

小児難病、川崎病に合併する心臓病を予防し、安心・安全な子育て支援に資する研究
A Study to Identify Comprehensive Childcare by Protecting Patients from the Intractable
Cardiac Complications Associated with Kawasaki Disease

平成24年 4月 ～ 平成26年 3月

永田 智

東京女子医科大学 医学部 教授

Satoru Nagata, M.D., PhD.

Professor & Chairman, Departments of Pediatrics, School of Medicine,
Tokyo Women's Medical University

全体要旨

川崎病の原因を確定するため、過去に申請者が患者の上部消化管から検出した「病原体の遺伝子」および川崎病の主要な合併症である冠動脈瘤形成の発端となる「病原体特異的なheat-shock protein(HSP)」を川崎病患者の臨床検体から検出しようとするツールの開発を試みた。

研究準備段階のゴールとして、病原体の遺伝子を分子生物学的に検出するプライマーの完成を目指した。その結果、目的菌の一つである*Acinetobacter*属細菌株は16S rRNA遺伝子の塩基配列を解読してみると、*A. Iwoffii*ではなく、*A. radioresistens*であったので、これに対する特異的primer s-Aradi-F / s-Aradi-R2 を作成した。次に目的とする*Neisseria*属菌株は、分子系統樹上、*Neisseria subflava*, *N. perflava*, *N. flavescens*と非常に近接しており、subgroupとして認識するprimerしか作製は困難であった。そこで、精度の高い*Neisseria*属・種特異的プライマーを作製するため、標準菌株(近縁菌種を含む)について、16SrRNA遺伝子のシーケンス解析を行い、18菌種のうち16菌種について16SrRNA遺伝子配列の解読を終了した。

本研究1年目では、*Neisseria*属の3菌種(*N. subflava*, *N. perflava*, *N. flavescens*)の16SrRNA遺伝子配列の解読後、*Neisseria*属の分子系統解析を行い、プライマーの再設計を試みた。その結果、系統的に5サブグループおよび2種に分けてそれぞれの特異的プライマーを構築し、その特異性にほぼ問題がないことを確認した。更に、病原体特異的HSP60タンパクの検出用の抗体作製を検討した。これまでに既報の配列より、*A. radioresistens*および*Neisseria*属HSP60遺伝子の全長を増幅可能なプライマーを設計し、このプライマーを用いて当該株におけるHSP60遺伝子配列を決定した。これらの遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列について近縁菌種とのアライメントを行い、種あるいは株特異的アミノ酸の特定およびエピトープの推定を試みた。その結果、各菌のHSP60を対象とした特異抗原を決定することができた (*Nesseria* 419-432; *Acinetobacter* 125-138; *Enterobacter* 426-439)。

本研究 2 年目では、病原体の遺伝子を分子生物学的に検出するプライマーについては、川崎病、疾患対照の臨床検体を用いた検証を、同疾患との関連が疑われる 3 種の HSP60 を対象とした特異抗原ペプチドの合成およびウサギへの免疫を検討することになっている。