

201015018B

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

臨床研究・予防・治療技術開発研究事業

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

(H20-臨床研究-一般-008)

平成20年度～22年度 総合研究報告書

平成24年4月

代表研究者：佐地 勉

厚生労働科学研究費補助金 医療技術実用化総合研究事業
臨床研究・予防・治療技術開発研究事業

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究課題

「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」
(H20- 臨床研究 - 一般 -008)

研究代表者 佐地 勉 (東邦大学医療センター大森病院 小児科 教授)

目 次

I. 総合研究報告

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 (RAISE study) …………… 1
佐地 勉

II. 分担研究報告

1. 研究参加施設リクルート …………… 27
森川 昭廣
2. 研究事務局運営 …………… 32
小林 徹
3. データセンターの取り組み …………… 42
中村 哲也
4. 中間解析の方法論と実施、および主要・副次評価項目における最終解析 …………… 51
竹内 一夫
5. 患者背景・血液検査結果と臨床予後との関連 …………… 57
荒川 浩一
6. 心筋・血管バイオマーカーによる川崎病不全型症例の早期予知に関する研究 …………… 72
小川 俊一
7. 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の臨床学的意義 … 81
濱岡 建城

8. 川崎病急性期末梢血単核症におけるユニークな活性化状態	90
原 寿郎	
9. 難治性川崎病における血管内皮細胞特異的サイトカインの動態と 川崎病急性期における miRNA による NF- κ B を中心とした自然免疫応答による 制御機構の解明	103
市田 路子	
10. 治療効果に影響する遺伝因子解析システムの構築	110
阿部 淳	
11. 川崎病の重症度評価	121
野村 裕一	
12. 川崎病の免疫グロブリン不応例に対するステロイドパルス療法の 効果と免疫グロブリン・ステロイド初期併用投与の副腎皮質抑制の検討	138
三浦 大	
13. 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比較試験	142
鮎澤 衛	
14. 冠動脈超音波検査法の検討 — 冠動脈同定率と検出率—	150
布施 茂登	
15. Primary endpoint に関連する冠動脈内径測定精度の検証	158
加藤 太一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	167
IV. 研究成果の刊行物・別刷	187

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総合研究報告
（平成 20 年度～平成 23 年度）

重症川崎病患者に対する免疫グロブリンと免疫グロブリン・プレドニゾン
初期併用投与のランダム化比較試験（RAISE Study）

研究代表者	佐地 勉	東邦大学医療センター大森病院 小児科	教授
分担研究者	森川昭廣	社会福祉法人希望の家附属北関東アレルギー研究所	所長
	小林 徹	群馬大学大学院小児科学分野	助教
	中村哲也	群馬大学医学部附属病院臨床試験部	副部長
	小川俊一	日本医科大学付属病院小児科	教授
	竹内一夫	埼玉大学教育学部	教授
	荒川浩一	群馬大学医学研究科小児科学	教授
	濱岡建城	京都府立医科大学小児循環器・腎臓科	教授
	原 寿郎	九州大学小児科	教授
	市田路子	富山大学医学部小児科	准教授
	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
	野村裕一	鹿児島大学小児発達病態分野	准教授
	三浦 大	東京都立小児総合医療センター 循環器科	部長
	鮎沢 衛	日本大学医学部小児科学系小児科学分野	准教授
	布施茂登	NTT 東日本札幌病院小児科	医長
	加藤太一	名古屋大学大学院 小児科学	講師
研究協力者	高月晋一	東邦大学医療センター大森病院小児科	助教
	監物 靖	東邦大学医療センター大森病院小児科	助教
	大谷哲也	国立成育医療研究センター研究所	共同研究員
	下山伸哉	群馬県立小児医療センター循環器科	医長
	関 満	群馬県立小児医療センター循環器科	医長
	土屋恵司	日本赤十字社医療センター小児科	部長
	安田謙二	島根大学小児科	助教
	勝部康弘	日本医科大学小児科	准教授
	池田和幸	九州大学大学院医学研究院成長発達医学	診療講師
	田中珠美	九州大学大学院医学研究院成長発達医学	学術研究員
	高田英俊	九州大学大学院医学研究院成長発達医学	准教授

山村健一郎	九州大学大学院医学研究院成長発達医学	特任助教
永田弾	九州大学大学院医学研究院成長発達医学	臨床助教
松尾知子	九州大学大学院医学研究院成長発達医学	技術補佐員
山口賢一郎	国立病院機構小倉医療センター小児科	医員
楠原浩一	産業医科大学小児科	教授
水野由美	福岡市立こども病院・感染症センター小児感染症科	部長
土方敦司	理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ	
小原 収	理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ	グループディレクター
廣野恵一	富山大学医学部小児科	助教
斎藤和由	富山大学医学部小児科	助教
高崎一朗	富山大学遺伝子実験施設	助教
尾内善広	千葉大学大学院公衆衛生学	講師
玉目琢也	東京小児総合医療センター循環器科	医員
福島直哉	東京小児総合医療センター循環器科	医員
知念詩乃	東京小児総合医療センター循環器科	医員
松岡 恵	都立小児総合医療センター循環器科	医員
横山晶一郎	都立小児総合医療センター循環器科	医員
大木寛生	都立小児総合医療センター循環器科	医長
澁谷和彦	都立小児総合医療センター循環器科	部長
坂本なほ子	国立成育医療研究センター研究所	室長

研究要旨：RAISE Study 研究班は平成 20 年にスタートし、日本における川崎病研究では最初となる多施設共同前方視的ランダム化比較試験を行い、この研究の最終目標であった IVIG + プレドニゾロン療法がこれまで約 30 年間近く続いてきた IVIG 単独療法よりも、より冠動脈瘤の頻度を統計学的に高い確率で有意に低下させることを証明した世界に誇れる結論であると考えられる。しかも、それを中間解析の段階で成し遂げたということも画期的である。

その結果は 2012 年 3 月 8 日付*で The Lancet に掲載されることが決定した。この結果は、日本のみならず世界の川崎病に関わる研究者にも朗報となることは確実であり、多くの子ども達が冠動脈瘤という生涯の合併症から身を守ることが可能となる。

そして、このような歴史的な研究成果を厚生労働省科学緩急費補助金研究の 1 つとして発表することができ、また、日本を代表する川崎病診療施設の参加が得られて出来たということは、今後の薬剤臨床試験の新しいモデルとなると確信している。

最後に、この study に御協力頂いた全国の小児科医、厚生労働省担当者の方々に、心からの深い謝意をお伝えし、研究の総括とする。

* e-publishing go-live 日付

1) 研究施設リクルート：森川昭廣

RAISE Studyを実行するための施設リクルートを行った。サンプルサイズからは年間1000症例以上の研究組織が必要と予想された。

2) 研究事務局運営：小林 徹

RAISE Studyの事務局として研究の運営を行った。Webシステムの管理維持、研究組織維持と新規研究参加施設の開拓、モニタリングレポート作成、画像データの処理等を大きなトラブルなく実施することができた。200例時点で実施した中間解析の結果、効果安全性評価委員会より症例登録停止が勧告され、平成23年4月2日に正式に症例登録中止となった。RAISE Studyによってステロイド初期併用療法の優越性が示された。

3) データセンターの取り組み：中村哲也

データセンターとして、セントラルデータマネジャーの業務について検討した。プロトコルや症例報告書を含む研究関連書類、ホームページ、Web登録システム、データマネジメント業データマネジメント試験全体のデータシート、心臓超音波検査が記録されたDVDに関連した問い合わせは合計608件であった。

4) 中間解析の方法論と実施、および主要・副次評価項目における最終解析：竹内一夫

倫理的配慮から、症例が200例登録された時点で中間解析を行った。Lan & DeMetsの α 消費関数を用いた場合、Fisherの正確確率検定のP値が0.0034を下回ったとき、IVIG+PSL群において統計学的有意に冠動脈病変合併頻度が低いと判断し、その時点で試験中止を推奨する。登録症例200例中194例が適格症例であった。Fisherの正確確率検定によるP値は0.000003であった。本研究が高いレベルで科学的かつ倫理的であったことを意味している。

5) 患者背景・血液検査結果と臨床予後との関連：荒川浩一

①血清中サイトカイン・ケモカイン上昇は治療抵抗例と有意に関連している ②リスクスコアは特に単球・好中球を活性化するサイトカイン・ケモカインと比較的強い相関を示し、内皮細胞障害マーカーとも有意に関連している ③IVIG+PSL療法はIVIG療法に比べ、各種サイトカイン・ケモカイン産生をより強力に抑制する ④IVIG+PSL治療抵抗例では有効例に比べ総ビリルビン、ASTが有意に高値であり、Na、総コレステロールは有意に低値である。

6) 心筋・血管バイオマーカーによる川崎病不全型症例の早期予知に関する研究：小川俊一

川崎病の初期治療前および治療薬3-6カ月後のバイオマーカーについて検討し、免疫グロブリン不応例の予知および不全型の診断にはPTX-3およびTNFR-1が有用であるとの結論を得た。

7) 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の臨床学的意義：濱岡建城
動脈硬化性病変へつながる血小板活性化、酸化ストレス、炎症に関するマーカーを測定し、臨床学的意義を検討した。血小板の活性化は回復期においても持続しており、IVIG不応群ではIVIG治療後も酸化ストレス状態が持続していた。

8) 川崎病急性期末梢血単核症におけるユニークな活性化状態：原 寿郎

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 γ δ 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。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、PBMNCにおいてTNF- α , IL-10, INF- γ 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。

9) 難治性川崎病における血管内皮細胞特異的サイトカインの動態と川崎病急性期におけるmicroRNAによるNF- κ Bを中心とした自然免疫応答による炎症の制御機構の解明
：市田 露子

① 難治性川崎病における血管内皮細胞特異的サイトカインの動態

川崎病の全身の炎症機転はインフリキシマブにより抑制されても、局所の血管炎は抑制されないことが示唆され、冠動脈病変の悪化を十分に阻止できない可能性が示された。

② 川崎病急性期におけるmicroRNAによるNF- κ Bを中心とした自然免疫応答による炎症の制御機構の解明【結論】

miR-93はVEGFAの発現を調節し、川崎病冠動脈病変における重要なシグナル伝達系を担っていると考えられた。

10) 治療効果に影響する遺伝子因子解析システムの構築：阿部 淳

RAISE Studyプロトコールの治療効果と遺伝因子との関連について検討することを目的として川崎病遺伝コンソーシアムを結成した。RAISE Studyにエントリーした川崎病患者や、研究参加施設でフォロー中の川崎病既往患者からDNA検体を収集・保存するシステムを構築した。結果的にRAISE Studyのプロトコールの検証に寄与することはできなかったが、今後の治療研究や病因研究に活用するとともに、遺伝子解析の共同研究を実施するためのプラットフォームとしてさらに発展させる基盤となり得る。

11) 川崎病の重症度評価：野村裕一

不応群のHMGB1値は有意に高値であり($14.8 \pm 11.3 / 9.7 \pm 5.5$ ng/ml, $P=0.006$)、Gunmaスコア4点以上を予測不応例とするIVIG不応スクリーニングの鋭敏度は63%、特異度は68%だったが、Gunmaスコア5点以上とHMGB1高値を予測不応例とすると鋭敏度81%、特異度71%と精度の向上がみられた。pltVEGFは不応群で高値でありIVIG後のpltVEGFは有意に高値が持続していた。またIVIG前のpltVEGFは最大coronary zスコアと有意な正の相関($R=0.524$, $p<0.0001$)がみられた。PCT値も不応群で有意に高値であり($2.3 \pm 3.6 / 1.0 \pm 1.5$ ng/ml, $P<0.005$)、PCT値による不応例予測のcut off値0.5 (ng/mL)は感度85%、精度64%だった。多変量ロジスティック解析を行うと、PCT値のOdds比が最も高かった。

12) 川崎病の免疫グロブリン不応例に対するステロイドパルス療法の効果と免疫グロブリン・ステロイド初期併用投与の副腎皮質抑制の検討：三浦 大

免疫グロブリン療法(IVIG)不応の川崎病に対するステロイドパルス療法(IVMP)の有効性・安全性を当施設と多施設で検討し、副腎皮質機能抑制について調査した。IVIG追加不応例に対するIVMPは、CAL抑制に有用である可能性があるが、有効性と副腎皮質機能抑制などの安全性については多数例での追試が必要である。

13) 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比較試験：鮎澤 衛

リアルタイム3Dエコーによる川崎病の冠動脈各部位の形態評価における有用性を検討した。その結果、3DEは2DEに比べて右冠動脈、回旋枝を含む分岐部の描出にすぐれていると考えられた。また、川崎病に対する免疫グロブリン静注療法(IVIG)の状況と心合併症の発生について全国調査成績を含めて経時的にまとめて検討した。

14) 冠動脈超音波検査法の検討-冠動脈同定率と検出率：布施茂登

冠動脈径に関する研究が進展していない。この問題を解決するために冠動脈の超音波検査方法の標準的方法を確立し、冠動脈内径標準値作成多施設共同研究を実施した。#1、#5、#6の検出率は100%であったが、#11に若干の同定の誤りを認め、#2の検出率が84.5%と低値であった。

15) Primary endpointに関連する冠動脈内径測定精度の検証：加藤太一

RAISE Studyで解析されたPrimary endpointの冠動脈内径測定精度を検証した。検者内誤差は観測値の相関(検者1 $R=0.96$, $P<0.001$ 、検者2 $R=0.97$, $P<0.001$)、冠動脈病変有無の一致(検者1 $\kappa=0.95$ 、検者2 $\kappa=0.97$)いずれも十分信頼に足る精度であることが確認できた。検者間誤差も同様に観測値の相関($R=0.94$, $P<0.001$)、冠動脈病変有無の一致($\kappa=0.92$)と同様に十分信頼に足る精度であることが確認できた。

A. 研究目的

- 1) RAISE Studyを遂行するために必要とされる総川崎病患者数は、エントリー率を40%と仮定すると年間1000症例を超える川崎病症例を持つ施設群が必要不可欠であると予想された。
- 2) 川崎病患者の10～20%はIVIGにより解熱しないIVIG抵抗例であり、新しい治療戦略が現在求められている。新たな多施設共同前方視的前方視的無作為化比較試験(RAISE Study)を平成19年度厚生労働科学研究の支援をいただき計画立案し、平成20年度より3年計画で臨床試験を実施することとなった。RAISE Studyの事務局運営を行った。
- 3) 医療機関におけるデータマネージャーの業務内容は、それまで確立されておらず、治験・臨床研究における明確な位置づけも十分なされていなかった。
- 4) 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。症例が200例登録された時点で、中間解析を行った。
- 5) RAISE Studyのコア・ラボラトリーとして、患者背景・血液検査結果と臨床予後との関連を複数のテーマについて検証することを目的とした。
- 6) 川崎病ないしは川崎病不全型と思われる症例の初期治療前および治療終了3-6か月後に上記バイオマーカーの値を測定し、これらの川崎病免疫グロブリン不応例の予知、および不全型の診断に有用であるかどうか検討した。
- 7) 血小板由来マイクロパーティクル(Platelet-derived microparticle: PDMP)は、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報告されている。川崎病急性期において動脈硬化性病変につながる血小板活性化、酸化ストレスおよび炎症について検討した。
- 8) 【2010年度】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。
【2011-12年度】IVIG不応川崎病に対するIFXの有効性と、IFX投与前後での血清サイトカインの変化を検討した。
- 9) NF- κ BのsignalingはmicroRNA(miR)によるネガティブフィードバック機構によって制御されているという報告がなされた。miRは目的とするmRNAの3' UTRに結合し、遺伝子発現を転写後レベルで抑制する機能性RNAである。
- 10) 川崎病の病因には複数の遺伝的要因と環境要因(感染因子を含む)が関与することが、疫学的な特徴から推測される。本研究では、治療効果に影響する可能性のある遺伝因子を事後的に検出してその影響を評価するシステムを構築することを目的とした。具体的には、国内の川崎病研究者が協力して遺伝研究を行う共同体(コンソーシアム)を結成し、DNA検体を保存・運用できるようにすることを目標とした。
- 11) IVIGを追加する必要性の高い重症例をスクリーニングし、それらの症例において新たな治療戦略を検討することを考えた。組織・細胞障害に関連するサイトカインであるHMGB1と血管炎に関与するサイトカインである

pltVEGF、敗血症の診断や重症度評価に用いられるPCTの重症度評価への応用について検討した。

- 12) IVIG不応の川崎病に対するステロイド療法の有効性・安全性は確立しておらず、小林(群馬)スコアに基づくIVIG不応予測例に対するプレドニゾロン(PSL)併用療法の効果は無作為化比較試験で検証する。
- 13) リアルタイムの3次元エコー(3DE)が臨床に導入されているが、川崎病の冠動脈各部位の形態評価に適している可能性があり、その有用性を検討した。全国調査成績をもとにIVIGの状況と心合併症の発症がどのように変化したか経時的に検討した。
- 14) 欧米にて使用されているZスコア(AHA statement)は、冠動脈の超音波検査による計測方法の統一がなされておらず、回帰分析によりZスコアを算出している統計学的な誤りが存在する。国内外において、信頼性の高い小児の冠動脈内径の標準値曲線は未だ作成されていない。
- 15) Primary endpoint解析担当者の内的/外的妥当性を確認し、Primary endpointの精度確認を行った。

B. 研究方法

- 1) 研究代表者、分担研究者が中心となって、学会・研究会・講演会での啓蒙活動を行った。また、研究参加希望施設に対する研究説明会を行った。
- 2) RAISE Studyの運営を行うため、以下の課題に取り組んだ。
 1. 研究計画書の確定と研究関連書類(研究参加施設登録用紙、説明同意文

書、データシート、有害反応報告書、RAISE StudyかんたんガイドRAISE Studyかんたんガイド心エコー編、外来掲示用ポスター、患者説明用パンフレット)の作成

2. 研究計画書の改訂ならびに英語版プロトコルの作成
 3. 患者説明用ならびに研究者説明用DVDの作成
 4. UMINへの研究参加施設登録と研究者登録、ID・パスワード発行
 5. 症例登録システムの構築と管理維持
 6. 患者向けホームページ・研究者向けホームページの作成と管理維持
 7. メーリングリスト作成と管理維持
 8. 研究参加施設への研究実施説明会開催
 9. 参加施設IRB申請補助
 10. 研究関連資料の納入
 11. 研究参加施設リクルート
 12. 定期・最終モニタリングの実施支援
 13. 最終解析の実施支援
 14. 新たな冠動脈計測方法の開発
 15. 川崎病遺伝コンソーシアム設立
- 3) RAISE studyの研究デザインは多施設共同非盲検無作為化比較試験であり、症例登録は最小化法を用いた動的割り付けとし、UMIN-INDICEによりWeb上で行った。データセンターでは種々の業務手順書を作成し、データ管理業務を遂行した。
- 4) 不適格症例を除いたところ、194例が解析対象であった。PROBE法で中央解析を行った心エコー結果で、冠動脈病変があった場合をエンドポイント陽性とした。Fisherの正確確率検定を実施し、有意確率を得た。中間解析結果は効果・安全性評価委員会に提出された。

効果・安全性評価委員会から、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こととしていた。

- 5) 残血清は速やかに-80℃に血清保存し、保存血清はBioPlex suspension array systemを用いて、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、TNF α 、IFN γ 、GCSF、MCP-1、MIP-1 α を、ELISA法にてICAM-1を測定した。1g群、2g群においてエンドポイントをIVIG治療に対する初期IVIG不応・再燃、冠動脈一過性拡大、冠動脈瘤とし、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。各群間における登録前血液検査結果と患者背景と臨床予後(治療抵抗例)との関連をMann-WhitneyのU検定、もしくはFisherの直接確率法にて検定した。
- 6)
1. TNF- α (tumor necrosis factor- α)
 2. (ケモカイン)バイオマーカーである monocyte chemoattractant preotein-1 (MCP-1)
 3. 血管炎マーカーである可溶性接着因子 sICAM-1
 4. 血管炎症のバイオマーカーであるPTX-3
 5. 血管作動性物質であるEndothelin-1
 6. 心筋のストレスマーカーであるBNPおよびNT-proBNPを予定した。
 - 7) 血漿のPDMPをELISA法で測定し血小板1万あたりのPDMP値で評価した。酸化ストレス指標としてreactive oxygen metabolites (ROM)、抗酸化

力指標として biological antioxidant potential (BAP)、炎症性マーカーとして高感度CRP、IL-1, 2, 6、およびTNF- α を測定した。

- 8) 【2010年度】末梢血における活性化T, B, NK細胞の割合を解析した。CD69, HLA-DR, CD25を活性化マーカーとして用いた。免疫学的profileをさらに解析するために、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞、B細胞についてCD69陽性細胞の割合を解析した。mRNA発現レベルを解析するために、PBMCsを分離し、cDNA microarrayを行った。定量的RT-PCR法を用いてmRNA発現レベルを解析する目的で検体を採取した。

【2011-12年度】

IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF- α , IL-12p70を測定した。

- 9) 末梢血単核球細胞を分離し、mRNAおよびmiRのmicroarrayを施行した。
- 10) 川崎病の遺伝子研究を協働して進める「川崎病遺伝コンソーシアム」を組織する。本疾患における遺伝子研究の必要性とDNA保存の有用性について書面による説明を行い、同意が得られた患者から採血しDNAを抽出して保存するシステムを構築する。心後遺症の発生との関連が報告されている遺伝因子、あるいはコンソーシアム内で新たに合意された遺伝因子について、遺伝子多型解析や機能解析を行い、治療効果への影響を検討する。
- 11) IVIG前、IVIG後、遠隔期とコントロール群の治療前の血清を用いてHMGB1とVEGFをELISA法で測定した。PCT値は免疫化学蛍光法で測定した。
- 12) IVIG (2 g/kg/24時間)とアスピリン

経口投与(30～50 mg/kg/日)を行った。IVIG終了48時間後も37.5℃以上の発熱を認める例を不応例とし、同量のIVIGを追加した。さらに発熱が続く例をIVMP(30 mg/kg/日を3日間)後PSL経口投与(PSL後療法、1～2 mg/kg/日で開始、2週間で漸減)で加療した。自治医科大学公衆衛生学教室による川崎病全国調査のデータ用紙を用いて主にCAL合併率について検討した。臨床経過と治療前・1週間後・2週間後のACTHとコルチゾールの測定値を比較した。

13) 2DE、3DEにおける冠動脈の枝(LAD、LCX、RCA)別の描出スコアとスコアの合計を比較検討した。第9回～第21回の26年間に亘る川崎病全国調査成績から、心合併症発生率または合併症患者数を引用し、経時的に検討した。

14) 小児冠動脈内径標準値作成多施設共同研究実施計画書を作成した。

15) 対象は平成20年9月29日～平成22年12月2日の期間にRAISE Studyに登録されたりスクスコア5点以上の重症川崎病患者248症例。冠動脈内径計測にはOAサイエンス社(宮崎、日本)のPVStudio 2Dを用い、最大拡張部位の内径(trailing edge to leading edge)を3倍程度にデジタル拡大した後に計測した。冠動脈病変の定義は以下の通りである。

- ① 5歳未満：冠動脈内径3.0mm以上
- ② 5歳以上：冠動脈内径4.0mm以上
- ③ 近傍の正常冠動脈内径の1.5倍以上
- ④ 内腔が明らかに不正

画像解析担当者は小児超音波検査に精通した小児循環器専門医2名とした。

2名の画像解析担当者は独立して解析を行った。解析ソフトはIBM SPSS STATISTICSを用いた。

C. 研究結果

1) 研究開始時に登録された施設は25施設、総症例数700症例であった。

合計75施設が最終的な研究参加施設となった。

2) 平成20年度前半に新規研究関連書類の作成や修正を行い、症例登録開始時には研究計画書・研究関連書類の大部分を確定させた。国際的に権威ある医学雑誌に掲載するため、英語版プロトコルの作成を行い、英語版ホームページにて公開した。患者家族に病態とRAISE Studyについて説明するDVDを作成した。心エコー撮影方法の標準化と機材使用方法の周知徹底を目的とした研究者向けDVDも作成した。UMIN INDICEの全面的な支援を頂き、web割り付けシステムを開発した。研究情報を一般向けに発信するための患者家族向けサイトを公開した。研究者向けサイトに加え、メーリングリスト整備を行った。参加施設への研究実施方法の説明会を全体として2回開催した。IRB申請書類やIRB許可証を研究者向けサイトに掲載した。平成22年2月現在で全国74施設が参加施設として登録された。データセンターによる年二回の定期モニタリング、最終モニタリング実施を支援した。Endpointの盲検化としてPROBE法を用いたため、4点における心エコー録画とその中央解析が必須となった。盲見化されたデータは2回計測し、

intra- and inter-observer reliability は共にカッパ値0.9以上と最高水準の精度を得ることができた。デジタル録画された心エコー動画の冠動脈径計測を行うため、最も簡便にかつ正確に計測できる画像解析ソフトウェアとしてPV-Studio 2D (O Aサイエンス社製)を使用した。冠動脈径z scoreは現行のデータでは信頼性が不十分であったため、正常小児6600人を収集し、前向きコホート研究を開始した。平成23年12月現在で約4000例の正常小児冠動脈内径データが集積され、現在最終解析を実施中である。川崎病遺伝コンソーシアムを組織し、RAISE Study参加機関を中心としたコホート研究を行うこととした。

- 3) 約2年間の準備期間でプロトコルや症例報告書を含む研究関連書類、ホームページ、Web登録システム、データマネジメント業務手順書を作成した。試験全体のデータシート、心臓超音波検査が記録されたDVDに関連した問い合わせは合計608件であった。逸脱の可能性がある症例は32例認めた。6例が適格基準に該当せず最終解析から除外された。
- 4) 200例の追跡が終了した時点で、中間解析を実施した。適格症例は194例であった。IVIG群98名中26名(26.5%)に冠動脈病変が見られたのに対し、IVIG+PSL群96名における同発症頻度は3名(3.1%)、P値は0.000003であった。優越性が確認されたため、中間解析レポートとして、効果・安全性評価委員会へ提出した。平成20年12月2日に症例登録が停止された。

2014例の川崎病(以下KD)の治療患児のうち、1436例はリスクスコアが低く不適格であった。125例がIVIG+PSL群に、123例がIVIG群に割り付けられた。組入後、242例のデータを解析対象とした。CAA発生率はIVIG+PSL群で有意に低かった(IVIG+PSL群3%対IVIG群23% $P<0.0001$ 、リスク減少0.20、Number Needed to Treat (NNT) =5)。登録後4週目のCAA発生率もIVIG+PSL群で有意に低かった(3%対13%、 $P=0.014$)。ZスコアはIVIG+PSL群で有意に小さかった。IVIG+PSL群はIVIG群に比べ有意に短期間で解熱した($P<0.0001$)。追加治療の発生率はIVIG+PSL群で有意に低かった(13%対40%、 $P<0.0001$)。IVIG+PSL群では32回の追加治療が行われた。IVIG群では90回であった。IVIG+PSL群は白血球数が1週目、2週目は高く、ヘマトクリットは1週目、2週目、および4週目すべてで高かった。血小板数は4週目が低かった。ASTは2週目、4週目で低かった。血清Naは4週目で高かった。CRPは1週目、2週目が低かった。

- 5) IVIG抵抗例ではIL-6、IL-7、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、リスクスコアが統計学的有意に高値であった。高リスク患者では低リスク患者に比べIL-6、IL-7、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、ICAM-1が有意に高値であった。また、リスクスコアと各パラメーターとの相関分析ではIL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、ICAM-1とリスクスコアが統計学的に有意な関連を認めた。IL-6、IL-10、G-CSF、

ICAM-1はIVIG群に比べIVIG+PSL群においてより早期に低値となっていた。各群間の初期IVIG治療不応・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統計学的有意差を認めなかった。初期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0.80前後であり同等の予測確率であった。治療抵抗例では有効例に比べ好中球%、総ビリルビン、BNP、リスクスコア点数が有意に高値であった。治療抵抗例では有効例に比べ総ビリルビン、ASTが有意に高値であり、Na、総コレステロールが有意に低値であった。IVIG+PSL群における治療抵抗例予測の予測効率を検証するためのROC曲線下の面積は総ビリルビン 0.78、Na 0.28、総コレステロール 0.34、AST 0.63であった。

6) IVIG反応例と不応例におけるIVIG前の各種バイオマーカー：TNFR-1およびPTX-3はIVIG不応例において有意に高値を呈した。群馬スコアとPTX-3、TNFR-1との間にも比較的良好な相関関係が認められた。

7) 治療開始前の川崎病例のPDMPは有意に高値であった。PDMPは施行後に有意に低下した。IVIG奏功群のROMは、IVIG治療直後には 567.0 ± 96.1 U.CARR ($P < 0.05$ vs. IVIG直前)に、またIVIG治療2週後には 448.6 ± 75.2 U.CARR ($P < 0.01$ vs. IVIG治療直後)へと経過とともに速やかに低下していた。IVIG不応群のROMは、IVIG直前はIVIG奏功群と同様に明らかに高値

(566.5 ± 43.3 U.CARR、 $P < 0.01$ vs. control)を示したが、IVIG初回治療直後には有意の低下を示さなかった(544.8 ± 71.2 U.CARR, n. p vs. IVIG治療直前)。

8)

1. Flow cytometry法を用いた、川崎病急性期におけるT, B, NK細胞の活性化マーカーの解析

CD69+ B細胞の割合は急性期に比較して回復期で有意に上昇していた。また、CD56+CD16+, CD16+CD56-NK細胞におけるCD69陽性細胞の割合が川崎病回復期に比較して急性期で有意に高値だった。γδT細胞におけるCD69陽性細胞の割合が回復期に比較して急性期で有意に高値だった(中央値 急性期 17.9%、回復期 7.9%、 $p < 0.0005$)。

2. cDNA Microarray法を用いた、川崎病患者PBMNCsの遺伝子発現解析

川崎病急性期患者PBMNCsで2倍以上発現の高い遺伝子が658存在した。Pathway解析を行ったところ、川崎病急性期と有意に相関のあるpathwayが36存在し、そのうち上位12pathwayを示した。自然免疫に関与しているToll-like receptor (TLR) signaling pathway、NK細胞関連細胞傷害性 pathwaysは、一部up-regulatedしていた。マイクロアレイ解析の結果、正常対照に比較して川崎病患者PBMNCsで3倍以上発現の高い遺伝子が47存在し、その10遺伝子のうち、自然免疫系に関与しているものが5遺伝子存在した。自然免疫、獲得免疫系の双方に関連のあるものが3遺伝子存在した。

3.川崎病患者におけるサイトカイン解析

【マイクロアレイ解析】

自然免疫と関連のあるS100A9やS100A12遺伝子、またhepatocyte growth factor(HGF)遺伝子は、正常対照に比較して川崎病急性期で2倍以上、発現が高値だった。

【定量的RT-PCR法による解析】

S100A9やS100A12遺伝子発現レベルは、川崎病回復期に比較して急性期で有意に高値を示した。

4. 細胞内サイトカイン染色

flow cytometry法を用いて、川崎病患者(急性期・回復期)PBMNCsの細胞内サイトカイン染色を行った。単球におけるTNF- α もしくはIL-10産生細胞の割合や、T細胞におけるIFN- γ もしくはIL-10産生細胞の割合は、急性期と回復期で有意な変化は認められなかった。

今回、当科で経験したIVIG不応川崎病に対するIFXの有効性と、IFX投与前後での血清サイトカインの変化について検討を行った。IL-6はIFX治療により有意に低下した。さらに、IFX治療後に追加IVIGを要した症例は、血清IL-6値は、IVIG+群で有意に高値を示した。【目的】インフリキシマブの血管炎に対する作用機序を明らかにした。【方法】IVIG反応群18例とIVIG不応群14例についてもサイトカイン動態を解析し、インフリキシマブ投与群と比較検討を行った。【結果】インフリキシマブ投与例ではSTNFR、IL-6はインフリキシマブ投与前に有意に高値を示し、投与後に低下したが、MRP8/MRP14およびS100A12はむしろインフリキシマブ投与後に増加し、VEGFは変化

なく高値を示し続けた。

9) 【研究要旨】病態の進展にmicroRNA(miR)が重要な役割を担っていると仮定し、急性期川崎病に関するmiRを明らかにし、messenger RNA (mRNA)との関連を検討した。末梢血から単核球細胞を分離し、mRNAおよびmiRのmicroarrayを治療前後で施行した。【結果】全847miRのうち、川崎病に特異的と考えられるmiRは以下の5種あり、治療前、コントロールと比較して、miR-93, miR-877は発現が有意に低下、miR-92b, miR-182, miR-296-5pは発現が有意に亢進していた。治療後、これら5種のmiRの発現はすべて正常化した。治療前後で有意に変化したmRNAは12種であった。これらのうち、miR-93によって制御されていると報告のあるVEGFAの発現も治療によって正常化した。miR-93とVEGFAの発現を調べると強い負の相関を認めた($R^2=0.9683$)。同患者の血清中VEGFAは、VEGFAのmRNAと同様、治療により速やかに低下し、VEGFAと強い正の相関を示した。

全847miRのうち、健常対照群と有意差のあったmiRは9種(発現亢進6種 低下3種)であった。更に熱性疾患群と比較し、川崎病に特異的と考えられるmiRは以下の5種あり、治療前、コントロールと比較して、miR-93, miR-877は発現が有意に低下しており、miR-92b, miR-182, miR-296-5pは発現が有意に亢進していた。治療後、これら5種のmiRの発現はすべて正常化した。miR-93によって制御されていると報告のあるVEGFAの発現も

治療によって正常化した。miR-93とVEGFAの発現を調べると強い負の相関を認めた。同患者の血清中VEGFAの値をELISAキットによって測定すると、VEGFAのmRNAと同様、治療により速やかに低下し、VEGFAと強い正の相関を示した。

10) 2010年2月に「川崎病遺伝コンソーシアム」が結成された。本コンソーシアムは、「川崎病の疫学やゲノムに対する知識を深め、川崎病の発症や重症化をより有効に予測し予防するための新しい研究計画を立案するために協力すること(規約第3条)」、および「川崎病DNAバンクを設置して遺伝に関する共同研究を推進すること(同4条)」を目的とする。さらに、共同研究を行う上で必要な機密保持や参加施設の権利と義務、知的財産権保護についても一定の合意に達した(同7～9条)。本コンソーシアムは2010年2月から2015年3月まで活動する予定である。参加施設で保存されている川崎病患者の既存検体について調査したところ、約2,000名分のDNA検体がコンソーシアムでの研究に使用可能であることが分かった。既存のDNA検体を用いた2つの研究プロジェクトが開始された。一つは、コンソーシアム参加機関である東邦大学およびその他の医療機関において収集された川崎病患者を解析対象としたゲノムワイド関連解析で、研究協力者らにより理化学研究所において実施した。もう一つは、中核施設でコンソーシアム発足以前に収集された川崎病患者のDNA検体を用いた候補遺伝子探索型のSNP解析である。これまでに得られた

知見をSNP解析で検証する試みを進めている。

11) 不応群のHMGB1値は有意に高値であり($14.8 \pm 11.3 / 9.7 \pm 5.5$ ng/ml, $P=0.006$)、Gunmaスコアも有意に高値だった($5.1 \pm 2.9 / 2.7 \pm 2.1$, $P < 0.001$)。Gunmaスコア5点以上とHMGB1高値を予測不応例とすると鋭敏度81%、特異度71%だった。pltVEGF ($\times 10^{-8}$ pg)は川崎病群で有意に高値だった。IVIG前のVEGFは不応群が有意に高値だった。IVIG後のpltVEGFは高値が持続していたおり(図1)、反応群と有意差を認めた。不応群のPCT値も有意に高値だった($2.3 \pm 3.6 / 1.0 \pm 1.5$ ng/ml, $P < 0.005$)。CAAのある例のPCT値はCAAのない例より高値だったが有意差は認めなかった($P=0.081$)。

ROC解析により得られたPCT値による不応例予測のcut off値0.5 (ng/mL)は感度85%、精度64%だった。多変量ロジスティック解析を行うと、PCT値のOdds比が最も高かった(オッズ比 6.2、95%信頼区間 1.4-27.4)。川崎病主要症状の発熱とリンパ節腫脹のみを呈した16例(KDiL)を比較検討したところ、KDiL群では有意に不応例頻度が多く冠動脈後遺症頻度も有意に多かった。不応例もしくはCAAへの関与をLogistic回帰分析を行うと、KDiL、リンパ節腫脹、早期入院、IVIG開始病日、白血球数高値、CRP高値が不応例のリスクだった。ロジスティック解析では6症状があることは、IVIG不応の有意なリスクであることが示された。高Gunmaスコア例中の不応例は

16例だったが、そのほとんどである14例(88%)が6主要症状例だった。

- 12) 初回IVIG不応の74例に追加IVIGを行った。さらに不応の21例をIVMP・PSL後療法で加療した。発症4週目のCALは、IVIG反応例に1例、IVMP・PSL後療法例に2例の計3例に認めた。巨大瘤はなかった。全国調査の川崎病2825例のうち、2588例(91.6%)に初回IVIGを行った。初回IVIG不応の462(17.9% [2588人のうち])例に追加IVIGを行い、追加IVIG不応の154例をIVMP(136例)、インフリキシマブ(10例)、3回目のIVIG(4例)などで加療した。CALは計77例(2.7% [2825人中の]); 拡大55、瘤17、巨大瘤5)に認めた。治療開始後にP群ではACTHもコルチゾールも低値の傾向があった。
- 13) LADでは両者に有意差はなかった。LCX、RCAでは3DEの方が2DEに比べ高値であったが、LCXのみ有意差を認めた。全体の比較では3DEが2DEに比べ有意に高かった。

表2. 冠動脈描出能

	2DE	3DE	有意差
LAD	2.4±0.6	2.6±0.5	n.s.
LCX	1.1±0.7	2.0±0.6	p<0.01
RCA	2.1±0.7	2.6±0.5	n.s.
Total	5.6±1.5	7.3±1.4	p<0.01

心合併症全体の発生率は、全調査期間を通じて減少しており、直近の21回調査(2009.10年対象)では3%であった。直近では約75%の例が2g/kg単回投与を実施されていた。拡大と瘤の減少は

ほぼ直線的で、2g/kg単回投与認可による減少傾向の変化はなかったが、巨大瘤の推移は、一時的に増加が見られ、以後再び減少傾向にあった。致命率の罹患度改善比は第9回の0.137%から直近第21回の0.0042%の比較で32.6であった。急性期拡大病変の発生数は継続的に減少しておらず、後遺症期拡大と急性期および後遺症期の瘤は直線的減少ではあるが、発生率の推移に比べて勾配は緩やかであった。致命率の罹患度改善比は第9回の28例から直近第21回の1の比較で28.0であった。

- 14) 平成22年4月より症例登録を開始した。結果、日本全国50施設以上が本研究に参加し、症例登録を行うことができた。中間解析の結果、4000例のサンプルサイズで精度が担保できることが確認された。
- 15) 四回の計測全てが±0を中心に正規分布しており、0.5mm以上の誤差があった症例は1%未満と極めて少数例であった。相関係数0.96 (P<0.001)と1回目と2回目の計測結果には非常に強い正の相関を認めた。相関係数0.97 (P<0.001)と1回目と2回目の計測結果には非常に強い正の相関を認めた。検者間誤差は、相関係数0.94 (P<0.001)と2名の計測結果は非常に強い正の相関を認めた。冠動脈病変有無のκ値は0.92と極めて高い一致率であった。

D. 考察

- 1) RAISE Studyは2008年9月29日より開始され、平成22年12月2日現在で248例が登録された。対象となる重症例でRisk score5点以上の患者の割合

は3割であった。RAISE Studyでは一定のペースで症例登録が進み、最終的に53%のエントリー率と予想を上回る結果となった。

2) 実際に研究運営をして行くことによって現在川崎病の診療や研究に関する課題が浮き彫りになってきた。

3) 臨床研究の実施環境の整備については、ここ数年、活発に議論されてきた。平成9年に医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(GCP省令)が制定され(平成9年厚生省令第28号)、欧米と同等の治験の信頼性を確保するための基準が、ICH-GCPの合意等に基づき導入されて以来、治験の環境は徐々に整備されてきた。一方、医師主導臨床試験の環境整備は、一部を除き、国内では出遅れている。

GCP省令の制定に伴い、臨床研究の科学性、倫理性、信頼性を確保するため、治験の契約から実施に係る手続が増加し、また、外国で実施された臨床試験データの受入れが可能となったこと等により、欧米で治験を実施するケースが拡大した。

4) 中間解析の方法として、古典的な Pocockの方法やO'Brien-Flemingの方法があるが、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 α 消費関数を用いる方法で、自由度が高い。本試験で採用予定の α 消費関数を用いた中間解析は、妥当であったと考えられる。

5) 今回の検討で血清中のサイトカインやケモカインといった生理活性物質が治療抵抗例に関連することが明らかと

なった。超重症川崎病患者を初期治療開始前により高い確率で予測できることも可能になるかもしれない。

6) PTX-3がIVIG不応例予知および不全型の診断に有用性の高いバイオマーカーであると推定される。川崎病を疑った際に、BNPまたはNT-proBNPが有意に高値を呈している際には川崎病の不全型を強く疑うべきである。

7) 川崎病では血小板が非常に活性化しており、急性期治療における抗血小板療法必要性を裏付ける結果であった。PDMPが血管炎の病態評価においても有用である可能性が示唆された。不応群においてはIVIG初回投与による有意な変化は見られず、IVIGが直接的にROS生成を抑制しているとはいえないことが示唆された。IVIG不応群のTNF- α が低下しなかったことも、議論の最中である抗TNF- α 療法の根拠となり得る所見と考えられる。

8) 獲得免疫系に関与しているTCR, BCR signaling pathwayがdown-regulateされており、自然免疫系に関連のあるTLR signaling pathway、NK細胞関連細胞傷害性pathwaysは、大部分はdown-regulateされていた。これらの結果から、自然免疫系の受容体を直接介して、ないしはサイトカイン signaling pathwayを介して活性化されることが示唆された。

Microarray解析の結果、正常対照に比較して川崎病患者PBMNCsにおいて3倍以上発現の高かった上位10遺伝子のうち、5遺伝子が自然免疫系に関与していた。急性期および回復期でIL8遺伝子の発現レベルが軽度上昇し

ていた。このことから、末梢血単核球のうち、単球は弱く活性化していることが推測された。ITPKCは恐らく $\alpha\beta$ T細胞というよりはむしろ、自然免疫系の細胞や非免疫系の細胞(内皮細胞)のregulatorとして役割を果たしていることが予想される。

IFXは、TNF α を抑制することにより、その下流であるIL-6の産生や炎症反応、CAL形成を抑制すると考えられる。

9) 全847miRのうち、健常対照群と有意差のあったmiRは9種(発現亢進6種 低下3種)であった。更に熱性疾患群と比較し、川崎病に特異的と考えられるmiRは以下の5種あり、治療前、コントロールと比較して、miR-93, miR-877は発現が有意に低下しており、miR-92b, miR-182, miR-296-5pは発現が有意に亢進していた。治療後、これら5種のmiRの発現はすべて正常化した。miR-93によって制御されていると報告のあるVEGFAの発現も治療によって正常化した。miR-93とVEGFAの発現を調べると強い負の相関を認めた($R^2=0.9683$)。同患者の血清中VEGFAの値をELISAキットによって測定すると、VEGFAのmRNAと同様、治療により速やかに低下し、VEGFAと強い正の相関を示した。

10) 本研究は、RAISE Studyそのものが中間報告段階で早期に成果を上げたために、当初の予定通りの患者検体を収集することができなかった。しかし、DNA検体の収集と保存の体制を計画通りに整えることができたし、参加施設で保存されていた既存検体を用いた候補遺伝子探索型のSNP解析が進行中で

あることなど、遺伝研究を協働して進めるための「インフラ」を整えるという目的は達せられた。

11) 6主要症状例のリスクは、Gunmaスコアによる高リスクと判断された例においては、更に注意すべきものと考えられた。HMGB1やpltVEGF、PCT等の血液検査データだけでなく、川崎病主要症状を用いた川崎病の重症度評価は有用と考えられた。

12) IVIG追加不応例に対するIVMP・PSL後療法では、全例解熱が得られ、CAL合併率は9.5%であった。一方、同様の治療方針を多施設に拡大すると、CALは2.7%であり、IVMPによる抑制効果は十分とは言えなかった。

13) LMT、LADの描出能は2DEと3DEで差は無かった。LCXにおいては3DEでの描出能が有意に優れていた。RCAは、有意差はなかったが、RCAの3DEでのみ描出される例の理由では、RCAが3次元的に走行し、また、拍動による動きが大きいことが要因として考えられる。特に川崎病冠動脈病変の診断に関しては、右冠動脈、回旋枝の描出率が向上し、川崎病の冠動脈エコー診断精度を向上させるために非常に有用性が高いと考えられる。中瘤および巨大瘤、心筋梗塞も発生率はその時点まで順調に減少し、さらに、2003年の2g/kg単回投与認可後、巨大瘤を除いて、発生率としては更に減少してきている。

しかし、患者実数を見ると、一部の病変で発生率の減少ほどの実数減少は見られておらず、とくに急性期の拡大病変では18回調査から19回調査(2003, 04年から05, 06年対象)にかけて、巨