years; range, 4.1–5.3 years) without CAL and from five healthy adults. PBMCs were separated from peripheral blood and were used for cDNA microarray analysis.

To analyse mRNA expression levels using quantitative real-time RT-PCR, blood samples were obtained from 10 to 16 KD patients (median age, 1.7 years; range, 4 months–7.2 years) in both acute and convalescent phase, and from 20 age-matched control subjects including nine patients (median age, 2.6 years; range, 5 months–13.1 years) with active infections [three patients with bacterial meningitis (one *Haemophilus influenzae* type b, one *Streptococcus pneumoniae* and one unknown), six patients with viral infection (three measles, three Epstein–Barr virus infection)] and 11 healthy children (median age, 5.0 years; range, 1.7–7.6 years).

All subjects gave written informed consent for this study, according to the process approved by the Ethical Committee of Kyushu University and Fukuoka Children's Hospital and Medical Center for Infectious Diseases, Fukuoka, Japan.

Total RNA extraction and RNA amplification

PBMCs were separated from peripheral blood by density-gradient centrifugation using lymphocyte separation medium (Cappel-ICN Immunobiologicals, Costa Mesa, CA, USA) containing 6.2 g Ficoll and 9.4 g sodium diatrizoate per 100 ml. Total RNA was extracted from these cells using an RNA extraction kit (Isogen; Nippon Gene, Osaka, Japan), according to the manufacturer's instructions. Total RNAs from five healthy adults were mixed. An amino allyl message amp aRNA Kit (Ambion, Austin, TX, USA) was used to amplify the total RNA. Briefly, double-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using oligo-dT primer with a T7 RNA polymerase promoter site added to the 3' end. Then, *in vitro* transcription was performed in the presence of amino allyl uridine-5'-triphosphate (UTP) to produce multiple copies of amino allyl-labelled complementary RNA (cRNA). Amino allyl-labelled cRNA was purified, and then reacted with N-hydroxy succinimide esters of Cy3 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) for cRNA from PBMCs of healthy controls, and Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) for that from PBMCs of the acute-phase KD patients, according to the protocol of Hitachi Software Engineering (Yokohama, Japan).

Microarray analysis

Microarray analysis for PBMCs of acute-phase KD patients was performed using an AceGene Human Oligo Chip 30K (Hitachi Software Engineering) that contains approximately 30 000 genes. The arrays were scanned by FLA-8000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan), and changed to the numerical values by ArrayVision (Amersham Biosciences). The numerical data were normalized using the LOWESS method. In the microarray analysis of PBMCs, data from three KD patients and those from five healthy controls were compared. Genes that were up-regulated consistently in KD patients compared with healthy controls, and that showed more than a threefold difference by the comparison between the two groups in the mean expression levels, were selected. The data with low signal-to-noise ratios ($S/N < 3$) were not used for further analysis. The data were analysed using Gene Spring software (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA).

Accession number

GSE17975 (Gene Expression Omnibus).

Pathway analysis of microarray results

To understand the underlying phenomenon in the acute phase of KD, a system biology approach was performed using microarray data. Genes were selected as follows: (i)

data with low signal-to-noise ratios ($S/N < 3$) were excluded; (ii) the mean expression ratio between three KD patients and five healthy controls was more than $1.0 \log_2$, or less than $-1.0 \log_2$; and (iii) if two or more probes represented the same gene, probes with maximum mean fold-change values were selected. Selected genes were put into Pathway-Express in Onto-Tools (<http://vortex.cs.wayne.edu>). Pathway-Express searches the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database (<http://www.genome.ad.jp/>) for each input gene, and the impact analysis was performed in order to build a list of all associated pathways [7–9]. An impact factor (IF) is calculated for each pathway incorporating parameters, such as the normalized fold change of the differentially expressed genes, the statistical significance of the set of pathway genes and the topology of the signalling pathway [8]. The corrected gamma P -value is the P -value provided by the impact analysis. The differences were considered to be significant when the corrected gamma P -value was less than 0.05.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from cell pellets of PBMCs using the same method as used in the microarray analysis, followed by cDNA synthesis using a first-strand cDNA synthesis kit (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) with random hexamers. *S100A9*, *S100A12*, *TNFA*, *IL1B*, *IL8* and *IL6* mRNA expression levels were analysed by TaqMan[®] gene expression assays Hs00610058_m1, Hs00194525_m1, Hs00174128_m1, Hs99999029_m1, Hs99999034_m1 and Hs99999032_m1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). These products consisted of a $20 \times$ mix of unlabelled PCR primers and a TaqMan MGB probe (FAMTM dye-labelled). A TaqMan human glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) control reagent kit (Applied Biosystems) was used as an internal control. These TaqMan probes were labelled with the quencher fluor-6-carboxy-tetramethyl rhodamine (emission 1, 582 nm) at the 3' end through a linker-arm nucleotide. The mRNA expression levels of the targeted and GAPDH genes were quantified by an ABI PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems), as described previously [10]. A comparative threshold cycle (CT) was used to determine gene expression levels relative to those of the no-tissue control (calibrator). Hence, steady-state mRNA levels were expressed as an n -fold difference relative to the calibrator, as described previously [11]. To calculate the relative expression level in cells, the level of gene expression was divided by that of the GAPDH. All experiments were carried out in duplicate and repeated for confirmation.

Flow cytometry

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) blood samples were collected from both patients and controls. The proportions of CD69⁺ cells were analysed within 12 h after

sampling by using an EPICS XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), as described previously [10]. The proportions of HLA-DR⁺ or CD25⁺ cells were also analysed within 24 h. The forward and side light-scatter gate was set to analyse viable cells and to exclude background artefacts. Multi-colour staining was carried out with fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)- or PE-cyanin 5.1 (PC5)-conjugated monoclonal antibodies against CD3, CD16, CD19, CD25, CD56, CD69, HLA-DR and T cell receptor (TCR) $\gamma\delta$ (Beckman Coulter). Three-colour flow cytometric analysis was performed on cells within the lymphocyte light-scatter gate using forward and side scatters. Heparinized whole blood samples from five healthy controls were preincubated with or without lipopolysaccharide (LPS) or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin for 4 h at 37°C under a 95% humidified air with 5% CO₂, and intracellular tumour necrosis factor (TNF)- α , IL-10 or interferon (IFN)- γ staining was performed using the Fastimmune Intracellular Staining System (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) [12]. The analysis gate was set for monocytes or T cells by side scatter, and CD14 or CD3 expression. Intracellular TNF- α , IL-10 and IFN- γ staining in peripheral blood cells from seven KD patients was performed using the same system, without *in vitro* stimulation.

Results

Flow cytometric analysis of the activation markers on T, B and NK cells at acute phase of KD

We first analysed the proportions of activated T, B and NK cells in the peripheral blood of KD patients by flow cytometry. CD69, HLA-DR and CD25 were used as activation markers. As shown in Fig. 1a, the proportions of CD69⁺ T cells were significantly higher at acute phase than those at convalescent phase of KD, while those of CD69⁺ B cells were more prominent at convalescent phase than at acute phase of KD ($P < 0.01$). The proportions of CD69⁺ cells in CD56⁺CD16⁺ and CD16⁺CD56⁻ NK cells at acute phase of KD were significantly higher than those at convalescent phase of KD. The proportions of CD69⁺ cells in CD56⁺CD16⁻ NK cells and the proportions of CD25⁺ or HLA-DR⁺ cells in T cells, B cells or all three NK cell subsets were not significantly different between the two phases of KD.

To analyse further T cell activation in KD, the proportion of CD69⁺ cells were investigated through the separation of T cells to $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells, which are involved in acquired and innate immunity, respectively. As shown in Fig. 1b and c, the proportions of CD69⁺ cells in $\gamma\delta$ T cells at acute phase of KD were significantly higher than those at convalescent phase of KD (median values: 17.9% at acute phase *versus* 7.9% at convalescent phase in $\gamma\delta$ T cells, $P < 0.0005$). Conversely, the activation of $\alpha\beta$ T cells was minimal in terms of CD69

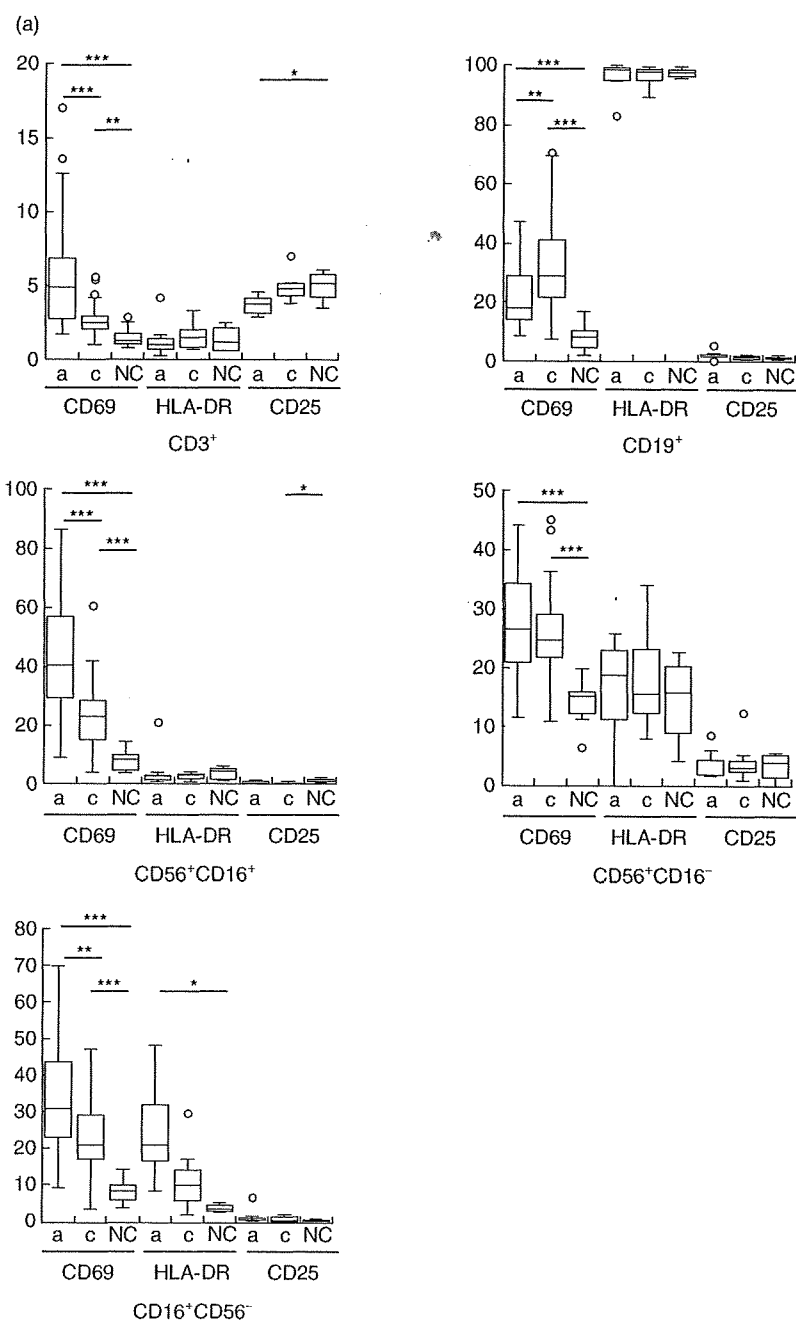


Fig. 1. Flow cytometric analysis of the activation markers on T, B and natural killer (NK) cells at acute phase of Kawasaki disease (KD). (a) The proportions of activated T, B and NK cells in the peripheral blood of seven patients with KD and 15 healthy control subjects were analysed by flow cytometry. CD69, human leucocyte antigen D-related (HLA-DR) and CD25 were used as activation markers. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.0001$. (a) Acute phase; (c) convalescent phase; NC, healthy controls. The form of box-plot is as follows. The bottom and the top of the box correspond to 25th and 75th percentile points, respectively. The line within the box represents the median, and the whiskers indicate the values of 10th and 90th percentiles. (b,c) Representative density plot of flow cytometric analysis of CD69⁺ cells on NK, T and B cells (b) and the proportions of CD69⁺ cells in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells (c) in KD patients. The proportions of CD69⁺ cells were investigated in NK cells ($n = 35$), $\alpha\beta$ T cells ($n = 23$), $\gamma\delta$ T cells ($n = 23$) and B cells ($n = 35$). ** $P \leq 0.0005$; * $P \leq 0.01$.

expression at acute phase of KD (median values: 4.5% at acute phase and 2.8% at convalescent phase).

Microarray analysis of the gene expression in PBMCs from KD patients

Pathway analysis. To assess the innate and acquired immunological status in KD more precisely, the gene expression profiles of PBMCs from the patients were analysed by microarray. Six hundred and fifty-eight genes in PBMCs

from KD patients showed more than twofold higher expression levels compared with those from healthy controls. These 658 genes were put into Pathway-Express in Onto-Tools (<http://vortex.cs.wayne.edu>). Pathway-Express searched the KEGG pathways in the Onto-Tools database for each input gene, and built a list of pathways [7]. Thirty-six pathways, associated significantly with acute phase of KD, were selected and the top 12 pathways are listed in Table 1. Among the pathways extracted by Pathway-Express, all input genes in antigen processing and presentation, T cell receptor (TCR)

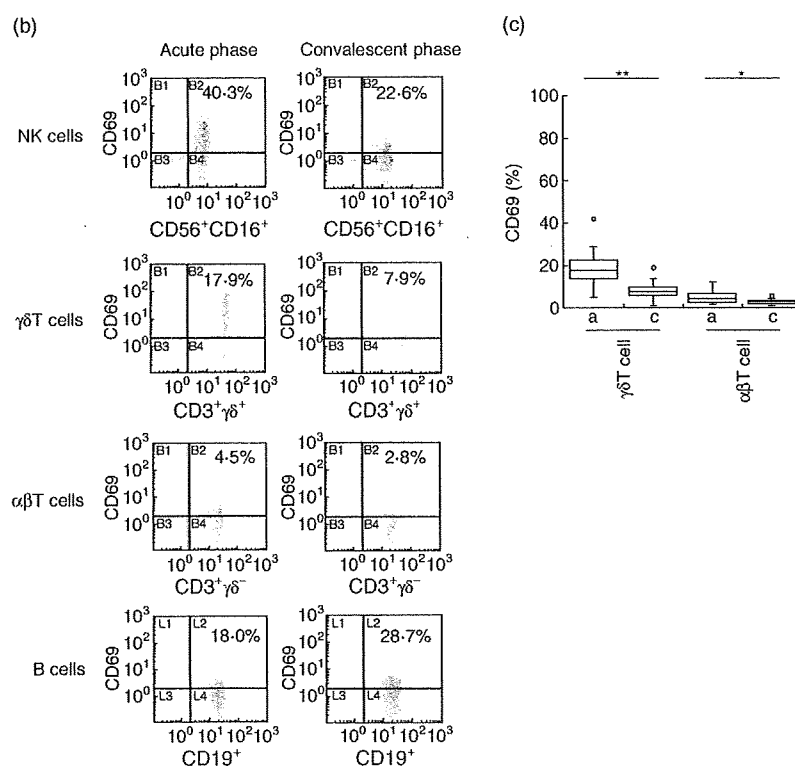


Fig. 1. Continued

Table 1. The results of the pathway impact analysis for a set of genes associated with acute phase of Kawasaki disease.

Pathway name	Input genes in pathway			Impact factor	Corrected gamma P-value
	Total	Up	Down		
Antigen processing and presentation	7	0	7	51.621	2.01E-21
Phosphatidylinositol signalling system	2	0	2	35.807	1.04E-14
Circadian rhythm	3	0	3	22.942	2.60E-09
T cell receptor signalling pathway	14	0	14	18.903	1.23E-07
Toll-like receptor signalling pathway	14	6	8	18.526	1.76E-07
Natural killer cell-mediated cytotoxicity	14	4	10	14.664	6.71E-06
Ribosome	11	0	11	13.743	1.59E-05
Apoptosis	10	3	7	13.426	2.13E-05
MAPK signalling pathway	17	4	13	10.964	2.07E-04
Cytokine-cytokine receptor interaction	16	7	9	9.511	7.78E-04
Fc epsilon RI signalling pathway	8	3	5	9.323	9.22E-04
B cell receptor signalling pathway	7	0	7	8.690	0.00163044

Pathway-Express was used for the pathway impact analysis in order to build a list of all associated pathways. An impact factor (IF) is calculated for each pathway incorporating parameters such as the normalized fold change of the differentially expressed genes, the statistical significance of the set of pathway genes and the topology of the signalling pathway. The corrected gamma P-value is the P-value provided by the impact analysis. Thirty-six pathways were significant at the 5% level on corrected P-values, and the top 12 pathways were selected. Up-regulated genes were as follows: (i) Toll-like receptor signalling pathway; extracellular-regulated kinase (ERK), CD14, Toll-like receptor (TLR)-8, MAP kinase kinase 6 (MKK6), MD2 and TLR-5. (ii) Natural killer cell-mediated cytotoxicity; tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), ERK, Fc epsilon RI gamma (FCER1G) and TRAILR3. (iii) Apoptosis; TRAIL, protein kinase A regulatory subunit 1A (PRKAR1A) and TRAILR3. (iv) Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway; ERK, CD14, interleukin (IL)-1R2 and MKK6. (v) Cytokine-cytokine receptor interaction; TRAIL, tumour necrosis factor receptor superfamily, member 17 (TNF-RSF17), IL-18RAP, IL-1R2, TNF-SF13B, TRAILR3, and hepatocyte growth factor (HGF). (vi) Fc epsilon RI signalling pathway; ERK, FCER1G, and MKK6.

Table 2. Microarray analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) between Kawasaki disease (KD) patients and healthy controls.

Gene name	Gene ontology	Synonyms	GenBank	Fold difference*
NLR family, apoptosis inhibitory protein	Nucleotide binding	NAIP	NM_004536	7.2
Fc fragment of IgG, high-affinity Ia, receptor (CD64)	Immune response	FCGR1A	NM_000566	5.6
Haemoglobin, gamma A	Oxygen transport	HBG1	NM_000559	5.3
Haemoglobin, alpha 1	Oxygen transport	HBA1	NM_000558	5.1
Grancalcin, EF-hand calcium-binding protein	Calcium ion binding	GCA	NM_012198	4.5
Fibrinogen-like 2 (constitutively expressed in cytotoxic T-cells)	Signal transduction	FGL2	NM_006682	4.4
Ice protease-activating factor	Defence response to bacterium	NLRC4 (IPAF)	NM_021209	4.2
Placenta-specific 8		PLAC8	NM_016619	4.1
Immunoglobulin superfamily, member 6	Immune response	IGSF6	NM_005849	4.1
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	Inflammatory response	S100A9	NM_002965	3.9

*The difference of mean gene expression levels between 3 KD patients and controls (healthy donors) in microarray analysis is given. NLR: nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing. Genes that showed more than threefold expressional differences between KD patients and healthy controls were selected and the top 10 genes were listed. Gene ontology was not applied in PLAC8. Hypothetical proteins were excluded. IgG: immunoglobulin G; EF hand: The EF-hand describes the nearly perpendicular arrangement of the E and F helices flanking the 12-residue Ca²⁺-binding loop, in analogy to the stretched out right hand with the forefinger (E helix) and thumb (F helix) and the remaining fingers folded to form the Ca²⁺-binding loop.

signalling pathway and B cell receptor (BCR) signalling pathway, which are involved in acquired immunity, were down-regulated. Conversely, TLR signalling and NK cell-mediated cytotoxicity pathways, related closely to innate immunity, were partly up-regulated.

Top 10 genes in microarray analysis. In microarray analysis, 47 genes in KD patients were up-regulated more than threefold compared with those in healthy controls, and the top 10 genes are shown in Table 2. Among them, five genes such as nod-like receptor (NLR) family, apoptosis inhibitory protein (NAIP), NLRC4 (IPAF), S100A9 protein, Fc fragment of IgG, high-affinity Ia, receptor (FCGR1A, also known as CD64) and grancalcin (GCA, EF-hand calcium-binding protein)

were related closely to innate immune responses [13–17], while three genes such as fibrinogen-like protein 2 (FGL2), placenta-specific 8 (PLAC8) and immunoglobulin superfamily, member 6 (IGSF6) were related to both innate and acquired immunity [18–20].

Cytokine analyses in KD patients

Microarray analysis. Sixteen genes that have been reported to have a role in the pathophysiology of KD were selected from the microarray data, and the relative gene expression levels in PBMCs of KD patients compared with those of healthy controls are shown in Table 3. Expression levels of *S100A9* and *S100A12* genes, which encode the

Table 3. Cytokine- and chemokine-related genes expressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of acute-phase Kawasaki disease (KD) patients.

Gene name	Gene ontology	Synonyms	GenBank	Fold difference*
Interleukin 1 beta	Immune response	IL-1B	NM_000576	0.3
Interleukin 2	Immune response	IL-2	NM_000586	0.7
Interleukin 4	Regulation of immune response	IL-4	NM_000589	0.4
Interleukin 6	Inflammatory response	IL-6	NM_000600	0.5
Interleukin 8	Immune response	IL-8	NM_000584	0.2
Interleukin 10	Immune response	IL-10	NM_000572	0.8
Tumour necrosis factor	Inflammatory response	TNF	NM_000594	0.9
Interferon gamma	Regulation of immune response	IFN-γ	NM_000619	0.9
Chemokine (C-C motif) ligand 2	Inflammatory response	CCL2 (MCP1)	NM_002982	1.1
Chemokine (C-C motif) ligand 4	Immune response	CCL4 (MIP1B)	NM_002984	0.6
Chemokine (C-C motif) ligand 5	Immune response	CCL5 (RANTES)	NM_002985	0.4
Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Immune response	CSF3	NM_172220	1.0
Vascular endothelial growth factor A	Cytokine activity	VEGFA	NM_001025366	0.4
Hepatocyte growth factor	Protein binding	HGF	NM_000601	2.8
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	Inflammatory response	S100A9	NM_002965	3.9
S100 calcium binding protein A12	Inflammatory response	S100A12	NM_005621	3.5

*The difference of mean gene expression levels between three KD patients and controls (healthy donors) in microarray analysis is given. Sixteen genes that have been reported to have a role in the pathophysiology of KD were selected from the microarray data.

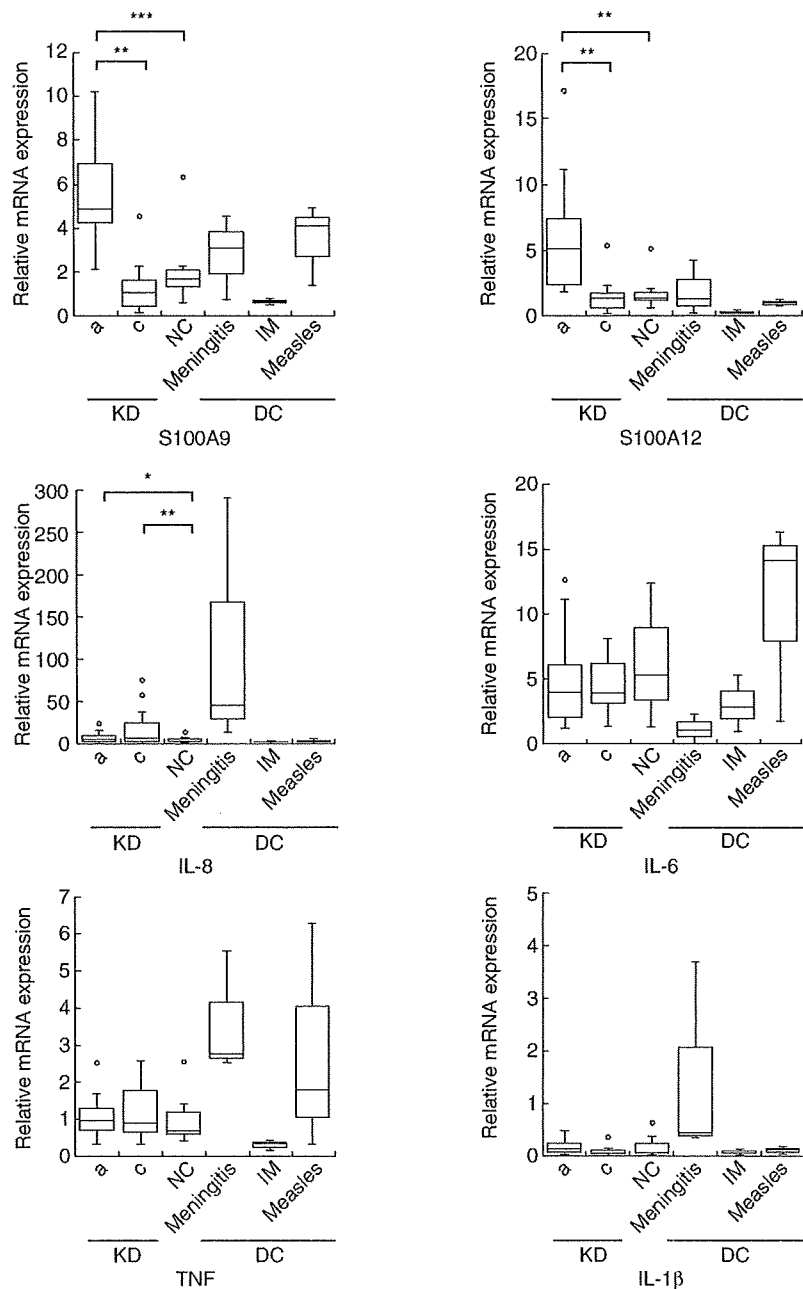


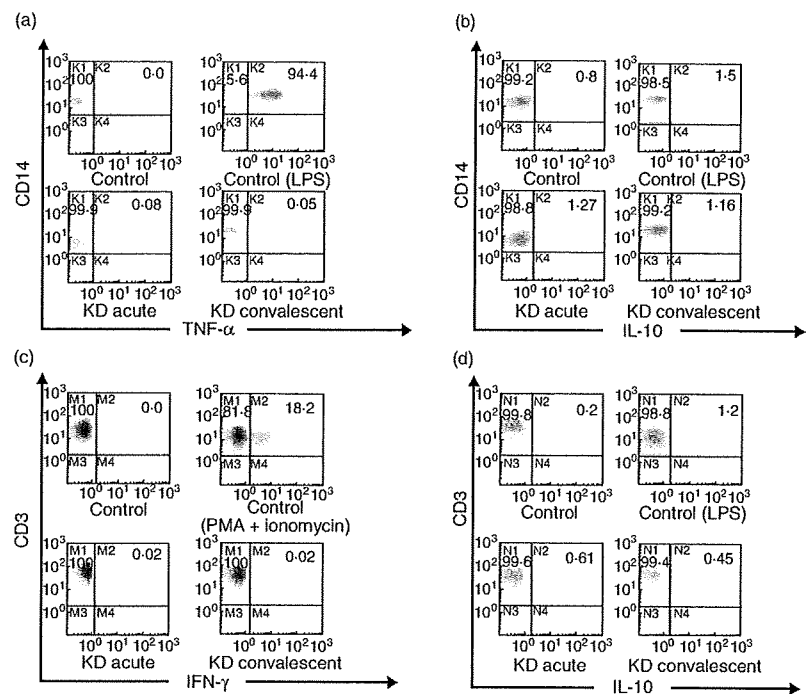
Fig. 2. Relative expression levels of *S100A9*, *S100A12*, *IL8*, *IL6*, *TNF* and *IL1B* genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) at acute phase of Kawasaki disease (KD). The gene expression levels of these cytokines were determined by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method using glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) as an internal control. Gene expression levels of PBMCs from 10 KD patients, 11 healthy controls (NC), nine diseased control subjects [three patients with meningitis, three patients with acute infectious mononucleosis (IM) and three patients with measles] are shown. Only *IL8* gene expression levels were analysed in 16 KD patients. The form of box-plot was the same as Fig. 1. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (a) Acute phase; (c) convalescent phase.

proinflammatory factors in innate immunity, as well as of the hepatocyte growth factor (*HGF*) gene, were more than twofold higher in KD patients than in healthy controls, while the expression levels of other cytokine, chemokine and growth factor genes were not elevated. Decreased gene expression levels of *IL4*, *IL10* and *IFNG* in KD patients were consistent with our previous data obtained by quantitative RT-PCR [21].

Quantitative RT-PCR analysis. To confirm the microarray data, the gene expression levels of six major cytokines,

S100A9, *S100A12*, *IL-8*, *IL-6*, *TNF-α* and *IL-1β*, were analysed in KD patients and controls by quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 2, the relative expression levels of *S100A9* and *S100A12* genes in PBMCs at acute-phase KD were significantly higher than those at convalescent-phase KD, consistent with previous reports [5,22]. Expression levels of the *IL8* gene at both acute and convalescent phases of KD were slightly but significantly higher than those of healthy controls. The expression levels of *TNF*, *IL1B* and *IL6* genes at either acute or convalescent phases of KD were not significantly different from those in healthy controls.

Fig. 3. Flow cytometric analysis of intracellular cytokine production of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) at acute phase of Kawasaki disease (KD). Intracellular cytokine production in PBMCs at acute and convalescent phases of KD was analysed by flow cytometry. Representative data of tumour necrosis factor (TNF)- α (a) and interleukin (IL)-10 (b) staining in monocytes, and those of interferon (IFN)- γ (c) and IL-10 (d) staining in T cells are shown. As positive and negative controls, representative data of TNF- α (a) and IL-10 (b) staining in monocytes with and without crude lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/ml), and IFN- γ (c) and IL-10 (d) staining in T cells with and without phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (25 ng/ml) plus ionomycin (1 μ g/ml) are shown. The figure shows representative results of seven KD patients and three healthy controls.



Intracellular cytokine analysis. We analysed intracellular cytokines in the freshly isolated PBMCs at acute and convalescent phases of KD by using flow cytometry. Intracellular TNF- α or IL-10 production in monocytes and IFN- γ or IL-10 production in T cells were analysed in the peripheral blood of KD patients. As shown in Fig. 3, the percentages of both TNF- α or IL-10-producing cells in monocytes and IFN- γ or IL-10-producing cells in T cells were not significantly different between acute phase (TNF- α -producing cells: median 0.08%, range 0.04–0.09%; IL-10-producing cells: median 1.27%, range 0.47–1.31% in monocytes; IFN- γ -producing cells: median 0.02%, range 0.00–0.03%; IL-10-producing cells: median 0.61%, range 0.35–0.69% in T cells) and convalescent phase (TNF- α -producing cells: median 0.05%, range 0.00–0.08%; IL-10-producing cells: median 1.16%, range 0.79–2.43% in monocytes; IFN- γ -producing cells: median 0.02%, range 0.00–0.07%; IL-10-producing cells, median 0.45%, range 0.40–0.70% in T cells), further suggesting little intracellular production of such cytokines by peripheral blood cells at acute-phase KD.

Discussion

Massive releases of cytokines, chemokines and growth factors play a pivotal role in the immunopathogenesis of KD [1]. Although numerous immunological studies on peripheral blood leucocytes have been reported, the status of peripheral T cell activation remains controversial [3]. In this regard, no previous studies have analysed T cells by separating them into two distinct populations, $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T

cells, which are involved mainly in acquired and innate immunity, respectively. A predominant activation of $\gamma\delta$ T cells as well as NK cells in the present study, together with previous observations that neutrophils and monocytes are activated in KD [3,23,24], has suggested that innate immunity is involved actively in acute-phase KD. Although a recent report has shown no expansion of CD69⁺CD4⁺ or CD69⁺CD8⁺ cells in the peripheral blood of KD [25], it might have been difficult to detect the increases of CD69⁺ T cells in the peripheral blood without the separation into $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells, because a major CD69⁺ T cell population resided in CD4⁻CD8^{-dim+} $\gamma\delta$ T cells in KD.

In KD, it has been thought that most activated T cells moved to local tissues from peripheral blood at acute phase and returned from there at convalescent phase [3]. However, because significant proportions of activated $\gamma\delta$ T cells and NK cells with a small proportion of activated $\alpha\beta$ T cells were detected constantly in the peripheral blood at acute-phase KD, we performed DNA microarray analysis of PBMCs to check the activation status of these cells. Pathway analysis revealed that the pathways involved in acquired immunity such as antigen processing and presentation, TCR signalling and BCR signalling were all down-regulated, and that innate immunity pathways such as TLR signalling and NK cell-mediated cytotoxicity were partly activated, with a large part of them down-regulated. These findings suggested that a small proportion of $\alpha\beta$ T cells and a considerable proportion of $\gamma\delta$ T cells were activated not through TCR signalling pathway by either conventional antigen or superantigen but directly through innate immunity receptors and/or cytokine signalling pathways.

Among the top 10 genes whose expression was more than threefold higher in KD than in normal controls, five genes were related to innate immunity and two of the five were molecules associated with the NLR signalling pathway. Popper *et al.* reported that the expression levels of genes involved in innate immunity, proinflammatory responses and neutrophil activation and apoptosis were up-regulated and those related to NK cells and CD8⁺ lymphocytes were down-regulated at acute-phase KD by DNA microarray analysis of peripheral whole blood cells, including neutrophils [26]. Verma *et al.* have also reported the up-regulated expression of the genes related to innate immunity such as the TLR signalling pathway, complement activation and matrix-adhesion molecule at acute-phase KD [27]. These studies demonstrated consistently the importance of innate immunity in the pathophysiology of acute-phase KD.

Although monocytes in the peripheral blood are considered to be activated *in vivo* in KD [3], there have been few reports showing that monocytes are actually producing such cytokines as IL-6, IL-8 and TNF *in vivo*, which are elevated in sera of KD patients. Abe *et al.* [5] demonstrated that there were no significant differences in the expression levels of *IL6*, *IL8* and *TNF* genes in separated monocytes before and after high-dose gammaglobulin therapy. Rather, monocytes are actively producing unique cytokines such as damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) (S100A9, S100A12) [5], one of which was reported to be produced by monocytes through the interaction with TNF-activated endothelial cells [14]. In our study, no significant differences of *IL6*, *IL1B* or *TNFA* mRNA levels in PBMCs were detected among patients with acute-phase KD, those with convalescent-phase KD and controls by microarray and quantitative RT-PCR. In the *IL8* gene expression, however, quantitative RT-PCR analysis of samples from a larger number of patients showed that slightly increased expression levels of the *IL8* gene at both acute and convalescent phases of KD, suggesting a weak activation of monocytes among PBMC. Although a previous study showed that 1–2% of PBMCs were positive for intracellular IL-6, TNF- α or TNF- β by immunofluorescent microscopy [28], our analysis of blood samples shortly after drawing revealed no expansion of intracellular TNF- α , IL-10 or IFN- γ -positive cells in acute-phase KD by flow cytometry.

We confirmed that the inositol 1, 4, 5-trisphosphate 3-kinase C (ITPKC) gene was associated with the development of KD [29] in our KD samples (data not shown), but presumably ITPKC acts mainly as a regulator of innate immune cells or non-immune cells (endothelial cells) rather than of $\alpha\beta$ T cells, because (i) only a small fraction of $\alpha\beta$ T cells showed an activation marker *in vivo*; (ii) the pathways involved in acquired immunity were all down-regulated (Table 1); and (iii) we have found a significant association between an innate immunity receptor gene and KD development, and have established a new KD mouse model with

coronary arteritis by an innate immunity receptor ligand (unpublished observations).

In conclusion, the present data have indicated that PBMC showed a unique activation status with high expression of DAMP genes but low expression of proinflammatory cytokine genes, and that the innate immune system appears to play a role in the pathogenesis and pathophysiology of KD. Further studies are needed to elucidate the mechanism responsible for the development of KD and coronary arteritis in terms of the activation of the innate immune system both *in vitro* and *in vivo*.

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Health and Labour Sciences Research Grants, Comprehensive Research on Practical Application of Medical Technology: Randomized Controlled Trial to Assess Immunoglobulin plus Steroid Efficacy for Kawasaki Disease (RAISE) Study (grant 008), a grant-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (grant 21790993), grants from the Japan Therapeutic Study Group for Kawasaki Disease (JSGK), and grants from the Japan Kawasaki Disease Research Center.

Disclosure

None.

References

- 1 Burns IC, Glode MP. Kawasaki syndrome. *Lancet* 2004; 364:533–44.
- 2 Rowley AH, Baker SC, Orenstein JM, Shulman ST. Searching for the cause of Kawasaki disease – cytoplasmic inclusion bodies provide new insight. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:394–401.
- 3 Matsubara T, Ichiyama T, Furukawa S. Immunological profile of peripheral blood lymphocytes and monocytes/macrophages in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 141:381–7.
- 4 Ichiyama T, Yoshitomi T, Nishikawa M *et al.* NF-kappaB activation in peripheral blood monocytes/macrophages and T cells during acute Kawasaki disease. *Clin Immunol* 2001; 99:373–7.
- 5 Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J Immunol* 2005; 174:5837–45.
- 6 Akagi T, Rose V, Benson LN, Newman A, Freedom RM. Outcome of coronary artery aneurysms after Kawasaki disease. *J Pediatr* 1992; 121:689–94.
- 7 Khatri P, Voichita C, Kattan K *et al.* Onto-Tools: new additions and improvements in 2006. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: W206–11.
- 8 Draghici S, Khatri P, Tarca AL *et al.* A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Res* 2007; 17:1537–45.
- 9 Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Nakaya A. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:42–6.
- 10 Furuno K, Yuge T, Kusuhara K *et al.* CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr* 2004; 145:385–90.

- 11 Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL *et al.* Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002; 415:536–41.
- 12 Takada H, Yoshikawa H, Imaizumi M *et al.* Delayed separation of the umbilical cord in two siblings with interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency: rapid screening by flow cytometer. *J Pediatr* 2006; 148:546–8.
- 13 Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006; 7:1250–7.
- 14 Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81:28–37.
- 15 Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3:382–90.
- 16 Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med* 1983; 158:1092–113.
- 17 Panelli MC, Wang E, Phan G *et al.* Gene-expression profiling of the response of peripheral blood mononuclear cells and melanoma metastases to systemic IL-2 administration. *Genome Biol* 2002; 3:RESEARCH0035.
- 18 Chan CW, Kay LS, Khadaroo RG *et al.* Soluble fibrinogen-like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170:4036–44.
- 19 Rissoan MC, Duhon T, Bridon JM *et al.* Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2002; 100:3295–303.
- 20 King K, Moody A, Fisher SA *et al.* Genetic variation in the IGSF6 gene and lack of association with inflammatory bowel disease. *Eur J Immunogenet* 2003; 30:187–90.
- 21 Kimura J, Takada H, Nomura A *et al.* Th1 and Th2 cytokine production is suppressed at the level of transcriptional regulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2004; 137:444–9.
- 22 Ebihara T, Endo R, Kikuta H *et al.* Differential gene expression of S100 protein family in leukocytes from patients with Kawasaki disease. *Eur J Pediatr* 2005; 164:427–31.
- 23 Suzuki H, Noda E, Miyawaki M, Takeuchi T, Uemura S, Koike M. Serum levels of neutrophil activation cytokines in Kawasaki disease. *Pediatr Int* 2001; 43:115–19.
- 24 Biezeveld MH, van Mierlo G, Lutter R *et al.* Sustained activation of neutrophils in the course of Kawasaki disease: an association with matrix metalloproteinases. *Clin Exp Immunol* 2005; 141:183–8.
- 25 Brogan PA, Shah V, Clarke LA, Dillon MJ, Klein N. T cell activation profiles in Kawasaki syndrome. *Clin Exp Immunol* 2008; 151:267–74.
- 26 Popper SJ, Shimizu C, Shike H *et al.* Gene-expression patterns reveal underlying biological processes in Kawasaki disease. *Genome Biol* 2007; 8:R261.
- 27 Verma S, Melish ME, Volper E *et al.* Analysis of disease-associated genes and proteins in Kawasaki disease. Abstracts of the 9th International Kawasaki Disease Symposium 2008:44.
- 28 Eberhard BA, Andersson U, Laxer RM, Rose V, Silverman ED. Evaluation of the cytokine response in Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:199–203.
- 29 Onouchi Y, Gunji T, Burns JC *et al.* ITPKC functional polymorphism associated with Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery aneurysms. *Nat Genet* 2008; 40:35–42.

