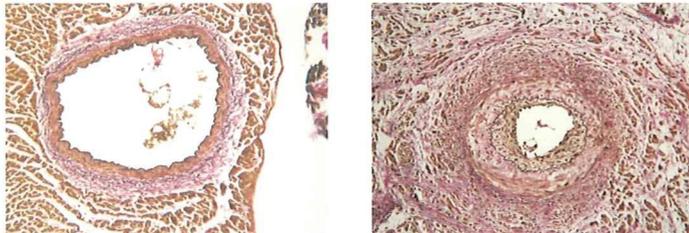


えられるが、今回の急性期から慢性期にわたる血管内皮機能に関する研究を行う上で、モデル作成とその基本的

な血管病変の形態的リモデリング様式が明らかとなっている点は極めて意味のあるものとする。

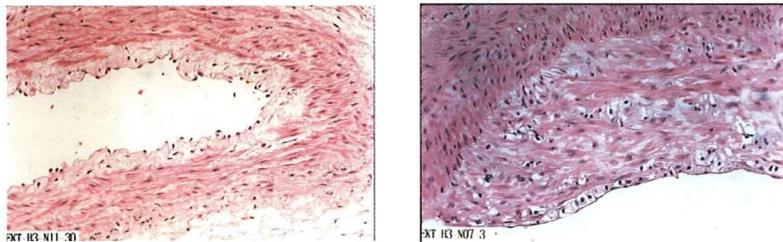
図1



(コントロール)

(血管炎)

図2

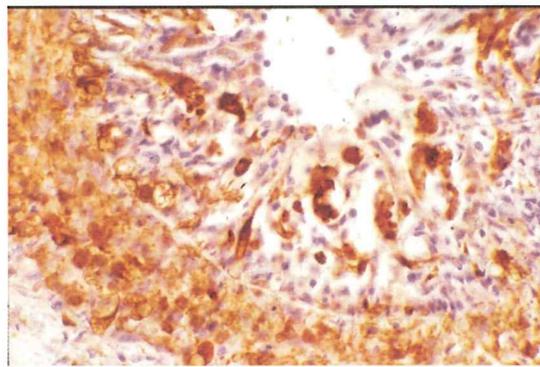


(非血管炎群)

(血管炎群)

図3

(平滑筋遊走)

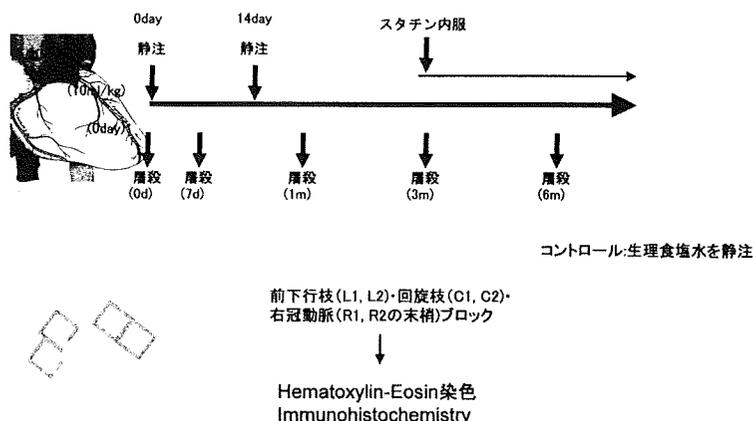


2. 研究目的

<家兔アレルギー性冠状動脈炎モデル>

実験動物には、離乳早期の日本白色系家兔(週齢5週、体重700g前後)を用いる。血管炎モデルは、既に報告した方

法に基づき生後 5 週および 7 週目に馬 群 20 羽ずつを検討する。
血清を耳静脈内投与して作成する。各



①表題 ウサギを用いた動脈硬化発現試験

②試験目的 ウサギ冠動脈の内部炎症発症後における動脈硬化発現試験

③試験責任者

名称 : 京都府立医科大学大学院医学研究科 小児循環器・腎臓学

所在地 : 京都府京都市上京区河原町通広小路梶井町 465 番地

試験者 : 濱岡 建城

④試験協力施設及び関係者

名称 : バイオゲート株式会社

所在地 : 岐阜県山県市大森 331-1

運営管理者 : 三田村 聡

実験責任者 : 五島 英雄

実験主担当者 : 五島 博幸

⑤ 適用する基準及びガイドラインなど

動物の福祉

●「動物の愛護及び管理に関する法

律」(昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105 号、平成 11 年 12 月 22 日改正)

●「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日、法律第 105 号)

●「動物実験に関する指針」(昭和 62 年 5 月 22 日、(社)日本実験動物学会)

●「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、平成 18 年 6 月 1 日)

⑥試験日程

試験開始日 : 2009 年 9 月 1 日

試験終了予定日 : 2009 年 6 月 1 日

⑦試験材料及び試験方法

⑦-1 投与試料

⑦-1-1 投与試料 1 : ウマ血清

(GIBCO 社製)

保存条件：冷凍保存

⑦-1-2 投与試料 2：ウマ血清と、FCA(フロイントコンプリートアジュバント；ベクトン・ディッキンソン社製)を1:1の割合で混ぜ合わせ、超音波分散機にてエマルジョン化させたもの。

⑦-1-3 投与試料 3：生理食塩液(大塚製薬社製)

⑦-2 試液の調製

15%ホルマリン液

水 10L にホルムアルデヒド液(36.0~38.0%；和光純薬工業社製)3L を加え、さらに水 7L を加えて混合し、室温にて保存する。

⑦-3 機器及び器具

上皿電子天秤：ザルトリウス社製、BP8100

超音波分散機：SMT 社製、UH-50
マイクロピペッター：ギルソン社製、

P-200、P-1000

ポリプロピレンチューブ：ベクトン・デ

ィッキンソン社製、50mL、15mL

ポリプロピレンチューブ：ソレンソン・

バイオサイエンス社製、1.7 mL

シリンジ：テルモ社製、1mL、5m

L、10

m

L

注射針：テルモ社製、24G、25G

⑦-4 使用動物

動物種及び系統：SPFグレート

生産者：北山ラベス株式会社

性別：雄性

試験匹数：6羽(試験群4羽)(対照群2羽)

動物の選択：5週齢で体重0.6~1.0kgの健康なウサギを用い、飼育室で試験前7日以上飼料および水を与えて飼育後、健康とみなされた動物を使用する。

個体識別：ラベル法にて識別されたケージに、1個体ずつ収容し識別する。

⑦-5 飼育条件

飼育室の環境：温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50\pm 15\%$ 、照明1日12時間(8:00~20:00)

の動物飼育室。ウサギ用ステンレス製ケージ(W35×D50×H35cm)に1羽につき1ケージにて飼育する。

飼料：試験群、及び対照群ともに、馴飼から試験9週目までの間は、固型飼料ORC4(オリエンタル酵母工業社製)を、以後14週間は高コレステロール飼料(ORC4 99%、コレステロール1%；オリエンタル酵母工業社製)をステンレス製給餌器にて約150~200g/日与える。

飲料水：フィルターに通した水道水を自動給水器により自由に摂取させる。

⑦ - 6 群構成

表 1 群構成

群	名称	動物数	投与試料		
			投与1回目 (試験開始時)	投与2回目 (試験1週目)	投与3回目 (試験3週目)
第1群	試験群	4羽	投与試料2	投与試料1	投与試料1
第2群	対照群	2羽	投与試料2	投与試料3	投与試料3

⑦ - 7 試験方法

①試験開始の前日

に群分けを行い、群間の平均体重に大きな差がないようにする。

②試験開始当日、体重を測定した後、両群に25G針付きの1mLシリンジを用いて、投与試料2を動物体重1kgあたり0.1mLずつ左右2箇所背部皮下投与する。

③試験1週目、及び3週目に、両群の体重を測定し、試験群においては、24G針付きの5mLシリンジを用いて、ペントバルビタールを耳介静脈より投与することで麻酔をかけ、その後、24G針付きの10mLシリンジを用いて、投与試料1を耳介静脈より15～30分かけて、動物体重1kg

あたり10mL投与する。なお、対照群に

は麻酔処理は行わず、24G針付きの10mLシリンジを用いて、投与試料3を耳介静脈より動物体重1kgあたり10mL投与する。

④観察期間は試験3週目から23週目までとし、試験動物に異常がないか定期的に確認する。また、両群とも、試験9週目までは、通常飼料のORC4を与え、それ以降は、ORC4から高コレステロール飼料に切り替えて飼育を行う。

⑤観察期間中は、週ごとに試験動物観察記録を作成する。また、表2の測定日に従って体重の測定を行い、記録を残しておく。

なお、観察期間終了までに試験動物が死亡した場合は、速やかに試験委託者に報告し、試験動物の追加について判断を仰

ぐ。

表2 観察期間中の体重測定日

ORC4飼育時	試験4週、5週、6週、7週、9週目
高コレステロール飼料飼育時	試験10週、11週、12週、13週、15週、17週、20週目

⑥観察期間終了後、試験動物の体重を測定して頸動脈より全採血する。その後、心臓及び大動脈(起始部から約10cm程度)を摘出し、冠動脈に触れないように、心臓の両心室に割を入れ、生理食塩水にて洗浄する。理食塩水にて洗浄する。血管内部も、大動脈から生理食塩水を注入して洗浄する。その後、大動脈から15%ホルマリン液を注入し、血管内部に行き渡らせてから、心臓及び大動脈を15%ホルマリン液に入れ、固定しておく。

なお、観察期間終了までに死亡した試験動物については、体重を測定した後、上記と同様の方法で心臓及び大動脈を摘出し、生理食塩水で洗浄後、ホルマリン固定する。

⑦その後、右冠動脈については、起始部より一定の距離をおいて2箇所、左冠動脈については、起始部から前下行枝と回旋枝に分岐するまでの間で2箇所、前下行枝と回旋枝に分岐した直後の両血管部位の2箇所、合計6箇所

の冠動脈組織を横断面となるように切り出し、パラフィンブロックを作製す

⑧パラフィンブロック1個につき5枚のスライド標本を作製し、HE染色を行う。

⑦ - 8 概要図

以下に試験の概要を図で示す。

⑧ 試験報告書

記録用紙を整理して報告書を作成し、送付する。

⑨ 試験材料、組織及び資料

⑨ - 1 試験材料、組織

試験責任者が管理する。

⑨ - 2 資料

試験責任者が管理する。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

急性期川崎病難治例に対する抗 TNF α 製剤 Infliximab (レミケード) 使用についての使用実態調査の結果

分担研究者：佐地 勉 東邦大学医療センター大森病院 小児科 教授

研究協力者： 荻野廣太郎（関西医大）、濱岡健城（京都府立医大）

（日本川崎病学会学術委員会）

研究要旨：

難治性で IVIG 抵抗性の重症川崎病にたいする抗 TNF α 抗体 Infliximab(レミケード)の効果を検討する目的で、全国使用実態調査を行った。その結果、過去4年間と同様、2009年度には33例において使用されていた。概ね80%近くでは有効性があり、また大きな副作用は経験されておらず、比較的安全に使用されていた。さらに使用時期が10日以前であれば、冠動脈瘤を形成する頻度が極めて低いと思われた。重症川崎病には抗 TNF α 製剤が有効で安全である事が推察されたが今後の症例の蓄積が必須である。

調査協力施設；医師

山口大学；橋本邦生、五稜郭病院；小児科 岩井 崇、九州厚生年金病院；牟田香織、白石 暁、大場詩子、順天堂練馬病院；小児科 福永英生、九州大学病院；池田和幸、北里大学医学部；緒方昌平、獨協大学；坪井龍生、国立成育医療センター；小穴慎二、京都大学附属病院；土井 拓、横浜市立大学市民総合医療センター；森 雅亮、富山大学；廣野恵一、山形大学；鈴木浩、東邦大学医療センター大森病院；監物 靖、高月晋一

A. 研究目的

IVIG 不応の川崎病 (KD)難治例に対して Off-label 治療薬として Infliximab(レミケード：Rm) が使用されてから約4年が経過した。2006~2008年の間に計3回の使用実態調査を行なって来たが、今回第4回目の調査を行ったので報告する。Rm 使用に際しては、多くは IVIG その他ステロイドを含む急性期薬物療法が無効であった症例に対して適応外で使用されてきた。Pilot Study としての集計結果から安全性と有用性を導き

出す事が目的である。

B. 研究方法

対象：2008年7月から2009年8月末までの1年間にRmを使用した症例。

方法：川崎病学会の主な会員370名へ郵送により使用の有無を確認した。

C. 研究結果

結果：平成21年8月末日に郵送し、同9月9日現在156施設から回答が得られた。その結果RM使用例は33例(13施設)(男：25例、女8例)報告された。その他、エラスポール29例、ウリナスタチン67例、シクロスポリン10例、血漿交換療法13例も記載されていた。年齢は4mから8y5m。有効は24/33例、再発熱2例であった。冠動脈瘤は12例に残存した。10日未満で使用されたときは4/18例、10日以後では5/15例に瘤が残存した。

33例がIVIG不応であった。24例で瘤が見られなかった。1例に瘤の増悪作用があると判定されていた。副作用は4例(発熱2例、発疹1例、感染症1例)に認められた。4回の総計では、有効76%(76/97)、無効11.3%、副作用は7/97例であった。

D. 考案

考察：Rmには多くの急性期・慢性期の合併症が報告されており、安易に使用するべきでないとする意見が多い。一方、難治例では巨大冠動脈瘤を残す危険性(Risk)が高く、期待され

る効果(Benefit)とのbalanceを考え使用されていると思われる。

昨年までの3年間の検討では、心不全の悪化が懸念される急性期は使用が避けられていたが、IVIG反応性の判断が早まり、使用時期は10日前後へと早くなってきていた。4回の集計で8割近い症例では解熱効果が見られ、しかもRmが10日未満に使用されれば冠動脈瘤の出現頻度は低い(5/45例)と結論された。

E. 結論

難治性IVIG不応KDに対して、Rmは相当数で使用されていた。乳幼児に使用されている状況であるが、現在までは比較的安全性にまた有効に使用されていると考えられた。第2又は第3の選択にはなりえらと思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 佐地勉：特集にあたって(特集 成人期における川崎病安城動脈瘤を考える) .Vascular Medicine.6 (1):1, 2010
2. Muro T, Maruyama Y, Onishi K, Saze M, Okada E, Matsuura H, Saji T: Mimicking Kawasaki disease in bumed children: Report of four cases. Burns, 35: 594-599, 2009
3. 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 of Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J.* 28(6):498-502, 2009

4. Hirono K, Kemmotsu Y, Wittkowski H, Foell D, Saito K, Ibuki K, Watanabe K, Watanabe S, Uese K, Kanegane H, Origasa H, Ichida F, Roth J, Miyawaki T, Saji T: Infliximab reduces cytokine-mediated inflammation but does not suppress cellular infiltration of the vessel wall in refractory Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 65 (6) : 696-701, 2009

5. Takatsuki S, Ito Y, Takeuchi D, Hoshida H, Nakayama T, Matsuura H, Saji T: IVIG Reduced Vascular Oxidative Stress in Patients With Kawasaki Disease. *Circ J.* 73(7): 1315-8, 2009

6. 荻野廣太郎、佐地勉、濱岡建城、菌部友良: 特集 川崎病 —第 33 回禁忌川崎病研究会—我が国における難治性急性期川崎病に対する infliximab 療法の現状—3 回の使用実態調査結果から—. *Progress in Medicine* 29:1722-1727, 2009.7

7. 佐地勉:急性期治療 ウリナスタチン療法. 小児科臨床ピクシス 9 川崎病のすべて. 中山書店: 106-108.東京、2009.7

8. 佐地勉、鈴木啓之、市田露子、小林徹:川崎病急性期治療の最前線 冠動脈瘤を作らないための治療オプション. *Pharma Medica.* 27 (3) :167-175、2009.3

2. 学会発表

1. 佐地勉:川崎病の up-to-date: IVIG に不応の難治例への治療 option.第 124 回日本小児科学会岩手地方会, 盛岡, 2009.12

2. 佐地勉:肺高血圧症の新しい考え方と治療薬の選択.第 1 回広島小児肺高血圧研究会, 広島, 2009.12

3. 小島泰子、監物靖、池原聡、嶋田博光、高月晋一、中山智孝、佐藤真理、松裏裕行、小原明、佐地勉:腹部超音波検査上門脈気腫を合併した急性期川崎病乳児例.第 25 回関東川崎病研究会, 東京, 2009.11

4. 松裏裕行、佐地勉、菌部友良、濱岡建城、荻野廣太郎、太田八千雄、大島美保、長谷川圭司、大久保淳、梶野真弓、木村光明、渡部綾佳、監物靖、高月晋一、松原知代、福永英生、緒方昌平、相原真樹子、今川智之、喜瀬広亮、吉林宗夫、白石泰資、橋本邦生、岸本小百合:小児薬用量をどのように決めるべきか 川崎病の急性期治療薬としての Infliximab の安全性と有効性—3 回のアンケート調査から—.第 36 回日本小児薬理学会, 香川, 2009.11

5. 佐地勉:急性期川崎病の IVIG 難治例への治療選択.第 26 回沖縄キッズハート, 那覇, 2009.11
6. Saji T: Update of Kawasaki Disease in Japan- Current issues and treatment for IVIG refractory cases-. The 59th Annual Fall Meeting of The Korean Pediatric Society. Seoul (Korea), 2009. 10
7. 小川俊一、赤字禎治、石井正浩、唐津賢佑、佐地勉、鈴木淳子、菌部友良、馬場清、濱岡建城、藤原久義、鮎澤衛、岡田知雄、荻野廣太郎、深澤隆治、西垣和彦:日本循環器学会ガイドライン川崎病心臓血管後遺症の診断と治療に関するガイドライン (2008 改訂) (ガイドライン解説) .第 29 回日本川崎病学会・学術集会, 名古屋, 2009.10
8. 大原関利章、横内幸、儘田洋、武藤里志、定本清美、大野尚仁、佐地勉、高橋啓:川崎病動脈炎モデルにおける抗サイトカイン療法 of 血管炎抑制効果の組織学的検討. 第 29 回日本川崎病学会・学術集会, 名古屋 2009.10
9. 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向けて. 第 29 回日本川崎病学会・学術集会, 名古屋, 2009.10
10. 佐地勉、荻野廣太郎、濱岡建城: 抗 TNF α 製剤 Infliximab (レミケード) 使用についての第 4 回実態調査の結果.第 29 回日本川崎病学会・学術集会, 名古屋, 2009.10
11. 監物靖、嶋田博光、池原聡、高月晋一、中山智孝、松裏裕行、佐地勉、幸田恭子、石黒精:急性期川崎病の難治例におけるインフリキシマブの臨床的有効性.第 29 回日本川崎病学会・学術集会, 名古屋, 2009.10
12. 佐地勉:川崎病治療アルゴリズム—大量 IVIG と抗 TNF α 製剤 (レミケード) の安全性・有用性—. 第 5 回静岡川崎病研究会, 静岡, 2009.7
13. 小林徹、森川昭博、井上佳也、荒川浩一、佐地勉、中村哲也、竹内和夫、大谷哲也、阿部淳、菌部友良、濱岡建城、原寿郎、小川俊一、市田露子、野村裕一、三浦大:重症川崎病患者に対する免疫グロブリン・プレドニゾ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, 東京, 2009.6
14. Saji T: Multi-potential Effects of Sildenafil and PDE-5 Inhibitor – Pulmonary Vasodilatation and Beyond (Special Lecture). 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation. Matsushima, 2009.6

15. 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 実施に当たっての課題:RAISE-studyでの準備を通して. 第 112 回日本小児科学会, 奈良,2009.5
16. 小林徹、佐地勉:急性期川崎病患者 に対する 免疫グロブリン治療反 応性を予測する 新規スコア.創薬 基盤推進研究事業 政策創薬総合 研究事業 血管炎治療のための人 工プロクローナルグロブリン製剤 の開発と安全性確保に関する研究
- 平成 21 年度第 1 回班会議, 千葉, 2009.5
- 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

川崎病に対するインフリキシマブ使用における指針（案）

インフリキシマブを川崎病に使用する場合、下記の要領で使用することが望ましい。この基準は、班研究初年度の指針であり、今後、変更がありうる。

1、適応

- 1) 充分量の超大量 γ グロブリン静注療法不応例（いわゆる難治性川崎病）に使用する。
- 2) BCG 接種後 6 ヶ月以上経過している。
- 3) 両親からインフォームドコンセントが得られている。
- 4) 下記感染症スクリーニングで感染症の可能性が否定されている。
- 5) 冠動脈瘤発症予防に対しては第 10 病日以内の使用が望ましい。

2、投与前に、親への十分な説明を行い、同意を得なければならない。

3、投与前の感染症スクリーニングとして、下記項目を行っておく。

- 1) 結核患者との接触歴の有無
- 2) 胸部 X 線
- 3) 胸部 CT（造影なし）
- 4) 血液、尿細菌培養、細菌培養など
- 5) B 型肝炎ウイルス(HBs 抗原、HBe 抗原)
- 6) クオオンティフェロン検査（望ましい）

4、投与方法

5mg/kg（最大 100mg）を生理食塩水 100ml で希釈して、2 時間以上かけて静注する。

5、短期及び長期の副作用出現の可能性がある。投与後 1 時間は、インフュージョンリアクションのチェックを含めて注意深い観察を行う。急性期以後も長期の視察を要す。

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

川崎病患者血清中の自己成分反応性抗体の抗原タンパク質の同定に関する研究
研究分担者 服部 成介 北里大学薬学部生化学講座・教授

研究要旨

本分担研究は、川崎病患者に特異的に認められる自己の細胞成分に対する自己抗体を同定し、川崎病患者の発症機序の解明と診断に資することを目的とする。多くの腫瘍、感染症、自己免疫疾患等で健常人には見られない、自己抗体が検出されており、川崎病が免疫反応の亢進による血管炎を主徴とすることから、川崎病特有の自己抗体の同定を目指す。

川崎病患者自己抗体が反応する抗原を同定には、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞を抗原とし、患者血清を用いた2次元ウェスタンブロット法を採用した。川崎病患者約30名について2次元ウェスタンブロットを行って、自己抗体が反応するスポットを検索した。その結果、抗原タンパク質を3種同定した。そのうちの1つの抗原に関してELISA系を構築して抗体価を評価した。その結果、カットオフ値を0.071に設定した場合、44例中25例(57%)の患者血清が陽性と判定されたのに対し、正常血清は6例中で陽性試料はなかった。以上の結果は、従来簡便かつ客観的な診断法がなかった川崎病の診断に有用である。

A. 本分担研究は、川崎病患者に特異的に認められる自己の細胞成分に対する自己抗体を同定し、川崎病患者の発症機序の解明と診断に資することを目的とする。多くの腫瘍、感染症、自己免疫疾患等で健常人には見られない、多くの腫瘍、感染症、自己免疫疾患等で健常人には見られない、自己抗体が検出されており、川崎病が免疫反応の亢進による血管炎を主

徴とすることから、川崎病特有の自己抗体の同定を目指す。

B. 研究方法

川崎病患者自己抗体が反応する抗原を同定には、患者血清を用いたウェスタンブロット法を採用した。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) の抽出液を作成し、これを2次元ゲル電気泳動で展開する。展開したタンパク質を抗

原とし、患者血清中の抗体を用いたウェスタンブロット法により抗体反応性の抗原を同定する（スキームを図1として示した）。HUVEC細胞タンパク質は蛍光色素Cy5標識により検出し、抗体抗原反応はECLキットによって検出した。患者反応性のスポットよりタンパク質を抽出し、プロテアーゼ消化後に生じたペプチドを質量分析計測定することにより抗原タンパク質を同定した。

同定したタンパク質のcDNAを取得し、遺伝子組み換え発現系を作成し、精製抗原を作成する。これを用いてELISA測定系を作成し、患者血清中の抗体価を定量的に測定した（図1）。

本研究はすべての共同研究者が属する研究機関の倫理委員会の承認を得ており、インフォームドコンセントが得られた患者のみより、血清を採取した。

C. 研究結果および考察

川崎病患者約30名について二次元ウェスタンブロットを行って、自己抗体が反応するスポットを検索した。その結果、4名の患者について、共通の抗原スポットと反応する結果が得られた。代表的な解析結果を図2として示す。図の矢頭で示したスポットが4名の患者血清で共通に反応しているのが認められる。同様の実験をすべての患者について行い、抗原タンパク質を3種同定した（特許申請の関係で、固有名詞は記載せずタンパク質A、B、Cと表記する）。

これらの抗原タンパク質について遺伝

子組み換え発現系を作成し、抗原タンパク質を精製し、ELISA測定系を作成した。タンパク質AはHEK293T細胞にて大量に発現し、精製抗原を得た。さらにELISA系を構築して抗体価を評価した。その結果、カットオフ値を0.071に設定した場合、44例中25例（57%）の患者血清が陽性と判定されたのに対し、正常血清は6例中で陽性試料はなかった（図3）。

抗原Bおよび抗原Cに対して2次元ウェスタンブロット法で陽性となる血清が複数存在することを認めているが、抗原タンパク質の過剰発現と精製抗原を用いたELISAは今後行なう予定である。

川崎病は血管内皮細胞に炎症反応が生じると考えられており本研究で同定した抗原は、診断マーカーとして有用であり、病因の解明にも役立つと考えられる。またγグロブリン療法に反応しない患者の血清の反応性も調べることで、川崎病の疾患の性質に応じてさらにグループ分けすることも可能ではないかと考えられる。

D. 考察

達成度

本分担研究においては、研究申請書に記載したとおり川崎病自己抗原の候補を3種同定することができた。そのうちの1つであるタンパク質Aに関しては、ELISA測定系を構築し、実際に患者スクリーニングに使える可能性が高いことを示すことができた。したがって、今年度の研究目標は達成している。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

川崎病では、自己成分に対する自己抗体の存在を報告した論文が二報あるが、抗原の同定と ELISA 系による定量的測定を行ったものではなく、今回の成果は学術的また国際的に見て新規性が高いものである。また ELISA による川崎病の確定診断法が確率されれば、臨床応用として有用なものである。

今後の展望について

今回得られた自己抗原による川崎病診断において、患者の自己抗体陽性率は 60%程度であるので、さらに複数の抗原を同定し、その組合せによって川崎病の診断の感度と精度を高めることが望まれる (図 4)。また本分担研究では、検体数が少なかったため、初回大量ガンマグロブリン静注 (IVIG) 不応川崎病 (iKD) と応答性の川崎病を区別することなく測定しているが、今後は病態の差を解明できるような抗原の同定が必要である。

研究内容の効率性について

本研究分担においては分担者のこれまでに培ったプロテオミクス技術を生かして二次元ウェスタンブロットや質量分析計を用いた抗原タンパク質同定を行った。したがって、研究費を効率的に使用しつつ比較的順調に研究を遂行することができた。

E. 結論

本分担研究に於いて川崎病患者特有の自己細胞成分に対する自己抗体を同定した。この結果を生かした ELISA 測定系により川崎病診断に有用である可能性が示された。

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表 3件

服部成介 プロテオミクス技術による細胞内シグナル伝達系の解析

日本蛋白質科学会年会 ワークショップ
2009.05.21 熊本

服部成介 プロテオミクス技術による細胞内シグナル伝達系の解析

JHUPO 年会 シンポジウム
2009.07.27 東京

服部成介 プロテオミクス技術による細胞内シグナル伝達系の解析

日本生化学会大会 シンポジウム
2009.10.23 神戸

2) 海外

原著論文 2件

Phosphoproteomic profiling of ERK MAP kinase signaling reveals a role of phosphorylation in the interaction of nucleoporins with transport factors.

Kosako H, Yamaguchi, N, Aranami C,

Ushiyama M, Kose S, Imamoto N, Taniguchi H, Nishida E, Hattori S. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16:1026-1035, 2009.

Phosphorylation of Nephrin Triggers Ca²⁺ Signaling by Recruitment and Activation of Phospholipase C- γ 1.

Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S. *J Biol Chem.* 284:8951-8962, 2009.

Temporal perturbation of tyrosine

phosphoproteome dynamics reveals the system-wide regulatory networks.

Oyama M, Kozuka-Hata H, Tasaki S, Semba K, Hattori S, Sugano S, Inoue J, Yamamoto T. *Mol Cell Proteomics.* 8:226-231, 2009.

H. 知的所有権の出願状況・取得状況（予定を含む）

本分担研究で同定した川崎病患者特異的自己抗体の抗原による ELISA 測定系を特許出願の予定である。症例数を増やして解析する必要があり、症例数が揃った時点で出願を予定している。

図 1

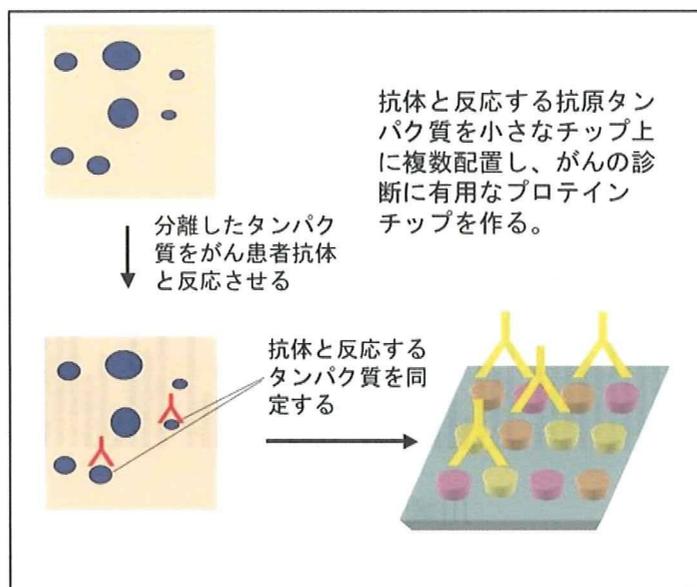


図1. 川崎病自己抗原同定のスキーム

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) の抽出液を二次元ゲル電気泳動で展開し、タンパク質をPVDF膜に転写後に、患者血清を用いたウェスタンブロット法によって自己抗体が反応するスポットを同定する。さらに質量分析法によって、スポット中のタンパク質を同定し、抗原タンパク質を用いた診断用チップを開発する。

図 2

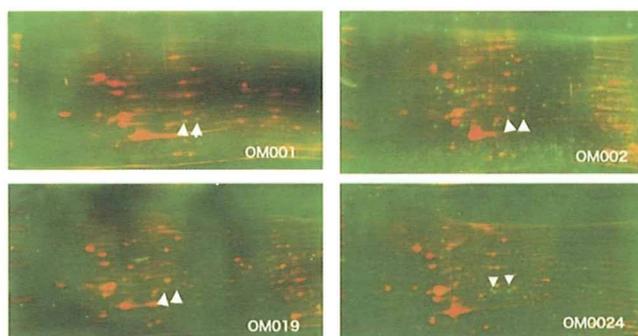


図2. 川崎病患者血清で共通に認められた自己抗体パターン
HUVEC抽出液を抗原とし、患者血清を用いたウェスタンブロット法により、共通に反応する抗原スポット(矢頭)が認められた。

図 3

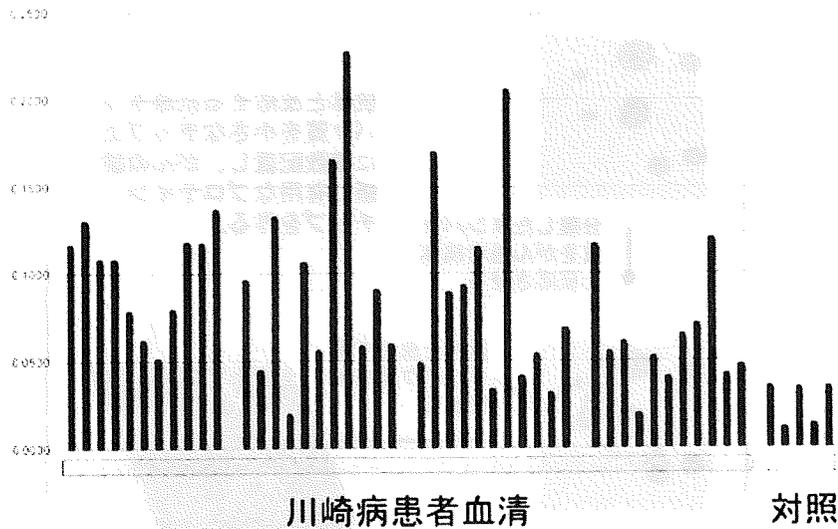


図3. 川崎病患者血清の抗原タンパク質Aに対する反応性
 抗原タンパク質Aを用いたELISA測定系により、抗体価を定量的に評価した。その結果、カットオフ値を0.071に設定した場合、44例中25例(57%)の患者血清が陽性と判定されたのに対し、正常血清は6例中で陽性試料はなかった。

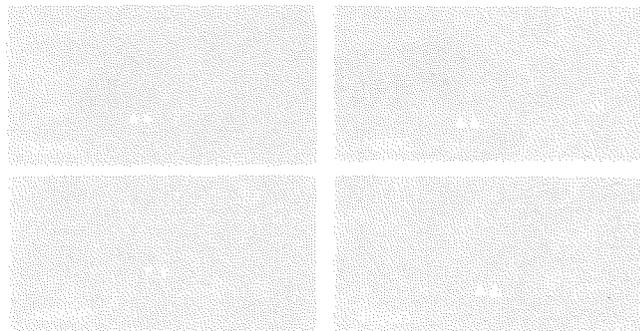


図4. 川崎病患者血清の抗原タンパク質Aに対する反応性
 抗原タンパク質Aを用いたELISA測定系により、抗体価を定量的に評価した。その結果、カットオフ値を0.071に設定した場合、44例中25例(57%)の患者血清が陽性と判定されたのに対し、正常血清は6例中で陽性試料はなかった。

図4

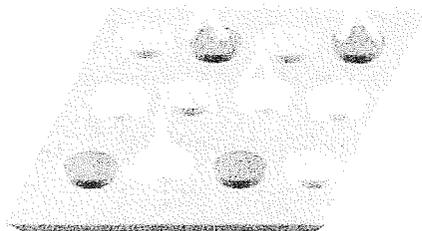


図4. 診断チップの概念図

川崎病患者に特有の自己抗体が反応する細胞成分を同定し、チップ上に配置する。患者血清をチップと反応させ、どの抗原に反応したかを検出することで、川崎病の診断に用いる。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

難治性川崎病のバイオマーカーの検討

分担研究者 阿部淳 国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部免疫療法研究室 室長

研究協力者 小穴慎二 国立成育医療センター総合診療部 医長

伊藤秀一 国立成育医療センター第1専門診療部腎臓科 医長

研究要旨：難治性川崎病を早期に診断するサイトカイン/バイオマーカーについて評価する目的で、IVIG 療法前後での血漿中のサイトカイン濃度および好中球の PRV-1 蛋白量を測定した。その結果、初回 IVIG 療法に対する反応性を予測する上でも、また後遺症としての冠動脈障害の発生を予測する上でも、PRV-1 が感度、特異度ともに最も優れたバイオマーカーであることが示された。

A. 研究目的

川崎病の標準治療である免疫グロブリン大量静注療法（IVIG 療法）に反応しない不応例が約 16%存在し、その約 25%が心後遺症を合併する難治性川崎病である。本研究は、難治性川崎病を早期に診断して適切な治療方法を選択するためのサイトカイン/バイオマーカーについて評価することを目的とする。

B. 研究方法

(1) IVIG 療法およびインフリキシマブ療法前後での血漿中のサイトカイン（IL-6, IL-8, G-CSF, sTNFR1, sTNFR2）濃度を測定した。測定にはサスペンションビーズアレイによるマルチプレックスアッセイ（BD バイオサイエンス）を用いた。

(2) IVIG 療法およびインフリキシマブ療法前後での好中球の膜蛋白 CD177

（polycythemia rubra vera 1, PRV-1）の発現量を定量した。測定には蛍光標識抗 CD177 抗体（BD バイオサイエンス）による免疫染色とフローサイトメトリーを用いた。

(3) IVIG 療法に対する治療反応性や冠動脈障害の発生を予測する上での、これらのサイトカイン/バイオマーカーの有用性について検討した。

C. 研究結果

国立成育医療センターでは、急性期川崎病患者のサイトカイン/バイオマーカーの測定を 2008 年 9 月に開始した。以降、2009 年 12 月までの 16 カ月間で対象患者数は 101 名、測定件数は 213 件になった。月別の患者数と測定件数を図 1 に示す。これまでに疫学調査から知られている通り、患者数、測定件数ともに 12 月から 1 月にかけてピークが見られた。患者 1 名当たり