

患者背景・血液検査結果と臨床予後との関連

分担研究者	荒川浩一	群馬大学大学院小児科学分野	教授
研究協力者	小林 徹	群馬大学大学院小児科学分野	助教
研究協力者	下山伸哉	群馬県立小児医療センター循環器科	医長
研究協力者	関 満	群馬県立小児医療センター循環器科	医長
研究協力者	土屋恵司	日本赤十字社医療センター小児科	部長
研究協力者	鮎沢 衛	日本大学板橋病院小児科	准教授
研究協力者	安田謙二	島根大学小児科	助教

研究要旨：本分担研究では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検証した。結果、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ことによって臨床症状の改善と血管炎の鎮静化を誘導する④リスクスコアが2g/kg単回投与の治療レジメに対しても適応可能である⑤IVIg+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、総コレステロールが有意に低値である事を見いだした。今後大規模前向きコホート研究を実施し、本仮説が検証されることが望まれる。

A. 研究目的

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

平成20年度より重症川崎病患者に対する新たな多施設共同前方視的無作為化比較試験(RAISE Study)が開始された。RAISE Studyによって重症川崎病患者に対する免疫グロブリン(IVIg) +プレドニゾロン(PSL)初期併用療法が標準的治療である

IVIg療法に比べ冠動脈病変形成抑制と治療抵抗例抑制に優れていることが前方視的に証明された。

そこで本分担研究では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。

B. 研究方法

(1) リスクスコア点数と各種サイトカイン・ケモカイン濃度との関連

対象患者は2000年8月～2005年3月までの期間に群馬県立小児医療センターに

て初期治療を受けた32例とした。32例中31例は先行研究である無作為化比較試験でIVIG群(18症例)とIVIG+PSL群(14症例)にランダム割り付けを行われた。残りの1症例は家族の希望IVIG+PSL群の治療を行った。全症例の代諾者より書面によるinformed consentを得た。

IVIG群は免疫グロブリン1g/kg×2日間とアスピリン 30mg/kg/dayの併用療法とした。IVIG+PSL群はIVIG群の治療に加え、病初期よりプレドニゾロン 2mg/kg/dayを静注で投与、全身状態改善後内服に変更し、CRP陰性化後15日間かけて漸減中止するプロトコールとした。

対象患者は①初期治療開始前②IVIG終了後24～36時間③IVIG終了後2～3週で血液検査を行い一般血算・生化学・血清検査を行った。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。

IVIG抵抗例を初期治療開始前に予測するリスクスコアを表1に示す。IVIG投与前までのデータを用いて7つの変数の総和をリスクスコア点数として計算した。川崎病診断前に複数回血液検査が施行されている場合、AST、CRP、好中球%は最高値を、Na、血小板数は最低値を代表値とした。スコア点数5点以上をIVIG抵抗例高リスク患者と定義した。

統計学的検討は対応のない連続変数にはMann-WhitneyのU検定を、対応のある連続変数にはWilcoxonの順位和検定を用いた。リスクスコアと各パラメーターとの

関連はSpearmanの相関分析を行った。検定は全て両側とし、 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

(2) リスクスコアの外的妥当性検証

対象患者は2000年8月～2009年7月までの期間に群馬大学、群馬県立小児医療センター、群馬県済生会前橋病院、前橋赤十字病院、群馬中央総合病院、桐生厚生総合病院、館林厚生病院、原町赤十字病院、利根中央病院、高崎総合医療センター、藤岡総合病院、伊勢崎市民病院、深谷赤十字病院、日本大学板橋病院、日本赤十字医療センター、島根大学にてIVIGを含む初期治療を受けた川崎病患者1626例とした。1626例中990例がIVIG 1g/kg/日×2日間投与(1g群)、636例がIVIG 2g/kg/日×単回投与(2g群)をうけた。1g群は全例がIVIG開始後36時間以内に投与が終了していた。アスピリンは30mg/kg/dayで併用投与を行い、CRP陰性化後に5mg/kg/dayへ減量とした。

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

1g群、2g群においてエンドポイントをIVIG治療に対する初期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。

(3) IVIG+PSL治療抵抗例に関連する因子の抽出

対象患者は2008年9月29日～2010年12月2日までの期間にRAISE Studyに登録された248例中、最終解析に至ったIVIG+PSL群121症例とIVIG群121症例の計242症例。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。両側検定で $P < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

C. 研究結果

(1) リスクスコア点数と各種サイトカイン・ケモカイン濃度との関連

1. 臨床転帰と各パラメーターとの関連

IVIG群18例中4例がIVIG抵抗例(全例初期治療不応)であり、そのうち3例が冠動脈病変を合併していた。一方、IVIG+PSL群では14例中2例がIVIG抵抗例(全例再燃)であり、そのうち1例が冠動脈病変を合併していた。

IVIG抵抗例ではIVIG有効例に比べ、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(表2)。

2. リスクスコアと各パラメーターとの関連

リスクスコア5点以上を高リスク患者、4点以下を低リスク患者と定義し、2群間で初期治療開始前の各種パラメーターに差があるか検討を行った結果、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(表3)。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(表4)。

3. 初期治療別・経時的変化

上記検討で統計学的有意差があったIL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、ICAM-1の初期治療別・経時的変化をそれぞれ解析した。IL-6、IL-10、IL-17、G-CSF、ICAM-1はIVIG群、IVIG+PSL群共に初期治療開始後前値に比べ低下していったが、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。

(2) リスクスコアの外的妥当性検証

1g群、2g群間での患者背景・臨床症状は治療開始病日、白血球数、血小板数を除き統計学的有意差を認めなかった(表5)。また、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(表6)。

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。リスクスコアのカットオフ値を5以上としてIVIG不応例の予測を検討したところ、同様に2g群は1g群とほぼ同等の予測確率であった(表7)。

(3) IVIG+PSL治療抵抗例に関連する因子の抽出

IVIG群における治療抵抗例(初期治療不応例・再燃例)と有効例との治療前患者背景・血液検査結果を表8に示す。IVIG群

121症例のうち、52例(40%)が治療抵抗例であった。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。

IVIG+PSL群における治療抵抗例と有効例との治療前患者背景を表9に示す。IVIG+PSL群のうち、17例が治療抵抗例であった。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。リスクスコア点数は全く同等であり、白血球数、BNP、CRP値はIVIG群と異なり治療抵抗例でより低値な傾向であった。

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曲線下の面積を算出した。ROC曲線下の面積は総ビリルビン 0.78 (95%信頼区間0.66-0.91)、Na 0.28 (95%信頼区間0.12-0.44)、総コレステロール 0.34 (95%信頼区間0.21-0.47)、AST 0.63 (95%信頼区間0.47-0.79)であった。

D. 考察

本検討により、以下のことが明らかとなった。

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。
3. IVIG+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ことによって臨床症状の改善と血管炎の鎮静化を誘導する。
4. リスクスコアが2g/kg単回投与の治療

レジメに対しても適応可能である。

5. IVIG+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、総コレステロールが有意に低値である。

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。これらのマーカーや遺伝子の情報とをリスクスコアに組み合わせることによって新たな予測モデルを作成し、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。そうすることによって重症度に応じたよりきめ細やかな治療方法の選択をおこなうこと、すなわちテーラーメイド医療の実現が今後の目指す方向性であろう。

IVIG+PSL抵抗例に関連する因子として総ビリルビン、Na、総コレステロール、ASTの4因子が関連していることが明らかとなった。中でも総ビリルビン値、Naは治療抵抗例に強く関連しており、8割近い精度でIVIG+PSL抵抗例を予測することが可能であった。治療抵抗例を早期に抽出し、その上でどのような治療戦略をとるべきかが問題となる。川崎病治療における初期治療不応例に対してはIVIG投与がゴールドスタンダードであると言われている。しかしコントロールスタディーが存在しないためエビデンスレベルは低く、現治療抵抗例に対してどのような追加療法を、もしくは更に強力な初期治療強化療法検討する必要があると考えられる。

これらの研究結果を基に、今後多施設共同の前向きコホート研究を実施し、更に精度の高い研究を実施し検討すべきであろう。

E. 結論

本分担研究によって、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ことによって臨床症状の改善と血管炎の鎮静化を誘導する④リスクスコアが2g/kg単回投与の治療レジメに対しても適応可能である⑤IVIG+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、総コレステロールが有意に低値である事を見いだした。今後大規模前向きコホート研究を実施し、本仮説が検証されることが望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 小林徹、小林富男、荒川浩一. ガンマグロブリン不応例の予測と層別化 小児内科 2009;41:69-72.
2. Kobayashi T, Inoue Y, Otani T, Morikawa A, Kobayashi T, Takeuchi K, Saji T, Sonobe T, Ogawa S, Miura M, Arakawa H. Risk stratification in the decision to include prednisolone with intravenous immunoglobulin in primary therapy for Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:498-502.
3. 小林徹、小林富男、荒川浩一 免疫グロ

ブリン治療抵抗例の予測スコア 小児科臨床ピクシス9 川崎病のすべて 2009: 116-119.

4. Seki M, Kobayashi T, Kobayashi T, Morikawa A, Otani T, Takeuchi K, Ayusawa M, Tsuchiya K, Yasuda K, Suzuki T, Shimoyama S, Ikeda K, Ishii Y, Arakawa H. External Validation of a Risk Score to Predict Intravenous Immunoglobulin Resistance in Patients With Kawasaki Disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30:145-147.
 5. Kobayashi T, Saji T, Otani T, Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Kato T, Hara T, Hamaoka K, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Seki M, Fukazawa R, Ogawa C, Furuno K, Tokunaga H, Takatsuki S, Hara S, Morikawa A, RAISE Study Group Investigators. Efficacy of immunoglobulin plus prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki disease: a prospective, randomised, open, blinded-endpoint trial. *The LANCET*, in press.
 6. 小林徹、小林富男、荒川浩一. 川崎病急性期治療の進歩. 循環器内科. 69(4):324-329
- ### 2. 学会発表
1. Shimoyama S, Kobayashi T, Inoue Y, Takeuchi K, Kobayashi T, Okada Y, Tamura K, Tomomasa T, Otani T, Arakawa H, Morikawa A. A new

- scoring system to predict intravenous immunoglobulin unresponsiveness in patients with Kawasaki disease. 14th World Congress on Heart Disease, The International Academy of Cardiology Annual Scientific Sessions 2008 Toronto, Canada, 28 July, 2008.
2. 小林徹、佐地勉、森川昭廣、小川俊一、市田路子、野村裕一、三浦大、荒川浩一 川崎病に対する新規治療法を開発するための多施設共同無作為化比較試験 (RAISE Study) 第35回日本小児臨床薬理学会 2008年12月6日 東京都新宿区
 3. 小林徹、小林富男、池田健太郎、石井陽一郎、鈴木尊裕、下山伸哉、岡田恭典、渡邊正之、荒川浩一 IVIG抵抗例に対する追加治療としてのプレドニゾロン投与は予後を改善するか. 第179回日本小児科学会群馬地方会 2008年12月7日 群馬県前橋市
 4. 小林徹、井上佳也、岡田恭典、小林富男、田村一志、関満、池田健太郎、石井陽一郎、荒川浩一、森川昭廣 川崎病患者の層別化と免疫グロブリン・プレドニゾロン初期併用療法の効果 第111回日本小児科学会総会・学術集会 2008年4月26日、東京都中央区
 5. 小林徹、小林富男、岡田恭典、渡邊正之、鈴木尊裕、下山伸哉、池田健太郎、石井陽一郎、荒川浩一. IVIG抵抗例に対する追加治療としてのプレドニゾロン投与は予後を改善するか. 第29回日本川崎病研究会シンポジウム. 2008.10.18. 北海道札幌市
 6. Kobayashi T, Kobayashi T, Morikawa A, Otani T, Seki M, Tsuchiya K, Takeda T, Arakawa H. External validation of a risk score to predict intravenous immunoglobulin resistance in patients with Kawasaki disease. 5th World congress of pediatric cardiology and cardiac surgery. Cairns, Australia, June 23 2009
 7. 小林徹、佐地勉、森川昭廣、市田路子、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回日本小児科学会学術集会. 2009.4.19. 奈良
 8. 小林徹、佐地勉、藺部友良、森川昭廣、濱岡建城、原寿郎、小川俊一、市田路子、阿部淳、野村裕一、三浦大、井上佳也、荒川浩一. 重症川崎病患者に対する免疫グロブリン・プレドニゾロン初期併用療法の有用性を検討するRAISE Study. 第24回関東川崎病研究会 2009.6.27
 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むけて. 第29回日本川崎病学会. 2009.10.18. 名古屋
 10. 小林徹、小林富男、荒川浩一 IVIG不応予測モデル -群馬のリスクスコア- 第30回日本川崎病学会シンポジウム 2010.10.11. 京都
 11. Kobayashi T, Saji T, Otani T, Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Kato T, Hara T, Hamaoka K, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Seki M, Morikawa A, The RAISE Study Investigators.

Efficacy of Primary Therapy With Intravenous Immunoglobulin Plus Prednisolone for Severe Kawasaki Disease - Results From a Japanese Multicenter Randomized Clinical Trial. American Heart Association Scientific Session 2011, Orlando, Miami, USA, Nov 14, 2011

12. Kobayashi T, Kobayashi T, Ishii Y, Seki M, Ikeda K, Shimoyama S, Suzuki T, Arakawa H. The association between serum cytokines/chemokines and a risk score in the acute phase of Kawasaki Disease. International Congress on Coronary Heart Disease 2011, Venice, Italy, Oct 25, 2011.

13. 小林徹、小林富男、石井陽一郎、関満、池田健太郎、下山伸哉、鈴木尊裕、荒川浩二。急性期川崎病患者における血清サイトカイン・ケモカイン値とリスクスコアとの関連。第114回日本小児科学会学術集会。2011.8.14. 東京

14. 小林徹、佐地勉、大谷哲也、竹内和夫、中村哲也、荒川浩一、加藤太一、原寿郎、濱岡建城、小川俊一、三浦大、野村裕一、布施茂登、市田路子、鮎沢衛、阿部淳、森川昭廣、RAISE Study Investigators. 重症川崎病患者に対する免疫グロブリン・プレドニゾロン初期併用投与は冠動脈予後と臨床経過を改善する。第38回日本小児臨床薬理学会。2011.11.3. 大津

2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし

表1：リスクスコアの項目と点数

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

表2：治療抵抗例と各種パラメーターとの関連

	治療有効例 (n=26)	治療抵抗例 (n=6)	P値
IL-2 (pg/mL)	16.8±11.8	23.9±13.9	0.207
IL-4 (pg/mL)	15.3±22.0	12.4±13.9	0.689
IL-6 (pg/mL)	1095±867	2125±1277	0.010
IL-8 (pg/mL)	19.9±26.3	26.1±14.3	0.087
IL-10 (pg/mL)	23.9±25.5	71.1±48.2	0.002
IFN γ (pg/mL)	48.8±60.8	79.0±52.8	0.055
TNF α (pg/mL)	20.1±28.2	31.5±19.9	0.119
IL-1 β (pg/mL)	13.0±12.5	20.5±12.8	0.119
IL-5 (pg/mL)	9.3±6.2	13.0±12.8	0.173
IL-7 (pg/mL)	6.4±4.5	8.9±3.2	0.087
IL-12 (pg/mL)	11.0±21.1	12.7±10.5	0.308
IL-13 (pg/mL)	13.2±20.7	10.8±7.1	0.524
IL-17 (pg/mL)	16.6±14.7	27.5±15.1	0.025
G-CSF (pg/mL)	133.4±142.8	681.6±470.5	0.003
MCP-1 (pg/mL)	69.3±94.4	107.2±144.5	0.285
MIP-1 α (pg/mL)	85.5±51.8	163.8±109.9	0.003
ICAM-1 (pg/mL)	32.2±17.6	45.0±14.7	0.107
リスクスコア (点)	2.7±2.1	7.5±1.4	<0.001

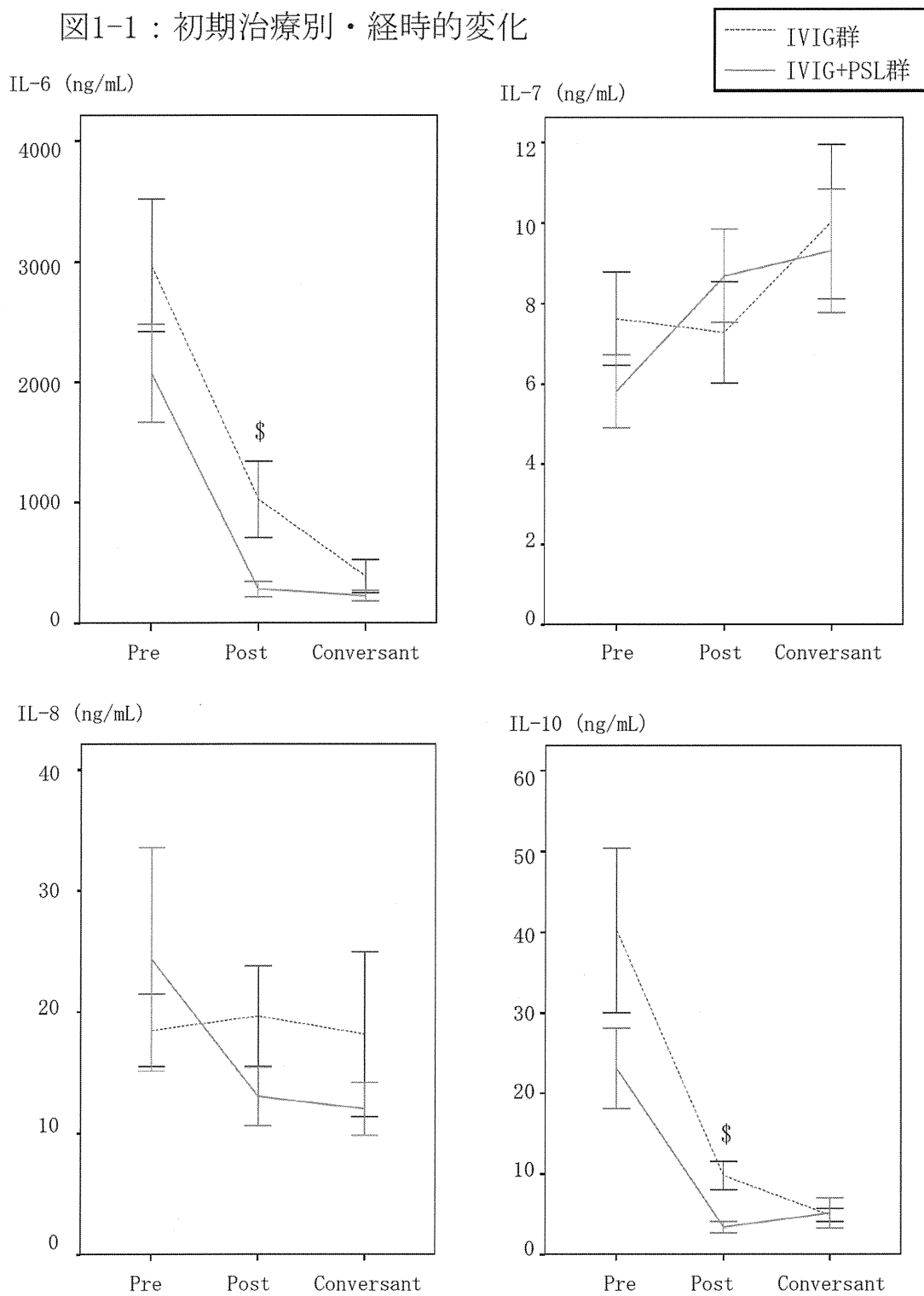
表3：IVIG抵抗リスクと各種パラメーターとの関連

	低リスク患者 (n=22)	高リスク患者 (n=10)	P値
IL-2 (pg/mL)	16.1±10.1	21.7±16.1	0.287
IL-4 (pg/mL)	13.2±23.1	18.1±17.5	0.129
IL-6 (pg/mL)	1039±855	1835±1173	0.008
IL-8 (pg/mL)	20.3±28.4	22.7±12.9	0.092
IL-10 (pg/mL)	19.1±22.6	71.1±48.2	<0.001
IFN γ (pg/mL)	53.9±64.7	55.9±50.1	<0.001
TNF α (pg/mL)	20.1±28.2	31.5±19.9	0.795
IL-1 β (pg/mL)	14.3±13.0	14.7±12.9	0.795
IL-5 (pg/mL)	9.7±6.2	10.6±7.2	0.617
IL-7 (pg/mL)	5.6±3.2	9.5±5.5	0.031
IL-12 (pg/mL)	7.1±5.6	20.8±32.9	0.235
IL-13 (pg/mL)	13.8±22.2	10.5±7.6	0.646
IL-17 (pg/mL)	14.2±8.7	28.4±21.5	0.020
G-CSF (pg/mL)	136.0±155.5	456.6±455.6	0.011
MCP-1 (pg/mL)	60.1±93.1	112.3±121.8	0.070
MIP-1 α (pg/mL)	76.1±50.3	153.2±83.7	0.002
ICAM-1 (pg/mL)	30.1±17.7	44.5±13.2	0.022
リスクスコア (点)	2.1±1.4	7.0±1.6	<0.001

表4：リスクスコア点数と各種パラメーターとの相関

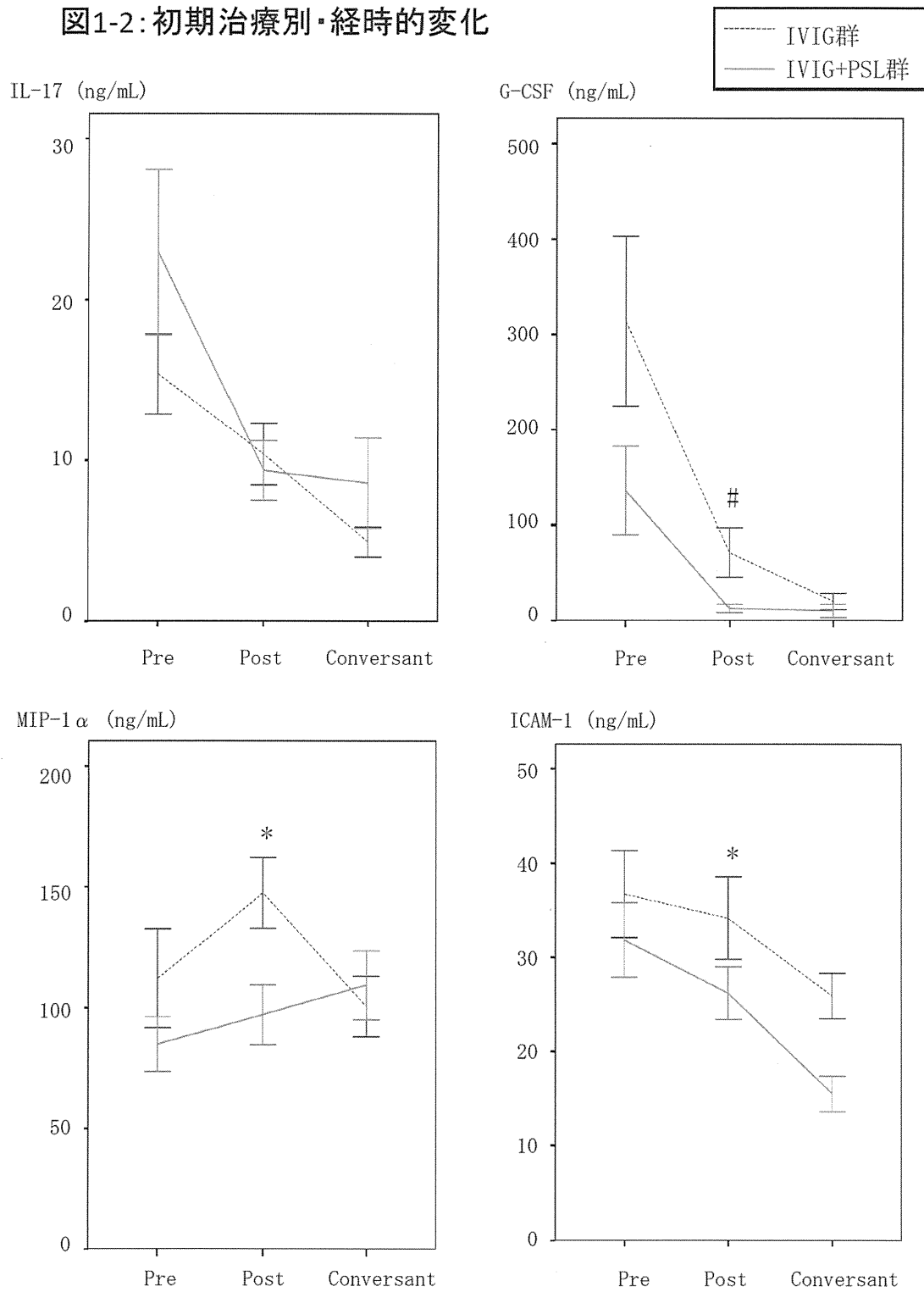
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- γ	TNF- α	IL-1 β	IL-5
相関係数	0.248	0.118	0.450	0.394	0.662	0.186	0.184	0.148	0.265
P値	0.172	0.522	0.010	0.026	0.001	0.309	0.314	0.419	0.143
	IL-7	IL-12	IL-13	IL-17	G-CSF	MCP-1	MIP-1	MMP3	ICAM-1
相関係数	0.374	0.264	0.167	0.399	0.556	0.173	0.472	0.264	0.501
P値	0.035	0.144	0.362	0.024	0.001	0.345	0.006	0.144	0.003

図1-1：初期治療別・経時的变化



IVIG群 vs IVIG+PSL群: * P<0.05, # P<0.01, \$ P<0.05

図1-2: 初期治療別・経時の変化



IVIG群 vs IVIG+PSL群: * P<0.05, # P<0.01, \$ P<0.05

図1-3: 初期治療別・経時的変化

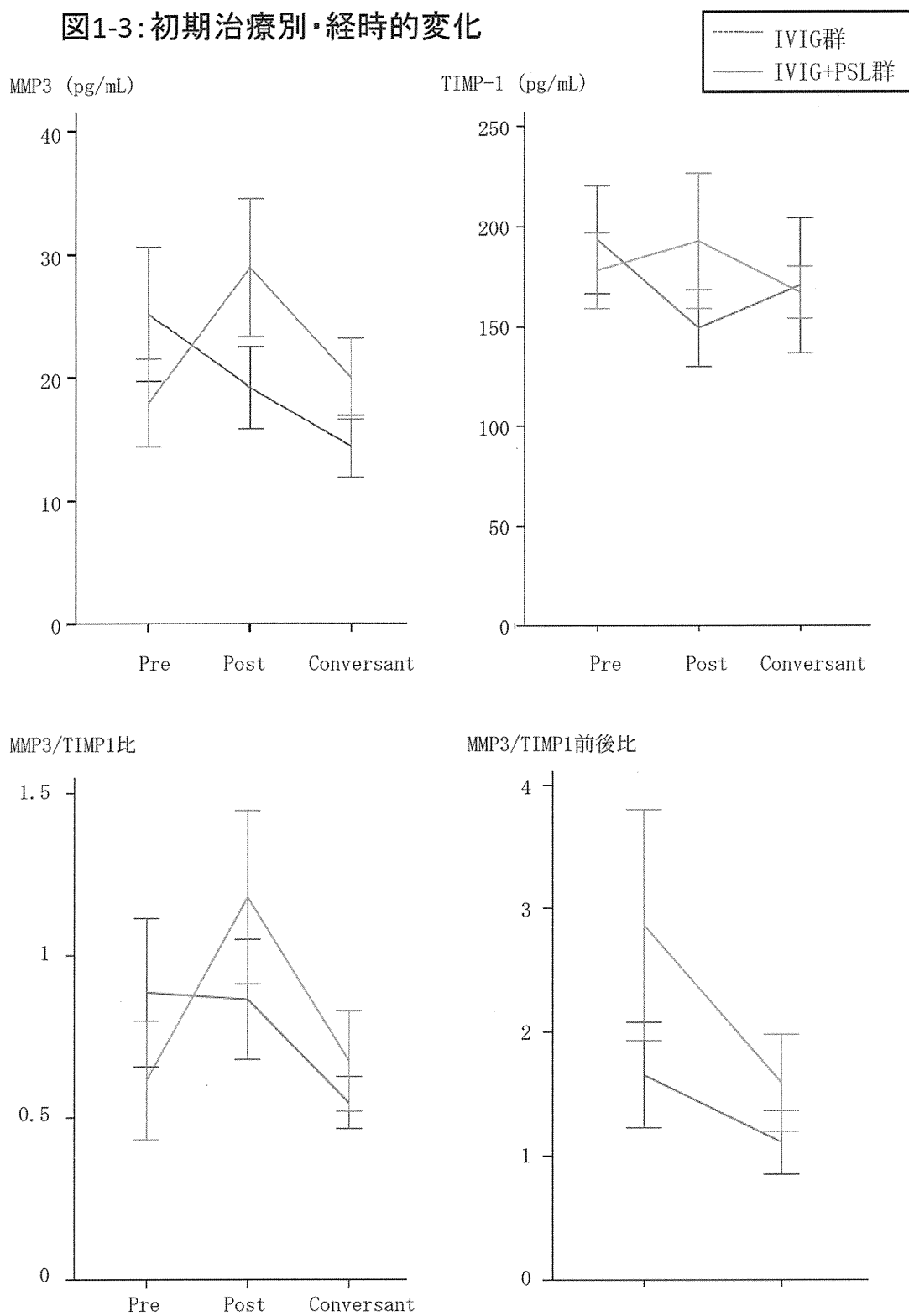


表 5 IVIG 治療前患者背景と血液検査結果

	IVIG-1g/kg × 2 (n=990)	IVIG-2g/kg × 1 (n=636)	P 値
男	564 (57%)	351 (55.2%)	0.086
月齢	25 (1-137)	22 (1-118)	0.111
IVIG 開始病日	5 (1-13)	5 (1-16)	<0.001
白血球数 (× 10 ³ /mm ³)	14.1 (4.1-38.1)	14.7 (4.1-41.2)	0.013
好中球%	70 (14-95)	70 (9-96)	0.47
血小板数 (× 10 ⁴ /mm ³)	32.7 (3.4-796)	34.5 (4.6-78.9)	0.002
AST (IU/L)	37 (13-1517)	37 (5-1776)	0.908
Na (mmol/L)	135 (126-146)	135 (122-143)	0.568
CRP (mg/dL)	7.4 (0.5-40.3)	7.0 (0.1-32.3)	0.029
リスクスコア点数	3 (1-10)	3 (1-10)	0.467

表 6 IVIG 治療抵抗例・冠動脈病変の発生頻度

	IVIG-1g/kg × 2 (n=990)	IVIG-2g/kg × 1 (n=636)	P 値
IVIG 治療抵抗例, n (%)	227 (22.9)	143 (22.5)	0.86
初期 IVIG 不応例, n (%)	197 (19.9)	120 (18.9)	0.65
再燃例, n (%)	30 (3.0)	23 (3.6)	0.57
一ヶ月までの冠動脈病変, n (%)	68 (6.9)	42 (6.6)	0.92
一ヶ月時の冠動脈病変, n (%)	32 (3.2)	20 (3.1)	1.00

表 7 治療群間の予測確率

	ROC 曲線下の面積 (95%信頼区間)	感度 (%)	特異度 (%)
IVIG-1g/kg × 2			
治療抵抗例	0.82 (0.78-0.85)	73.6	79.1
一ヶ月までの冠動脈病変	0.77 (0.71-0.83)	75	70.1
一ヶ月時の冠動脈病変	0.81 (0.73-0.89)	81.3	68.3
IVIG-2g/kg × 1			
治療抵抗例	0.80 (0.76-0.85)	69.8	80
一ヶ月までの冠動脈病変	0.78 (0.72-0.84)	67.5	72.3
一ヶ月時の冠動脈病変	0.81 (0.74-0.89)	80	71.2

表 8 IVIG 群における治療有効例と抵抗例との比較

	治療有効例 (n=69)	治療抵抗例 (n=52)	P 値
月齢	32±26	34±23	0.30
性別男 (%)	55	56	1.00
診断病日	4.0±1.1	4.0±0.8	0.95
白血球数 (*10 ³ /mm ³)	15.5±4.4	15.7±5.1	0.91
好中球%	73.8±14.9	80.5±9.9	0.019
ヘマトクリット (%)	34.0±2.8	34.0±3.1	0.58
血小板数 (*10 ⁴ /mm ³)	31.5±9.2	29.2±9.1	0.12
総ビリルビン (mg/dL)	1.2±1.0	1.9±1.3	<0.001
AST (IU/L)	214±280	309±379	0.073
Na (mmol/L)	132.2±2.4	131.8±3.1	0.52
総コレステロール (mg/dL)	141±27	139±31	0.54
総タンパク (g/dL)	6.6±0.6	6.5±0.6	0.72
アルブミン (g/dL)	3.7±0.4	3.8±0.4	0.79
CRP (mg/dL)	9.0±4.8	10.4±5.6	0.075
BNP (ng/dL)	114±248	187±436	0.034
リスクスコア点数	6.0±1.3	6.8±1.5	0.002

表 9 IVIG+PSL 群における治療有効例と抵抗例との比較

	治療有効例 (n=104)	治療抵抗例 (n=17)	P 値
月齢	37±29	27±18	0.30
性別男 (%)	56	53	1.00
診断病日	4.4±1.2	4.5±0.7	0.44
白血球数 (*10 ³ /mm ³)	15.7±5.0	13.4±3.7	0.08
好中球%	78.1±11.7	80.0±10.5	0.62
ヘマトクリット (%)	33.6±3.0	33.9±3.6	0.99
血小板数 (*10 ⁴ /mm ³)	29.1±8.1	30.3±11.7	0.74
総ビリルビン (mg/dL)	1.1±0.9	2.3±1.7	<0.001
AST (IU/L)	165±239	378±383	0.037
Na (mmol/L)	132.1±2.5	131.1±3.6	0.015
総コレステロール (mg/dL)	140±27	126±17	0.043
総タンパク (g/dL)	6.4±0.6	6.3±0.8	0.50
アルブミン (g/dL)	3.6±0.5	3.4±0.6	0.20
CRP (mg/dL)	10.3±6.0	8.3±2.9	0.30
BNP (ng/dL)	101±164	88±53	0.065
リスクスコア点数	6.2±1.3	6.2±1.2	0.98

心筋・血管バイオマーカーによる川崎病免疫グロブリン不応例 および不全型症例の予知診断に関する研究

研究分担者 小川俊一 日本医科大学小児科 教授
(研究協力者 勝部康弘 日本医科大学小児科 准教授)

研究要旨：川崎病の免疫グロブリン療法に対する不応例の多くが冠動脈病変合併例であり、また、主要症状が診断基準を満たさない不全型にも冠動脈病変合併例が多く存在する。従って、初期治療前に免疫グロブリン不応例および不全型を早期に診断し、より強力な初期治療を行うことにより冠動脈病変の合併症例を激減することが可能である。その予知には血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に直接関わる血管マルチバイオマーカーの検討が有用と考える。また、川崎病の約半数に心筋炎が合併している可能性があり、心筋ストレスマーカーもこれらの予知に有用と考える。我々は炎症性サイトカイン受容体(TNFR-1)、ケモカイン(MCP-1)、接着分子(ICAM-1)、血管炎症反応ペプチド(PTX-3)、血管内皮細胞由来因子(ET-1)、心筋のストレスマーカー (BNP, NT-pro BNP)などのバイオマーカーを候補に上げ川崎病の初期治療前および治療約3-6か月後に検討し、免疫グロブリン不応例の予知、不全型の診断に対する有用性を検討した。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。最終的にはPTX-3が異常高値を呈した川崎病と診断された症例では免疫グロブリンに対する不応例となり、また川崎病の診断基準を満たさない症例を不全型と診断することが可能と判断した。ただし、PTX-3、TNFR-1の測定は迅速には行えない。従って今後臨床に供するためには迅速診断法の確立が重要である。一方、BNP、NT-proBNPは迅速に測定可能なバイオマーカーであり、川崎病の不全型を疑った際にBNPまたはNT-proBNPが有意に上昇していれば、川崎病不全型の診断の一助となる。

A. 研究目的

最近の川崎病発症患者数は年間1万人を超え、小児100人に1人の罹患率であり、日常診療において無視できない疾患となっている。現在の急性期初期治療の主体は大量免疫グロブリン療法であり、この治療法が行われる以前の冠動脈病変合併率は15-20%と大変高いものであったが、免疫グロブリン大量療法が導入された頃より減少傾

向を辿っている。しかし、今でも3.2%に心血管後遺症が認められ(第20回川崎病全国調査成績)、これは決して無視できない数字である。

現在行われている大量免疫グロブリン療法の15～20%は治療不応例であり、その70-80%に冠動脈病変が合併すると報告されている。また、第20回の全国調査では17.4%に川崎病不全型が認められている。

不全型の診断は難しい場合があり、初期治療が遅れる場合もある。第17回の全国調査では川崎病不全型の18.4%に冠動脈拡大性病変が認められている。これは5症状以上を満たす川崎病における値よりも高い値であった。従って、不全型を早期に診断し、適切なる初期治療につなげることが重要となる。冠動脈後遺症を残さずに川崎病を治癒させるには川崎病急性期の初期治療が極めて重要となる。それにはまず免疫グロブリン治療不応例の予知、不全型の早期診断が極めて重要となる。今までに川崎病の重症度判定として原田のスコアなどが用いられ、臨床に寄与してきた。また最近になり、より免疫グロブリン不応例を予知するのに優れたスコアとして群馬のスコア (Kobayashi T, et al. Circulation. 116:2606-2612, 2006)が汎用されている。これらのスコアは川崎病に伴う臨床症状、血液検査所見を用いた間接的なものであり、多くのバイアスがかかる可能性がある。我々は以前より川崎病のバイオマーカーの検出をgene chipやプロテノミックスの方法を用いて網羅的に行ったが、検体数の問題等もあり、有意なデータを得ることが出来なかった。そこで、本研究では、川崎病の病態の根幹をなすと思われる、炎症性サイトカインの受容体であるTNFR-1、ケモカインのMCP-1、接着分子のICAM-1、血管炎症反応ペプチドで血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の両方より分泌されるPTX-3、血管内皮細胞由来因子であるET-1に注目した。さらに、川崎病の急性期には約半数に間質の浮腫を主体とした心筋炎を合併することが知られている。心筋細胞ストレスマーカーであるBNP(B-type natriuretic peptide), NT pro-BNP(N-

terminal proBNP)を検討することにより免疫グロブリン不応例、川崎病不全型を診断することが可能と考えた。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。

B. 研究方法

対象は川崎病と診断もしくは川崎病が疑われた患者107例。研究内容を十分に説明し、承諾が得られた患者に対し施行。検体は川崎病のルーチンの血液検査を施行する際に採血した残余血液を使用。川崎病の初期治療法は大量免疫グロブリン (IVIG) (2g/kg/1回)点滴静注を行った。免疫グロブリン不応例に対してメチルプレドニンによるパルス療法ないしはハーフパルス療法を施行。以下の7種類の血管炎に関与すると考えられるバイオマーカーの血清・血漿濃度を測定し、それぞれの閾値を決定。

1. TNF- α (tumor necrosis factor- α) : 炎症性サイトカインであり、単球、マクロファージ、血管内皮細胞などから産生される。TNF- α はICAM-1の発現を助長し、また、好中球に作用してエラスターゼを分泌させ血管内皮細胞障害を惹起する。川崎病の急性期にはTNFR-1の血中濃度は極めて高く、川崎病の発症、冠動脈瘤の形成、免疫グロブリン抵抗性など、川崎病の多岐に渡る病態に深く関与する。TNF- α は血管障害マーカーとなりうるが、半減期は約20分と短いので、TNF- α に作用する可溶性TNF- α 受容体である血清TNFR-1の濃度がその良い指標となる。

2. 血管炎に伴う免疫系(ケモカイン)バイオマーカーであるmonocyte chemoattractant preotein-1 (MCP-1) : MCP-1は単球・マクロファージの活性化に関わるバイオマーカーであり、単球に対して強力な走化性活性を有し、単球を活性化する。活性化された単球は血管内皮細胞に接着し、内皮細胞間隙より内皮下に迷入し、マクロファージに変わり組織破壊を起こす。従って血管炎の初期段階を律速しており、血漿MCP-1濃度は血管炎の重症度を反映するバイオマーカーとなる。

3. 血管炎マーカーである可溶性接着因子sICAM-1(soluble intercellular adhesion molecule-1) : 血管内皮細胞表面に接着分子が増加してくるような病態で増える。白血球や単球の冠動脈内皮への接着が血管炎の初期段階と考える。ICAM-1はinterleukin-1 (IL-1)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interferon- γ (IF- γ)などの炎症性サイトカインにより血管内皮細胞での発現が増強する。従ってsICAM-1は血管炎の初期段階でのバイオマーカーとなりうる。

4. 血管炎症のバイオマーカーであるPTX-3 : PTX-3はpentraxin super familyに属する急性炎症性反応蛋白である。同ファミリーにはCRPも含まれるがPTX-3はCRPとは違い血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージ、好中球などに発現する。このマーカーは血管内皮細胞のみならず血管平滑筋細胞にも発現している。川崎病の主たる病態は汎血管炎であり、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の両方に障害が及ぶ。血漿PTX-3は血管炎に伴う血管内皮細胞・平滑筋細胞障害の程度と相関し、血管炎の重症度を評価しうるバイオマーカーである。

5. 血管作動性物質であるEndothelin-1 (ET-1) : endothelin(ET)は21個のアミノ酸残基からなる生理活性ペプチドであり、強力で持続的な血管収縮作用を有する。ETファミリーの中でET-1は血管内皮細胞より産生され、血管平滑筋細胞に発現しているETA受容体を介して血管収縮に、また血管内皮細胞に発現しているETB受容体を介してNOやプロスタサイクリンなどの血管拡張因子の遊離作用に関係している。従って、血漿ET-1濃度は血管内皮の情報を探るのに良い指標となる。血管炎に伴い血管内皮細胞障害が惹起され、ET-1の産生が増加し、血漿ET-1濃度が増加する。

6. 心筋のストレスマーカーであるBNPおよびNT-proBNP: BNPは心筋細胞でプロBNPとして合成され、血中への分泌過程で、活性型のBNPと非活性型のNT-proBNPに分裂する。NT-proBNPは半減期がBNPよりも数倍長く(BNP: 22分、NT-proBNP: 122分)循環血液中や採血検体条件下での安定性が高い。心不全患者におけるその重症度および予後規定因子として臨床で確立されたバイオマーカーである。川崎病の際にもBNPおよびNT-proBNPが有意に上昇することが報告されており、その上昇は主に間質の浮腫を伴う可逆的な心筋炎によるものと、川崎病の急性期に上昇する炎症性サイトカインであるIL1- β 、IL-6、TNF- α の刺激により産生が増加するためと考えられる。

【各バイオマーカー測定方法は以下の方法を予定している】

a. 可溶性TNF- α レセプター -1 (TNFR-1) :ELISAキットを用いて血清濃度を測定する。

b. MCP-1:ELISAキット (human MCP-1

Cytoscreen™, Biosouce International)を用いて血漿濃度を測定する。

c. sICAM-1:ELISAキット (Ray-Bio)を用いて血清濃度を測定する。

d. PTX-3 : ELISAキット (Perseus Proteomics Inc.)を用いて血漿濃度を測定する。

e. ET-1 : ELISAキット (An ENZO Life Science Inc)を用いて血清濃度を測定する。

f. BNPおよびNT-proBNP:ELISAキットを用いて血漿および血清濃度を測定する。

C. 研究結果

1. 川崎病、免疫グロブリン不応例および不全型症例の臨床プロフィール

対象は不全型を含む川崎病で、全例において少なくとも免疫グロブリン2g/kg/回の治療を受けている。

表-1 川崎病患者の臨床プロフィール

	川崎病	不応例	不全型
症例数	99	21	8
月齢	13.4±3.6	11.2±5.3	18.1±7.1
男/女比	76/23	15/6	6/2
群馬スコア	3.2±0.8	6.1±1.3	5.8±1.1
CAL	2/99	2/21	1/8

2. 治療前後における各種バイオマーカーの変動および閾値の設定

1) IVIG前後における各種バイオマーカーの変動

IVIG前およびIVIG治療3-6か月後のそれぞれのバイオマーカーの推移を見てみると、TNFR-1、MCP-1、ICAM-1、PTX-3、ET-1、BNP、NT-proBNPはそれぞれIVIG前の値はIVIG後に比し有意に高値を呈した

(表-2、図-1)。

表-2 IVIG前および数ヶ月後の各種バイオマーカーの変動

	IVIG前	IVIG数ヶ月後
TNFR-1	3370±1107*	1116±271
MCP-1	824.5±440.7*	290.1±75.3
ICAM-1	280.0±162.4*	128.9±35.7
PTX-3	27.4±19.4*	3.4±2.1
ET-1	2.7±1.1*	1.4±0.6
BNP	75±144*	17±7
NT-proBNP	983±922*	83±49

*p<0.05 vs. IVIG数ヶ月後

2) 各種バイオマーカーの閾値の設定

各種バイオマーカーのIVIG後の平均値+2sdを凌駕する値を閾値に設定した(表-3)。

表-3 各種バイオマーカーの閾値

	閾値
TNFR-1	1658
MCP-1	440
ICAM-1	200
PTX-3	7.5
ET-1	2.5
BNP	25
NT-proBNP	181

3. IVIG反応例の予知に関するバイオマーカーの有用性

1) IVIG反応例と不応例におけるIVIG前の各種バイオマーカー

免疫グロブリン治療前のIVIG反応例と不応例における各種バイオマーカーを検討した。TNFR-1およびPTX-3はIVIG不応例において反応例に比し有意に高値を呈した。一方、ICAM-1、ET-1、MCP-1、BNP、NT-proBNPはいずれもIVIG不応例で高い

傾向を示したが、その差は有意ではなかった(表-4)。

表-4 IVIG不応例、反応例におけるIVIG前の各種バイオマーカーの値

	IVIG不応例	IVIG反応例
TNFR-1	4696±464*	3259±1092
MCP-1	1112.6±436.8	734.4±414.4
ICAM-1	454±180	217±103
PTX-3	52±27*	20±7
ET-1	2.7±1.2	2.7±1.1
BNP	87±129	71±154
NT-proBNP	10237±1011	964±916

* p<0.05 vs. IVIG反応例

2) 臨床スコア(群馬大スコア)とPTX-3、TNFR-1との相関関係

臨床上有用とされている群馬スコアとPTX-3との相関関係を検討すると、 $r=0.64$, $p=0.000$ と良好な相関関係が認められた。さらにTNFR-1の間にも比較的良好的な相関関係が認められた($r=0.61$, $p=0.005$)。

3) バイオマーカーを用いたIVIG不応例予知の感度・特異度

PTX-3の反応例の遠隔期における平均値+2sdを凌駕する値である7.5ng/mlを閾値として、IVIG不応例の予知を行ってみると感度は95.2%、特異度は98.7%、TNFR-1では1658pg/mlを閾値とした時の感度は90.5%、特異度は97.4%といずれも高い感度、特異度を持ってIVIG反応例を予知することが可能であった。

4. 川崎病不全型の診断に関するバイオマーカーの有用性

1) 不全型における各種バイオマーカーの値 川崎病不全型のIVIG前後における各種バ

イオマーカー変動を示す(表-5)。検討したすべてのバイオマーカーでIVIG前の値はIVIG後より高い値を呈した。

表-5 不全型のIVIG前における各種バイオマーカーの値

	IVIG前	IVIG数ヶ月後
TNFR-1	4763±561*	1021±196
MCP-1	786.7±523.6*	306.3±56.2
ICAM-1	270.2±242.5*	103.6±46.1
PTX-3	49.8±12.9*	3.1±1.9
ET-1	3.0±1.6*	1.2±0.8
BNP	69±124*	13.8±6.2
NT-proBNP	1011±630*	83±49

* p<0.05 vs. IVIG数ヶ月後

2) 閾値による不全型の診断

免疫グロブリン治療前のIVIG反応例と不全型における各種バイオマーカーの値を検討した。TNFR-1およびPTX-3は川崎病不全型においてIVIG反応例に比し有意に高値を呈した。症例数は少ないがPTX-3、TNFR-1の閾値より推定される感度はいずれも87.5%、特異度は98.7%、97.4%であり、高い確率を持って不全型を診断することが可能と考えられる。また、不全型を疑った際にはBNP、NT-proBNPの測定を行い、有意な上昇が認められた際には川崎病不全型と診断する一助とする。

D. 考案

今まで得られたデータから分析すると、川崎病IVIG不応例の予知および川崎病不全型の診断にはPTX-3およびTNFR-1が有用なバイオマーカーであることが示された。川崎病の血管炎はまず血管内皮細胞障害が惹起され、続いて血管平滑筋細胞の障害が起こる。従ってこの2つに関連するPTX-3がIVIG