

つ DNA や mRNA をガラス板上に結合し、定量する。

- DNA マイクロアレイは、ヒトゲノムの塩基配列決定プロジェクトの成果に呼応する形で開発された。植え込まれた何万種類ものプローブは、各々ヒトのゲノムデータベースから選ばれた塩基配列を有しており、プローブに結合した mRNA の量を統計的に処理することにより、細胞や組織で発現している遺伝子総体のパターン (トランスクリプトーム*) を知る事ができる (1)¹⁾。

マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

- DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析の対象は、末梢血中の細胞や生検組織中の細胞である*²⁾。
- 手順の概略を記すと、抽出した RNA を逆転写酵素や RNA 合成酵素によって増幅すると同時に、蛍光色素などで標識する。これを短い断片に切断した後、DNA マイクロアレイとハイブリダイゼーションする。洗浄後に、アレイ上のプローブと結合した RNA の蛍光発色の輝度を、コンピュータを用いて測定し定量化する (2)²⁾。
- 得られた結果はプローブごとに、相対的な蛍光強度として出力される。アレイ 1 枚あたり数万種類にも及ぶプローブのデータを統計処理するために、パソコン用に開発された解析プログラムが数多く市販されている*³⁾。

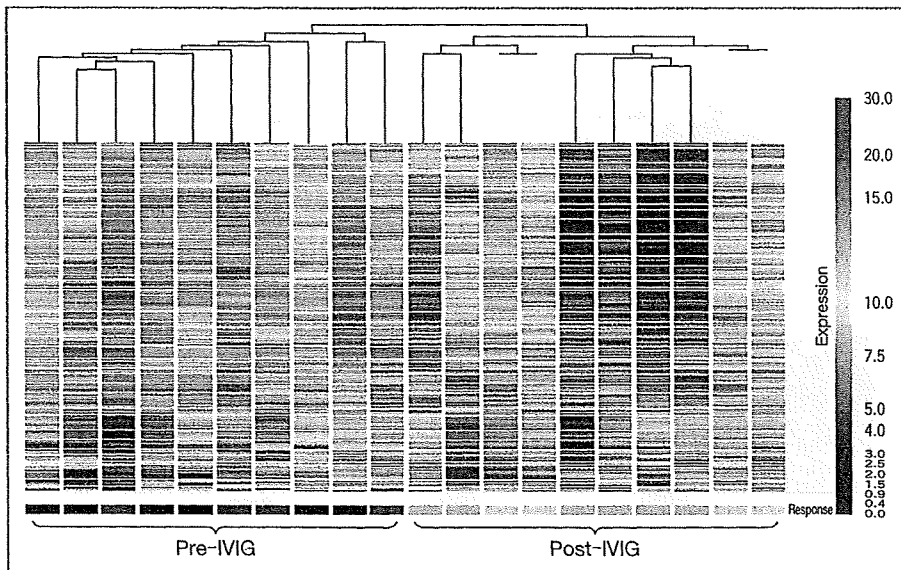
川崎病急性期の遺伝子発現プロファイリング

- ここでは、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析の実例として、急性期川崎病患者の末梢血の遺伝子発現プロファイルを示す (3)。

遺伝子発現プロファイリングから何がわかるか

- 前述のように、DNA マイクロアレイを用いて継時的な遺伝子発現プロファ

③ IVIG 反応例および不応例のクラスター解析



10 名 20 枚分のマイクロアレイ・データを用いてクラスター解析を行った。その結果、10 名の患者の発現プロファイルは IVIG 療法の前と後とで、有意に異なることがわかった。しかし、治療によく反応した 6 名の患者 (紺色および水色の box の上のカラム) と、治療に不応だった 4 名の患者 (赤色および黄色の box の上のカラム) の発現プロファイルは、IVIG 療法後にははっきりと区別できたが、IVIG 療法前には区別できなかった。

*1
トランスクリプトーム (transcriptome)

ゲノム (genome) とは、遺伝子 (gene) と染色体 (chromosome) という 2 つの単語の合成語である。ヒトでいえば 1 個の細胞核にある 23 組 46 本の染色体に含まれる DNA の塩基配列の情報全体をゲノムという。トランスクリプトームはゲノムから派生した造語であり、細胞あるいは組織に含まれる mRNA の全体像をさす。

*2
凍結組織切片から切り出した微小な細胞塊や、ホルマリン固定後の組織から抽出された RNA を用いた遺伝子発現プロファイリングも報告されている。

*3
DNA マイクロアレイは、トランスクリプトーム解析に用いられるだけでなく、個々人の遺伝子そのものの多様性の解析にも使われている。遺伝子中の一塩基多型 (SNP) や遺伝子数多型 (CNV) を、ゲノム全体の中から調べる事ができる。

SNP : single nucleotide polymorphism

CNV : copy number variation

IVIG : intravenous immunoglobulin (免疫グロブリン療法)

PRV-1 : polycythemia rubra vera
1

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)

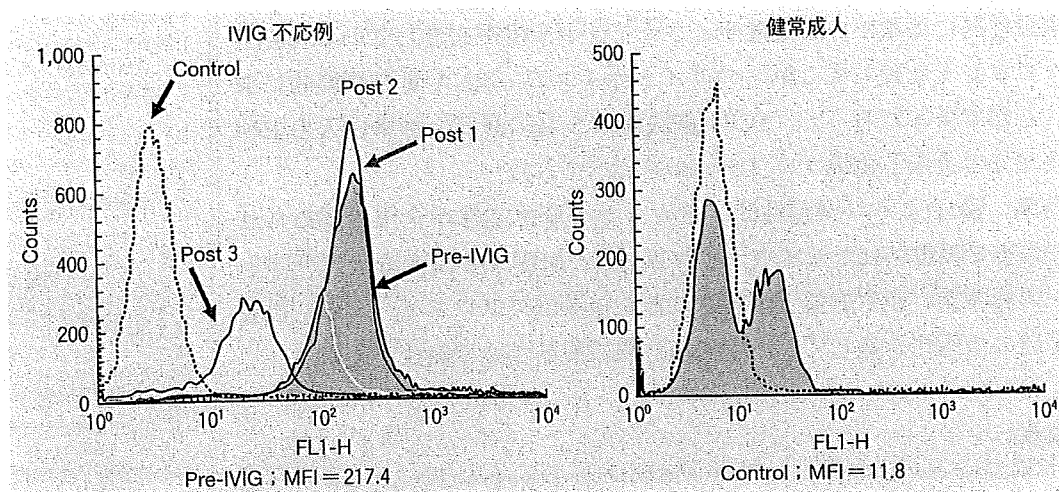
MFI : mean fluorescence intensity

イルの変化を調べることにより、個々の患者の病態が時期的にどのように変動するのかが知ることができる。たとえば、IVIg療法によってどのような遺伝子の mRNA 量が最も大きく変動したのか、など。

●③に示した遺伝子群のなかで、PRV-1という遺伝子の mRNA が、IVIg療法後に多くの患者で最も大きく低下した。PRV-1は真性多血症の患者から発見された分子で、好中球の分化段階に参与している。実際に、川崎病患者、とりわけIVIg療法不応の患者の好中球では、PRV-1の発現が亢進していることが確かめられた(④)。

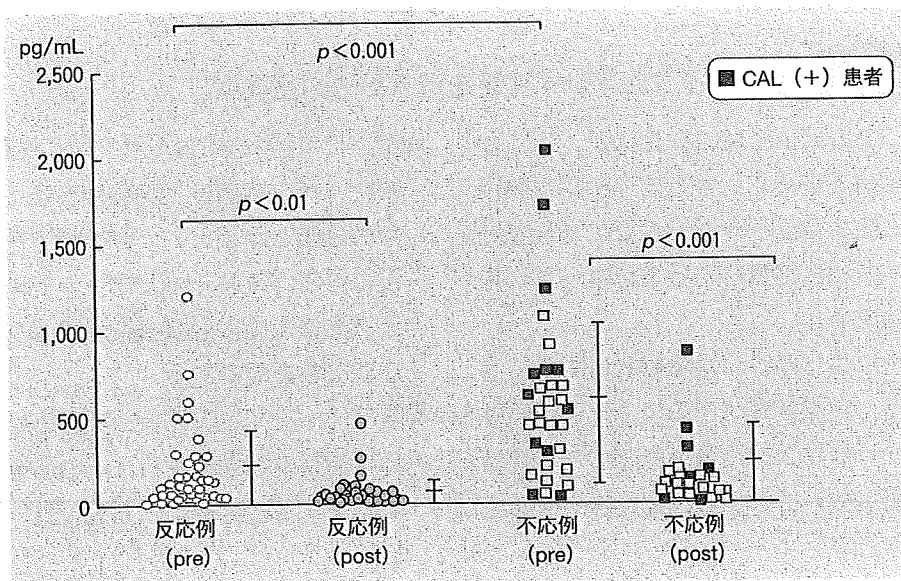
●PRV-1を高発現する好中球は、好中球増殖因子であるG-CSFによって骨髓からリクルートされてきた幼若な桿状核白血球である。実際に、川崎病患者の血清を調べてみると、IVIg療法前の患者、とくにIVIg療法に不応

④ IVIg 不応例における PRV-1 発現量の経時変化

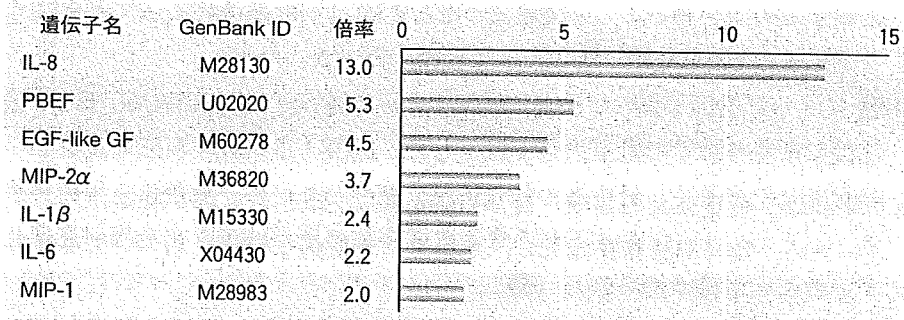


(阿部 淳ほか、フローサイトメトリーを用いた免疫グロブリン療法の反応予測。関東川崎病研究会レポート Vol. 20, 2007 より)

⑤ 川崎病患者血清中の G-CSF 濃度



⑥ 川崎病患者で mRNA が増加していたサイトカイン



IL : interleukin
 PBEF : pre-B cell enhancing factor
 EGF-like GF : epidermal growth factor-like growth factor
 MIF : macrophage migration inhibitory factor

の患者で G-CSF 濃度が有意に上昇していた (⑤)。

- G-CSF は、生体内では炎症性サイトカインなどで刺激された血管内皮細胞や肝臓の類洞内皮細胞で主につくられる。川崎病でみられる G-CSF の上昇は、患者の血管炎の病態を反映するものと考えられる。
- 川崎病急性期には種々の炎症性サイトカインの産生が亢進している。DNA マイクロアレイを使ってこれらのサイトカインの mRNA 量を網羅的に調べることができるだろうか。IVIG 療法前の 5 名の患者と健常成人の末梢血単核球での遺伝子発現プロファイルを比べてみた。
- その結果、⑥ のような炎症性サイトカインの産生亢進が全例で認められた。これまで報告されたサイトカイン以外に、MIF や PBEF などのサイトカインの興味深い産生亢進が示唆された。前者はマクロファージの、後者は好中球の活性化を通じて、川崎病の病態に関与する可能性がある。

*4
リアルタイム PCR など。

*5
マイクロアレイ実験の結果は、あくまでも相対的な遺伝子の発現量を反映することに留意する必要がある。たとえば、組織から抽出した RNA サンプルを用いる場合、その遺伝子発現プロファイルは、組織中に含まれる種々の細胞の比率に影響される。また、遺伝子の発現量が相対的に多いからといって、産生されるタンパク量も多いとは限らない。組織での産生の効率が悪かったり異化が亢進していれば、タンパク量は減少する。

■ 参考文献

- 1) Abe J, et al. Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J Immunol* 2005 ; 174 : 5837-45.
- 2) 阿部 淳. サイトカインプロファイルからみた川崎病. *医学のあゆみ* 2007 ; 222 : 849-54.
- 3) Abe J, et al. Elevated granulocyte colony-stimulating factor levels predict treatment failure in patients with Kawasaki disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008 ; 122 : 1008-13.



アドバイス

マイクロアレイ実験を行うための注意点

- DNA マイクロアレイは、少量のサンプルから多大な結果を得ることができる有用な技術であるが、膨大なデータから意味のある情報を引き出すために注意しなければならない点がいくつもある。
- まず、第一にしっかりした実験計画を立てることである。実験条件 (どのような患者検体を集めるか) やサンプル数 (意味のある統計解析に必要な数) について、よく検討する必要がある。
- 第二に、良質な RNA サンプルを集めること、またマイクロアレイ実験がうまくいっているかの確認 (quality control) を常に行うことである。結果を別の方法*4 で再確認すること、そのために必要な患者検体を用意しておくことも重要である。
- 第三に、マイクロアレイ実験の結果から実際の病態を推察するため、その遺伝子のタンパクとしての発現量にも留意する必要がある*5。

急性期治療


ステロイドパルス療法：IVIG 不応例

三浦 大

IVIG : intravenous immunoglobulin

IVMP : intravenous methylprednisolone pulse


*1
5章“ステロイドパルス療法：初期治療”参照。

*2
同等性、非劣性の評価 
2種類の治療成績を単純に比較し有意差がない場合、効果が同等と主張することは誤りである。統計学的には、非劣性検定などにより同等性を証明しなければならない。

*3
清瀬小児病院循環器科（以下、当院）。

*4
本方針は、米国のガイドライン^{*5}にも則しており、世界的にも容認されると考える。

*5
米国心臓協会の川崎病のガイドライン (AHA scientific statement)
幅広く川崎病の診療指針を網羅しているのが、世界的な動向を把握する意味で一読を勧める。本指針には、ステロイド治療はIVIG 2回以上の不応例に限定するべきで、通常IVMPとして用いると記載されている。(Newburger JW, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease. Circulation 2004 ; 110 : 2747-71.)

*6
冠動脈病変の臨界点 (critical point) 
第10病日前後から、心エコー図検査でも病理所見でも冠動脈病変が出現することが知られている。IVIG追加⁴⁾、IVMPを含め治療の種類にかかわらず、遅くとも第9病日以内の解熱を目指すべきである。

aPTT : activated partial thromboplastin time

IVMPの特徴

- 急性期川崎病に対するステロイド療法は、以前の禁忌のイメージが払拭され世界的に使用されるようになったものの、その適応や投与方法は施設によりさまざまである。
- 本項では、免疫グロブリン治療 (IVIG) 不応例へのメチルプレドニゾロンの超大量投与、いわゆるステロイドパルス療法 (IVMP) について述べる。
- IVMPの特徴は以下のとおりである。
 - ① 解熱作用が早い¹⁻³⁾。冠動脈病変も抑制する可能性がある。
 - ② 終了後に発熱の再燃 (リバウンド) を認めることがある^{1,2)}。
 - ③ 一過性であるが、徐脈、高血圧、高血糖などの副作用を伴う^{1,2)}。
 - ④ 医療費が安価である³⁾。とくに包括医療では経済的メリットが大きい。

IVMPの適応

- 川崎病に対するIVMPの適応は、以下の3つに大別される。

IVIG初回から併用

- 主に不応が予測される重症例。別項^{*1}を参照されたい。

IVIG初回不応例

- 治療としては、IVIG追加が一般的であるが⁴⁾、主に上記①④の理由によりIVMPを用いている施設がある。
- しかし従来の報告では¹⁻³⁾、IVMPとIVIG追加の冠動脈病変予防効果の同等性は統計学的に証明されていない^{*2}。

IVIG追加不応例

- 当院^{*3}では、上記③の副作用の問題も考慮し、IVIG追加不応例をIVMPの適応としている^{*4}。
- IVIG追加終了後も発熱が続く場合は、冠動脈病変の臨界点^{*6}である第10病日⁴⁾に至る前に、速やかにIVMPを開始すべきである。

当院におけるIVMPの投与方法

メチルプレドニゾロン

- 30mg/kg/日 (最大1,000mg) を2時間で点滴静注、3日間投与。

ヘパリン併用

- 15IU/kg/時、IVMP開始後72時間持続点滴、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) で調節。

ファモチジン併用

- 1mg/kg/日、分2内服、ステロイド投与中は原則併用。

抗菌薬併用

●アンピシリン（ピクシリン®）静注，アモキシシリン経口などを適宜併用。

プレドニゾロン（PSL）後療法*7

●1（～2）mg/kg/日から開始し2（～4）週間で漸減中止，発熱した際は適宜増減して対応。

投与方法の調整

●IVMP は，川崎病以外にもリウマチ性疾患，呼吸器疾患，腎疾患など種々の病態の重症例に用いられる*8が，適切な投与方法は確立していない。併用薬もプレドニゾロン後療法の妥当性も明らかではないので，施設によって調整してもよいであろう。

当院の成績

IVIG 初回不応例に対する IVMP と IVIG 追加の無作為比較試験

- 2001年1月～2003年5月，初回 IVIG（2g/kg/日）終了48時間後も発熱が持続または再燃した22例を対象に，IVMP と IVIG 追加の無作為比較試験を行った（①）¹⁾。
- IVMP によって全例速やかな解熱が得られたが，一部の症例に発熱のリバウンドが生じた（②）。
- IVMP 群における最高体温は，IVIG 追加群に比し，投与後2日目では有意に低値であったが（中央値 36.9℃ vs 37.8℃， $p=0.02$ ），3日目以降では有意差を認めなかった。
- IVMP 群の発熱例は，投与後3日目までは，IVIG 追加群に比し有意に低率であったが（1例 vs 8例， $p<0.001$ ），4日目以降は6例ずつで同数となり，治療を要した例の割合も有意差がなかった（3例 vs 2例）。第30病日における両群の冠動脈病変の割合（2例 vs 3例）も同様であった（③）。
- 一部の症例（IVMP 群7例，IVIG 追加群8例）で，サイトカインを含め血液検査値を比較した⁵⁾。投与後4日目では，IVIG 追加群に比し，IVMP 群における白血球数・好中球数が高値，CRP 値・TNF- α ・MCP-1が低値を示

PSL：prednisolon

*7

前記②のリバウンド防止目的で，IVMP後にプレドニゾロン内服による後療法も当院では行っている。

*8

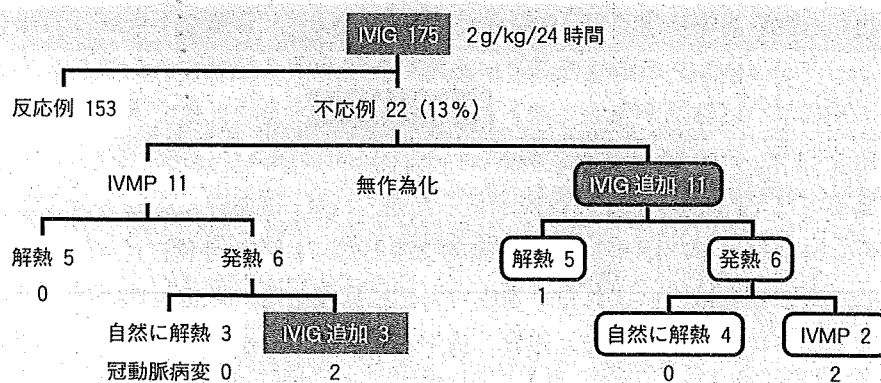
IVMP の作用機序

IVMPの投与量は，ステロイドホルモンが作用する糖質コルチコイド受容体の飽和量を大幅に上回る。したがって，IVMPの機序として，その他の受容体の介在，直接的な細胞傷害作用などが推測されているが，詳細はわかっていない。炎症性サイトカインを抑制する機序も不明である。

TNF- α ：tumor necrosis factor- α （腫瘍壊死因子 α ）

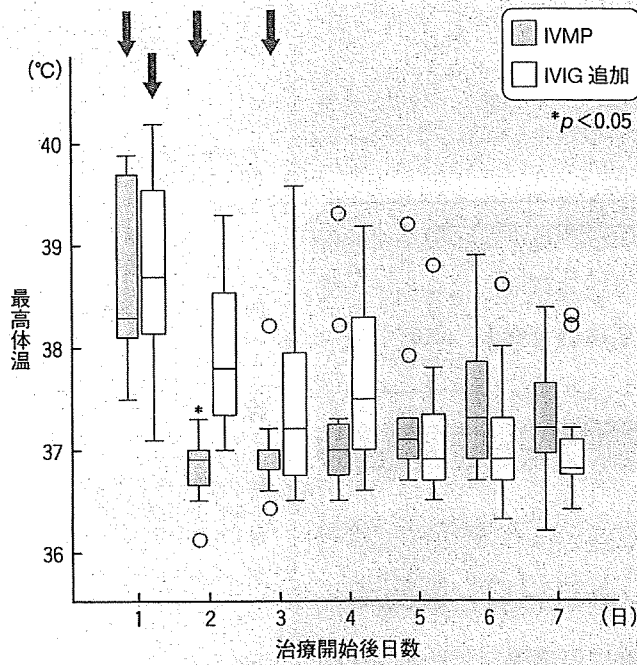
MCP-1：monocyte chemoattractant protein-1

① IVIG 初回不応例に対する IVMP と IVIG 追加の比較試験のプロトコールと成績



（Miura M, et al. 2005¹⁾より改変して引用）

② IVIG 不応例に対し IVMP と IVIG 追加を行った際の体温の変化



箱ひげ図の箱は 25 パーセント点, 中央値, 75 パーセント点を, error bar は箱の長さの 1.5 倍以内の最小値と最大値を, ○○印ははずれ値を示す. IVMP 群の最高体温は, IVIG 追加群に比し, 投与後 2 日目のみ有意に低値であった.
(Miura M, et al. 2005¹⁾ より改変して引用)

③ 副作用の比較

	IVMP (n=11)	IVIG 追加 (n=11)	p 値
心拍数 (/分)	68 (63, 76)	98 (76, 110)	0.01
洞性徐脈	9 (82%)	2 (18%)	0.01
最低体温 (°C)	35.4 (0.4)	36.1 (0.5)	0.0002
低体温 (< 35.0°C)	1 (9%)	0 (0%)	1.00
高血圧	10 (91%)	6 (55%)	0.15
高血糖 (> 125mg/dL)	6 (55%)	0 (0%)	0.01
aPTT 短縮	3 (27%)	2 (18%)	1.00
塞栓症	0	0	
便潜血	0	0	

連続変数のうち, 正規分布する値は平均値 (標準偏差) で示し, 正規分布しない値は中央値 (25 パーセント点, 75 パーセント点) で示した.
(Miura M, et al. 2005¹⁾ より改変して引用)

IL-6 : interleukin-6 (インターロイキン-6)

VEGF : vascular endothelial cell growth factor (血管内皮成長因子)

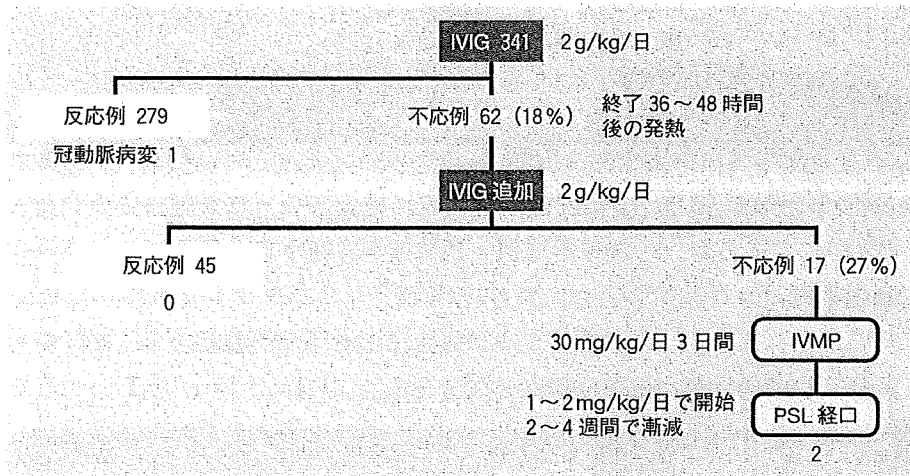
*9

このような IVMP の問題点を指摘すると, 経験の乏しい施設では開始に逡巡するかもしれないが, 副作用を知るからこそ安心して治療を行えるのである. 発熱も炎症性サイトカインも早期に抑制するというメリットを生かし, 積極的に IVMP を行うことを勧めたい.

したが, いずれも 7 日目では有意差がなかった.

- IL-6 と VEGF にも有意差はないものの同様の動態がみられた. すなわち, サイトカインに対する IVMP の抑制作用も, 早期に出現するがリバウンドを伴うことが示唆された.
- IVMP の副作用 (③) に関しては¹⁾, 洞性徐脈が特徴的で, IVIG 追加群に比し有意に高率に生じた (9 例 vs 2 例, $p = 0.01$). 重篤な不整脈は認めなかったが, IVMP の際はモニター心電図を注意深く観察すべきである.
- IVMP 群では体温が急速に降下し, 最低体温は有意に低値であった (平均値 35.4°C vs 36.1°C , $p = 0.002$).
- 高血圧は IVMP 群に多い傾向があったが, IVIG 追加群と有意差はなかった. 高血糖は IVMP 群に有意に高率に生じた (6 例 vs 0 例, $p = 0.01$).
- これらの変化は, いずれも一過性で自然に回復した. 血栓・塞栓症, 消化管出血, けいれん, 感染, 知覚・精神障害といった副作用は両群とも認めなかった*9.

④ 現在の当院のプロトコールと成績



IVIG 追加不応例に対する IVMP とプレドニゾロン後療法

- 以上の成績に基づき、当院では、IVIG 追加不応例に IVMP・プレドニゾロン後療法を行う方針とした (④)。
- 2003 年 7 月～2007 年 6 月の 4 年間の成績では、第 10 病日未満に IVIG を開始した川崎病は 341 例、IVIG 初回不応 62 例 (18.2%) に IVIG を追加し、さらに不応の 17 例 (27.4%, 全体の 5.0%) に IVMP・プレドニゾロン後療法を行った。
- プレドニゾロンの投与日数は 13～40 (中央値 14) 日で、1 例のみが 28 日を超えた。プレドニゾロン 14 日投与終了後 10 日目に発熱が再燃した 1 例に 3 回目の IVIG を行った。
- 第 30 病日の冠動脈病変は、IVIG 反応例に 1 例 (拡大)、IVMP・プレドニゾロン後療法を行った例に 2 例 (拡大と瘤) の計 3 例 (0.9%) で、巨大瘤は認めなかった。
- 3 例の冠動脈病変は、いずれも 6 か月以内に正常化した。
- すなわち早期に診断すれば、IVIG 追加不応例に対する IVMP・プレドニゾロン後療法によって、冠動脈瘤をほぼ抑制できると考える。

■ 参考文献

- 1) Miura M, et al. Adverse effects of methylprednisolone pulse therapy in refractory Kawasaki disease. Arch Dis Child 2005 ; 90 : 1096-7.
- 2) Furukawa T, et al. Effects of steroid pulse therapy on immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. Arch Dis Child 2008 ; 93 : 142-6.
- 3) Hashino K, et al. Re-treatment for immune globulin-resistant Kawasaki disease : a comparative study of additional immune globulin and steroid pulse therapy. Pediatr Int 2001 ; 43 : 211-7.
- 4) Miura M, et al. Coronary risk factors in Kawasaki disease treated with additional gamma globulin. Arch Dis Child 2004 ; 89 : 776-80.
- 5) Miura M, et al. Effects of methylprednisolone pulse on cytokine levels in Kawasaki disease patients unresponsive to intravenous immunoglobulin. Eur J Pediatr 2008 ; 167 : 1119-23.

