

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K10042

研究課題名(和文)川崎病の発症に係る細菌同定およびheat-shock蛋白の産生動態に関する検討

研究課題名(英文)Molecular biological analysis on peripheral blood and pharyngeal mucosa of Kawasaki disease children

研究代表者

永田 智(Nagata, Satoru)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70266055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病患児の咽頭拭い液や末梢血検体から病原菌候補の菌群の遺伝子が検出されるか、急性期末梢血検体中にそれらの菌株特異的なHeat-shock protein(HSP) 60が検出されるか解析した。川崎病群22例、疾患対照群18例を対象としたところ、遺伝学的には*N. subflava*に近似した新種の*Neisseria*属の細菌が、患児の咽頭粘膜から対照群より36%高い検出率で検出された。Enterobacteriaceaeの遺伝子は病児咽頭粘膜のみから検出され、11例中6例はPasteurellaceae family に属していた。なお、血液検体中に、細菌遺伝子、特異的HSP60は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病患児の咽頭拭い液や末梢血検体から病原菌候補の菌群の遺伝子が検出されるか、急性期末梢血検体中にそれらの菌株特異的なHeat-shock protein(HSP) 60が検出されるか解析した。川崎病群22例、疾患対照群18例を対象としたところ、遺伝学的には*N. subflava*に近似した新種の*Neisseria*属の細菌が、患児の咽頭粘膜から対照群より36%高い検出率で検出された。Enterobacteriaceaeの遺伝子は病児咽頭粘膜のみから検出され、11例中6例はPasteurellaceae family に属していた。なお、血液検体中に、細菌遺伝子、特異的HSP60は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：To detect causative pathogens of Kawasaki disease (KD), we performed molecular biological analyses of peripheral blood and pharyngeal mucosa samples from 22 KD children and compared the findings with those of 18 disease controls in this study. Levels of heat-shock protein 60 (HSP60) were analyzed in the blood samples using an enzyme-linked immunosorbent assay.

Novel *Neisseria* species were detected with genetic profiles similar to those of *N. subflava* at a detection rate of 36% more in the KD mucosa than in controls, however, there was no statistical difference. Enterobacteriaceae genes were detected in only 11 KD mucosa samples, 6 of which belonged to the Pasteurellaceae family, while the others belonged to the Enterobacteriaceae family. No bacterial genes or those specific to HSP60 were found in any peripheral blood samples.

研究分野：小児科学分野

キーワード：川崎病 分子生物学的解析 咽頭ぬぐい液 末梢血 *Neisseria*属 Enterobacteriaceae

1. 研究開始当初の背景

川崎病の病因は未だ解明されていないが、流行性、季節性があることより何らかの感染症の関与が疑われている。しかし、日本人に多いなど宿主側にも川崎病へ罹患しやすい何らかの遺伝的特性を有することが推測され、単純な感染症とは言い難い。これまでの報告で得られた知見を考え合わせると、「ある遺伝的な背景をもった個体に川崎病発症の引き金となる微生物が感染し、発症する」という筋書きが一番病因を説明しやすいと考えられる。申請者らは、川崎病の病原体の侵入門戸として、抗原の侵入面積が著明に広く粘膜免疫が最も発達している消化管粘膜に着眼し、川崎病患児の上部消化管粘膜を生検し、宿主の免疫系を著しく活性化する何らかの抗原が侵入している可能性を示唆した。さらに、川崎病患児咽頭粘膜から得られた菌群を検出可能な PCR 用の 16SrRNA プライマーおよびそれらの菌株特異的 HSP60 を検出するポリクローナル抗体を協力研究者らと共に開発するに至った。

2. 研究の目的

申請者らの提唱している川崎病病原菌候補が、実際の川崎病患児の病態発症に強く関与していることを証明するために、川崎病で当科に入院した患児の咽頭拭い液や末梢血検体から、それらの菌群の遺伝子が検出されることおよび急性期末梢血検体中にそれらの菌株に特異的な HSP60、および自己抗原であるヒト HSP60 が検出されることを同年齢の川崎病以外の有熱疾患患者との比較において証明する。

3. 研究の方法

(1) 前向き観察研究：

川崎病患者においては、川崎病の診断を受けて入院し、治療経過中の患児で、治療開始前、ガンマ・グロブリン治療 (IVIG) などの治療終了時に、疾患対照患者では入院時に、それぞれ咽頭拭い液および定期検査のため採血した一部 (約 2.0ml) を試験項目である病原菌候補の 16SrRNA プライマーを用いた高感度定量と菌株特異的およびヒト HSP60 の測定に供した。

(2) 観察および検査項目

保護者に試験の説明を行い、試験参加の意思を確認の上、患者の適格性の確認し、以下の試験スケジュールに従って試験を実施した。咽頭拭い液の綿棒検体および定期検査のための血液検体に加え約 2.0ml の追加検体を採血し、うち全血 1.0ml を専用容器に入れ、小児科研究室の 4 冷蔵庫に一時保存した。残血液検体は直ちに遠心分離の上血清を採取して小児科研究室の -80 冷凍庫に保存した。これらの保存検体は、約 2 週間 j から 1 カ月に 1 回、共同研究先であるヤクルト本社 中央研究所に郵送し、前者を病原菌候補の 16SrRNA プライマーを用いた高感度定量測定用に、後者を菌株特異的およびヒト HSP60 の測定用に供した。検体の授受の際は、「11. 被験者の人権に対する配慮および個人情報の保護の方法」に基づき、被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者の秘密保護に十分配慮した。

(3) 評価項目

主要評価項目

- ・治療開始時の咽頭拭い液および血液検体における病原菌候補菌の遺伝子の検出 と 血液検体におけるそれら菌株特異的およびヒト HSP60 の検出状況
- ・川崎病患者においては、退院前の回復期検体における病原菌候補菌およびその菌株特異的および

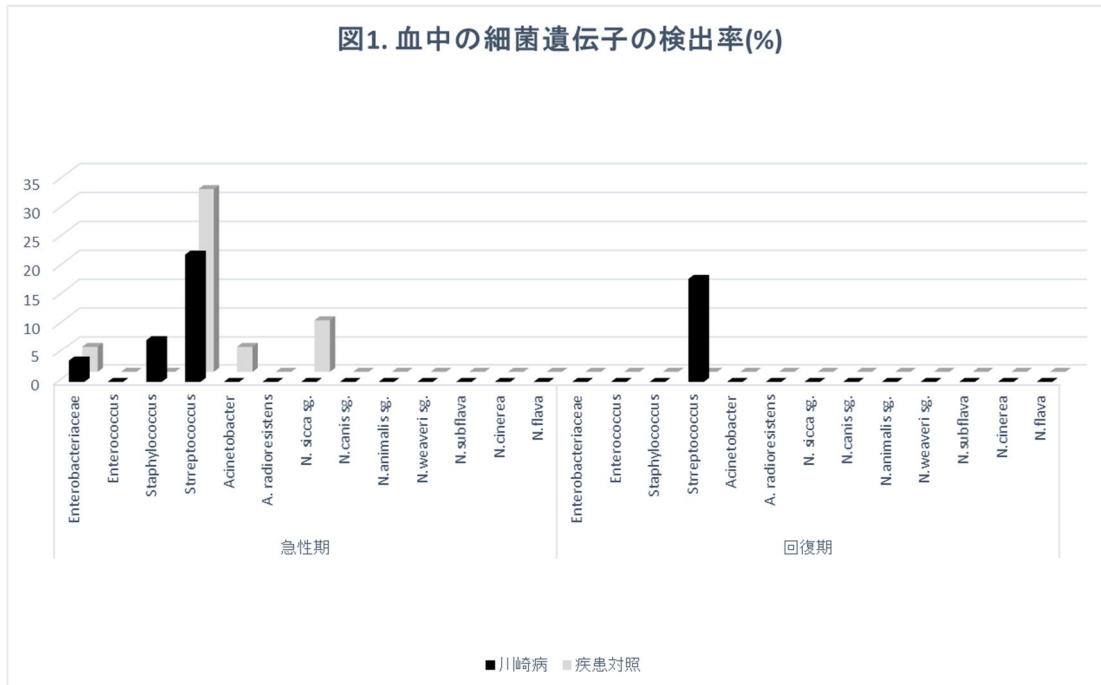
びヒト HSP60 の検出状況

副次的評価項目

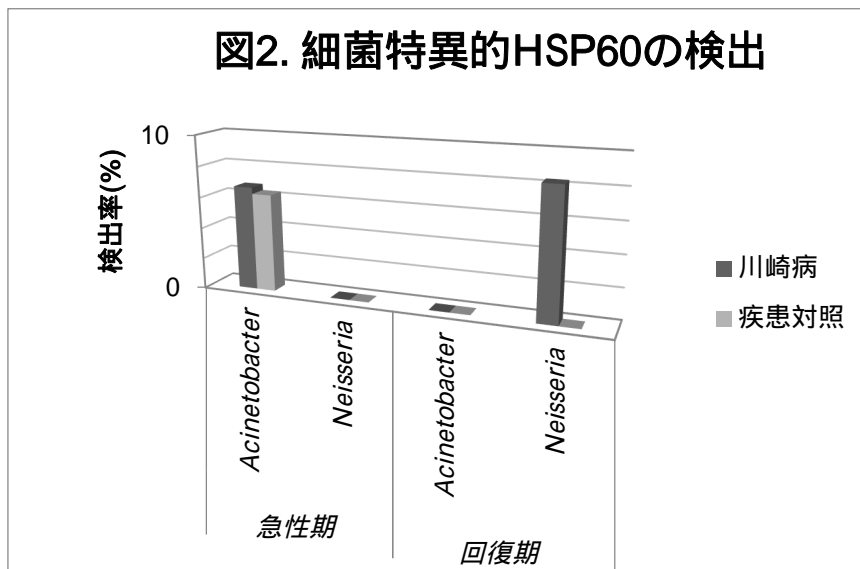
・川崎病患者においては、IVIG 不応例(2週間後)の冠動脈病変の発症率と病原菌候補の種類および菌株特異的および HSP60 の血中濃度の関連性

4. 研究成果

(1) 血液中の細菌遺伝子 (川崎病群 20 例、疾患対照群 16 例)の検出：川崎病群と疾患対照群間で、検出される細菌の種類に関しては明瞭な差異は認められなかった(図1)。



(2) 血清 Heat-shock 蛋白 (HSP) 60 の検出 (川崎病群 30 例、疾患対照群 16 例)：川崎病急性期血清で認められるものと予想していた Acinetobacter 特異的 HSP60 は、疾患対照群の血清中でも 1 例認められ、川崎病において特異的に血中に検出される蛋白と結論することはできなかった(図2)。Acinetobacter もしくは Neisseria HSP60 の患者血清中検出率は、川崎病群で 10%、疾患対照群で 6%程度であった。



(3) 咽頭ぬぐい液の細菌遺伝子の検出 (川崎病群 22 例、疾患対照群 18 例)：申請者らの過去

の検討で川崎病の発症に関与すると推測していた *Neisseria* 属の細菌は、新種のものであったが、細菌遺伝学的には *N.subflava* に最も近似するものであった。しかし、同菌は、川崎病群で疾患対照群より 36.0% 検出率は高まっていたが、Fisher's exact test では統計的有意差は認められなかった。一方、Enterobacteriaceae の遺伝子は川崎病群でのみ検出され、疾患対照群では一切検出されなかった。この Enterobacteriaceae 陽性検体における増幅産物の塩基配列を解析したところ、11 例中 5 例は、Enterobacteriaceae family、6 例は Pasteurellaceae family に属していた。

以上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoru Nagata	4. 巻 7
2. 論文標題 Causes of Kawasaki Disease-From Past to Present	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2019.00018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	鶴田 敏久 (Tsuruta Toshihisa) (70197771)	東京女子医科大学・医学部・非常勤講師 (32653)	
研究分担者	千葉 幸英 (Chiba Yukihide) (80567991)	東京女子医科大学・医学部・非常勤助教 (32653)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------