

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（c）

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22591190

研究課題名（和文）：川崎病の病因解明に対する新たなアプローチ

研究課題名（英文） New approach for the elucidation of the etiology of Kawasaki disease.

研究代表者：鈴木 啓之（Suzuki Hiroyuki）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80196865

研究成果の概要（和文）：

平成 22～24 年度に川崎病診断基準を満たして当院に入院した川崎病患児の内 58 例から、入院時に咽頭ぬぐい液を採取して、増菌培養し、DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて全 DNA を抽出し、5 つの SAg(SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J, TSST-1)断片について PCR で検討した。58 例中 7 例から SPE-G、6 例から SPE-J の遺伝子断片が検出された。1 例からは SPE-G, SPE-J の 2 つの SAg 遺伝子断片が検出されており、58 例中 12 例(20.7%)の咽頭ぬぐい液から GAS 由来のスーパー抗原遺伝子断片が検出された。この事実は再現性のあるものであり、重要なデータである。しかも、これらのすべての症例においても、咽頭培養からは GAS は検出されていない。従って、口腔・咽頭に存在するいかなる菌がこれらの SAg 遺伝子を保有するかは、非常に重要な点であり、本研究の主要テーマであった。しかし、今回の研究において未だその菌種を同定するに至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

We collected the samples of throat swab from 58 patients who met the diagnostic criteria for Kawasaki disease and were admitted to our hospitals. Bacteria from throat swab were cultured in liquid culture solution (Brain-Heart-Infusion). We extracted total DNA from those bacteria using DNA Mini Kit (QIAGEN). Using total DNA extracted from bacteria as a template, polymerase chain reaction (PCR) was performed for 5 SAg genes- streptococcal pyrogenic exotoxin type A(SPE-A), SPE-C, SPE-G, SPE-J, and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). SPE-G gene and SPE-J gene were detected in 7 and 6 of 58 patients, respectively. Both SPE-G gene and SPE-J gene were detected in one of 58 patients. Thus, gene fragments of superantigens derived from group A streptococcus (GAS) were detected in the samples of throat swabs from 12 of 58 patients (20.7%). These results were reproduced and very important. However, GAS was not detected from any patients in whom SPE-G and SPE-J gene were detected. Thus, it is very important point and the theme in this study that any kind of bacteria have these superantigen genes. Unfortunately, we could not isolate the bacteria in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1600000	480000	2080000
23 年度	1000000	300000	1300000
24 年度	700000	210000	910000
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児循環器学

1. 研究開始当初の背景

川崎病は疫学上、地域・時間集積性を認め感染性因子の関与が疑われてきたが、病原性を有する一定の感染性因子を分離できず、今なお原因不明である。我々は、川崎病患者の便中 DNA から *S.pyogenes*(GAS) が保有するスーパー抗原(SAg)遺伝子を有意に多く検出することを明らかにした(J Pediatr 2009;155:266-270)。

2. 研究の目的

今回、この新たな知見に基づいて、口腔・咽頭に存在し、病原性を想定されてこなかった常在菌(主にレンサ球菌)に SAg 遺伝子が transfer されている可能性を想定し、その SAg と細菌種を同定することが目的である。

3. 研究の方法

1) 検体収集：

対象となる小児の口腔・咽頭ぬぐい液を採取する。

2) 口腔・咽頭ぬぐい液の培養と得られた培養液から細菌 DNA の抽出

1) 得られた口腔・咽頭ぬぐい液を液体培地(Brain-Heart Infusion Broth, Trypticase- Soy Broth 等)で嫌気・好気培養で増菌を行う。*予期される問題点に対する配慮、問題が生じた時の対応策：目的とする SAg 遺伝子はプロフェージの形で細菌染色体中に組み込まれている可能性が高いため、目的とする遺伝子をより確実に増幅する目的で、増菌中(log phase)にマイトマイシンを添加することも考慮している。

3) 上記で得られた口腔・咽頭培養液から、DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて全 DNA を抽出し、PCR 使用時まで-20℃で保存する。

4) PCR による SAg 遺伝子の増幅

3)から得られた細菌由来の DNA を用いて以下の SAg 遺伝子について検討する。

① 今回検討する予定の SAg は、申請者がすでに便中の SAg 遺伝子で検討した SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J である。それぞれの SAg の特異プライマーを設定して、遺伝子増幅を行う(J Pediatr 2009;155:266-270)。

②陽性コントロールは、SPE-A, G, J は理化研の JCM No. 5674(*St. pyogenes*)、SPE-C は ATCC No. 700294(*St. pyogenes*)、TSST-1 は ATCC No. 51651(*St. aureus*)から DNA を採取して用いる。

5) 細菌の菌種同定：

① 4)で SAg 遺伝子が増幅された場合に、増菌された液体培地中のその SAg 遺伝子をもつ

細菌が含まれると予測される。これを分離同定するために、各種寒天培地(選択培地も含む)に液体培地の菌を散布し培養する。得られたコロニーの1つ1つの DNA を簡易法で抽出し、4)で陽性となった SAg 遺伝子の有無を PCR で確認する。

② 上記で陽性となった細菌の菌種を同定するために、コロニーから得られた DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行って菌種を最終的に同定する。

4. 研究成果

当院に入院した川崎病患者の内 58 例から、入院時に咽頭ぬぐい液を採取して、増菌培養し、DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて全 DNA を抽出し、5つの SAg(SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J, TSST-1)断片について PCR で検討した。58 例中 7 例から SPE-G、6 例から SPE-J の遺伝子断片が検出された。1 例からは SPE-G, SPE-J の 2 つの SAg 遺伝子断片が検出されており、58 例中 12 例(20.7%)の咽頭ぬぐい液から GAS 由来のスーパー抗原遺伝子断片が検出された。しかしながら、これらのスーパー抗原遺伝子を保有する菌・菌種の同定に至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. 鈴木啓之：川崎病の治療 日本臨床 (増刊号)：132-136, 2013 査読：無

2. 鈴木啓之：免疫抑制剤シクロスポリン A の有用性 小児科臨床 66(1)：25-31, 2013 査読：無

3. 佐地 勉、鮎澤 衛、三浦 大、小林 徹、鈴木啓之、森 雅亮、寺井 勝、小川俊一：川崎病急性期治療ガイドライン 日本小児循環器学会雑誌 28:supplement 3: S1-S28, 2012 査読：無

4. 垣本信幸、鈴木啓之、末永智浩、武内 崇、吉川徳茂、洪田昌一、濱田洋通、本田隆文、寺井 勝、笹子久美子、尾内善広、鈴木洋一、羽田 明：IVIG 不応川崎病症例に対する CsA 療法時の血中カリウム濃度の検討 Prog Med 32:1469-1473 2012 査読：無

5. Onouchi Y, Ozaki K, Burns JC, Shimizu C, Terai M, Hamada H, Honda T, Suzuki H, Suenaga T, Takeuchi T, Yoshikawa N, Suzuki Y, Yasukawa K, Ebata R, Higashi K, Saji T, Kemmotsu Y, Takatsuji S, Ouchi K, Kishi F, Yoshikawa T, Nagai T, Hamamoto K, Sato Y, Honda A, Kobayashi H, Sato J, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Murata Y, Sasago K, Takahashi A, Kamatani N, Kubo M, Tsunoda T, Hata A, Nakamura Y, Tanaka T, Japan Kawasaki disease Genome Consortium & US Kawasaki disease Genetics Consortium.: A genome-wide association study identifies three new risk loci for Kawasaki disease. *Nature Genetics* 44 (5): 517-521, 2012 査読 : 有
6. Hamada H, Suzuki H, Abe J, Suzuki Y, Suenaga T, Takeuchi T, Yoshikawa N, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Honda A, Onouchi Y, Terai M, and Hata A.: Inflammatory cytokine profiles during Cyclosporin treatment for immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. *Cytokine* 60:681-685, 2012 査読 : 有
7. 鈴木啓之 : 川崎病の本態にせまる –古くして新しい研究から– 肝機能障害小児科診療 74 (8): 1133-1136, 2011 査読 : 無
8. 鈴木啓之 : 川崎病の病因における新たな展望 –川崎病はスーパー抗原病?– *Prog Med* 31: 1688-1691, 2011 査読 : 無
9. 末永智浩, 鈴木啓之, 武内 崇, 垣本信幸, 吉川徳茂, 打田俊司, 岡村吉隆, 渋谷昌一 : 当院で経過観察中の川崎病巨大冠動脈瘤合併例の検討 *Prog Med* 31:1700-1703, 2011 査読 : 無
10. Suzuki H, Terai M, Hamada H, Honda T, Suenaga T, Takeuchi T, Yoshikawa N, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Onouchi Y, Sasago K, Suzuki Y, Hata A.: Cyclosporin A treatment for Kawasaki disease refractory to initial and additional Intravenous Immunoglobulin. *Pediatr Infect Dis J* 30:871-876, 2011 査読 : 有
11. 鈴木啓之, 荻野廣太郎, 中村好一, 上原里程, 屋代真弓, 柳川 洋 : 川崎病急性期にステロイド投与を受けた症例の冠動脈障害は発生の分析 日本小児科学会雑誌 114(5) : 853-857, 2010 査読 : 有
12. Kuroi A, Imanishi T, Suzuki H, Tujioka H, Yoshikawa N, Akasaka T.: Clinical characteristics of patients with Kawasaki disease and levels of peripheral endothelial progenitor cells and blood monocyte subpopulations. *Circ J* 74(12):2720-2725, 2010 査読 : 有
13. Suzuki H, Suenaga T, Shibuta S, Takeuchi T, Yoshikawa N.: Marker of T-cell activation is elevated in refractory Kawasaki disease. *Pediatr Int* 52(5):785-789, 2010 査読 : 有
14. Onouchi Y, Ozaki K, Burns JC, Shimizu C, Hamada H, Honda T, Terai 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* 19(14): 2898-2906, 2010 査読 : 有
- [学会発表] (計 13 件)
1. 鈴木啓之 : IVIG 不応例に対するシクロスポリン A の有用性と今後の展望 第 32 回日本川崎病学会 2012.10. 東京
2. Suzuki H.: Do multiple superantigens trigger the onset of Kawasaki disease? The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012 March 28-31, 2012, Tokyo, Japan
3. Kitano N, Suzuki H, Takeuchi T, Suenaga T, Kakimoto N, Shibuta S, Uemura S, Yohikawa N, Takeshita T: Epidemiological profile of Kawasaki disease in a complete enumeration study from 1999 to 2010 in Wakayama prefecture, Japan The 10th International Kawasaki Disease Symposium, February 7-10, 2012, Kyoto, Japan
4. Suenaga T, Suzuki H, Kakimoto N, Takeuchi T, Yohikawa N, Shibuta S. Analysis of time-clustering in resistance to intravenous immunoglobulin therapy for Kawasaki disease. The 10th International Kawasaki

Disease Symposium, February 7-10, 2012, Kyoto, Japan

5. Suzuki H.: Cyclosporin A treatment for patients with Kawasaki Disease Resistant to IVIG. The 10th International Kawasaki Disease Symposium, February 7-10, 2012, Kyoto, Japan
6. 鈴木啓之：シクロスポリン A の難治性川崎病治療における現状と今後の展望 第 28 回関東川崎病研究会 2011.11.26. 東京
7. 鈴木啓之：IVIG 不応の川崎病症例に対するシクロスポリン A 療法 第 114 回日本小児科学会学術集会 国際シンポジウム 1 川崎病 IVIG 不応例への治療戦略 2011.8.12. 東京
8. 鈴木啓之：2 回の IVIG に不応の川崎病症例に対するシクロスポリン A 療法 第 47 回日本小児循環器学会学術集会 特別シンポジウム 「IVIG 不応重症川崎病症例への挑戦 -炎症制御からみた治療 option-」 2011.7.6. 福岡市
9. 鈴木啓之：特別講演：川崎病の病因における新たな展望 -川崎病はスーパー抗原病？- 第 35 回近畿川崎病研究会 2011.3. 大阪市
10. 鈴木啓之、寺井 勝、尾内善広、浜田洋通、本田隆文、末永智浩、武内 崇、渋田昌一、吉川徳茂、鈴木洋一、羽田 明：川崎病重症度と ITPKC 遺伝子多型との関連性の分析 第 30 回日本川崎病研究会 2010.10. 京都
11. 鈴木啓之、寺井 勝、浜田洋通、本田隆文、末永智浩、武内 崇、渋田昌一、吉川徳茂、尾内善広、鈴木洋一、羽田 明：IVIG に不応例に対する治療プロトコール～シクロスポリン A 療法～ シンポジウム「難治性川崎病の治療戦略」～病態、作用機序から見た戦略～ 第 30 回日本川崎病研究会 2010.10. 京都
12. 鈴木啓之：川崎病は溶連菌毒素を中心とするスーパー抗原病？ ランチョンセミナー：「川崎病の病因解明の最前線」 第 30 回日本川崎病研究会 2010.10. 京都市
13. 鈴木啓之：難治性川崎病に対するシクロスポリン治療 シンポジウム：<近畿地区

における IVIG 不応(予測)例に対する急性期川崎病治療研究の今後> 第 34 回近畿川崎病研究会 2010.3.13. 大阪市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者：

鈴木 啓之 (Suzuki Hiroyuki)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80196865

(2) 研究分担者

吉川 徳茂 (Yoshikawa Norishige)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：10158412

武内 崇 (Takeuchi Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：10246522

末永 智浩 (Suenaga Tomohiro)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70433365

(3) 連携研究者

()

研究者番号：