

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001 - 50966

(P2001 - 50966A)

(43)公開日 平成13年2月23日 (2001.2.23)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/68		G 0 1 N 33/68	2 G 0 4 5
33/53		33/53	D
			W
33/92		33/92	Z

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 11数)

(21)出願番号 特願2000 - 65601(P2000 - 65601)

(22)出願日 平成12年3月9日(2000.3.9)

(31)優先権主張番号 88113771

(32)優先日 平成11年8月10日(1999.8.10)

(33)優先権主張国 台湾(TW)

(71)出願人 500112445

財團法人台湾養猪科学研究所
台湾苗栗縣竹南鎮郵政信箱23號

(72)発明者 李 文 權

台湾新竹市中華路六段七九九巷九弄四號

(72)発明者 黄 德 揚

台湾高雄市新興區建華里六鄰南台路一四四
之三號

(72)発明者 黄 高 彬

台湾苗栗縣竹南鎮營盤里建國路一五十巷五
弄二號

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 稔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 川崎病の診断のための方法およびシステム

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 典型的川崎病および非典型的川崎病を含む川崎病の検出法を提供する。

【解決手段】 川崎病であることが疑われる患者の血中におけるハプトグロビン (H p) レベル (重量 / 容量) の測定値 (A) 対アポリポタンパク質 A 1 (A p O A 1) レベル (重量 / 容量) の測定値 (B) の比率 (A / B) をインデックスとして算出し、該インデックスを所定の限界値と比較して、インデックスが所定の限界値より高い場合に当該患者が川崎病に罹患していると判定することからなる川崎病の診断方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 川崎病 (KD) であることが疑われる患者の KD 診断方法であって、当該患者におけるアポリポ蛋白質 A1 (ApoA1) レベル (重量 / 容量 w / v による) に対するハプトグロビン (Hp) レベル (重量 / 容量 w / v による) の比率をインデックスとして使用する方法。

【請求項 2】 川崎病 (KD) であることが疑われる患者の KD 診断方法であって、(a) 当該患者の血中ハプトグロビン (Hp) レベル (w / v) を測定して A 値を得ること、(b) 当該患者の血中アポリポ蛋白質 A1 (ApoA1) レベル (w / v) を測定して B 値を得ること、(c) A / B の比率をインデックスとして算出すること、(d) 段階 (c) で得られたインデックス A / B を限界値と比較すること、但し、この限界値に基づき、陽性テスト (PPV) の予測値が 70% より高いものである、そして、(e) もし、このインデックスが限界値より高い場合、当該患者が KD に罹患していると診断すること、を含む方法。

【請求項 3】 限界値が 2.0 より高いものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 限界値が 3.0 より高いものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】 限界値が 3.5 より高いものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】 KD が、患者が発熱後 3 - 10 日以内に診断され得る、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】 KD が、患者が発熱後 5 - 7 日以内に診断され得る、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 変態性または典型的川崎病 (KD) を、ハプトグロビン (Hp) のフェノタイプを使用することによって、KD であることが疑われる患者について診断し、早期に KD の処置戦術を決定する方法。

【請求項 9】 KD であることが疑われる患者について変態性川崎病 (AKD) を診断し、早期に KD の処置戦術を決定する方法であって、当該患者中のハプトグロビンのフェノタイプを同定し、もし Hp のフェノタイプが Hp 2 - 1 または Hp 1 - 1 であれば、CAA の生成を予防するために、当該患者の KD の処置が発症初日から 7 日以内に決定されること、を含む方法。

【請求項 10】 KD であることが疑われる患者について、当該患者におけるアポリポ蛋白質 (A1) の血中レベル (重量 / 容量による) に対するハプトグロビン (Hp) の血中レベル (重量 / 容量による) の比率をインデックスとして使用する、川崎病 (KD) の診断システム。

【請求項 11】 川崎病 (KD) であることが疑われる患者の KD 診断システムであって、(a) 当該患者の血中ハプトグロビン (Hp) レベル (w / v) を測定して A 値を得る手段、(b) 当該患者の血中アポリポ蛋白質* 50

* A1 (ApoA1) レベル (w / v) を測定して B 値を得る手段、(c) A / B の比率をインデックスとして算出し、次いで、このインデックス A / B を与えられた限界値と比較する、但し、この限界値に基づき、陽性テスト (PPV) の予測値が 70% より高いものである、そして、もし、このインデックス A / B が限界値より高い場合、当該患者が KD に罹患していると診断する手段、を含むシステム。

【請求項 12】 当該患者の血中ハプトグロビン (Hp) レベル (w / v) が、Hp に特異的なリガンドを用いる免疫分析によって測定される、請求項 11 に記載のシステム。

【請求項 13】 当該患者の血中ハプトグロビン (Hp) レベル (w / v) が、Hp に特異的なレジェンドを用いる免疫分析によって測定される、請求項 11 に記載のシステム。

【請求項 14】 KD であることが疑われる患者の AD または KID の診断システムであって、当該患者中の Hp のフェノタイプを同定する手段、但し、もし患者の Hp のフェノタイプが Hp 2 - 1 または Hp 1 - 1 であれば、CAA の生成を予防するために、当該患者の KD の処置が発症初日から 7 日以内に決定されることを含む、早期に KD の処置戦術を決定するシステム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、典型的川崎病および非典型的 (atypical) 川崎病を含む川崎病の検出法に関する。より具体的には、本発明は川崎病の診断のための方法およびシステムに関する。

【0002】

【従来の技術】川崎病 (以後、“KD”) は、最初に日本で川崎富作により記載された。KD は、特に 5 歳以下の子供に発症する、急性全身性脈管炎である。本疾病は、長期の熱、赤味ならびに手および足の硬化浮腫ならびに炎症の複数の臨床的および生化学的特徴および最も一般的に冠状動脈異常 (以後、“CAA”) の合併症により特徴付けられる。KD は、全ての人種背景の子供で世界中で認識されている。125,000 を超える例が、1994 年の最後までに報告されている (Shulman et al., Kawasaki Disease, Pediatric Rheumatology, 42:1205-1222, 1995); 日本での年間の発症例は、5 歳以下の子供 100,000 人当り 67 人である; 台湾では、この数は 5 歳以下の子供 100,000 人当り 32 人と概算される。米国では、発症例は年間 3,000 から 5,000 の範囲である。本疾病は、最も一般的に急性冠状動脈障害として証明されている。未処置で放置すると、重篤な合併症および死をもたらす。

【0003】現在、KD の診断の特異的試験は存在しない。病因が不明確なままであるため、初期の段階での明確な KD の診断は非常に困難である。KD の疫学および

び臨床的性質に基づいて、KDは同定されない感染性作用因子によりもたらされることが示されるが、KDは一定の遺伝的素因の個体において免疫介在症候群を導くことが確認されている。

【0004】KDは、5日以上続く熱、結膜充血、唇および口腔粘膜の変化、末梢四肢の変化、皮膚発疹および頸部リンパ節症を含む6個の症状のうち5個の同定により臨床的に診断される(Morens DM. et al., National Surveillance of Kawasaki Disease. Pediatrics 65: 21-258, 1980)。通常、6個の症状のうち5個がKDの決定の基準と見なされる。

【0005】臨床的顕示の種々の重症度および不定の相のため、KDに罹患しているある患者において、特徴的な冠状動脈異常が、KDの基準に合わない病気の発症の後に出現し、非典型的川崎病(AKD)と呼ばれる(Rowley et al., Incomplete Kawasaki Disease with Coronary Artery Involvement. Eur. J. Pediatr, 151: 577-580, 1992)。AKDの診断は、これらの患者が、6個の症状のうち3個か4個しか有しないため、困難である。実際、KDの決定の全ての基準に合わせるの、AKDの発見には厳しすぎ、心筋梗塞または突然死の続発症をもたらす。冠状動脈炎の全ての患者は、4個以下の症状を有する(Boven et al., Atypical Kawasaki Disease Citation: An Often Missed Diagnosis; (Joffe et al., Atypical and Complicated Kawasaki Disease in Infants, Do We Need Criteria?, West J Med, 162: 322-327, 1995)。冠状動脈異常(CAA)は、回復段階の間の心臓病による突然死をもたらすため、KDに付随する最も特徴的で恐ろしい合併症である(Syed et al., Coronary Artery Aneurysm: A Review, Progress in Cardiovascular Diseases, 40: 77-87, 1997)。ある場合アスピリンと組み合わせる静脈内免疫グロブリン(IVIG)での初期治療は、急性相のCAAの発生率を減少させるのに有効であることが判明した(Furusko et al., Japanese Gamma Globulin Trials for Kawasaki Disease, In Schulman ST, ed, Kawasaki Disease. New York: Alan R Liss Inc. pp. 425-432, 1986; Newburger et al., The Treatment of Kawasaki Syndrome With Intravenous Gamma Globulin. N Eng J Med 315: 341-347, 1986)。

【0006】抗腫瘍壊死因子モノクローナル抗体を使用した患者のKDの診断を確認する方法は、USP 5, 075, 236に記載された。更に、USP 5, 286, 623は、免疫アッセイまたはV₂またはV_{8.1}を発現するmRNAを測定することにより、V₂またはV_{8.1}のレベルを決定するために、患者から取ったサンプルを含むT細胞レセプターをアッセイすることを含む、患者におけるKDの可能性をスクリーニングする方法を提供した。毒素ショック症候群毒素-1(TSS-1)に特異的に結合する抗体を使用した、患者のKDの可能性のスクリーニング法は、USP 5 470 71

6に記載された。しかし、上記の引用文献の方法は、いずれも、これらの既知の方法で検出する物質が、また他の疾病に罹患している患者に存在するため、KDの厳密な診断または検出を提供しない。

【0007】上記のように、KDまたはAKDの処置の戦術を初期に決定できるように、初期段階でKDおよびAKDを診断するための有効で特異的な方法を発見する緊急で、非常に重要な必要性がある。

【0008】

【発明の要約】本発明の一つの目的は、患者のハプトグロビン(Hp)の血中レベル対アポリポタンパク質A1(A1)の血中レベルの比率を指数として使用した、川崎病(KD)の疑いのある患者のKDを診断する方法の提供である。

【0009】特に、請求している本発明は、

- (a) A値を得るための、患者のハプトグロビン(Hp)の血中レベル(w/v)の測定;
- (b) B値を得るための、患者のアポリポタンパク質A1(Apo A1)の血中レベル(w/v)の測定;
- (c) 指数としてのA/Bの計算;
- (d) (c)段階で得た指数A/Bとカットオフ値(限界値)との比較、ここでカットオフ値を基本にして、陽性予測値(PPV)は70%より高い;そして
- (e) 指数がカットオフ値より高い場合、患者をKDに罹患しているとして診断することを含む、KDの疑いのある患者の川崎病(KD)の診断法を提供する。

【0010】本発明の他の目的は、ハプトグロビンの表現型を使用した、KDの初期の処置の戦術を決定するための、KDの疑いのある患者の、非典型的(変態性)または典型的川崎病の診断法の提供である。本発明はまた、KDの疑いのある患者のKDおよび/またはAKDを診断するためのシステムを提供する。

【0011】

[図面の簡単な説明]

図1はKD患者のハプトグロビンの表現型を示す。図2(a)は、KDの疑いのある患者が発熱した日数および患者で提示されるHpの表現型を示す。図2(b)は、Hp表現型が各々Hp₂₋₂およびHp₂₋₁+Hp₁₋₁である患者のHpレベルを示す。

【0012】一つの態様において、本発明は、患者のハプトグロビン(Hp)の血中レベル(重量/容量)対アポリポタンパク質A1(Apo 1)の血中レベル(重量/容量)の比率を指数として使用した、川崎病(KD)の疑いのある患者のKDを診断する方法の提供である。

【0013】驚くべきことに、ハプトグロビン(Hp)の血中レベル(重量/容量)対アポリポタンパク質AI(Apo AI)の血中レベル(重量/容量)の比率が、KDの診断の指数として使用できることが、本発明により判明した。

【0014】ハプトグロビン(Hp)は、ヒトおよび他の

哺乳類の血液のような殆どの体液に存在するヘモグロビン結合急性相タンパク質である。患者のHpの血中レベルは、患者が炎症、異なる病因の感染、外傷、組織障害および悪性増殖に罹患している時増加するが、患者が溶血状態および重症肝細胞欠乏にある時、減少する。従って、Hpの血中レベルの変化は、種々の病理学的状態にある患者の診断および/または処置の効果の評価に使用できる(Dobryszcka W. 1997, Biological Functions of Haptoglobin-New Pieces to an Old Puzzle, Eur J Clin Chem Clin Biochem; 35: 647-654)。

【0015】Hpのレベルは、比濁アッセイを使用して測定できる。アッセイは感受性であり、2.5 - 7.4%の変化の係数(CV)の範囲のラン内精度および7.0(CV)のラン間精度を示す(Lente et al., Evaluation of a Nephelometric Assay for Haptoglobin and its Clinical Useness)。

【0016】アポリポタンパク質A I (Apo A I) は、95%より高い量で高密度コレステロールを含む血中の主要タンパク質である。Apo A I はまた比濁アッセイにより測定できる。

【0017】他の疾病に罹患している患者と比較して、KDに罹患している患者は、Hpの有意に増加したレベルおよびApo A I の有意に減少したレベルを有することが驚くべきことに判明した。従って、本発明において、HPの血中レベルとApo A I の血中レベルの比率(Hp/Apo A I)が指数として使用できると結論付けている。本発明に従って、本比率を使用したKDの診断法は非常な特異性を有する。

【0018】特に、KDの疑いの有る患者の川崎病(KD)の診断法は：

(a) A値を得るための、患者のハプトグロビン(Hp)の血中レベル(w/v)の測定；

(b) B値を得るための、患者のアポリポタンパク質A I (Apo A I)の血中レベル(w/v)の測定；

(c) 指数としてのA/Bの計算；

(d) (c)段階で得た指数A/Bとカットオフ値との比較、ここでカットオフ値を基本にして、陽性予測値(PPV)は70%より高い；そして

(e) 指数がカットオフ値より高い場合、患者をKDに罹患しているとして診断することを含む。

【0019】本発明の診断試験の精度を確認するために、本発明の方法のおよび陽性預言的値(PPV)への特異的、感受性を、引用して包含させるゴールド・スタンダード法(Charron et al., Diagnostic Value of Electrocardiography and Echocardiography for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy in a Genotyped Adult Population, Circulation Vol. 96, No. 1, pp. 214-219, 1997)により評価する。

【0020】本発明に従って、カットオフ値は、陽性予測値(PPV)の計算により決定できる。PPVは患者の

陽性試験の予測値である。例えば、患者の試験のPPVが70%より高い場合、患者がKDに罹患している可能性は70%より高いことを意味する。実施例1の表2に示すように、カットオフ値が2.0である時、PPVは70%より高いことが判明した。本発明に従って、カットオフ値は2.0(PPVは70%より高い)、好ましくは3.0(PPVは90%より高い)、および最も好ましくは3.5(PPVは95%より高い)である。

【0021】本発明に従って、KDは急性段階の患者の3 - 10日以内のように、好ましくは5 - 7日に、および理論的には疾病の最初の日のように、初期に診断できる。本発明は、KDの診断の単純で、簡単で経済的であり、感受性の方法である。

【0022】本発明の方法に従って、HpのレベルおよびApo A I のレベルは、体液サンプル、好ましくは血液サンプルで測定できる。好ましくは、サンプル中のHpおよびApo A I のレベルは重量/容量(w/v)で示す。KDの診断は、KDの疑いのある患者のHpおよびApo A I のレベルの測定、指数としての比率(Hp/Apo A I)の計算、およびカットオフ値と比率の比較により行い、比率がカットオフ値より高い場合、KDに罹患しているとして患者を診断する。

【0023】他の態様において、本発明は、ハプトグロビン(Hp)の表現型を使用した、KDの処置の戦術を決定するための、KDの疑いのある患者の、非典型的または典型的川崎病の診断法を提供する。本方法は、患者のハプトグロビン(Hp)の表現型の同定、上記段階で同定したハプトグロビン(Hp)の表現型を基本にした、KDの初期の治療の戦術の決定を含む。

【0024】ハプトグロビン(Hp)は遺伝的多形性を示す。3つの主な表現型(フェノタイプ)は、Hp 1-1、Hp 2-1およびHp 2-2として名付けられ、2つの対立遺伝子はHp 1およびHp 2である。Hp多形性は、免疫応答ならびに自己免疫および炎症疾患に関係すると思われる(Anglois et al., 1996, Biological and Clinical Significance of Haptoglobin Polymorphism in Humans)。ハプトグロビンの生物学的および臨床的な意義は、本質的に、ハプトグロビンとヘモグロビンの反応、ヘモグロビン刺激性脂質過酸化(peroxidation)に対する酸化防止作用およびプロスタグランジン合成における阻害効果が含まれる(Dobryszcka W., Biological Functions of Haptoglobin-New Pieces to an Old Puzzle, Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997; 35: 647-654)。しかし、従前の技術では、ハプトグロビンとKDの関係は開示されていない。

【0025】通常、不定型KDは、疾患(illness)初日から、7日内には見られず、患者は臨床的に診断され、そのため、KD処置のストラテジーを早期に決定することができない。驚くべきことに、本発明により、Hpの表現型は、KD内のCAA形成に付随することがわかっ

た。即ち、殆どのHp 2-2患者は、定型KDとして臨床的に診断され、殆どのHp 2-1およびHp 1-1患者は、不定型KDとして臨床的に診断された。KDの疑いのある患者において、Hpの表現型がHp 2-1またはHp 1-1であるならば、患者のKD処置は疾患初日から、7日以内に決定され、CAA形成を防止できることを示唆する。

【0026】本発明の開示は、急性段階のHpレベルがHpの表現型に基づき変化することである。Hpの表現型の同定に基づき、小児科医は、IVI G治療のような、KD治療のストラテジーを早期に決定し得、またKD処置のタイミングを決定し得、CAAを防止し得る。本発明に示すとおり、たとえ患者がAKDであると診断されても、Hp対立遺伝子を有する患者でCAAを患うケースを48.1%から8.3%に減少させることができ、KD処置を早期に決定できた。

【0027】ある実施態様では、本発明は、KDの疑いのある患者のKDおよび/またはAKDの診断システムを提供する。本発明のシステムには、以下の事項が含まれる。

(a) 当該患者におけるハプトグロビン(Hp)のレベル(w/v)を測定し、A値を得る方法、(b)当該患者におけるアポリポタンパク質AI(Apo AI)のレベル(w/v)を測定し、B値を得る方法、(c)指標としてA/Bの比を算出し、次いで、指標A/Bをカットオフ値(カットオフ値に基づく、陽性予測値(PPV)は70%よりも高くなる。)と比較し、指標(A/B)がカットオフ値よりも高ければ、当該患者をKD患者と診断する方法。

【0028】本発明により、HpおよびApo AIをそれぞれ検出する方法(HpおよびApo AIレベルを同定および/または測定することを含む)には、Hpに特異的なリガンドを用いる結合アッセイまたはApo AIに特異的なリガンドを用いる結合アッセイのようなもの、それぞれを含む。さらに好ましくは、リガンドは、ポリクローナル抗体であり、最も好ましくは、モノクローナル抗体である。HpまたはApo AIに特異的なポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体は当分野に既知の標準的技術により調製することができる。モノクローナル抗体を調製する方法には、任意の融合技術を通じて所望の特異性(HpおよびApo AIとの反応性)を有する抗体を作成できる不滅のセルラインを調製すること、および高い反応性および特異性を有するハイブリドーマを得ること、およびハイブリドーマコロニーの上清からモノクローナル抗体を得ることを含む。ポリクローナル抗体は商業的に利用することができる(Calbiochem Inc., USAなど)。

【0029】任意の既知のまたは通常の、HpまたはApo AIを検出する方法を本発明において使用することができる。好ましい実施態様において、HpまたはA

po AIのレベルは、固体支持体に固定化した抗体を用いるアッセイにより、測定することができる。次いで、結合したHpまたはApo AIは、レポーターを含む検出試薬を用い検出し得る。適当な検出試薬には、固定化抗体-Hp/Apo AI複合体と結合し、検出することができる任意の化合物を含む。好ましいレポーターには、酵素、基質、補因子、阻害剤、色素、放射能物質、発光物質および蛍光物質を含む。結合試薬とレポーターの結合は、当分野に既知の標準的方法を用い行い得る。通常結合試薬も商業的に利用し得る。

【0030】次いで、検出試薬を、固定化抗体-Hp/Apo AI複合体と十分な時間インキュベーションし、結合したHp/Apo AIを検出する。次いで、結合してない検出試薬を取り除き、結合した検出試薬を、レポーター基を用い検出する。レポーター検出に用いる方法は、レポーターの性質に依存する。放射能物質の場合、シンチレーション・カウンティングまたは放射能写真法が通常適当である。分光器方法を用い、色素、発光基および蛍光基を検出し得る。レポーターとしての酵素は、基質を加え、その後、その産物を分光器または他の分析により、通常検出し得る。

【0031】固体支持体は、当業者に既知であり、抗体が結合し得る任意の固体物質であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレートにおけるテストウェルまたはニトロセルロースもしくは他の適当な膜であり得る。他に、支持体は、ガラスのようなビーズまたはディスク、ガラス繊維、ラテックス、またはポリスチレンもしくは塩化ポリビニルのようなプラスチック物質である。

【0032】抗体は、当分野に既知の様々な技術を用い固体支持体に結合し得る。本発明のとおり、本明細書で使用する“結合する”という語は、非共有結合的会合(吸着のような)および共有結合的結合(直接結合または架橋試薬となり得る)の両方をいう。

【0033】特定の実施態様では、アッセイは、免疫吸着剤と結合した酵素(ELISA)である。アッセイは、最初に、固体支持体上に固定化された抗体とサンプルを接触させる。そのためサンプル内のHpおよびApo AIは固定化抗体と結合することができる。結合していないサンプルを、固定化抗体から取り除き、固定化抗体-Hp/Apo AI複合体と結合できる検出試薬を加える。

【0034】他の実施態様では、本発明は、KDの疑いのある患者においてAKDまたはKDを診断し、早期にKD処置のストラテジーを決定するシステムであって、患者のHp表現型を同定する方法(もし患者のHp表現型がHp 2-1またはHp 1-1ならば、患者のKD処置が疾患初日から7日以内に決定され、CAA形成を防止できることを示唆する)を含むシステムを提供する。Hpの表現型を同定する方法は、表現型Hp 1-1、Hp 1-

2およびHp 2-2を同定するための、Hp 2サブユニットおよびHp 1サブユニットに特異的なリガンドを用いる結合アッセイなどを含む。ハプトグロビンの表現型はまた、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ゲル電気泳動またはポリアクリルアミドゲルの等電点電気泳動のような当分野に既知の方法の後、上記のようにHp 1またはHp 2サブユニットに特異的な抗体を用いてイムノプロットすることにより、決定できる。

【0035】以下に実施例を、例示により提供するが、これらに制限するものではない。

【0036】実施例

実施例1 Hp/Apo AIの比率を使用することによるKDの診断

試料収集

KDの診断は、Department of Pediatrics of Kaohsiung Medical College, 台湾によるCenter of Disease Control(CDC, Morensら, 1980)(Morensら, Pediatrics 65:21, 1980)で確立された臨床基準に基づいた。血清試料をKD患者から集めた。外来患者の診療所を訪れたKDではない患者から得られた試料を正常な対照として連続的に集めた。加えて、本発明の方法の特異性を明らかにするために、長期にわたり発熱しているがKDではない肺炎の患者から得られた血清試料を病気の対照として連続的に集めた。血清試料は全て、24時間以内は4℃、または1ヶ月間は-20℃で保存した後、試料を生化学的に特性決定した。

【0037】イムノネ(immunone)によるHpおよびApo AIの測定

凍結させた血清試料または新たな血清試料を温めて室温に戻した。HpおよびApo AIのレベルをレイト・イムノフェロメティ(rate immunonephelometry)(IMMAGE™ 免疫化学システム, Beckman, 米国)により測定した。

【0038】結果

KD患者、肺炎患者、および正常な患者におけるHpおよびApo AIの血中レベルの変化を表1に示す。KDの子供達におけるHpの血中レベルは、正常な子供達におけるHpの血中レベルより約5、6倍高かった。しかしながら、KDの子供達におけるApo AIのレベルは、正常な子供達のApo AIのレベルより約52%低かった。肺炎のみを患っている子供達におけるHpのレベルは、正常な子供達のHpのレベルより約3.0倍高かった。肺炎を患っている子供達におけるApo AIのレベルは、正常な子供達のApo AIのレベルより35%低かった。

【0039】KD患者および正常な患者における比率(Hp/Apo AI)は、著しく異なっていた。KD患者における比率は、正常な子供達および肺炎を患っている子供達より、各々、13.6倍および2.45倍大きかった(表1)。従って、該比率(Hp/Apo AI)は、KDを診断するための指標として使用することができることを提示した。感受性、特異性、および様々な限界値に対する陽性の予測値を表2に記した。感受性は、次の式で計算する：

真陽性 / (真陽性 + 偽陰性) × 100。

【0040】特異性は、次の式で計算した：

真陰性 / (真陰性 + 偽陽性) × 100。

【0041】PPVは、次の式で計算した：

真陽性 / (真陽性 + 偽陽性) × 100。

【0042】表2に示すように、限界値は、PPVが70%より高いことを示す2.0より大きいという結論を下すことができ、十分な感受性および特異性は、5 - 10日間長期にわたり発熱している患者か、または5 - 7日間発熱している患者に対して得ることができた。

【0043】

【表1】

表1 川崎病を患っている対照および患者の臨床および実験データ

臨床および 実験データ	対照		川崎病
	健康	肺炎	
性別、M/F	23/12 (35)	15/5 (20)	20/13 (33)
年齢、月数	29.63 ± 14.62 ^a (35)	27.20 ± 18.34 ^a (20)	18.79 ± 13.96 ^b (33)
発熱開始後の日数	-	6.80 ± 1.58 ^a (20)	6.64 ± 1.37 ^a (33)
血小板, x 1000/mm ³	315.59 ± 116.82 ^a (17)	298.08 ± 137.74 ^a (13)	350.75 ± 156.86 ^a (28)
WBC, x 1000/mm ³	9.56 ± 3.24 ^b (16)	8.99 ± 2.98 ^b (14)	13.88 ± 5.81 ^a (28)
CRP, μg/mL	-	18.99 ± 50.50 ^b (14)	87.67 ± 77.19 ^a (23)
Hp, mg/dL	59.42 ± 42.91 ^c (33)	197.45 ± 94.94 ^b (17)	332.58 ± 94.45 ^a (33)
Apo AI, mg/dL	188.53 ± 34.72 ^a (34)	122.44 ± 28.38 ^b (17)	89.91 ± 34.78 ^c (33)
Apo B, mg/dL	74.14 ± 19.99 ^b (34)	82.19 ± 31.10 ^{ab} (17)	88.68 ± 24.11 ^a (33)
Hp/Apo AI	0.315 ± 0.143 ^c (33)	1.753 ± 1.010 ^b (17)	4.309 ± 2.17 ^a (33)

略語: Apo A I、アポリポタンパク質 A I; Apo B、アポリポタンパク質 B;
CRP、C反応性タンパク質; F、女の子; Hp、ハプトグロビン;
Hp/Apo A-I、Apo A-Iに対するHpの比率; M、男の子;
WBC、白血球。
値は、平均±標準偏差(SD)であって、試験した症例数を()内に示す。
同じ列にある様々な文字での上付き文字は、著しく異なる(P<0.05)。

【0044】

* * 【表2】
表2 KDを診断するためのHp/Apo AIに対する
感受性、特異性、陽性の予測値、および陰性の予測値

Hp/Apo AI 限界値	感受性	特異性	PPV*
KDの最終診断前の5-10日間の長期にわたる発熱			
3.5	0.697	0.941	0.958
3.0	0.758	0.882	0.926
2.5	0.788	0.706	0.839
2.0	0.879	0.412	0.744
KDの最終診断前の5-7日間の長期にわたる発熱			
3.5	0.615	0.933	0.941
3.0	0.731	0.867	0.905
2.5	0.769	0.667	0.800
2.0	0.885	0.600	0.793

*PPV: 陽性の予測値

【0045】実施例2 Hp表現型を使用するAKD診断法

サンプル収集

題目について、KDを有する3ヶ月から5歳および10ヶ月の54人の子供に対して試験した(表3に示す)。彼らは実際に、台湾のChungo-Ho Memorial Hospital、Kaohsiung Medical Collegeの小児科部門の患者である。患者は、2-28日の範囲、平均で8.5日間入院した。KDの診断は、疾病管理センター発行の臨床標準に30基づいて行なった(Center for Disease Control: CDC, Morens et al., 1980)。疾病段階の定義は、Schaller(19

96)の分類、これはHicksおよびMelish(1986)のものを修正したものである、に従って行なった。従って、主要な臨床所見および合併症を伴う1-10日の持続時間を、KDの“急性(acute)”段階と定義した。臨床所見および合併症を伴う11-20日の持続時間を、KDの“亜急性(subacute)”段階と定義した。KD患者と対照人口との間のHp表現型の分布を比較するために、診療所の外来患者の子供の血清サンプルを連続的に収集した。

【0046】方法

血清サンプルを新たに採取した血液から分離し、一定量に分け、-20で保存し、臨床化学試験用および実験

室試験用とした。Hpのレベルを免疫比濁割合で測定した(IMMAGE™ immunochemistry Systems, Beckman, USA)。典型および非典型KD患者全員に、二次元超音波心臓検査を行なった。膨張および動脈瘤を含む、CAA評価用の超音波心臓検査特徴を、日本のKD調査委員会から採用した。この特徴とは、冠動脈の、直径3.0mmまたはそれ以上への拡大である。表3で、亜急性段階のKDを有すると診断されており、IVIIG処置をしていない7患者を除外した。残った47患者(41人は急性段階と、6人は亜急性段階と診断)に高用量のIVIIG(2g/kg体重)およびアスピリン(60-80mg/kg体重)を投与した。亜急性KDからの回復の期間は、患者全員に低用量のアスピリン(3-5mg/kg体重)を処方した。

【0047】血清タンパク質のレベルをLowry方法で測定した。ウェスタン免疫ブロット法用の血清タンパク質100μgのサンプルを、はじめに12.5%硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析した。電気泳動後、ゲルを緩衝溶液(transfer buffer)(50mM トリスホウ酸塩、pH 8.3、1mM EDTA)に10分間浸した。次いで、分析したタンパク質を、ニトロセルロース膜上でセミドライ方法により電気移動した(OWL Scientific Plastics Inc. Cambridge, MA)。この膜を、トウイーンを含むト*

表3 川崎病患者および対照人口のハプトグロビン表現型分布

母集団	ハプトグロビン表現型分布 (母集団の%)				頻度 Hp ¹
	Hp 2-2	Hp 2-1	Hp 1-1	Hp 0-0	
川崎病# (n = 54)	50.0 (27)	42.6 (23)	7.4 (4)	0.0 (0)	0.293
参考					
台湾1998年(カオシユン)# (n = 198)	55.1 (109)	34.3 (68)	9.6 (19)	1.01 (2)	0.258
台湾 1962年(タイペイ)	52.9	37.7	9.3	0.0	0.273
中国 1983年(Han)	53.7	37.1	8.2	0.89	0.267

参照：台湾1998年、Lee et al., 1998; Taiwan 1962, Blaackwell et al., 1962; China 1983, Lianh et al., 1983. #川崎病の患者と台湾の対照人口との間のハ

プトグロビン分布は、有意な違いはなかった(P>0.05) 【0050】Hp表現型はCAA形成と関連することが示唆された。表4に示すとおり、表現型Hp 2-2のKD患者は急性段階と診断され、3人の患者がCAAを有していた。対照的に、急性段階と診断された表現型Hp 2-1のKD患者は、そのときCAAを有していた。表現型Hp 2-1の患者は最近亜急性段階と診断され、そのときその患者はCAAを有していた。さらに驚くべきことに、Hp 1-1を有する全てのKD患者は、亜急性

*リス緩衝食塩水(TTBS: 20mM Tris-HCl, pH 7.4、500mM NaCl、0.05% トウイーン20)中3%ゼラチンで1時間インキュベートし、TTBSですすいだ。その後、膜を、ヒトHp(Calbiochem; 1%ゼラチンを含むTTBSで1:5000希釈)のポリクローナル抗体で、室温で30分間インキュベートした。TTBSで3回洗浄した後、膜を、アルカリホスフェート(Sigma: 1%ゼラチンを含むTTBSで1:5000希釈)と共役したヤギ抗ウサギ抗体と、室温で30分間反応させた。この膜をTTBSで3回すすいで、発現緩衝剤(ニトロブルーテトラゾリウム 15mg、0.7% N,N-ジメチルホルムアミド、100mlに対して30mgの5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、1mM MgCl₂、および100mM NaHCO₃、pH 9.8)で室温で発現させた。

【0048】結果

KDを有する患者のHp表現型(図1および表3)を測定し、参考対照を伴うHp表現型の分布と比較した。表3に示すX²静止分析による結果のとおり、KDグループの3つの主要表現型Hp 2-2、Hp 2-1、およびHP 1-1の分配は、1998年に台湾で示された参考グループと比べて有意な違いはなかった。

【0049】

【表3】

段階でCAAを有していると診断された。3種類Hp表現型のKD患者のCAA形成割合は、Hp対立遺伝子1を有する患者がより高い発生率の進行CAAを有するという違いが見られた。図2は、KD診断前の熱の持続期間がHp表現型で異なることを示す(Hp 2-2: 6.90 ± 2.4日、Hp 2-1およびHp 1-1: 10.0 ± 4.4日、P=0.05)。上述の結果より、表現型と同様に血清Hpレベルは、CAA形成と関連があることが分かった。しかし、HP¹対立遺伝子をもつKD患者は初期発見することができず、早い段階で適切な処置を決定することもできなかった。それゆえに、HP¹対立遺伝子をもつKDが疑われる患者を7日以内にIVIIGで処置し、CAAの形成を防いだ。

【0051】

* * 【表4】

表4 KD患者における各段階での冠状動脈異常の形成とハプトグロブリン表現型との間の相関

ハプト グロブリン 表現型	冠状動脈異常の形成(%)				
	疾患段階 を分けな かった	疾患段階を10日目で分けた		IVIIG処置に関する仮定のタイミング	
		急性(≤10日)	亜急性(>10日)	タイミング1(≤7日)	タイミング2(>7日)
全体	44.4 (24/54)	35.7 (15/42)*	75.0 (9/12)*	28.1 (9/32)*	72.7 (16/22)*
Hp 2-2	40.7 (11/27) [ⓐ]	40.0 (10/25) [ⓐ]	50.0 (1/2) [ⓐ]	40.0 (3/20) [≠]	42.9 (3/7) [ⓐ]
Hp ¹ 対立 遺伝子	48.1 (13/27) [ⓐ]	29.4 (5/17) [ⓐ]	80.0 (8/10) [ⓐ]	8.3 (1/12) ^{*≠}	80.0 (12/15) ^{*ⓐ}
Hp 2-1	47.8 (11/23)	31.3 (5/16)	85.7 (6/7)	9.1 (1/11)	83.3 (10/12)
Hp 1-1	50.0 (2/4)	0.0 (0/1)	66.7 (2/3)	0.0 (0/1)	66.7 (2/3)

略語：Hp、ハプトグロブリン；IVIIG、静脈内免疫グロブリン；KD、川崎病。
 *KD疾患段階を10日目で分けない場合、CAA形成とHp表現型との間の相関は、有意な相違ではない(P>0.05)。
 *CAA形成と、KDと診断される前の段階での発熱日数との間の相関は、有意な相違である(P<0.05)。
 ≠IVIIG処置に関する仮定の有効タイミングを7日以内に設定した場合、CAA形成とHp表現型との間の相関は、有意な相違である。

【0052】実施例3. 臨床データ

Kaohsiung 医科大学(台湾)のChung-Ho記念病院・小児科で臨床試験が行われた。患者の診断はHp/Apo A1比を用いて行われ、処置方針が決定された。KDが疑われた各患者のデータは、年齢、Hp値、Apo A1

値、Hp/Apo A1比、およびハプトグロブリン表現型を含み、表5に示す。表から分かるように、患者のHp/Apo A1比はすべて3.5以上である。

【0053】
【表5】表5

患者番号	1	2	3	4	5	6
年齢(月)	5	29	76	14	52	77
ハプトグロブリン	335	442	528	576	332	245
Apo A1	92.8	97.9	99	78.1	34.9	53.8
Hp/Apo A1	3.61	4.51	5.33	7.38	9.51	4.55
表現型	不明	Hp 2-2	Hp 2-2	Hp 2-1	Hp 2-1	Hp 2-1

【0054】患者No1は入院前の3日間38.6の熱があった。入院第1日目で患者の体温は38.6であった。細菌培養の結果は陰性であり、病状が他の知られている経過から説明できなかった。患者の臨床状態は、KDについての通常の判定基準に適合しなかった。患者のHp/Apo A1値が3.61まで上り、入院第2日目に静注免疫グロブリン(IVIIG)で処置した。IVIIG処置後、患者の体温は急速に下り、正常範囲となり、血小板レベルが増加して、一般症状が改善された。さらに、心臓エコー検査で、患者に冠状動脈異常(CAA)が認められなくなった。継続的な発熱とCAAに加えて、患者に、唇の発赤、イチゴ状の舌、手掌と足裏の小さい肥厚と発赤および指の落屑などの症状があった。このことから患者がKDと思われた。

あった。入院第1日目で患者の体温は38.7であった。細菌培養の結果は陰性であり、病状が他の知られている経過から説明できなかった。患者の臨床状態は、KDについての通常の判定基準に適合しなかった。Hp/Apo A1値が4.51まで上り、患者を入院第2日目にIVIIGで処置した。IVIIG処置後、患者の体温は正常範囲まで下がり、血小板レベルが増加して、一般症状が改善された。継続的な発熱に加えて、患者に、CAA、イチゴ状の舌、手掌と足裏の紅斑および両掌の緩和な肥厚などの症状が見られた。このことから患者がKDと思われた。この患者のハプトグロブリン表現型はHp 2-2であった。

【0055】患者No2は入院前の6日間38の熱が50

【0056】患者No3は入院前の7日間39の熱があった。この患者は、別の病院で扁桃炎と誤診されていた。入院第1日目で患者の体温は38.2であった。

細菌培養の結果は陰性であり、病状が他の知られている経過から説明できなかった。患者の臨床状態は、KDを決定するための通常の判定基準に適合しなかった。患者のHp/ApA1価は5.33まで上がった。このHp/ApA1価からして、入院2日目にIVI Gで処置することが決定された。IVI G処置後、患者の体温は正常範囲にまで下がり、血小板レベルが増加して、一般症状が改善された。継続的な発熱以外に、患者に、CAA、唇と指の落屑、イチゴ状の舌などの症状が見られた。このことから患者はKDと考えられた。患者のハプトグロビン表現型はHp2-2であった。

【0057】患者No4は入院前の4日間40.9の熱があった。入院第1日目で患者の体温は39であった。細菌培養の結果は陰性であり、病状が他の知られている経過から説明できなかった。患者の臨床状態は、KDについての通常の判定基準に適合しなかった。発熱の7日間処置後でも、発熱は改善しなかった。Hp/ApA1価は7.38まで上り、患者を直ちにIVI Gで処置した。IVI G処置後、患者の体温は正常範囲に下がり、血小板レベルが増加して、一般症状が改善された。継続的な発熱に加えて、患者に、CAA、手および指の落屑、結膜炎、赤い口内などの症状があった。このことから患者がKDと思われた。この患者のハプトグロビン表現型はHp2-1であった。

【0058】患者No5は入院前の4日間38.5の熱があった。この患者は、別の病院で敗血症と誤診されていた。入院第1日目で患者の体温は38.5であった。細菌培養の結果は陰性であり、病状が他の知られている経過から説明できなかった。患者の臨床状態は、KDについての通常の判定基準に適合しなかった。Hp/ApA1価が9.51まで上がり、患者を入院第2日目にIVI Gで処置した。IVI G処置後、患者の体温は正常範囲にまで下がり、血小板レベルが増加して、一*

*般症状が改善された。継続的な発熱に加えて、患者に、CAA、手掌と足裏の落屑、結膜炎、イチゴ状の舌などの症状があった。このことから患者がKDと思われた。この患者のハプトグロビン表現型はHp2-1であった。

【0059】患者No6は入院前の4日間39の熱があった。この患者は、別の病院で猩紅熱と誤診されていた。入院第1日目で患者の体温は37.8であった。細菌培養の結果は陰性であり、病状が他の知られている経過から説明できなかった。患者の臨床状態は、KDについての通常の判定基準に適合しなかった。Hp/ApA1価が4.55まで上がり、入院第2日目にIVI Gで処置した。IVI G処置後、患者の体温は正常範囲まで下がり、血小板レベルが増加して、一般症状が改善された。継続的な発熱に加えて、患者に、指の落屑、結膜炎、イチゴ状の舌などの症状があった。このことから患者がKDと思われた。この患者のハプトグロビン表現型はHp2-1であった。

【0060】患者No4-6の臨床データからは、KDの通常の判定基準によっては早期にKDであるとHP2-1の患者を診断することができなかった。典型的でないKDであるからである。しかし、Hp/ApA1価を用いると、KDの診断が可能となり、早期にIVI Gでの処置ができる。CAA症状はIVI Gによる早期の処置で防ぐことができる。

【0061】上記の観点からしてHp/ApA1価はKDを失くするための指標として用い得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 KD患者のハプトグロビンの表現型を示す図である。

【図2】 (a)は患者の発熱日数およびHp表現型を示す図であり、(b)は異なる表現型の患者のHpレベルを示す図である。

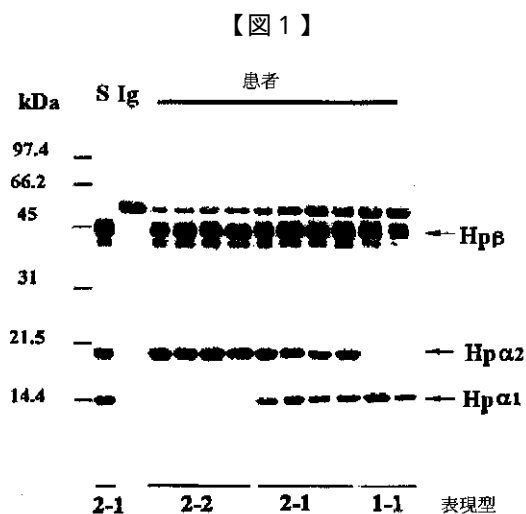
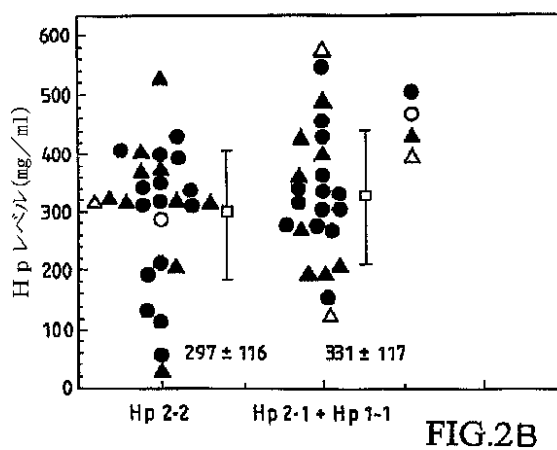
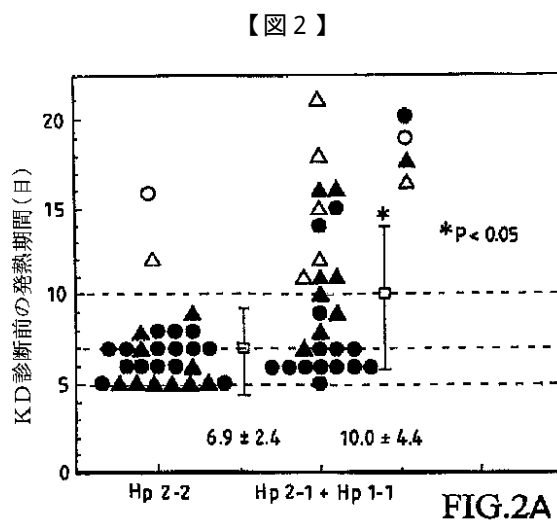


FIG.1



フロントページの続き

(72)発明者 陳 惠卿
台湾高雄市三民區寶中里十四鄰建興路二四三號

(72)発明者 金 悦祖
台湾高雄市三民區臥龍路六十巷一弄三號六樓

(72)発明者 邱 世欽
台湾台北縣三芝鄉後 村九鄰蘭陽街二十一號

(72)発明者 揚 瑞成
台湾高雄市左營區博愛二路一九八號十樓之

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 CA25 DA36 DA66
DA77 FB03 JA01 JA06

专利名称(译)	用于诊断川崎病的方法和系统		
公开(公告)号	JP2001050966A	公开(公告)日	2001-02-23
申请号	JP2000065601	申请日	2000-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	财団法人台湾养猪科学研究所		
申请(专利权)人(译)	财団法人台湾养猪科学研究所		
[标]发明人	李文權 黄德揚 黄高彬 陳惠卿 金悦祖 邱世欽 揚瑞成		
发明人	李文權 ▲黄▼▲德▼揚 ▲黄▼高彬 陳惠卿 金悦祖 邱世欽 揚瑞成		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/92		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/53.W G01N33/92.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/DA66 2G045/DA77 2G045/FB03 2G045/JA01 2G045/JA06		
优先权	088113771 1999-08-10 TW		
其他公开文献	JP3534306B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 要解决的问题: 提供一种检测包括典型川崎病和非典型川崎病在内的川崎病的方法。 解决方案: 怀疑患有川崎病(A)的患者血液中的触珠蛋白(Hp)水平(重量/体积)的测量值与载脂蛋白A1(ApOA1)水平的测量值(重量/体积)(计算(B)的比率(A/B)作为指标, 并且将该指标与预定极限值进行比较, 并且当该指标高于预定极限值时, 确定患者患有川崎病。 川崎病的诊断方法。

(7) 特開 2000-11

表 1 川崎病を患っている対照および患者の臨床および実験データ

臨床および 実験データ	対照		川崎病
	健康	肺炎	
性別、M/F	23/12 (35)	15/5 (20)	20/13 (33)
年齢、月数	29.63 ± 14.62 ^a (35)	27.20 ± 18.34 ^a (20)	18.79 ± 13.96 ^b (33)
発熱開始後の日数	-	6.80 ± 1.58 ^a (20)	6.64 ± 1.37 ^a (33)
血小板、x 1000/mm ³	315.59 ± 116.82 ^a (17)	298.08 ± 137.74 ^a (13)	350.75 ± 156.86 ^a (28)
WBC、x 1000/mm ³	9.56 ± 3.24 ^b (16)	8.99 ± 2.98 ^b (14)	13.88 ± 5.81 ^a (28)
CRP、μg/mL	-	18.99 ± 50.50 ^b (14)	87.67 ± 77.19 ^a (23)
Hp、mg/dL	59.42 ± 42.91 ^a (33)	197.45 ± 94.94 ^b (17)	332.58 ± 94.45 ^a (33)
Apo A1、mg/dL	188.53 ± 34.72 ^a (34)	122.44 ± 28.38 ^a (17)	89.91 ± 34.78 ^a (33)
Apo B、mg/dL	74.14 ± 19.99 ^b (34)	82.19 ± 31.10 ^b (17)	88.68 ± 24.11 ^a (33)
Hp/Apo A1	0.315 ± 0.143 ^a (33)	1.753 ± 1.010 ^b (17)	4.309 ± 2.17 ^a (33)

略語: Apo A I、アポリポタンパク質 A I; Apo B、アポリポタンパク質 B;
CRP、C反応性タンパク質; F、女の子; Hp、ハプトグロビン;
Hp/Apo A-I、Apo A-I に対する Hp の比率; M、男の子;
WBC、白血球。
値は、平均±標準偏差(SD)であって、試験した症例数を()内に示す。
同じ列にある様々な文字での上付き文字は、著しく異なる(P<0.05)。