

[表1] 性別、年齢別、診断別初回免疫グロブリン(IG)投与後の追加治療法

		総数 (%)	IG追加投与(%) ***	ステロイド投与 (%)	infiximab投与 (%)	免疫抑制剤投与 (%)	血漿交換 (%)
総数*		21,247 (100)	4,049 (19.1)	1,390 (6.5)	194 (0.9)	172 (0.8)	105 (0.5)
性別	男	12,123 (100)	2,510 (20.7)	857 (7.1)	133 (1.1)	113 (0.9)	72 (0.6)
	女	9,124 (100)	1,539 (16.9)	533 (5.8)	61 (0.7)	59 (0.6)	33 (0.4)
年齢別	2歳未満	10,353 (100)	1,839 (17.8)	603 (5.8)	64 (0.6)	101 (1.0)	55 (0.5)
	2歳以上	10,894 (100)	2,210 (20.3)	787 (7.2)	130 (1.2)	71 (0.7)	50 (0.5)
診断別**	定型例	17,641 (100)	3,591 (20.4)	1,223 (6.9)	176 (1.0)	151 (0.9)	97 (0.5)
	不定型例	551 (100)	108 (19.6)	39 (7.1)	7 (1.3)	4 (0.7)	2 (0.4)
	不全型	3,053 (100)	349 (11.4)	127 (4.2)	10 (0.3)	17 (0.6)	6 (0.2)

*初回IG使用例 21,247人を集計した。

**初回IG使用例 21,247人のうち診断不明2人は除いた。

1人の患者に複数の治療法を用いている例がある。

***再燃時のIG投与を含む

[表2] 性別、年齢別、診断別初回免疫グロブリン(IG)投与後の追加治療法(初回IG不応例)

		総数 (%)	IG追加投与 (%)	ステロイド投与 (%)	infiximab投与 (%)	免疫抑制剤投与 (%)	血漿交換 (%)
総数*		3,532 (100)	3,231 (91.5)	1,025 (29.0)	151 (4.3)	129 (3.7)	79 (2.2)
性別	男	2,200 (100)	2,004 (91.1)	653 (29.7)	105 (4.8)	84 (3.8)	53 (2.4)
	女	1,332 (100)	1,227 (92.1)	372 (27.9)	46 (3.5)	45 (3.4)	26 (2.0)
年齢別	2歳未満	1,557 (100)	1,441 (92.5)	442 (28.4)	46 (3.0)	76 (4.9)	38 (2.4)
	2歳以上	1,975 (100)	1,790 (90.6)	583 (29.5)	105 (5.3)	53 (2.7)	41 (2.1)
診断別**	定型例	3,138 (100)	2,897 (92.3)	905 (28.8)	136 (4.3)	113 (3.6)	74 (2.4)
	不定型例	89 (100)	81 (91.0)	31 (34.8)	5 (5.6)	3 (3.4)	1 (1.1)
	不全型	304 (100)	252 (82.9)	88 (28.9)	9 (3.0)	13 (4.3)	4 (1.3)

*初回IG使用例 21,247人のうち不応例3,532人を集計した。

**不応例のうち診断不明1人は除いた。

1人の患者に複数の治療法を用いている例があるので、横の合計は総数を超えることがある。

川崎病の冠動脈障害に合併する血栓症および血栓塞栓症に対する血栓溶解療法に関する研究

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 原田真菜、秋元かつみ 順天堂大学小児科 助教)

研究要旨：川崎病の冠動脈障害に伴い、拡大性病変ではトロンビン生成亢進に伴うフィブリン形成を主体とする静脈血栓が、また狭窄部位においては血小板を中心とした動脈血栓が形成され、心筋梗塞を惹起し、突然死に繋がる場合もある。冠動脈瘤内に血栓が認められた場合、また血栓塞栓による急性心筋梗塞を合併した場合には迅速なる血栓溶解療法が必要となるが、小児期の血栓溶解療法の確たるものは今まで示されていない。我々は全国調査を行い、現在小児に対して行われている血栓溶解療法の現状を調査した。その結果、血栓溶解療法は小児循環器医が常勤している48施設のみで行われていた。なお、小児科単独で行っている施設は15施設、他科(主に循環器内科)との共同で行っているのは33施設であった。使用した血栓溶解薬は、ウロキナーゼおよび組織プラスミノゲンアクチバター(t-PA:チロキナーゼ、アルテプラゼ、モンテプラゼ)であった。血栓溶解療法としては全身投与療法(DIV)、冠動脈内注入療法(ICT)およびそれらの併用療法が行われていた。併用例も含め全身投与療法を施行している施設(78.6%)が多く、70.8%の症例が全身投与療法を受けていた。急性心筋梗塞症例に対しては全身投与療法とICTの併用療法もしくはICTを、非心筋梗塞症例に対しては全身投与療法を単独で選択する施設が多かった。血栓の発見までの時間が短いほど、また、血栓が小さいほど血栓溶解療法は有効である傾向にあった。なお、血栓溶解療法による出血を含む副作用はほとんど認められず、また、施行方法別による有意差も認められなかった。

以上より、瘤内に血栓が認められた場合には、ウロキナーゼまたはt-PAの全身投与療法が、また、心筋梗塞を合併した際の血栓溶解療法はそれらを用いた全身投与療法とICTの併用または、ICTが有用と考える。

A. 研究目的

最近の川崎病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。川崎病の冠動脈障害の特徴は急性期から回復期に認められる瘤を主体とする拡大性病変と、回復期以降に認められる狭窄性病変であり、それは瘤の前後、瘤間、さらに稀に瘤内に認められる。冠動脈が拡大した部位では血管内皮機能を調節

メカニカルストレスである shear stress(剪断応力)が低下し、トロンビン生成亢進によるフィブリン形成を主体とする静脈血栓が、また、狭窄性病変では shear stress は亢進し、それに伴う血小板を中心とする動脈血栓が形成され、心筋梗塞を惹起し、突然死に繋がる場合もある。小児期においては狭窄性病変のみでは管腔を閉塞するような血栓が形成されることは稀であり、冠動脈瘤の存在が問題となる。冠動脈瘤を合併した場合には大きさにもよるが5-6mm以上であれば短期間ないしは長期に亘ってワーファリンが投与される場合が多いと考えられる。しかし、小児期ではワーファリンによる血栓形成のコントロールが困難な場合があり、血栓が形成されることは避けられない。多くの冠動脈瘤は大動脈よりの分岐部近傍に存在するので、瘤内の血栓は、ある程度の大きさになれば心エコー検査にて血栓と同定されることが間々ある。このような瘤内に血栓を認めた場合、さらに、血栓塞栓による急性心筋梗塞を合併した際には迅速な血栓溶解療法が必要となる。しかし、その様な症例は施設によって異なり、多くても年に1-2例、ほとんどの施設では数年に1例程度であり、血栓溶解療法に対するまとまった結論が出せる施設は無い。従って、小児期における血栓溶解療法に対するスタンダードとなる治療法は示されておらず、成人領域にて行われてきた血栓溶解療法を小児に応用して行って来たのが実情である。最近の成人領域では血栓に対する治療法は溶解療法ではなく、血栓吸引療法が主体となっている。一方、小児期ではデバイスの問題、血栓量の大きさなどから、血栓溶解療法が依然として重要な位置を占めている。

そこで、われわれは一施設のデータではな

く、日本国内の施設でのデータを集積し、その解析を行うことにより、小児に適した血栓溶解療法のがガイドラインが作成出来ると考え、その第一弾として、日本全国の施設に血栓溶解療法に関するアンケート調査を行い、その結果を分析した。

B. 研究方法

1.1 1次調査

第20回川崎病全国調査を行い川崎病患者が認められた972施設に対し、アンケート調査を施行した。

2.2 2次調査

1次調査にて回答のあった15施設23症例に対して2次アンケート調査を施行した。

C. 研究結果

【1次調査回答施設】

972施設中498施設より回答があった。回答率は51.2%であった。498施設の内、小児循環器医が常勤でいる施設は88施設であった。血栓溶解療法は48施設において施行されており、そのすべてが小児循環器医が常勤している施設であった。48施設のうち小児科単独で血栓溶解療法を施行しているのは15施設、他科との共同により施行している施設が33施設であった。小児科単独で血栓溶解療法を施行している15施設、23症例に対し2次調査を施行した。その結果以下の11施設より21症例の回答があった。

【2次調査回答施設】

2次調査では以下の11施設より21症例の調査結果が得られた。

群馬大学小児科、日赤医療センター小児科、日本医科大学小児科、順天堂大学小児科、聖マリアンナ医科大学小児科、大阪府立総合

医療センター小児科、近畿大学小児科、近畿大学奈良病院小児科、山口大学小児科、久留米大学小児科、大分大学小児科

【アンケート調査結果】

1. 治療対象疾患 (1 次、2 次調査結果を含む)

急性心筋梗塞(AMI): 5 症例

瘤内血栓(non AMI): 19 症例

2. 血栓溶解療法直前の血液凝固検査成績

1) PT/INR 2 施設 (0.94, 2.03)

2) TT 4 施設 (平均 34.8%)

3) aPTT 4 施設 (26.6-44.1sec, 平均 36.4sec)

3. 使用方法、使用薬剤、使用薬剤量 (下線は AMI 症例を示す)

1) ICT 単独療法 (7 症例)

・チロキナーゼ : 40,000 IU/kg x 3 回

・チロキナーゼ : 40,000 IU/kg x 4 回

・チロキナーゼ : 100,000 IU/kg x 1 回 (翌日に消失)

・チロキナーゼ : 100,000 IU/kg x 1 回 (3 日以内に消失)

・ウロキナーゼ : 4,000 IU/kg x 2 回

・ウロキナーゼ : 15,000 IU/kg x 1 回

・モンテプラーゼ : 30,000 IU/kg x 2 回・50,000 IU/kg x 1 回

2) 全身投与療法(DIV: 9 症例)

・アルテプラーゼ : 40 万 IU/kg/day x 1 日間 (無効)

・アルテプラーゼ : 40 万 IU/kg/day x 1 日間 (無効)

・アルテプラーゼ : 600 万/day x 3 日間 (無効)

・ウロキナーゼ : 3,750 IU/kg/day x 1 日間・1,875 IU/kg/h x 4 時間

・ウロキナーゼ : 60,000 IU/day x 5 日間

・ウロキナーゼ : 16,000 IU/kg/day x 1 日間

・ウロキナーゼ : 6,800 IU/kg/day x 1 日間+モン

テプラーゼ : 27,500 IU/kg/ x 3 回 iv

・ウロキナーゼ : 6,800 IU/kg/day x 1 日間+モン

テプラーゼ : 27,500 IU/kg/ x 2 回 iv

・モンテプラーゼ : 27,500 IU/kg x 1 回 iv

3) 併用療法(5 症例)

・ウロキナーゼ 4,000 IU/kg/day x 1 日間 DIV +

モンテプラーゼ 9,000 IU/kg x 2 回 ICT(無効)

・アルテプラーゼ 43 万 IU/kg/day x 1 日間 DIV

+ アルテプラーゼ 5 万 IU/kg x 3 回 ICT + ウ

ロキナーゼ 4,000 IU/kg/day 5 日間 DIV (無

効)

・アルテプラーゼ 30 万 IU/kg x 1 回 DIV + ウ

ロキナーゼ 10,000 IU/kg x 2 回 ICT + モンテ

プラーゼ 27,500 IU/kg x 3 日間 DIV

・アルテプラーゼ 30 万/kg/day x 1 日間 DIV +

ウロキナーゼ 10,000 IU/kg x 2 回 ICT + モンテ

プラーゼ 27,500 IU/kg/day x 3 日間 DIV

・アルテプラーゼ 30 万 IU/kg/day x 1 日間 DIV

+ ウロキナーゼ 10,000 IU/kg x 2 回 ICT + モ

ンテプラーゼ 27,500 IU/kg x 3 日間 DIV

(無効)

4. 血栓溶解療法後の抗血栓療法

1) ヘパリン 9 施設 (2-14 単位/kg/h, 平均 14 単位/kg/h)

2) ワファリン 3 施設 (平均 0.1mg/kg/day)

3) ヘパリン・ワファリン併用 3 施設

5. 血栓形成から発見までの推定時間

(2 次調査返信のあった 11 施設 21 症例)

1) 数時間以内 : 9 例

2) 数日以内 : 7 例、

3) 1 週間以上・不明 : 5 例

6. 溶解療法の効果(1 次、2 次調査を含む)

1) 急性効果 : 効果判定を血栓溶解療法開始 6 時間以内とした場合

AMI を合併した 5 例中 4 例において ICT

が行われ 2 例,50%が有効であった。一方、AMI を合併していない 19 症例のうち ICT 単独では 33.3%(1/3)、DIV 単独療法では 75%(9/12)、併用療法では 50%(2/4)が有効であった。

2) 遠隔効果：効果判定を血栓溶解療法開始 3 日以内とした場合

AMI を合併した 5 例中 4 例において ICT が行われ 3 例,75%が有効であった。一方、AMI を合併していない 19 症例のうち ICT 単独では 66.7%(2/3)、DIV 単独療法では 75%(9/12)、併用療法では 50%(2/4)が有効であった。

5. 血栓形成から発見までの時間および血栓溶解療法の効果(2 次調査 21 症例)

	数時間以内(9 例)	数日以内 (7 例)	1 週間以上・不明 (5 例)
ICT 単独	3 例(66.6%)	1 例(0%)	3 例(33.3%)
DIV 単独	2 例(100%)	6 例(50%)	1 例(100%)
併用療法	4 例(50%)	0 例(0%)	1 例(0%)

() :血栓溶解療法有効率(有効の判定は 6 時間以内)

6. 血栓の大きさと血栓溶解療法の効果(2 次調査 21 例のみ)

	10mm 以上(8 例)	10mm 未満(13 例)
ICT 単独	2 例(0%)	5 例(60%)
DIV 単独	4 例(75%)	5 例(60%)
併用療法	2 例(50%)	3 例(66.6%)

() :血栓溶解療法有効率(有効の判定は 6 時間以内)

7. 副作用の検討

血栓溶解療法により認められた合併症

- 1) CAG 施行による心室細動: 1 症例
- 2) ウロキナーゼによる 37.5 度以上の発熱: 1 症例
- 3) ウロキナーゼ 全身投与後のモンテプラーゼ 静注

後の軽度の鼻出血

D. 考案

現在、日本においては血栓溶解薬である、UK および t-PA の小児に対する保健適応は無い。従ってこれらの血栓溶解薬を使用しての血栓溶解療法を行う際には保健適応外薬剤使用ということになり、厳重な注意のものとして施行されるべき治療法である。川崎病後の冠動脈障害を有する患者で有意な血栓が同定されたり、血栓塞栓により急性心筋梗塞を合併した場合には、上記の制約があっても救命のためには血栓溶解療法を施行しなくてはならない場合がある。成人領域では血栓溶解薬として、全身投与の場合には UK および t-PA がまた、ICT の場合にはウロキナーゼのみが保健適応となる。従って、小児期の ICT も UK のみが一応適応と考えるが、現状では多くの施設で t-PA による ICT が行われ、有効であったとの報告も散見された。

今回の調査結果では以下の点がまとめられる。

1. 血栓溶解療法として、併用例も含め全身投与療法を施行している施設が多く(78.6%)、症例では 70.8%に全身投与療法が行われていた。
2. 急性心筋梗塞症例に対しては全身投与療法と ICT の併用療法もしくは ICT を、非急性心筋梗塞症例では単独にて全身投与療法治療方法を選択する施設が多かった。
3. 血栓の発見までの時間が短いほど、また、血栓が小さいほど血栓溶解療法は有効である傾向にあった。
4. 血栓溶解療法の合併症として危惧され

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いで良いと思われた。

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. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 冠動脈疾患(下) - 診断と治療の進歩 - XV. 川崎病の診断・治療の現状
川崎病後遺症の診断と治療のガイドラインのポイント. 小川俊一 日本臨床 2011;69(Suppl 9): 529-535
- 2) 特集 川崎病の本体にせまる - 古くて新しい研究から - II. 検査にせまる (検査結果から本態にせまる)「冠循環」
小川俊一 小児科診療 2011;79:1163-1170

3) 冠動脈障害を有する川崎病既往者の冠循環動態および侵襲的治療前後の冠循環動態を考察する. 小川俊一、落 雅美 J Jpn Coron Assoc 2011;17:66-74

2. 学会発表

- 1) 「冠動脈バイパス術後 10 年以上経過した川崎病の 2 例」 勝部康弘、上砂光裕、阿部正徳、大久保隆志、深澤隆治、小川俊一. 第 6 回神奈川県川崎病研究会 (平成 23 年 2 月 26 日、横浜)
- 2) 「PTX3, a New Biomarker for Vasculitis, Predicts Intravenous Immunoglobulin Unresponsiveness in Patients with Kawasaki Disease」 Yasuhiro Katsube, Miharuru Akao, Makoto Watanabe, Masanori Abe, Mitsuhiro Kamisago, Ryuji Fukazawa, Shunichi Ogawa. The American College of Cardiology's 60st Annual Scientific Session (2011 年 4 月 3 日, New Orleans)
- 3) 「Data Mining 法を用いた川崎病遺伝子多型解析」 深澤隆治、菌部友良、濱岡建城、濱本邦洋、渡邊誠、阿部正徳、上砂光裕、勝部康弘、小川俊一
第 47 回日本小児循環器学会 (平成 23 年 7 月 7 日、福岡)
- 4) 「成人期の川崎病既往者における冠イベントの実態と病態の解明: 全国調査の初期報告」 三谷義英、津田悦子、賀藤均、小川俊一、中村好一、高橋啓、横井宏佳、濱岡建城. 第 47 回日本小児循環器学会 (平成 23 年 7 月 7 日、福岡)
- 5) 「バイオマーカーは症状の揃わない川崎病の補助診断になり得るか?」 勝部康弘、赤尾見春、渡辺誠、阿部正徳、上砂光裕、深澤隆治、小川俊一
第 111 回日本小児科学会学術集会

(平成 23 年 8 月 14 日、東京)

6) 「川崎病性冠動脈瘤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、佐藤圭子、大槻将弘、織田久之、高橋健、稀代雅彦、清水俊明

第 114 回日本小児科学会学術集会

(2011 年 8 月 1 東京)

7) 「就学以前に川崎病後冠動脈障害に対して CABG を施行された症例の予後」

渡邊誠、小川俊一、勝部康弘、深澤隆治、上砂光裕、大久保隆志、赤尾見春、阿部正徳

第 31 回日本川崎病学会・学術集会

(平成 23 年 9 月 30 日、横浜)

8) 「Significance of Primary Therapy With Intravenous Immunoglobulin Plus Prednisolone For Severe Kawasaki Disease: Result From Japanese Multicenter Randomized Clinical Trial」

Tohru Kobayashi, Tsutomu Saji, Tetsuya Otani, Kazuo Takeuchi, Tetsuya Nakamura, Hirokazu Arakawa, Taichi Kato, Toshiro Hara, Kenji Hamaoka, Shunichi Ogawa, Masaru Miura, Yuichi Nomura, Shigeto Fuse, Fukiko Ichida, Toyama Univ, Mitsuru Seki, Akihiro Morikawa
American Heart Association Scientific Sessions

2011

(2011 年 11 月 14 日、Orland)

9) 「Acute Coronary Syndrome in Adults with a History of Kawasaki Disease: A Japanese Nationwide Survey」

Yoshihide Mitani, Etsuko Tsuda, Hitoshi Kato, Shunichi Ogawa, Yosikazu Nakamura, Kei Takahashi, Mamoru Ayusawa, Touru Kobayashi, Fukiko Ichida, Masaki Matsushima, Masahiro Kamata, Takashi Higaki, Kenji Suda, Hiroyuki Ohashi, Hiroyoshi Yokoi, Kenji Hamaoka.
American Heart Association Scientific Sessions
2011

(2011 年 11 月 16 日、Orland)

10) 「冠動脈バイパス術後 15 年程経過した川崎病の 2 症例」

赤尾見春、勝部康弘、上砂光裕、阿部正徳、大久保隆志、深澤隆治、小川俊一

第 222 回 日本循環器学会関東甲信越地方会

(平成 23 年 12 月 3 日、東京)

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

川崎病血管炎における酸化ストレスと血小板凝集能測定の臨床学的意義

研究分担者 濱岡 建城 京都府立医科大学 小児循環器・腎臓科 教授

研究要旨：近年、動脈硬化の発症・進展において酸化ストレスの一次的あるいは二次的な関与が知られている。これらは炎症と共に悪循環を形成し、病態が進行していくと考えられており、川崎病における血管炎でも同様のことが引き起こされている可能性が考えられる。また、川崎病治療において血栓性閉塞や動脈硬化性病変への進展予防を目的として、急性期から回復期にかけて通常抗血小板療法が行われるが、その臨床薬理学的評価はなされていない。そこで、川崎病急性期における酸化ストレスおよび炎症性マーカーを測定し、臨床学的意義を検討した。さらに抗血小板療法のモニタリング法を検討した。IVIG 不応群では IVIG 治療後も炎症が完全には鎮静化されず、酸化ストレス状態も持続していた。これらの指標は、IVIG 不応の予測あるいは早期発見および急性期治療の効果判定に有用である可能性が示唆された。また、全血凝集能測定法を用いた薬効モニタリングの有用性も示された。

A. 研究目的

川崎病急性期では、広範な血管内皮障害により血小板凝集能の亢進および著名な血小板数増加が見られることが知られている。この血小板凝集能の亢進は、冠動脈瘤の形成に関与しているほか、血管病変の血栓性閉塞や動脈硬化性病変への進展においても重要な危険因子であるため、急性期から回復期にかけて通常アスピリンを中心とした抗血小板療法が行われている。また拡大性病変が残存した場合には長期に継続される。しかしながら、汎用されている抗血小板薬の適応や投与方法については必ずしも一定のエビデンスに基づき使用されているわけではなく、経過観察の過程においても十分な臨床薬理学的評価がなされていないのが現状である。

また、血小板の活性化経路は複雑であるため、そのターゲットも多様化している。新規抗血小板薬も盛んに開発され、作用機序の異なる薬剤も臨床応用されるように

なってきたが、その一方で、抗血小板薬の耐性を示唆する結果も数多く報告されており、そのことから、薬効を確認する必要性が高まっていると言える。

この問題に対し、我々はこれまでに薬効評価法の一つとして血小板凝集能を測定してきた。従来の測定法（光散乱法）は、採取した血液から精製した多血小板血漿を用いて、コラーゲン等の惹起物質により誘導した凝集塊の光透過性を測定することで血小板凝集能を測定していた。しかしながら、多血小板血漿の精製は非常に煩雑であるうえ個人差があるなど、調整法の標準化が困難であり施設間で異なるのが現状であった。近年、全血による測定法（吸引圧力法）が開発されたことで多血小板血漿精製についての問題が解消され、手技も簡便になったことから、日常診療への導入が期待されている。

一方、近年、動脈硬化性病変への進展において、炎症と酸化ストレスの関与が報告

されている。川崎病における激しい炎症により活性化された炎症性細胞からの活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) 産生は亢進し、また血管内皮細胞の産生系も循環するサイトカインの刺激により亢進していると推測される。これら過剰に産生された ROS は、さらに白血球や血小板、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞などに作用し、さらなるサイトカイン産生や接着因子発現等を介して炎症の拡大を引き起こし、ROS 産生も亢進するといった悪循環が形成されていると考えられるが、詳細は明らかではない。

酸化ストレスは、ROS の生成系と消去系のバランスが崩れ、生成系が亢進している状態と定義される。すなわち、酸化ストレスを検討するにあたり、ROS の生成系のみならず消去系について同時に評価する必要がある。

そこで本研究では、川崎病急性期における炎症および酸化ストレスを検討し、臨床学的意義について検討した。また川崎病治療における抗血小板療法について薬理的検討を行い、その薬効評価を行った。

B. 研究方法

1. 川崎病急性期における酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン動態

【対象】川崎病急性期 19 例。うち 6 例は、初回 IVIG 治療終了 48 時間後も 37.5℃ 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 不良例も初回 IVIG 投与 2 週間後には解熱していた。

【方法】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高感度 CRP、IL-1, 2, 6、および TNF- α を測定した。結果は、IVIG 治療直前におけるそれぞれの測定値を 100 とし、変化率を求めて検討した。

・ROM、BAP：ウイスマー社製フリーラジカル解析装置を用いて測定。

・高感度 CRP、IL-1, 2, 6、TNF- α ：BioPlex suspension array system を用いて測定。

2. 全血凝集能測定を用いた抗血小板薬の薬効評価

【対象】対象は川崎病遠隔期 37 例 (年齢 14.4 \pm 8.7)、うち無投薬群 17 例、抗血小板療法群 20 例であった。通常の採血時に併せて本研究用の血液を採取し、以下の測定を行った。

1) 血小板凝集能測定

○光散乱法：クエン酸加血から精製した多血小板血漿を用いて、血小板自然凝集時の凝集能を測定する。10 秒間に検出された散乱強度の合計 (総散乱強度) の変化を 10 分間経時的に測定し、形成された凝集塊の数に比例する値として定量化する。血小板凝集塊は既報の定義を用いて、散乱強度により小凝集塊 (径 9-25 μ m)、中凝集塊 (径 25-50 μ m)、大凝集塊 (径 50-70 μ m) とする。測定は自然凝集に加え、collagen 刺激を行い抗血小板治療効果を評価する。

○吸引圧力法：クエン酸加血に血小板凝集惹起物質として collagen または ADP を 4 濃度添加し、反応させた血液

がフィルターチップで吸引され、フィルターに血小板凝集塊が目詰まりすることにより生ずる陰圧を測定。測定結果は、4 濃度の凝集惹起物質で測定した不可逆性凝集曲線の最大凝集率を 100% とし、50%の凝集率とグレーディングカーブが交差した点を凝集閾値濃度 (PATI) として算出した (図 7)。反応開始 5 分後の値であるため、グレーディングカーブは 2 次凝集値として示され、PATI は 2 次凝集が得られる最低凝集惹起濃度を意味する。吸引圧力法を用いて測定

2) 血清トロンボキサン B₂ 測定

ELISA 法を用いて測定。

(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。すべての研究対象者に、研究内容を十分に説明し、検体提供について自由意思で承諾を得るよう努め、書面による同意を得た。研究対象者が若年でインフォームド・コンセントを得ることが困難な場合は、保護者等からのインフォームド・コンセントを得た。また、人権保護や個人情報保護に関して十分に配慮した。

C. 研究結果

1. 川崎病急性期における酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン動態

IVIG 奏功群の ROM (図 1) は、IVIG 直前は明らかな高値を示し (623.5±85.2 U.CARR、 $P<0.0001$ vs. control) だが、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。

一方、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)。しかし、IVIG 初回治療 2 週後 (追加治療後) には有意に低下していた (368.7±57.2 U.CARR、 $p<0.01$ vs. pre-IVIG and post-IVIG)。なお、IVIG 奏功群と IVIG 不応群の間で、IVIG 治療直前の値には有意な差は見られなかった。

IVIG 奏功群の BAP (図 2) において、IVIG 治療前 (2689.8±225.1 mol/L) と治療直後 (2695.4±280.0 mol/L) で明らかな変動は見られなかったが、IVIG 治療 2 週後は明らかな増加傾向を示し、IVIG 治療前および IVIG 治療直後と比較して有意に高値 (2870.0±189.3 mol/L、 $p<0.01$ vs. pre-IVIG、 $p<0.05$ vs post-IVIG) を示した。一方、IVIG 不応群の BAP は、IVIG 治療前 (2476.3±76.8 mol/L)、IVIG 初回治療直後 (2483.5±204.7 mol/L)、IVIG 治療 2 週後 (2564.6±162.9 mol/L) で、経過中で有意な変化を認めなかった。また、IVIG 不応群の BAP は対照群 ($p<0.01$) および IVIG 奏功群 ($p<0.05$) に比較して有意に低値を示していた。

IVIG 奏功群では 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 (図 3)。一方、IVIG 不応群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 は低下していなかった (図 4)。

2. 全血凝集能測定を用いた抗血小板薬の薬効評価

コラーゲン惹起による全血凝集能測定の PATI は、PRP 法のクラス判定と負の相関を示し ($R_s = -0.8697$; $p < 0.0001$) (図 5A)、ADP 惹起においても PATI は、PRP 法のクラス判定と負の相関を示した ($R_s = -0.6198$; $p < 0.0001$) (図 5B)。

コラーゲン惹起による抗血小板療法群の PATI は、無投薬群と比較して、有意に高値を示した (0.93 [0.56-1.37] vs. 0.24 [0.19-0.42], $p < 0.0001$) (図 6)。

ADP 惹起による抗血小板療法群の PATI は、無投薬群と比較して、有意に高値を示した (2.32 [1.03-4.58] vs. 1.26 [0.75-2.88], $p = 0.0002$) (図 7)。

抗血小板療法群における serum TXB₂ は、無投薬群と比較して有意に低値を示した (0.93 [0.014-10.5] vs. 109.7 [9.9-157.5], $p < 0.0001$) (図 8)。

チエノピリジン系薬剤の併用群 (n=4) の PATI は、非併用群と比較して、有意に高値を示した (3.51 [2.91-4.58] vs. 1.63 [0.75-3.52], $p = 0.0036$) (図 9)。

コンプライアンス不良例の PATI は、無治療群と同様に低値を示し、トロンボキサン B₂ は高値を示し、内服が改善されたと思われる 2 ヶ月後の PATI は上昇し、トロンボキサン B₂ は低下した (図 10)。

D. 考察

川崎病急性期における ROS 生成系の指標である ROM は、健常小児と比較して有意に高値を示した。それは IVIG 治療により奏功群では、速やかに低下したが、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。

また、奏功群における IVIG 治療前の ROS 消去系指標である BAP は、健常小児と有意な差はなく、IVIG 治療直後でも変化は見られなかったが、2 週間後に上昇した。一方で、不応群における IVIG 治療前の BAP は有意に低値を示し、IVIG による変化も認められず、奏功群とは明らかに異なる反応を示した。このことから、BAP が IVIG に対する反応性を予測するマーカーになり得る可能性が示唆された。また、IVIG 不応群では、ROM の低下および BAP の上昇が見られないことから、酸化ストレス状態が持続した状態にあることが予測される。酸化ストレスは炎症と相互に増悪因子として働くことは知られており、今回の検討においても、IVIG 奏功群において各炎症性マーカーは IVIG 治療により速やかに低下していったが、不応群においては hs-CRP よび IL-6 は低下したものの、IL-1, 2, TNF- α はほとんど変化しなかった。

IVIG 不応群において 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 T 細胞の活性化が知られているが、IVIG の T 細胞における NF- κ B 活性化抑制効果は弱いとされている。そのため、近年 IVIG 不応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 不応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、川崎病においても 2004 年に初めて使用例が報告されてから、IVIG 不応例に対する有効性が次々と報告されている。今回、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る。

しかしながら、これら新規治療法は未だエビデンスに乏しく、投与方法や安全性も確立されていない。したがって、今後もさらにデータを収集し、有効性および安全性について精査していく必要がある。

抗血小板薬の薬効評価法に関して、未だコンセンサスを得たものはなく研究の域を脱しないが、血小板凝集能測定は臨床的に有用と考えられる手段の一つとして挙げられている。血小板の活性化にはいくつもの経路があり、抗血小板薬の作用機序も様々であることから、それぞれの抗血小板薬に対する薬効評価を統一することは難しいとされている。しかしながら、血小板凝集能測定は凝集惹起物質を変えることで、作用機序の異なる抗血小板薬を評価することが可能である点で有用であると考えられる。しかしながらこれまで、従来の PRP 法では PRP 調整における諸々の問題により抗血小板薬のモニタリングとしての導入は難しかった。

近年、新たに全血による凝集能測定が開発され、全血のまま測定することで、PRP 調整の問題が解決された。また、この測定法では血小板のみならずその他の血球や、

血小板凝集に関与する様々な因子も含まれていることから、生体内で起こる現象に近い状態を試験管内で再現することが可能である。そしてさらには、検体の調整をする必要がなく測定自体が非常に簡便になったため、診療中あるいはベッドサイドでの測定が容易になった。

本研究により、コラーゲン惹起による全血凝集能測定の PATI と従来の PRP 法のクラス判定が相関関係を示し、全血凝集能測定が PRP 法と同等に評価可能であることが明らかになった。この結果をもとに、全血凝集能測定を用いてアスピリンの薬効評価を試みた結果、コラーゲン惹起による PATI において、アスピリンを中心とした抗血小板療法群と無投薬群では有意な差を認め、さらに、血清 TXB₂ も同様に有意な差が示された。アスピリンは血小板の COX-1 の作用を不可逆的に抑制し TXA₂ の生成を阻害することから、その TXA₂ の安定代謝産物である TXB₂ を調べることで、アスピリンの薬力学的な面から効果を確認することができる。

最近では、アスピリン抵抗性を示唆する報告が相次いでいるが、その原因は解明されていないうえに、定義も明確ではないが、コンプライアンスの問題も大きいとされている。コンプライアンスの維持や確認は、問診だけでは困難な場合もあるため、客観的指標が求められている。今回、コンプライアンスが疑わしい症例において、PATI は低値を、血清 TXB₂ は高値を示し、コンプライアンス不良であることを客観的に裏付けた。その後、服薬を促した 2 か月後の PATI は高値を、血清 TXB₂ は低値を示し、コンプライアンスの改善が確認され、

血小板凝集能測定と血清 TXB₂ (アスピリンのコンプライアンスについて)は客観的な判断材料となり有用であると考えられる。

さらに ADP 惹起による PATI においても抗血小板療法群と無治療群では有意な差が得られた。近年では作用機序の異なる薬剤を組み合わせることも多く、薬効評価も総合的に行う必要があると考えられる。ADP はチエノピリジン系薬剤の評価にも用いられるため、ADP 惹起による全血凝集能測定では、アスピリンおよびチエノピリジン系薬剤との併用例における総合評価を行い得る可能性が示唆された。

以上のことから、全血凝集能測定は川崎病遠隔期例に対する抗血小板薬の薬効評価に有用であることが示された。抗血小板薬の効果をモニタリングすることは、川崎病遠隔期の最大の目標である心血管イベント発症予防に向けて極めて重要であると考えられるが、実際にはほとんど行われていないのが現状である。今回検討した全血凝集能測定は、手技的にも非常に簡便であることから、置き去りにされてきた薬効モニタリングの日常診療への導入が進むことが期待される。そしてさらには、それらの結果が、川崎病に対する最適な抗血小板薬の選択や投与量確立への一助になるのではないかと考える。

E. 結論

本研究により、炎症性マーカーおよび酸化ストレス測定が、川崎病血管炎の病態評価および急性期治療の効果判定に有用である可能性が示唆された。また急性期から回復期に通常行われ、冠動脈障害残存例ではさらに継続される抗血小板療法の薬効

モニタリングにおいて、全血凝集能測定が有用であることも示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Hamaoka K. Dynamics of reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in the acute stage of Kawasaki disease. *Circ J.* 75(10): 2453-9, 2011

2. 学会発表

国際会議

・Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Ozawa S, Hamaoka K. Dynamics of Oxidative Stress in the Chronic Stage of Kawasaki disease. The 44th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (Innsbruck, Austria) 2010

・Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Ozawa S, Hamaoka K. Relationship between Inflammation and Oxidative Stress of Kawasaki Disease in Acute Phase. The 45th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (Granada, Spain) 2011

・Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Ozawa S, Hamaoka K. Relationship between inflammation and oxidative stress in acute Kawasaki disease. The 10th International Kawasaki Disease Symposium (Kyoto, Japan) 2012

・Suzuki C, Yahata T, Hamaoka A, Fujii M, Ozawa S, Hamaoka K. Utiligy of Whole-Blood Aggregation for

Evaluation of Anti-Platelet Therapy in Chronic Stage of Kawasaki Disease. The 44th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (Innsbruck, Austria) 2010

・ Suzuki C, Yahata T, Hamaoka A, Fujii M, Ozawa S, Hamaoka K. Whole-Blood Aggregation Test Stimulated by ADP for Evaluation of Blood Aggregation Activity in Kawasaki Disease Patients with Anti-Platelet Management. The 45th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology, (Granada, Spain) 2011

・ Suzuki C, Yahata T, Hamaoka A, Fujii M, Ozawa S, Hamaoka K. Use of whole-blood aggregation and serum thromboxane B2 to assess compliance with anti-platelet therapy in Kawasaki disease patients. The 10th International Kawasaki Disease Symposium (Kyoto, Japan) 2012

国内会議

・ 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. 川崎病急性期における酸化ストレス動態. 第 46 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2010 年 7 月 6 日～9 日、千葉

・ 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. IVIG 反応性の予測マーカー ～酸化ストレスおよび抗酸化力指標～. 第 30 回日本川崎病学会・学術集会 2010 年 10 月 10 日 11 日、京都

・ 八幡倫代, 鈴木千夏, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 中村明宏, 小澤誠一郎, 濱岡建城.

川崎病急性期病態における酸化ストレスと炎症の関連～炎症マーカーとの関係から～. 第 47 回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2011 年 7 月 6 日～8 日, 福岡
・ 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 8 月 12 日～14 日, 東京

・ 鈴木千夏, 八幡倫代, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 小澤誠一郎, 濱岡建城. 川崎病遠隔期における ADP 刺激全血凝集能測定法の有用性. 第 46 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2010 年 7 月 6 日～9 日、千葉

・ 鈴木千夏, 八幡倫代, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 小澤誠一郎, 濱岡建城. 抗血小板薬の効果判定における全血凝集能測定法の有用性. 第 30 回日本川崎病学会・学術集会 2010 年 10 月 10 日 11 日、京都

・ 鈴木千夏, 八幡倫代, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 小澤誠一郎, 濱岡建城. 川崎病例における血小板小凝集塊の生成と全血凝集能測定法による最低凝集惹起濃度の関係第 47 回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2011 年 7 月 6 日～8 日, 福岡

・ 鈴木千夏, 八幡倫代, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 中村明宏, 小澤誠一郎, 濱岡建城. 川崎病遠隔期における ADP 刺激全血凝集能測定法の有用性

・ 鈴木千夏, 八幡倫代, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 中村明宏, 小澤誠一郎, 濱岡建城. 川崎病抗血小板療法のコンプライアンス評価における血小板凝集能および血清トロンボキサン B₂ 測定の有用性 第 31 回

日本川崎病学会・学術集会 2011 年 9 月
30 日～10 日 1 日、神奈川

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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19例中で陽性試料は3例のみであった。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ことを示している。

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。ゲル中のタンパク質をPVDF膜に転写し、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。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。

ラット心臓の免疫組織学的染色は、常法に従いタンパク質 A に対する市販抗体 (Sigma 社) を用いて行なった。抗体の特異性は、タンパク質 A を過剰に発現させた HEK293T 細胞およびタンパク質 A の mRNA を siRNA 法によりノックダウンした同細胞を試料としたウェスタンブロッティングにて検討した。

C. 研究結果および考察

川崎病患者約 44 名について二次元ウェスタンブロットを行い、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。同様の実験をすべての患者について行い、抗原タンパク質を同定した (特許申請の関係で、タンパク質名は記載せずタンパク質 A と表記する)。

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 3 例のみであった (図 1)。

さらに、タンパク質 A に対する抗体を用いて、ラット心臓冠動脈を免疫組織染色した結果、冠動脈に陽性のシグナルを

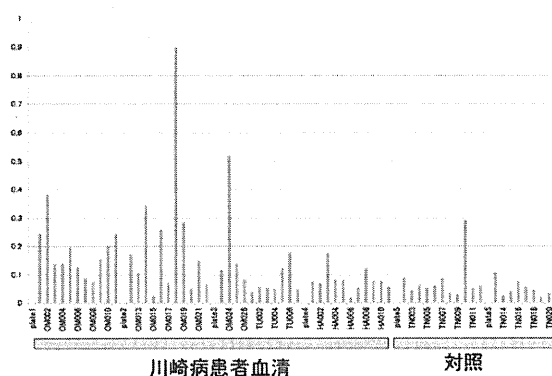


図1. タンパク質Aを抗原としたELISA測定結果
川崎病患者血清および対照者血清を用い、タンパク質Aを固相化したプレートを用いたELISA法により、抗体価を測定した。

得た。使用した抗体のウェスタンブロッティングにおけるシグナルは、タンパク質 A を過剰に発現させた HEK293T 細胞では、明瞭なシグナルであり、タンパク質 A の mRNA を siRNA 法によりノックダウンした同細胞では認められないことから、特異性は高いと考えられた。

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タンパク質 A を同定し、同タンパク質を用いた 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。また、タンパク質 A は、心臓冠動脈で発現しており、川崎病の主な病変が冠動脈に認められることから、タンパク質 A に対する免疫反応が発症要因の一つである可能性も示唆さ

れた。

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

研究発表

1. 論文発表

Hattori S, Kanda S, Harita Y. Tyrosine kinase signaling in kidney glomerular podocytes. *J. Signal Transduct.* 2011:317852.

Kanda S, Harita Y, Shibagaki Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, Hattori S. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC- γ 1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. *Mol Biol Cell.* 22(11):1824-1835, 2011.

Shirakabe K, Hattori S, Seiki M, Koyasu S, Okada Y. VIP36 protein is a target of ectodomain shedding and regulates phagocytosis in macrophage Raw 264.7 cells. *J Biol Chem.* 286(50):43154-43163, 2011.

Katsumata Y, Kawaguchi Y, Baba S, Hattori S, Tahara K, Ito K, Iwasaki T, Yamaguchi N, Oyama M, Kozuka-Hata

H, Hattori H, Nagata K, Yamanaka H, Hara M. Identification of three new autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus using two proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics.* 10(6):M110.005330, 2011.

学会発表

1. 服部成介 川崎病患者血清中の自己抗体とその抗原の解析 An autoantibody in sera of Kawasaki-Disease patients and analyses on its antigen. 第31回川崎病学会・学術集会 2011年10月1日 横浜

2. 抗インフルエンザウイルス創薬のための Capped RNA の合成法の開発。柴垣芳夫、生田尚子、井口幸子、水本清久、服部成介 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日 横浜

3. Otsuka, H., Akiyama, H., Gotou, Y., Tomatsu, M., Komen, T., Iida, N., Hattori, S., Kawasaki, Y., Tashiro, F. Analysis of membrane receptor aralin, a cancer-selective cytotoxic protein from Aralin eleta. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月14日 横浜

4. Ishido, N., Nagai, H., Kobayashi, H., Sako, Y., Arai, T., Hattori, S., Matsuda, M., Fukuda, M., Nakamura, T. Analysis of Rab35 function in neurite outgrowth using FRET biosensors. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15日 横浜

5. 飯田直幸、吉村憲彦、村越水香、武田彩香、高橋沙弥加、種五敦史、柴垣芳夫、服部成介 Proteomic identification of novel ERK substrates using in vitro phosphorylation: ERK phosphorylates adducin and regulates its interaction with F-actin.第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 横浜

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。

6. 持地保徳、柴垣芳夫、服部成介、太田安隆 キネシンファミリータンパク質 KIF11 は FilGAP 結合タンパク質である 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 横浜

7. 赤須仁美、佐藤龍洋、柴垣芳夫、服部成介 低分子量 G タンパク質 Rheb の新規シグナル伝達の解析 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 横浜

8. Shirakabe, K., Hattori, S., Seiki, M., Koyasu, S., Okada, Y. VIP36 is a target of ectodomain shedding and regulates phagocytosis in macrophage. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 横浜

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

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
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

川崎病患者の心後遺症の発生率を減らすためには、免疫グロブリン大量静注療法（IVIG 療法）に反応しない、いわゆる難治性川崎病を早期に診断して、適切な治療をできるだけ早期に開始することが必要である。本研究は、初回 IVIG に対する不応答および急性期の冠動脈障害を予測するためのバイオマーカーを同定することを目的とした。

B. 研究方法

IVIG 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）および幼若好中球が発現する polycythemia rubra vera 1 (PRV-1) の蛋白量を定量した。測定には、各々サイトメトリックビーズアレイシステム（BD バイオサイエンス）および免疫染色フローサイトメトリーを用いた。（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

当センターでは、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、2011 年 9 月までの月別の患者数と測定件数を図 1 に示す。2010、2011 年の総患者数は 111 名、160 名、検査件数は 342 件、451 件だった。インフリキシマブ療法を行った患者はこの間 15 名だった（図 1 の星印）。

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