

る出血は併用療法を行った 1 例においてのみ認められた。

成人領域では血栓溶解薬による出血傾向の出現が重要視されているが、小児期における血栓溶解療法では出血という副作用は問題にしなくて良いと思われた。

以上より、症例数は多くは無いが、UK および t-PA を用いての血栓溶解療法は有効であると考えられる。血栓による閉塞が無い症例では全身投与が、血栓塞栓による心筋梗塞症例では ICT または全身投与療法と ICT の併用療法が有効と考えられる。なお、用いる血栓溶解薬については症例数が少なく、有意な結論は出せなかった。

E. 結論

血栓溶解療法において重要なことは血栓の早期発見であり、AMI を伴っていない浮遊血栓に対しては全身投与療法が、また、AMI 症例に対しては DIV と ICT の併用療法または ICT 療法が推奨される。

F. 康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 川崎病後冠動脈狭窄のカテーテル治療

小川俊一

小児科 51:403-410, 2010 (2010 年 4 月 1 日発行)

2) Guidelines for Diagnosis and Management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease (JCS 2008)

JCS Joint Working Group. Chair: Shunichi Ogawa. Circ J 74:1989-2020, 2010 (2010 年

9 月)

2. 学会発表

1) Overview of the JCS 2008 Guidelines for Diagnosis and Management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease. Ogawa S. Meet the Expert The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.06, Kyoto)

2) Thrombocyte Gene Expression Profiling for Exploring Key Cytokines in Onset of Kawasaki Disease.

Fukazawa R, Abe M, Kamisago M, Katsube Y, Ogawa S. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.05, Kyoto)

3) PTX-3, a New Biomarker for Vasculitis, Predicts Intravenous Immunoglobulin Unresponsiveness in Patients with Kawasaki Disease. Katsube Y, Akao M, Matanabe M, Abe M, Watanabe M, Kamisago M, Fukazawa R, Ogawa S. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.06, Kyoto)

4) Evaluation of Coronary Artery Lesions after Kawasaki Disease by New Modality: Coronary CT Angiography/SPECT Fusion Image. Abe M, Fukazawa R, Kamisagao M, Katsube Y, Ogawa S. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.06, Kyoto)

5) Interferon-Gamma Inducible CXC Chemokines (IP10 and MIG) Play an Important Role in the Part of Pathogenesis of Kawasaki Disease. Kamisago M, Katsube Y, Fukazawa R, Abe M, Ogawa S. The 74th Annual Scientific

Meeting of the Japanese Circulation Society.
(2010.03.06, Kyoto)

6) Longitudinal and sequential follow-up results after percutaneous catheter intervention inpatients with Kawasaki disease. Ogawa S, Fukazawa R, Kamisagao M, Ohkubo T, Abe M, Matanabe M, Hajikano M, Suzuki N, Martanabe M, Katsube Y. European Society of Cardiology Congress 2010. (2010.08.29, Stockholm)

7) 川崎病冠動脈障害に対する冠動脈 CT/心筋 SPECT:Fusion 画像による評価. 阿部正徳、上砂光裕、深澤隆治、勝部康弘、小川俊一. 第 46 回日本小児循環器学会 (2010.07.10, 千葉)

8) 特別企画：「成人期川崎病既往者における冠イベントの実態と病態の解明に向けて；循環器内科と小児循環器のコラボレーション」川崎病心血管後遺症の診断と治療に関するガイドライン(日本循環器学会)の概説. 小川俊一
第 19 回日本心血管インターベンション治療学会 (2010.08.24, 仙台)

9) Data Mining 法による川崎病の遺伝子多型解析. 深澤隆治、阿部正徳、渡辺誠、菌部友良、濱岡建城、濱本邦洋、上砂光裕、勝部康弘、小川俊一. 第 30 回日本川崎病学会 (2010,10,10, 京都)

10) イブニングセミナー「この症例をどうする？」川崎病巨大冠動脈瘤血栓閉塞の 1 例. 阿部正徳、渡辺誠、大久保隆志、上砂光裕、深澤隆治、勝部康弘、小川俊一. 第 30 回日本川崎病学会 (2010,10,10, 京都)

11) 動脈内血栓に対する血栓溶解療法の全国調査結果. 原田真菜、秋元かつみ、大高正雄、織田久之、佐藤圭子、大槻将弘、高橋健、稀代雅彦、清水俊明、小川俊一. 第

30 回日本川崎病学会 (2010,10,10, 京都)

12) シンポジウム「難治性川崎病の治療戦略：1 IVIG 反応性の予測マーカー」バイオマーカーによる川崎病免疫グロブリン治療不応例の予測. 勝部康弘、阿部正徳、上砂光裕、深澤隆治、小川俊一. 第 30 回日本川崎病学会 (2010,10,11, 京都)

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

川崎病急性期病態における酸化ストレスと病因論的意義に関する研究 ～炎症マーカーとの関係から～

研究分担者 濱岡 建城 京都府立医科大学 小児循環器・腎臓病学

研究要旨：川崎病急性期における酸化ストレス指標と各種炎症性マーカーを同時測定し、急性期病態における酸化ストレスの病因論的意義を炎症マーカーの変動との関連性から検討した。IVIG 奏功例では酸化ストレス指標と炎症性マーカーは病勢に合わせて低下しており、酸化ストレスは間接的な炎症促進因子として病態形成に関与している可能性が示唆された。また、IVIG 反応不良例では TNF- α が増加傾向を示し、抗 TNF- α 療法施行の根拠となり得る所見と考えられた。

A. 研究目的

川崎病の病因は未だ不明であり、血管障害の発生・進展機序についても解明されていない。しかしながら、動脈硬化性血管病変の進展には炎症と増幅関係を有する酸化ストレスが強く関与していることから、川崎病における酸化ストレスの関与が注目されている。

酸化ストレスとは「体内の活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) 生成系と消去系のバランスが崩れ、生成系に傾いた状態」と定義される。これまで我々は、川崎病急性期において ROS 産生が亢進していること、そしてそれが IVIG 療法により低下することを報告してきた。また IVIG 反応不良例における治療前の抗酸化力が、奏功例に比し有意に低いことも併せて報告してきた。

川崎病急性期病態では、各種炎症性メディエーターが異常発現していることはすでに知られており、それらにより ROS が過剰に産生され、この ROS が炎症性メディエーターを誘導するという悪循環に陥り、過剰に産生された ROS が血管組織を傷害し、さらに炎症の拡大を引き起こしていると考えられる。

今回、川崎病急性期における酸化ストレス指標と各種炎症マーカーを測定し、急性期病態における酸化ストレス動態の意義を各種炎症指標の動きとの関連から検討した。

B. 研究方法

対象は川崎病急性期 19 例 (0Y10M - 5Y10M、中央値 1Y10M) であった (Table 1)。採血による検体採取は IVIG 治療直前、IVIG 治療終了直後、IVIG 治療終了 2 週間後に行い、それぞれ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 hs-CRP、IL-1, 2, 6、TNF- α を測定した。IVIG 治療直前におけるそれぞれの測定値を 100 とし変化率を求め検討した。なお、対象のうち 6 例は初回 IVIG 治療終

了 48 時間後も 37.5°C 以下に改善せず、IVIG あるいはステロイドによる追加治療を要した。これら IVIG 反応不良例も初回 IVIG 投与終了 2 週間後には解熱していた。

<手法>

ROM：ヘパリン血清を用い、ウイスマー社製酸化ストレス測定機器 (FREE) の dROMs テストを用いて測定した。

BAP：ヘパリン血清を用い、ウイスマー社製酸化ストレス測定機器 (FREE) の BAP テストを用いて測定した。

hs-CRP、IL-1, 2, 6、TNF- α ：BioPlex suspension array system を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は本学倫理委員会の承認のもとに行った。研究内容の説明は保護者に対し行い、十分な理解と文書による同意が得られた症例のみを対象とした。また、人権保護や個人情報保護に関して十分に配慮をした。

C. 研究結果

IVIG 奏功例では ROM の変動とすべての炎症性マーカーは病勢に合わせて低下していた (Figure 1)。一方、IVIG 反応不良例では炎症に鋭敏なマーカーである hs-CRP、IL-6 が低下しているのに反して、ROM や TNF- α 、IL-1, 2 は低下しておらず、変動は平行ではなかった (Figure 2)。

D. 考察

IVIG 奏功例と反応不良例での ROM と炎症の動きの相違により、酸化ストレスは炎症そのものとは異なる経路で血管炎に関与し、間接的な炎症促進因子として病態形成に関与している可能性が示唆された。

IVIG 反応不良例において IL-2 の低下

が見られなかったことは、T 細胞の活性化が IVIG では抑制されなかった可能性が考えられる。川崎病急性期では単球/マクロファージや血管内皮細胞、T 細胞が特に活性化していることが知られているが、IVIG の NF- κ B 活性化に対する抑制効果は異なり、単球/マクロファージと血管内皮細胞では強く抑制するが、T 細胞に対する作用は弱いとされている。そのため、近年 IVIG 反応不良例に対する追加治療として、免疫抑制剤であるシクロスポリンの有効性を示す報告が散見されるようになった。本研究における結果も、IVIG 反応不良例に対するシクロスポリンの使用について合理性を示唆している。

また、これまでに冠動脈瘤を認めた症例において TNF- α が有意に高値であったことが報告されている。抗 TNF- α 抗体であるインフリキシマブは、TNF- α を介して引き起こされる難治性クローン病や関節リウマチ等の炎症性疾患において有効性が認められており、川崎病においても 2004 年に初めて使用例が報告された。それ以降 IVIG 反応不良例に対して有効性を示す結果が報告されている。

今回、IVIG 奏功例において TNF- α は明らかな減少を示したが、IVIG 反応不良例においては減少せずむしろ若干上昇傾向にあった。これは、現在 IVIG 反応不良例に対して議論されている抗 TNF- α 療法における根拠の一つになり得る所見と考えられる。

しかしながら、シクロスポリンや抗 TNF- α 療法といった新規治療法は未だエビデンスに乏しいうえ、投与方法や安全性も確立されていない。今後、さらにデータを集め、有効性および安全性を追求していく必

要がある。

E. 結論

酸化ストレスは炎症性マーカーの動態とは一致しなかったが、病勢と同様に変動したことから、さらに IVIG 反応不良例や冠動脈障害合併例の病態および血管障害の発症・進展における酸化ストレスの病因論的意義を解明していくことが望まれる。

また、IVIG 反応不良例に対する追加治療として注目されている免疫抑制剤や抗サイトカイン療法の妥当性を示唆する結果が得られた。今後は、データを収集し有効性および安全性についても検討する必要があると考える。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

八幡倫代、鈴木千夏、濱岡亜希子、藤井麻衣子、小澤誠一郎、濱岡建城. 川崎病血管炎の病態形成における酸化ストレスの関与～炎症マーカーとの関係から～. 第 114 回日本小児科学会学術集会、2011 年 4 月 15 日～17 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

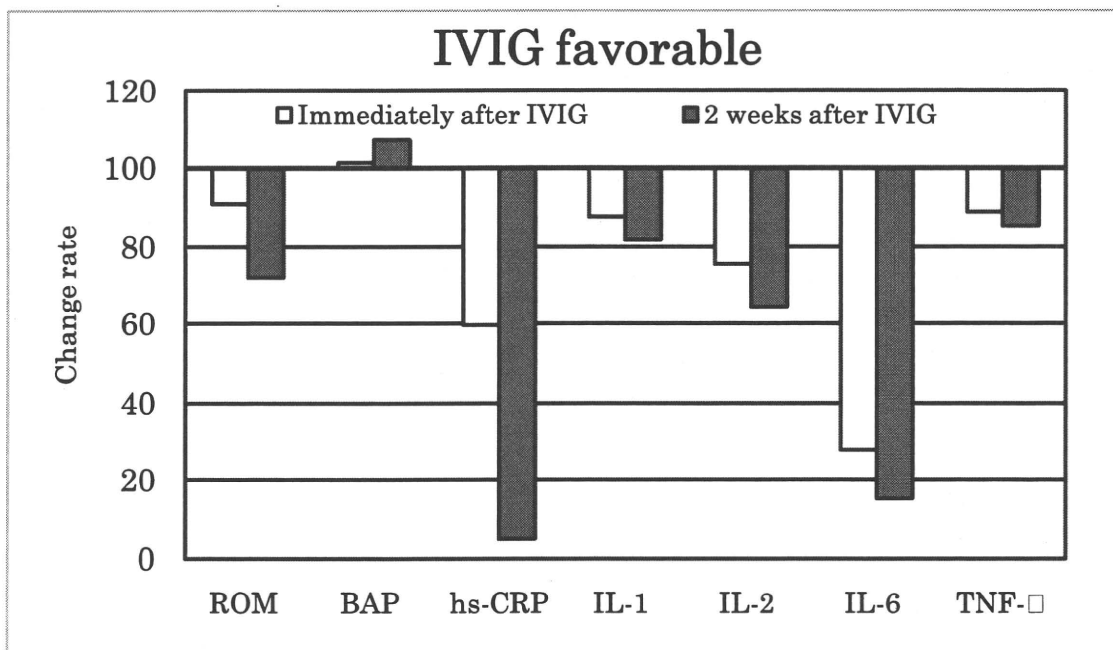
3. その他

特になし

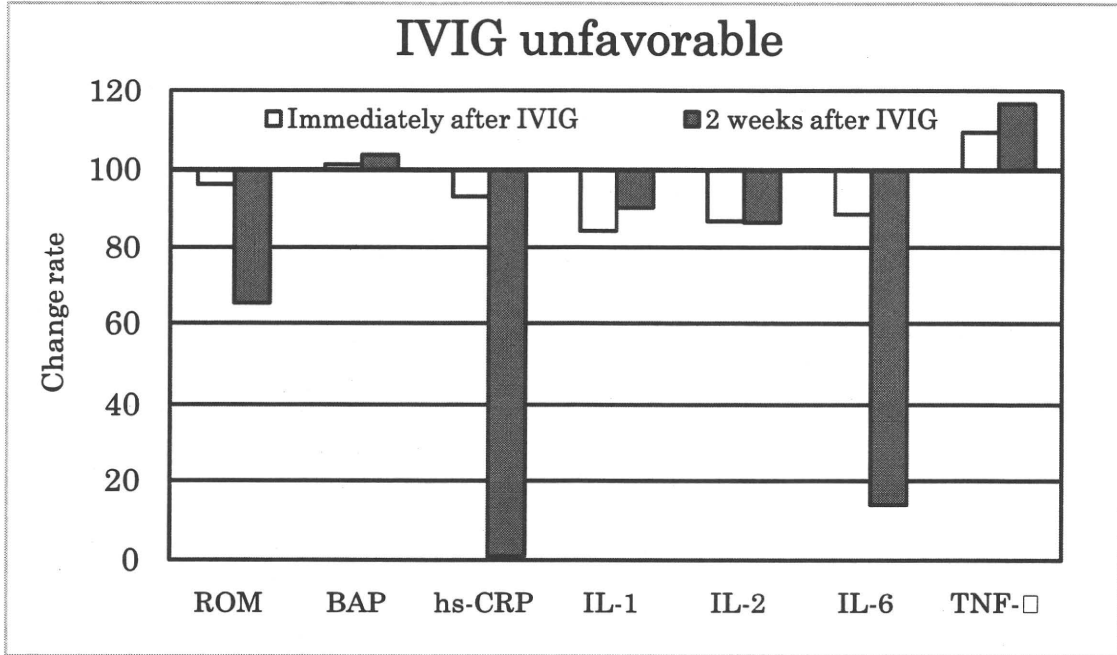
(Table 1)

Pl number	Responsibility to IVIG (0: favorable 1: unfavorable)	Gender (M: male F: female)	Age (months)	The beginning day of treatments	Coronary lesions	dilatation	Additional treatment	Severity of illness index (Gunma-score)
1	0	F	70	5	-	-	-	0
2	0	F	22	5	-	-	-	3
3	0	F	24	4	-	-	-	3
4	0	M	12	4	-	-	-	3
5	0	M	11	5	-	-	-	1
6	0	M	17	4	-	-	-	Unknown
7	0	M	18	3	-	-	-	2
8	0	M	26	5	-	-	-	2
9	0	M	14	3	-	-	-	2
10	0	F	23	6	-	-	-	0
11	0	M	11	3	-	-	-	3
12	0	F	11	9	-	-	-	1
13	0	F	39	4	-	-	-	3
14	1	M	24	3	○	○	IVIG+PSL	6
15	1	M	10	4	-	-	IVIG+PSL	5
16	1	F	28	4	-	-	IVIG+PSL	6
17	1	M	24	4	-	-	IVIG+PSL	6
18	1	F	36	5	○	○	IVIG+PSL	6
19	1	F	10	3	-	-	IVIG+PSL	5

(Figure 1)



(Figure 2)



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19例中で陽性試料は1例であった。またこの抗原タンパク質の組織レベルにおける発現を免疫組織染色により調べた結果、心臓冠動脈に強い発現を認めた。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

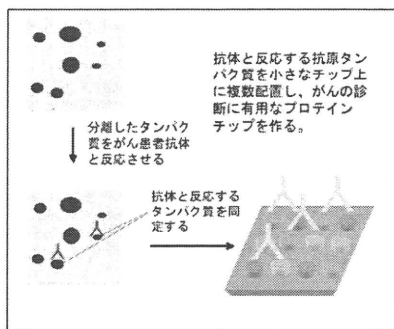


図1 川崎病自己抗原同定のスキーム
正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC) の抽出液を二次元電気泳動で展開し、タンパク質をPVDF膜に転写後に、患者血清を用いたウェスタンブロット法によって自己抗体が反応するスポットを同定する。さらに質量分析法によって、スポット中のタンパク質を同定し、抗原タンパク質を用いた診断用チップを開発する。

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。

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 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

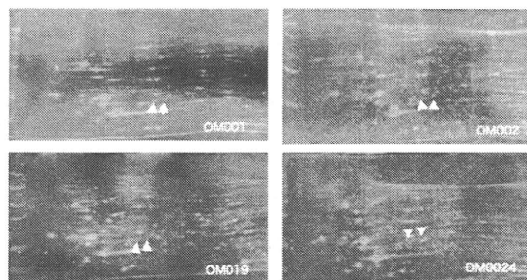


図2 川崎病患者血清で共通に認められた自己抗体パターン HUVEC抽出液を抗原とし、患者血清を用いたウェスタンブロット法により、共通に反応する抗原スポット(矢頭)が認められた。

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 19 例中で陽性試料は 1 例のみであった (図 3)。同抗原を用いた ELISA の結果

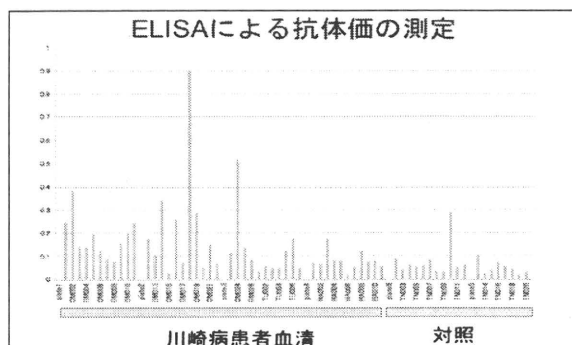


図3 川崎病患者自己抗体が反応するスポットを検索した。その結果、抗原タンパク質を3種同定した。そのうちの1つの抗原に関してELISA系を構築して抗体価を評価した。その結果、カットオフ値を0.071に設定した場合、44例中25例(57%)の患者血清が陽性と判定されたのに対し、正常血清は19例中で陽性試料は1例であった。

に基づいて ROC 曲線プロットをおこな

ったところ、同抗原は診断マーカーとして有用であることがわかった（図4）。

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

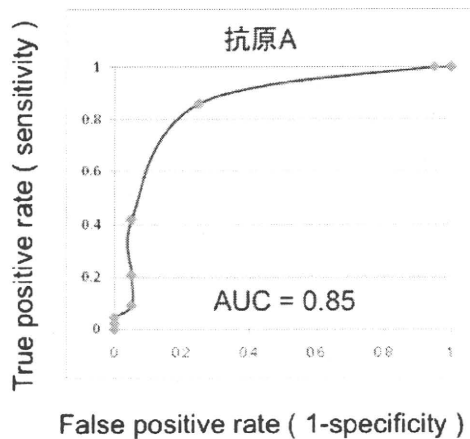


図4. 抗原Aを用いてROC曲線プロットをおこなったところ、同抗原は診断マーカーとして有用であった。

た ELISA は今後行なう予定である。

さらに、同抗原 A に対する抗体を用いて、ラット個体レベルにおける組織発現を調べた結果、同抗原 A は心臓冠動脈に高い発現を認めた。

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。そのうちのひとつであるタンパク質 A に関して症例数を増やして ELISA 測定系で検討し、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。また、同抗原が心臓冠動脈において発現が高いことも認めた。したがって、今年度の研究目標は達成している。

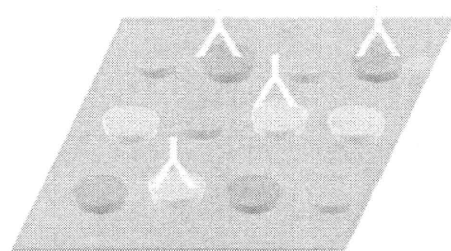


図5. 診断チップの概念図

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。

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) 国内学会発表

ワークショップ 2件

・田崎真哉, 尾山大明, 長崎正朗, 秦裕子, 仙波憲太郎, 後藤典子, 服部成介, 井上純一郎, 山本雅, 宮野悟, 菅野純夫 定量的チロシンリン酸化時系列情報に基づくEGFRシグナル伝達のシステムの解析 日本分子生物学会年会 2010.12.11 神戸

・佐藤 龍洋, 柴垣 芳夫, 木下 秀樹, 丸尾 祐二, 鶴沼 豊, 服部 成介 mTORシグナル伝達因子のプロテオーム解析 日本分子生物学会年会 2010.12.12 神戸
ポスター発表 5件

・服部 成介 川崎病自己抗体を利用した新規診断マーカー 川崎病学会年会 2010.10.10. 京都

・峯岸 ゆり子, 服部 成介, 後藤 典子 アダプタータンパク FRS2beta はCIN85/CD2AP-Cblと複合体を形成し、細胞内分解を介してErbB2シグナルを減弱化する 日本分子生物学会年会 2010.12.10 神戸

・吉村 憲彦, 飯田 直幸, 柴垣 芳夫, 佐藤 龍洋, 服部 成介 *in vitro*リン酸化法による新規ERK基質候補の同定 日本分子生物学会年会 2010.12.12 神戸

・宮崎 杏梨, 佐藤 龍洋, 柴垣 芳夫, 服部 成介 プロテオミクス技術によるラパマイシン非感受性mTORシグナル伝達系の解析 日本分子生物学会年会 2010.12.12 神戸

・大塚 寛子, 秋山 弘匡, 後藤 良隆, 戸松 誠, 米納 孝, 飯田 直幸, 服部 成介, 川崎 靖, 田代 文夫 タラノ芽由来抗腫瘍性タンパク質 aralin の癌細胞選択的毒性の発現機構の解析 日本分子生物学会年会 2010.12.12 神戸

2) 海外

原著論文 2件

SIRP-alpha-CD47 system functions as an intercellular signal in the renal glomerulus. Kurihara H, Harita Y, Ichimura K, Hattori S, Sakai T. Am J

Physiol Renal Physiol. 299:F517-27, 2010.

Phosphoproteomics-based modeling defines the regulatory mechanism underlying aberrant EGFR signaling. Tasaki S, Nagasaki M, Kozuka-Hata H, Semba K, Gotoh N, Hattori S, Inoue J, Yamamoto T, Miyano S, Sugano S, Oyama M. PLoS One. 5:e13926, 2010.

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。

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 国立成育医療研究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 国立成育医療研究センター総合診療部 医長
伊藤秀一 国立成育医療研究センター第1専門診療部腎臓科 医長
坂本なほ子 国立成育医療研究センター研究所成育疫学研究室 室長

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、未治療の川崎病患者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、PRV-1 と sTNFR-1 の組合せで、初回 IVIG に対する反応性および冠動脈障害の発生を、良好な感度と特異度で予測できることが分かった。

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。心後遺症の発生率を減らすためには、難治性川崎病を早期に診断して適切な治療を早期に開始することが必要である。本研究は、初期の IVIG 不応、および後期の冠動脈障害を予測できるバイオマーカーを探索するために、急性期川崎病患者の各種サイトカイン/細胞成分を測定して統計学的に検討した。

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、sTNFR-1、sTNFR-2）濃度を定量した。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システム（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）の発現量および T 細胞のシグナル伝達分子 STAT3 のリン酸化状態を定量した。測定には蛍光標識抗 CD177 抗体（BD バイオサイエンス）および蛍光標識抗リン酸化 STAT3 抗体による免疫染色とフローサイトメトリーを用いた。

（3）未治療の急性期患者の種々の測定値を、初回 IVIG に対する治療反応性および冠動脈後遺症の有無により各々 2 群に分けて Mann-Whitney の U 検定を行った。さらに治療反応性、心後遺症の合併をそれぞれアウトカムとして、多重ロジスティック回帰分析を行い、群分けに最適な測定値の組み合わせと、その計算式を求めた。

（倫理面への配慮）

本研究は国立成育医療研究センター倫理委

員会の承認を得て、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）に則って行われた。

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、2010年12月までの28カ月間で対象患者数は211名、測定件数は534件になった。月別の患者数と測定件数を図1に示す。インフリキシマブ療法を行った患者はこの間9名だった（図1の棒グラフ中に星印で示す）。月別の患者数・測定件数は、ともに冬季に多く季節変動が見られたが、インフリキシマブ療法施行例にはとくに季節性は見られなかった。

このうち、今回解析の対象としたのは治療前にバイオマーカーを測定し、その後IVIG治療を行った100名である。初回のIVIG奏効群は82名、不応群は18名だった。また、冠動脈後遺症の有無で分類すると、後遺症なしは91名、後遺症ありは9名だった。IVIG奏効群と不応群とで、各種測定項目を比較したところ、G-CSF、IL-6、sTNFR-1、sTNFR-2、PRV-1の5つが不応群で有意に高値だった（ $p < 0.01$ 、図2）。冠動脈後遺症の有無で比較した結果も同じく、G-CSF、IL-6、sTNFR-1、sTNFR-2、PRV-1の5つが後遺症あり群で有意に高値だった（ $p < 0.01$ & $p < 0.05$ 、図3）。

7種目の測定値を用いて治療反応性、心後遺症の合併をそれぞれアウトカムとして、多重ロジスティック回帰分析を行ったところ、sTNFR-1とPRV-1の2つが治療反応性、心後遺症の合併の両方に最も有意に関連する組み合わせとして選択された。この2項

目を用いて治療反応性スコアを計算する予測式を作成し、ROC曲線からCut Off値を0.148に決定した。スコア0.148以下を治療奏功群、0.148以上を不応群と予測すると、感度81.3%、特異度78.3%だった（図4）。同様に心後遺症合併スコアの予測式を作成し、Cut Off値を0.047に決定した。スコア0.047以下を後遺症なし群、0.148以上を後遺症あり群と予測すると、感度85.7%、特異度74.4%だった（図5）。

D. 考察

昨年度の研究では、PRV-1とさまざまな炎症性サイトカインを同時に測定して、難治性川崎病を早期に診断するためにはどの因子がバイオマーカーとして最も有用であるかを検討した。その結果、初回IVIG療法に対する反応性および冠動脈障害の合併の両方の面で、予後の悪い患者群ではPRV-1が最も有意に高値だった。IL-6はIVIG不応群では有意に高かったが、冠動脈障害の有無との相関はみられなかった。逆に、sTNFR-1は冠動脈障害(+)群では有意に高かったが、初回IVIGに対する反応性とはあまり相関しなかった。G-CSFはPRV-1ほど明瞭ではないものの、初回IVIG療法不応群および冠動脈障害(+)群の両方で有意に上昇していた。

今年度は、昨年度の6項目に加えてT細胞のリン酸化STAT3の蛍光染色強度を測定した。T細胞のSTAT3のリン酸化の程度は血中IL-6濃度を反映すると考えられるためである。治療前の患者を前向きにエントリーして総症例数が100名に達した時点で多重ロジスティック回帰分析を行った。結果は昨年度と似ているが、G-CSF、IL-6、sTNFR-1、sTNFR-2、PRV-1の5つが治療反

応性、心後遺症の両方に有意に関連することが確認された。研究目的の項でも述べた通り、IVIG 不応例と心後遺症合併例とは重なり合う頻度が高いので、各々に関連するバイオマーカーが同じ 5 項目になったことは偶然ではない。さらに、これら 5 項目の相関関係を調べたところ、5 項目とも相互に非常に高い相関係数を示すことが分かった (data not shown)。

多重ロジスティック回帰分析の結果から、調べた 7 項目のなかでは PRV-1 と sTNFR-1 の 2 つの組合せが、IVIG 反応性および冠動脈後遺症の発症に最もよく関連することが示された。7 項目中 2 項目しか有意のマーカーとして残らなかった理由は、各項目間の相関が非常に高いためであろうと考えられる。測定するサイトカインの種類をさらに増やして検討することも必要かもしれない。ともあれ、この 2 項目だけで、IVIG 反応性と冠動脈後遺症合併の可能性とを十分な感度と特異度で予測できる可能性が示されたことは重要である。今後、この 2 項目を用いて患者群を層別化し、さらに簡便な予測スコアの計算式を作ること、前向き研究で新たな患者コホートについて予測スコアの検証をおこなうこと、以上の 2 点を来年度の課題としたい。

E. 結論

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、PRV-1 と sTNFR-1 の組合せで、初回 IVIG に対する反応性および冠動脈障害の発生を、良好な感度と特異度で予測できることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 阿部淳: 川崎病. in 「総合小児科診療のための小児科学レビュー2010」(五十嵐隆監修). 総合医学社. 東京. 226-232, 2010.
2. 学会発表
 1. 阿部淳. 川崎病の病因解明の最前線 (セミナー講演). 第 30 回日本川崎病学会, 京都. 10 月 10-11 日, 2010.
 2. Fukuda S, Oana S, Sakai H, Kato H, Ito S, Saito A, Abe J, Ito R, Takayama JI. Development of coronary artery abnormalities associated with persistence of non-fever symptoms in Kawasaki disease. Peiatric Academic Societies 2010 Annual Meeting. Vancouver, Canada. May 1-4, 2010.
 3. Ueno H, Maekawa T, Tsuchida N, Oana S, Sakai H, Saito A, Ito S, Kato H, Abe J, Takayama JI. Clinical predictors of resistance to IVIG and progression to coronary artery abnormalities in patients with Kawasaki disease. Peiatric Academic Societies 2010 Annual Meeting. Vancouver, Canada. May 1-4, 2010.
 4. Matsuda A, Morita H, Saito H, Hirao Y, Abe J. C/EBP delta is involved in the anti-inflammatory mechanisms of IgG on human coronary artery endothelial cells. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. Aug 22-27, 2010.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
 4. 特許取得
該当なし
 5. 実用新案登録
該当なし
 6. その他
該当なし

図1. 月別の患者数と検査件数

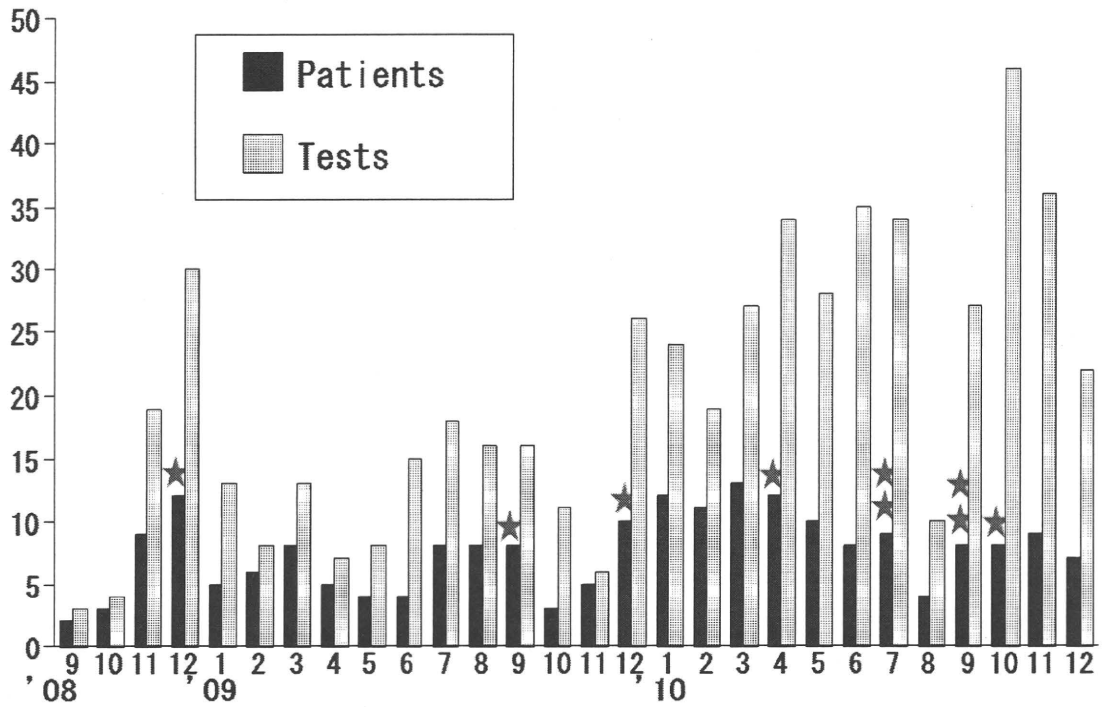


図2. IVIG療法に対する反応性と各バイオマーカーの値

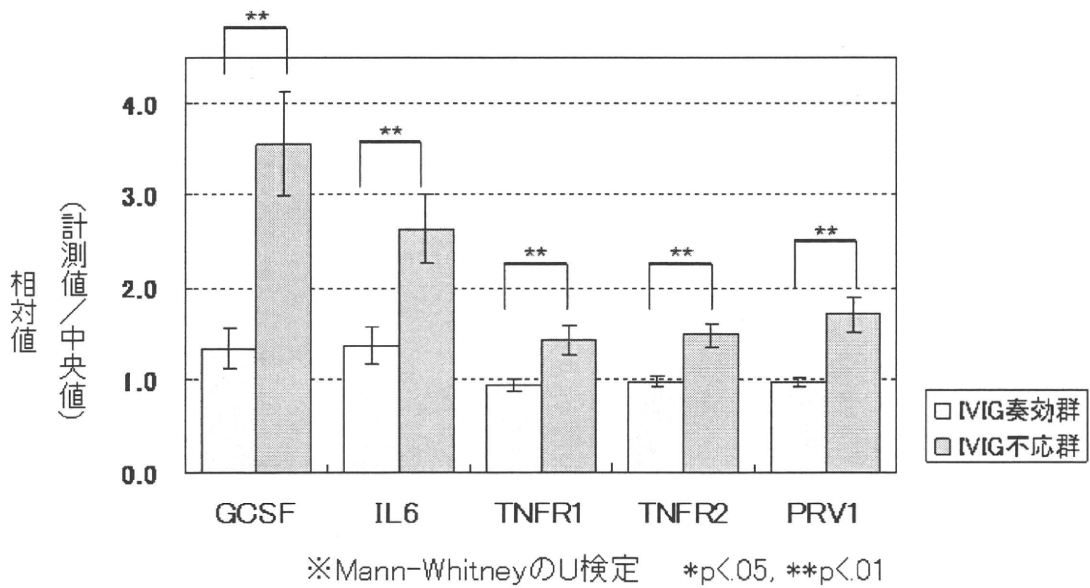


図3. 心後遺症の有無と各バイオマーカーの値

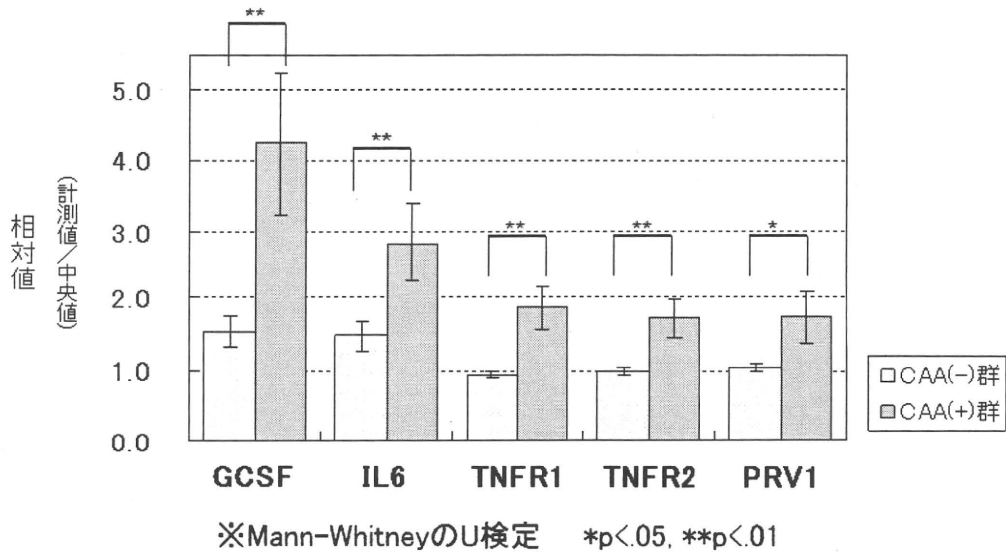


図4. TNFR1 と PRV-1 による治療反応性の予測

予測スコア (閾値 : 0.148)

		IVIG治療		計
		不応	奏効	
予測スコア	≥0.148	13	15	28
	<0.148	3	54	57
計		16	69	85

感度 : 81.3%

特異度 : 78.3%

図5. TNFR1 と PRV-1 による心後遺症リスクの予測

予測スコア (閾値 : 0.047)

		CAA		計
		+	-	
予測スコア	≥0.047	6	20	26
	<0.047	1	58	59
計		7	78	85

感度 : 85.7%

特異度 : 74.4%

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

難治性川崎病の治療ガイドライン作成

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（関西医大教授）、濱岡健城（京都府立医大教授）

（日本川崎病学会学術委員会）

調査協力施設（医師：敬称略）

山口大学小児科：平野玲史、札幌医科大学小児科：堀田智仙、九州厚生年金病院小児科；岸本小百合、山梨大学附属病院小児科：勝又庸行、九州大学病院小児科：池田和幸、筑波大学小児科：高橋実穂、日本医科大学 小児科：阿部正徳、国立成育医療研究センター総合診療部：小穴慎二、横浜市立大学市民総合医療センター小児科：森雅亮、今川智之、山形大学小児科：鈴木 浩、東邦大学医療センター大森病院小児科：監物 靖、高月晋一

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、第 5 回全国使用実態調査を行った。その結果、過去 4 年間と同様、2010 年度には 42 例において使用されていた。その結果 88%近くで有効性があり、無効例は 12.5%であった。また主要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 日未満であれば、冠動脈瘤を形成する頻度が 22 例中 2 例と極めて低い結果が得られた。重症川崎病で IVIG 不応例には抗 TNF α 製剤が有効で、しかも安全に使用されている事が推察される。今後も症例の注意深い観察が必須である。

A. 研究目的

IVIG 不応の急性期重症川崎病 (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 5 年が経過した。2006~2009 年の間に計 4 回の使用実態調査を行なって来たが、今回第 5 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おいて安全性と有用性を明らかにする事が目的である。

B. 研究方法

対象：2009 年 9 月から 2010 年 8 月末までの 1 年間に Rm を使用した KD 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

平成 22 年 8 月末日に郵送し、同 9 月 30 日現在 168 施設から回答が得られた。その結果 Rm 使用例は 68 例(19 施設)(であった。二次調査では 42 例 (11 施設) が報告され、男 : 27 例、女 15 例であった。年齢は 3m から 9y8m。1 歳以下 : 8 例 (瘤 1 例)、1-4 歳 : 25 例 (瘤 2 例)、4 歳以上 : 9 例 (瘤 0)、使用時期は、10 日未満 : 22 例 (瘤 2 例)、10~19 病日 : 18 例 (瘤 0 例、20 日以後 : 2 例 (瘤 1 例)。

有効は 33/42 例 (88.1%)、再発熱 5 例 (11.9%) であった。冠動脈瘤は 14 例 (33.3%) に残存した。10 日未満で使用されたときは 2/22 例、10 日以後では 3/20 例に瘤が残存した。冠動脈瘤 5 例の病日は、: 8 日 : 1, 9 日 : 1, 16 日 : 1, 20 日 : 1, 21 日 : 1) であった。

副作用は 8 例 (発熱 1 例、発疹 6 例、感染症 1 例) に認められた。

5 回の総計では、有効 81% (113/139 = 81.3%)、無効 (15/139=10.8%) 11.3%、不明 1 例であった。副作用は 14/139 例であった。

D. 考案

IVIG 不応の難治例では巨大冠動脈瘤を残す危険性 (Risk) が高く、Rm の冠動脈発症率減少作用、所謂 “期待される効果” (Benefit) と、重大な副作用を来たす “危険性” (Risk) を考え、現場では注意深く使用されていると思われる。

昨年までの検討でも、心不全の悪化が懸念される超急性期は使用が避けられていたが、IVIG 反応性の判断が早くなったせいか、使用時期は 10 日以内が約半数と早くなってきていた。5 回の集計で 8 割以上の症例で解熱効果が見られ、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く (6/62 例=9.6%)、10 日以後に使用された場合の 30 例/68 例=44.1% よりも低いと結論された。

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が、5 回の集計でも 139 例中 14 例 (10%) と低く、いずれも一過性で軽症の副作用であった。

E. 結論

この 5 年間の多くの症例の報告により、難治性の IVIG 不応 KD に対しては、Rm は年間 40~60 例使用されてきており、しかも一部では乳幼児にも使用されている状況である。しかし、現在までは比較的安全性に使用されていると考えられた。Rm は IVIG 不応の難治性 KD の第 2 又は第 3 の選択肢にはなりえると思われた。

H. 健康危険情報

なし

I. 研究発表

1. 論文発表

1. Takatsuki S, Nakamura R, Haga Y, Mitsui K, Hashimoto T, Shimojima K, Saji T, Yamamoto T: Severe pulmonary emphysema in a girl with interstitial deletion of 2q24.2q24.3 including ITGB6. Am J Med Genet A. 152A (4): 1020-5, 2010.4

2. Onouchi Y, Ozaki K, Burns JC, Shimizu C, Hamada H, Honda T, Teri M, Honda A, Takeuchi T, Shibuta S, Suenaga T, Suzuki H, Higashi K, Yasukawa K, Suzuki Y, Sasago K, Kemmotsu Y, Takatsuki S, Saji T, Yoshikawa T, Nagai T, Hamamoto K, Kishi F, Ouchi K, Sato Y, Newburger JW, Baker AL, Shulman ST, Rowley AH, Yashiro M, Nakamura Y, Wakui K,

- Fukushima Y, Fujino A, Tsunoda T, Kawasaki T, Hata A, Nakamura Y, Tanaka T: Common variants in CASP3 confer susceptibility to Kawasaki disease. *Hum Mol Genet.* (Epub ahead of print) 2010.4
3. Fuse S, Kobayashi T, Arakaki Y, Ogawa S, Katoh H, Sakamoto N, Hamaoka K, Saji T: Standard method for ultrasound imaging of coronary artery in children. *Ped Int.* 52: 876-882, 2010
4. JCS Working Group: Guidelines for Diagnosis and management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease (JCS 2008). *Circ J* 74(9): 1989-2020, 2010
5. 佐地勉、高月晋一:川崎病の心血管障害。小児科診療 小児の治療指針.73(suppl.):364-367、2010.4
6. 小林徹、佐地勉: 川崎病 (心合併症を含む) .小児臨床 63 : 618-622.2010
7. 佐地勉 : Question12 子どもの病気 川崎病 冠動脈拡張改善のアスピリンはいつまで服用?再発は?. 暮らしと健康 (保健同人社) .2011.3月号 : 84.2011
8. 佐地勉 : 急性期川崎病への抗サイトカイン療法 (抗 TNF α 製剤 Infliximab) .Annual Review 循環器 2011 : 中外医学社,2011.1、東京
2. 学会発表
1. Saji T: Genetic study and assessment of vascular beds in pulmonary arterial hypertension in pulmonary arterial hypertension. 44th Annual Meeting Association for European Paediatric Cardiology., 2010.5, Innsbruck
2. Saji T: WG Cardiovascular Morphology -Update on pulmonary arterial hypertension: Evaluation and current medical treatment. 44th Annual Meeting Association for European Paediatric Cardiology., 2010.5, Innsbruck
3. Saji T: Update on pulmonary hypertension (State of Art).The 1st JSPCCS- AEPC-AHA joint session (The 3rd Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society), 2010.7, Chiba
4. Saji T: Efficacy and Safety of Anti TNF- α agent Infliximab for Intractable and IVIG-Resistant Acute Kawasaki Disease. -Results from Multicenter Survey for Efficacy and Safety by Japan Kawasaki Disease Research Society-.International Forum of Child Intractable Disease, 2010.7, Tokyo
5. Sakazaki H, Niwa K, Lee JJ, Nakazawa M, Saji T, Nakanishi T, Akagi T, Ueno M, Takamuro M, Ichida F, Kojima N, Kato H: predictors of Mortality and the Effect of Disease Specific Therapy on Survival in Adult Patients With Eisenmenger Syndrome. American Heart Association Scientific Symposium 2010, 2010.11, Chicago.
6. 羽賀洋一、小峰由美子、渡邊美砂、佐藤真理、松裏裕行、小原明、関根孝司、館野昭彦、佐地勉 : 新型インフルエンザ下気道感染に対しステロイドパルス療法は有用である.第 24 回日本小児救急医学会.2010.5、京都
7. 阿部淳、小川俊一、深澤隆治、尾内善広、小林徹、池田和幸、佐地勉: 川崎病遺伝コンソーシアムの設立にむけて.第 46 回日本小児循環器学会.2010.7、千葉
8. 小林徹、佐地勉、小川俊一、三浦大、市田蒔子、野村裕一: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 46