

가와사키병 환자에서 혈장 및  
중성구의 elastase 활성도의 변화

연세대학교 대학원

의 학 과

홍 자 현

가와사키병 환아에서 혈장 및  
중성구의 elastase 활성도의 변화

지도교수 설 준 희

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

홍 자 현

홍자현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

## 감사의 글

본 논문을 완성하기까지 지도해주신 설 준희 교수님, 김 동수 교수님, 그리고 항상 세심하게 조언해주시고 격려해주신 이 종균 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 실험에 많은 도움을 주신 임상병리과의 김 현숙 교수님과, 심혈관 연구소의 황 기철 박사님, 이 경혜 선생님께도 깊이 감사의 말씀을 드립니다. 항상 마음의 안식처가 되어주시는 부모님과 격려와 협조를 아끼지 않은 남편과 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

저자 씀

# 차 례

국문요약-----	1
I.서론 -----	3
II.재료 및 방법-----	5
1. 연구대상-----	5
2. 연구방법-----	5
가. 혈장과 백혈구 분리-----	5
나. Elastase 활성도 측정-----	6
다. 통계처리-----	6
III.결과-----	8
1. 대상 환아들의 특성-----	8
2. 혈장과 중성구 추출물에서의 elastase 활성도-----	9
3. 가와사끼병의 경과에 따른 백혈구 수와 중성구 수의 변화--	10
4. 가와사끼병의 경과에 따른 elastase 활성도의 변화-----	11
IV.고찰-----	14
V.결론-----	18
참고문헌-----	19
영문요약-----	24

## 그림 차례

Fig 1. Comparison of elastase activity in plasma and neutrophil extracts-----	10
Fig 2. Changes of WBC and neutrophil count during the clinical course of Kawasaki disease-----	11
Fig 3. Plasma elastase activity in patients with Kawasaki disease-----	12
Fig 4. Changes of elastase activity in plasma and neutrophil extracts during the clinical course of Kawasaki disease-----	13

## 표 차례

Table 1. Clinical characteristics of patients-----	8
Table 2. Comparison of inflammation index-----	9

## 국문요약

### 가와사끼병 환자에서 혈장 및 중성구의 elastase 활성도의 변화

서론 : 가와사끼병은 초기 소아기의 전신적 혈관염의 일종으로 정맥용 면역글로불린으로 치료를 하더라도 10% 정도에서 발생하는 심혈관계 합병증이 문제가 되고 있다. 바이러스에 의한 심근염의 모델에서 HNE(human neutrophil elastase)가 핵심인자로 증명되고 있고, 가와사끼병 환자들의 조직검사 소견도 이와 비슷하여 저자들은 가와사끼병에서 심혈관계 합병증과 관련하여 HNE의 역할과 정맥용 면역글로불린의 효과를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법 : 2001년 11월부터 2002년 1월까지 연세의료원 소아과에 가와사끼병으로 입원한 환자 10명을 대상으로 하였고 대조군은 다른 열성 질환에 이환된 환자 15명으로 하였다. 가와사끼병 환자들에서 정맥용 면역글로불린 부여 전, 부여 1일 후, 발병 4주 쯤 심장초음파 검사를 시행하고 같은 시기에 말초 혈액을 얻어 혈장과 백혈구를 분리하여 각각에서 elastase 활성도를 측정하였다. 이 결과를 대조군의 것과, 그리고 가와사끼병의 경과에 따라 비교 분석하였다.

결과 : 1. 가와사끼병 환자들의 혈장 내 elastase 활성도가 대조군에 비해 유의하게 높았다. 2. 정맥용 면역글로불린 치료 1일 후 치료 전에 비해 혈장 내 elastase 활성도는 유의하게 감소하였고, 중성구 추출물의 elastase 활성도는 증가하였다. 3. 발병 4주 쯤 혈장 elastase 활성도는 다시 증가하여 치료 전과 같아졌으며, 중성구 추출물의 elastase 활성도 또한 감소하여 치료 전과 같아졌다. 4. 가와사끼병 환자 10명에서 심장초음파 검사 상 이상 소견은 발견되지 않았다.

결론 : 가와사끼병의 심근 손상에는 HNE가 관여하는 것으로 생각되며 심장초음파 검사 상 뚜렷한 이상이 없는 경우에도 잠재적 심근염 (occult myocarditis)이 동반되어 있을 가능성이 있다. 정맥용 면역글로블린은 중성구로부터 elastase의 분비를 억제함으로써 급성기 심근 손상의 진행을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다. 그러나, 아급성기 혈장 내 elastase 활성도가 다시 증가하는 것은 이 시기에 심혈관계 합병증의 발생률이 높은 것을 뒷받침하는 것으로 해석되며, 이의 진단을 위한 검사가 이 시기에 필수적으로 시행되어야 한다고 생각한다.

---

핵심되는 말 : human neutrophil elastase, 가와사끼병, 심근 손상, 정맥용 면역글로블린.



# 가와사끼병 환자에서 혈장 및 중성구의 elastase 활성도의 변화

<지도교수 설준희>

연세대학교 대학원 의학과

홍 자 현

## I. 서 론

가와사끼병(Kawasaki disease)은 초기 소아기의 열성 질환으로서 5일 이상의 발열, 양측 결막염, 부정형 발진, 경부 임파선 비대, 손발의 부종과, 피부의 낙설, 입술과 입의 변화(붉고, 마르고, 갈라진 입술, 딸기모양의 혀)를 특징으로 하는 전신적 혈관염(systemic vasculitis)이다<sup>1</sup>. 이 질환의 가장 흔하고 심한 합병증은 관상 동맥염(coronary arteritis)으로서, aspirin만으로 치료하였을 경우 환자의 25%에서 발생하였지만, 정맥용 면역 글로블린(Intravenous immunoglobulin)을 치료에 이용하면서 발생 빈도가 감소하여, 1999년 Yanagawa 등은 2221명의 가와사끼병 환자들 중 11.6% (257명)에서 심혈관계 합병증이 발생하는 것을 보고하였다<sup>2</sup>. 그러나, 이것이 갑작스런 사망의 원인이 될 수 있고, 소년기에 발병하였던 상당수의 환자가 성인이 되어 심근 경색 및 확장성 심근증(dilated cardiomyopathy)으로 진행할 수 있어<sup>3</sup>, 심혈관 병변 발생의 예방에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있다<sup>2</sup>.

가와사끼병의 병인론으로 보체계의 활성화<sup>4</sup>, IL-6, 8, TNF- $\alpha$  등의 사이토카인(cytokine) 생성 증가<sup>5</sup>, 혈관 내피세포에서 HLA class II 항원<sup>6</sup> 및 ICAM-1의 발현이<sup>7</sup> 증가되고 결국 혈관내피세포의 손상을 유발한다<sup>8</sup>는 연구결과가 발표되었고, 그 방아쇠 인자로서 bacterial lipopolysaccharide-bound neutrophil의 역할이 보고된 바 있지만<sup>9</sup> 아직 확립된 것은 없다. Human neutrophil elastase(HNE)는 일종의 serine proteinase로서 주로 중성구 내 아주르친화성 과립(azurophilic granule)에 저장되어 있지만, 핵막(nuclear membrane), 골지체(Golgi apparatus), 내형질세망(endoplasmic reticulum), 사립체(mitochondria)와 중성구 표면에도 일부 존재하는 것으로 되어있다<sup>10</sup>. 세포 외로 분비되면 정상 상태에서는 90%에서  $\alpha$ 1-antitrypsin을 비롯한  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor와 결합하여 활성이 억제된 상태로 존재하지만, 병적인 상태에서는 효소-억제제간 상호 균형이 깨지면서 활성이 증가되어 elastin 뿐만 아니라 세포 외 기질 성분(extracellular matrix component)인 type I-IV collagen, proteoglycan, fibronectin을 분해하는데, 특히 기저막을 이루고 있는 type IV collagen을 분해할 수 있기 때문에 중성구의 혈관외유출(extravasation)을 가능하게 하여 조직의 괴사를 초래할 수 있도록 한다. 또한 IL-2, TNF- $\alpha$ , interferon 등의 사이토카인을 활성화시키며, ICAM의 발현도 증가시키는 것으로 알려져 있다. 혈관염의 병인론으로서 HNE의 역할은 사구체 신증<sup>11</sup>, 제 2형 당뇨의 혈관병증<sup>12</sup> 등에서 이미 밝혀진 바가 있으며 대동맥류(aortic aneurysm)의 원인으로서도<sup>13</sup> 이미 규명된 바가 있다.

일종의 혈관염인 가와사끼병에서 HNE 활성도에 대한 연구는 세계적으로 극소수이고<sup>14-16</sup>, 국내 보고는 전무하다. 이에 본 연구자는 가와사끼병에서 HNE의 역할을 규명하고, 병의 경과에 따른 HNE활성도의 변화를 측정함으로써 심혈관계 합병증의 발생에 미치는 정맥용 면역글로불린의 역할을 알아보고자 실험을 시행하게 되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

2001년 11월부터 2002년 1월까지 연세의료원 소아과에서 가와사끼병으로 진단받고 정맥용 면역글로불린으로 치료받은 환자 10례를 대상으로 하였다. 진단은 1984년 Kawasaki Disease Research Committee in Japan<sup>17</sup>의 진단기준에서 전형적인 것만 하였고, 비전형적인 것은 제외하였다. 대조군은 같은 기간 내 가와사끼병을 비롯한 혈관염이 아닌 다른 열성 질환에 이환된 환자들로 하였다. 본 연구는 보호자로부터 고지에 입각한 동의 (informed consent)를 받아 시행되었다.

### 2. 연구 방법

가와사끼병의 경과 중 미세혈관염(microvasculitis)의 소견을 유발하는 발병 10일 이내의 급성기로서 1) 정맥용 면역글로불린 투여 전과 2) 투여 1일 후, 그리고 3) 관상 동맥 확장 및 혈관 내피세포의 증식이 시작되는 발병 4주 후에 각각 말초혈액검사와 함께 혈장 및 중성구 추출물(neutrophil extracts)의 elastase 활성도를 측정하였다. 같은 날 심장초음파 검사를 시행하여 좌심실 구출율(ejection fraction), 심낭 삼출(pericardial effusion)의 유무, 관상동맥 주위 에코 증가의 유무, 관상 동맥 확장의 유무를 조사하였다. 대조군에서도 치료 전 말초 혈액 검사와 함께 혈장 및 호중구의 elastase 활성도를 측정하였다.

#### 가. 혈장과 백혈구 분리

환자의 정맥으로부터 혈액 10 mL를 채혈하여 100 IU의 헤파린이 담긴 튜브에 넣고, 6% dextran in 0.9% saline 용액 2.5 mL를 첨가하여 4℃에서

30분간 세워두어 혈장과 leukocyte rich upper layer를 분리해낸 후 혈장은 elastase 활성도 측정 시까지  $-180^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. Leukocyte rich upper layer는 튜브에 넣고 cold ammonium-chloride solution 과 10 분간 반응시켜 적혈구를 용혈시킨 후 200xg에서 10 분간 원심 분리시킨다. Pellet만 꺼내어 8 mL의 FTA-ABS buffer를 넣은 후 200xg에서 10 분간 원심 분리시킨다. 세척 과정을 2-3회 반복한 후, pellet에 FTA-ABS buffer를 넣어 균질화되도록 섞은 후 elastase 활성도 측정 시까지  $-180^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

#### 나. Elastase 활성도 측정

EnzChek™ Elastase Assay Kit(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 이용하여 시행하였다. 백혈구 막의 용해를 위해서는 cell lysis buffer(New England BioLab, Beverly, MA, USA)를 이용하였다. Microwell plate (12.7 X 8.5 cm; 96 flat bottom wells, Numc InterMed, Denmark)에 reaction buffer (Tris-HCl; 0.1 M, pH 8.0)를 well마다 50  $\mu\text{L}$ 씩 넣고, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 DQ elastin을 50  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여 잘 섞어준다. 혈장은 10  $\mu\text{L}$ 씩, 백혈구 추출물은 10  $\mu\text{g}$ 씩 넣고, negative control에는 reaction buffer 50  $\mu\text{L}$ 를 넣어 실온에서 차광하고 30 분간 배양시킨다. Fluorescence microplate Leader LS 50B(Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)로 excitation/emission 485/530 nm 의 조건에서 fluorescence intensity를 측정하였다. 결과는 혈장의 경우는 이미 elastase의 농도를 알고 있는 표준액으로 측정한 standard curve와 비교하여 elastase의 활성도를 산정하였고, 백혈구 추출물의 경우는 흡광도 값(absorbance; A)을 그대로 이용하였고 이것을 환아 말초 혈액 검사 상 중성구 수의 비율로 보정하였다.

#### 다. 통계처리

통계처리는 SPSS 10.0 for Windows 프로그램을 이용하여 시행하였다.

가와사끼군과 열성 질환군의 비교에서는 Student's t test를 이용하였고, 가와사끼군에서 병의 경과에 따른 비교에서는 paired t test를 이용하였다. 모든 변수에서 정규성 검정을 시행하였다. 유의수준은 p 값이 0.05 미만인 것으로 하였다.

### III. 결 과

#### 1. 대상 환아들의 특성

가와사끼병 군과 열성 질환군의 입원 당시 나이에 유의한 차이는 없었다 (Table 1). 남녀비는 열성 질환군에서 여아의 비율이 더 많았으나, 성별에 따른 elastase 활성도의 차이는 없는 것으로 알려져 있어 결과에 영향을 미치지 않는 것으로 생각한다. 가와사끼병 환아들의 치료 전 발열 기간은 평균  $5.1 \pm 0.9$  일(4-7 일) 이었고, 정맥용 면역글로불린 2 g/kg 투여 후 모든 레에서 해열되었다. 열성 질환군은 15례 였고 살모넬라 감염 2례, 화농성 관절염 1례, 기관지 폐렴 7례, 급성 인후염이 5례 였다.

Table 1. Clinical characteristics of patients

	Group 1	Group 2
No. of patients	10	15
Male:Female	6:4	4:11
Age (month)	$39.7 \pm 28.3$ (12-86)	$35.1 \pm 21.9$ (11-96)

Values are expressed as mean $\pm$ SD (range)

Group 1. Kawasaki disease group

Group 2. Febrile disease group

입원 당시 환아들의 염증 지표인 백혈구 수, 중성구 수, C-반응성 단백 (CRP)의 농도에 있어 양군 사이에 모두 유의한 차는 없었다(Table 2).

Table 2. Comparison of inflammation index

	Group 1	Group 2	p value
WBC (No./mm <sup>3</sup> )	14714±6947 (5900-29150)	12204±4488 (6700-25800)	0.282
Neutrophil (No./mm <sup>3</sup> )	10584±7005 (2460-24780)	6902±3372 (3150-15990)	0.148
C-reactive protein	5.18±3.95 (0.4-12.2)	5.23±4.98 (0.19-17.71)	0.984

Values are expressed as mean±SD (range)

Group 1. Kawasaki disease group

Group 2. Febrile disease group

## 2. 혈장과 중성구 추출물에서의 elastase 활성도

혈장 elastase 활성도는 가와사끼병 군에서 6.19±0.74 (4.44-7.27) U/mL로 열성 질환군 (4.86±1.17 (3.53-6.97) U/mL) 에 비해 유의하게 높았으나, 중성구 추출물의 elastase 활성도는 가와사끼병 군과 열성 질환군 각각에서 6.35±1.70 (4.35-9.02) absorbance(A)/μg 과 7.78±4.14 (1.77-14.16) A/μg로 양군간 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 1).

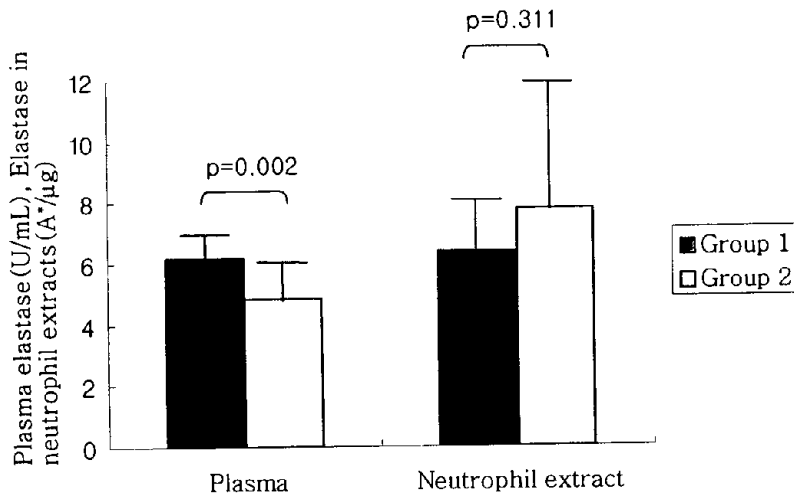


Figure 1. Comparison of elastase activity in plasma and neutrophil extracts. \*: absorbance, Group 1: Kawasaki disease group, Group 2: Febrile disease group.

### 3. 가와사키병의 경과에 따른 백혈구 수와 중성구 수의 변화

백혈구 수의 경우 정맥용 면역글로불린 투여 전 ( $14714 \pm 6947$  개/ $\text{mm}^3$ )에 비해 투여 1일 후 ( $7780 \pm 3620$  개/ $\text{mm}^3$ )와 발병 4주 후 ( $9359 \pm 1493$  개/ $\text{mm}^3$ )에는 유의한 차이가 있었으나, 투여 1일 후와 발병 4주 후 사이에는 유의한 차이가 없었다. 중성구 수의 경우, 정맥용 면역글로불린 투여 전 ( $10584 \pm 7005$  개/ $\text{mm}^3$ )에 비해 투여 1일 후 ( $2968 \pm 1985$  개/ $\text{mm}^3$ ) 유의한 감소를 보였고 발병 4주 후 ( $4578 \pm 1228$  개/ $\text{mm}^3$ ) 다시 유의한 증가 소견을 보였지만 정맥용 면역글로불린 투여 전에 비해서는 유의하게 감소한 결과를 보였다 (Figure 2).



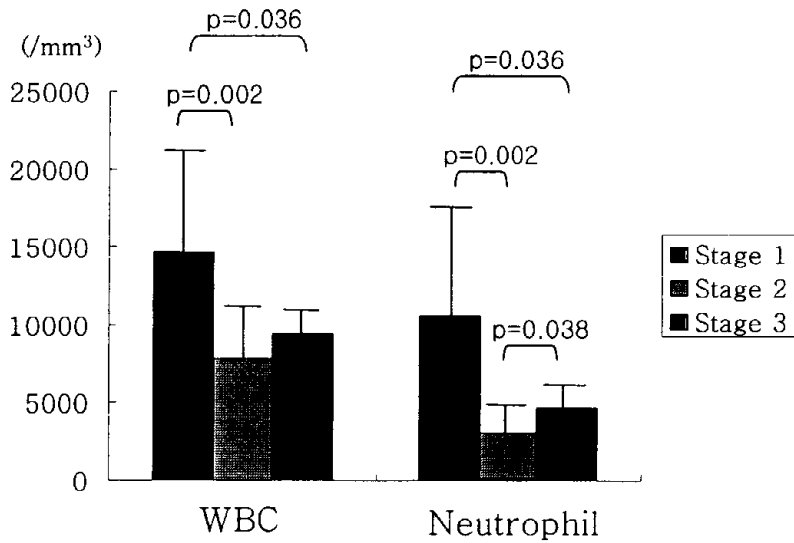


Figure 2. Changes of WBC and neutrophil count during the clinical course of Kawasaki disease. Stage 1: before infusion of intravenous immunoglobulin, Stage 2: 1 day after infusion of intravenous immunoglobulin, Stage 3: 4 weeks after disease onset.

#### 4. 가와사키병의 경과에 따른 elastase 활성도의 변화

가와사키병 환아들의 경과에 따른 혈장 내 elastase 활성도의 변화를 보면, 환아 4, 9를 제외하고는 정맥용 면역글로블린 투여 후 1일째 투여 전에 비해 활성도가 감소하였으며, 환아 2, 8을 제외하고는 발병 4주째 다시 활성도가 증가하였다. 환아 4의 경우 다른 환아들에 비하여 정맥용 면역글로블린 투여 후 혈장 elastase 활성도가 높았는데, 심장초음파 검사 상 이상소견은 없었다(Figure 3).

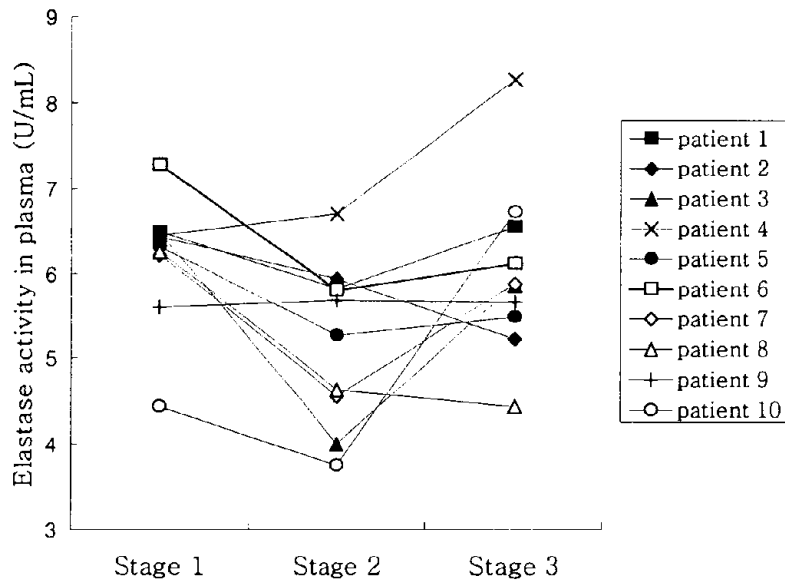


Figure 3. Plasma elastase activity in patients with Kawasaki disease. Stage 1: before infusion of intravenous immunoglobulin, Stage 2: 1 day after infusion of intravenous immunoglobulin, Stage 3: 4 weeks after disease onset.

가와사키병의 경과에 따른 혈장 elastase 활성도는 정맥용 면역글로불린 투여 전  $6.19 \pm 0.74$  (4.44-7.27) U/mL 에 비해 투여 1일 후  $5.22 \pm 0.94$  (3.75-6.70) U/mL 로 유의하게 낮아졌고, 발병 4주 후에는  $6.02 \pm 1.03$  (4.43-8.28) U/mL 로 다시 유의하게 높아졌다. 반면, 중성구 추출물의 경우에는 정맥용 면역글로불린 투여 후  $12.62 \pm 3.11$  (8.47-19.27) A/ $\mu$ g 로 투여 전  $6.35 \pm 1.70$  (4.35-9.02) A/ $\mu$ g 에 비하여 유의하게 활성도가 증가하였고, 발병 4주 후에는  $8.67 \pm 3.46$  (4.11-24.27) A/ $\mu$ g 로 다시 유의하게

감소하였으며 투여 전과 발병 4주 후 사이에는 유의한 차이가 없었다 (Figure 4).

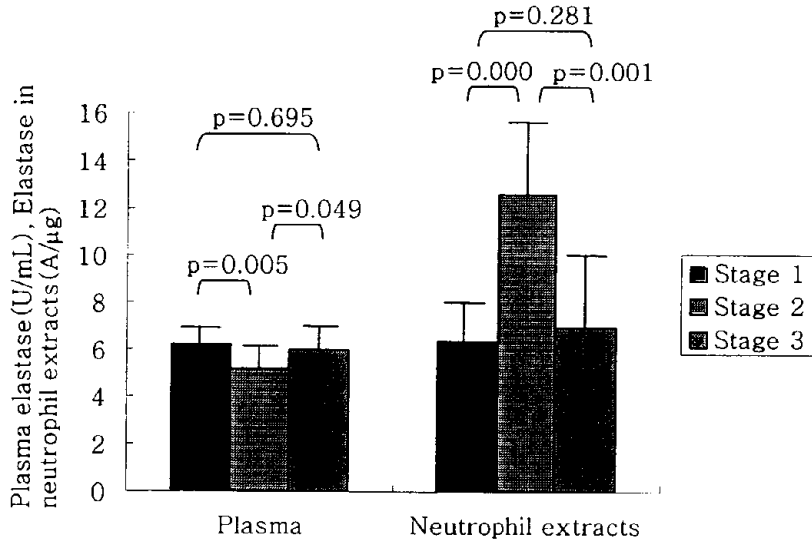


Figure 4. Changes of elastase activity in plasma and neutrophil extracts during the clinical course of Kawasaki disease. Stage 1: before infusion of intravenous immunoglobulin, Stage 2: 1 day after infusion of intravenous immunoglobulin, Stage 3: 4 weeks after disease onset.

#### IV. 고 찰

가와사키의 심혈관계 침범을 급성기와 아급성기로 나누어 생각할 때, 급성기의 주된 심장 병변은 심근염, 심막염, 판막염을 동반한 심내막염, 전도계의 염증 그리고, 주분지동맥(major branch artery), 소관상동맥(small coronary artery), 세동맥(arteriole), 모세혈관, 세정맥(venule)을 포함하는 모든 관상동맥의 혈관염 소견을 보이는 것으로 되어 있고<sup>18-19</sup>, 아급성기의 경우 관상동맥의 확장 또는 관상동맥류의 발생이 가장 흔한 시기이다. 관상동맥류의 경우 혈관 내벽의 비후, 혈전의 침착 등과 동반된 혈류 저하에 따른 심근 허혈로 심근경색으로 진행할 수 있음은 잘 알려져 있다.

그러나, 관상동맥의 협착이나 확장이 없는 경우 심장 손상의 기전은 아직 명확하게 밝혀지고 있지 않다. 조직학적으로는 발병 10일 이내의 미세혈관염(microvasculitis)소견 및 4주까지 지속되는 심근염의 소견과 이 때 나타나는 관상동맥내의 단핵구 침윤, 부종, 섬유화 내피세포 증식 및 내탄력층(internal elastic lamina)의 파괴 등의 소견이 보고되고 있어<sup>18-21</sup> 급성 바이러스성 심근염 때 나타나는 소견<sup>22-23</sup>과 유사한 것으로 생각된다. 최근 Liu 등이 가와사키 환아들의 심내막(endomyocardial)조직 검사 결과의 초미세구조적 특징을 미세혈관의 확장, 혈관내피세포의 손상(injury), 혈전을 동반한 혈소판 침착(agggregation) 그리고, 소세동맥(small arteriole) 벽의 비후와 내경의 협착(stenosis)으로 보고하였고 이런 소견들은 회복기(convalescent stage) 이후에도 지속되며 심혈관계의 후유증과 깊이 연관되어 있다고 보고하였다<sup>24</sup>. 또한 이러한 심근과 관상 미세혈관(coronary microvascular) 병변은 관상동맥 병변과도 깊이 연관되어 있어 이러한 관상 미세혈관 병변이 가와사키 병의 지속적인 후유증의 근본요인이 될 가능성이 있음을 제시하였다. 이런 소견들을 종합하여 볼 때 가와사키병의 심장손상 기전을 급성 바이러스성 심근염 때 나타나는 “microvascular spasm” 과 “reperfusion injury”에 의한<sup>25</sup> 가설을 제시할 수 있다. 또한

급성기부터 완해기까지의 가와사끼병의 모든 경과 중, 관상동맥 혈관 촬영의 결과와 Tc<sup>99m</sup>-HMPAO WBC 관류 스캔 결과사이의 불일치가 보고되고 있어 잠재적 심근염(occult myocarditis)의 가능성이 제시되고 있으며<sup>26</sup> 이것은 심장 미세순환의 폐쇄에 의한 결과로 해석된다.

심근의 허혈 후 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)에서 중성구의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데<sup>27</sup> 이러한 중성구의 혈관의 유출을 가능하게 한다는 점에서 human neutrophil elastase(HNE)의 역할에 관한 연구가 많이 되어져왔다. 심근의 허혈 후 재관류 모델에서 elastase 가 심근경색의 핵심인자로 작용하며 elastase 억제제를 사용할 경우 경색의 정도를 줄일 수 있다는 것은 이미 많은 연구를 통하여 증명되고 있다<sup>28-30</sup>. 바이러스성 심근염에서도 허혈 후 재관류에 따르는 중성구의 혈관의 유출에 elastase가 핵심적인 역할을 하며<sup>31</sup>, elastase 억제제인 elafin의 선택적인 과발현(overexpression)으로 심근 손상을 줄일 수 있었다는 보고가 있었다<sup>32</sup>. 이런 보고들을 종합하여 볼 때 가와사끼병의 심근 손상에도 elastase가 핵심적인 역할을 할 것으로 생각할 수 있다.

본 연구 결과 치료 전 가와사끼병 환자에서 다른 열성 질환군 환아들과 비교할 때 중성구 수의 유의한 상승은 없으면서 혈장 elastase 활성도는 유의하게 증가되어 있어 이것이 급성기 가와사끼병의 병리에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 심장초음파 검사 상 급성기에 이상 소견을 보인 경우가 없어서 elastase 활성도와 가와사끼병 심장 병변의 관계를 직접 증명할 수는 없었지만, 가와사끼병에서 심혈관계 합병증이 흔하고, 앞서 Kao 등이 제시한<sup>26</sup> 잠재적 심근염의 가능성을 고려하면 급성기에 elastase 가 심근염의 발생에 핵심적인 역할을 한다고 볼 수 있겠으나, 심혈관계 병변을 동반한 가와사끼병 환아들을 대상으로 한 연구가 더 필요하다고 생각한다.

또한 정맥용 면역글로블린 치료 후 혈장 elastase 활성도가 유의하게 감소하여 대조군의 elastase 활성도와 같아지는 결과를 보였는데 이것은 정

맥용 면역글로불린의 효과로서 급성기 심장 병변의 진행을 억제하는 효과로 해석할 수 있다. 이것은 가와사끼병의 치료제로서 정맥용 면역글로불린이 도입되면서 과거 aspirin만으로 치료하던 때에 비해 심혈관계 합병증의 발생률이 낮아진 것과 일치하는 결과라 할 수 있겠다. 반면, 중성구 추출물의 elastase 활성도는 치료 전에 비해 치료 후 유의하게 증가되는 것을 보여주어 정맥용 면역글로불린이 중성구로부터 elastase의 분비를 억제한다는 해석을 할 수 있겠다.

그러나, 정맥용 면역글로불린 투여 후 감소하였던 혈장 elastase 활성도는 발병 4주 후 다시 투여 전과 같은 상태로 상승되어, 실제 이 시기에 관상동맥류를 비롯한 심혈관계 합병증이 빈번하게 발생하는 가와사끼병 임상 경과상의 특징에 대한 실험적인 증거로 해석된다. 급성 염증의 지표인 중성구 수는 정맥용 면역글로불린 투여 후 유의하게 감소하고 이후에도 꾸준히 감소하여 투여 전에 비해 발병 4주 후에도 유의하게 감소된 소견을 보여주어 다른 염증성 병변은 급성기 정맥용 면역글로불린의 투여로 그 진행을 지속적으로 억제할 수 있지만, elastase와 관련되어 있을 것으로 생각되는 심혈관계 합병증의 진행 억제에 있어서는 정맥용 면역글로불린의 급성기 투여가 지속적인 효과는 가지지 못하는 것으로 생각된다.

따라서, 가와사끼병 환자에서 정맥용 면역글로불린 투여 후 발열을 비롯한 염증 증상이 호전되고 심장초음파 검사 상 이상소견이 없는 경우라 하더라도 발병 4주째 심혈관계 합병증의 진단을 위한 검사는 필수적이라 생각된다. 이러한 아급성기 중성구 수 감소에 반한 혈장 elastase 활성도 증가의 기전에는 본 실험의 결과를 바탕으로 생각해 볼 때, 중성구로부터의 elastase의 분비 증가가 관여한다고 볼 수 있겠다.

가와사끼병에서 elastase의 역할에 대한 연구는 1987년 Inamo 등에 의해 보고된 바가 있다<sup>15</sup>. 이 연구에서도 발병 20일 후 혈장 elastase 농도의 상승이 관상동맥류, 관상동맥의 확장, 심근염 등의 합병증 발생에 중요한 인자가 된다고 하여 본 연구의 결과와 일치하는 결과를 보여주었다. 가와사

끼병에서 심혈관계 합병증이 가장 심하고 흔한 합병증이며 갑작스런 사망에도 이를 수 있음을 생각할 때, 가와사끼병의 심장 손상기전을 밝히고 이를 예방하는 것은 필수적이라 하겠다. 본 연구자는 가와사끼병의 심장 손상 기전으로서 허혈 후 재관류에 따르는 elastase에 의한 심근 손상의 가설을 제시하는 바이며 이의 증명을 위해 이번 연구 외에 추가적으로 더 많은 연구가 필요하다고 생각한다.

## V. 결 론

저자는 가와사끼병 환아들의 임상 경과에 따른 염증수치와 혈장 및 중성구 추출물의 elastase 활성도를 측정하고 이것을 다른 열성 질환군 환아들의 것과 비교함으로써 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가와사끼병 환아들의 혈장 elastase 활성도가 대조군에 비해 유의하게 높아 가와사끼병에서의 심혈관계 합병증의 발생에 elastase 가 관여할 것으로 추정된다.
2. 가와사끼병 환아들에서 정맥용 면역글로불린 투여 후 혈장 elastase 활성도는 낮아지고 중성구 추출물의 elastase 활성도는 증가하는 소견을 보여 정맥용 면역글로불린이 중성구로부터 elastase의 분비를 억제하여 심근 병변의 진행을 막는 효과가 있을 것으로 생각된다.
3. 가와사끼병의 발병 4주 쯤 중성구 수는 치료 전에 비해 유의하게 감소하였으나, 혈장 elastase 활성도는 다시 치료 전과 같은 상태로 상승하는 소견을 보여 급성기 정맥용 면역글로불린의 투여로 다른 염증반응은 치료될 수 있으나, 심혈관계 합병증의 발생을 지속적으로 억제할 수는 없는 것으로 해석된다.

이상의 결론으로 정맥용 면역글로불린 치료 후 발열을 비롯한 급성 염증 반응은 호전되었다 하더라도 아급성기 심혈관계 합병증의 발생을 발견하기 위해 이 시기에 심장초음파, 심전도 등의 검사가 필수적이라 하겠다.



## 참고문헌

1. Kawasaki T. Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes in children, Clinical observation of 50 cases. *Jpn. J. Allergy* 1967;16:178-222.
2. Yanagawa H, Tuohong Z, Oki I, Nakamura Y, Yashiro M, Ojima T, et al. Effects of Gamma-Globulin on the Cardiac Sequelae of Kawasaki disease. *Pediatr Cardiol* 1999;20:248-51.
3. Kato H, Inoue O, Kawasaki T, Fujiwara H, Watanabe T, Toshima H. Acute coronary artery disease probably due to childhood Kawasaki disease. *Lancet* 1992;340:1127-9.
4. Kohsaki T, Abe J, Asahina T, Kobayashi N. Classical pathway complement activation in Kawasaki syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:520-5.
5. Gupta M, Noel GJ, Schaefer M, Friedman D, Bussel J, Johann-Liang R. Cytokine modulation with immune gamma-globulin in peripheral blood of normal children and its implications in Kawasaki disease treatment. *J Clin Immunol* 2001;21:193-9.
6. Terai K, Khono Y, Namba M, Umemiya T, Niwa K, Nakajima H, et al. Class II major histocompatibility antigen expression on coronary arterial endothelium in a patient with Kawasaki disease. *Hum Pathol* 1990;21:231-4.
7. Inoue Y, Kimura H, Kato M, Okada Y, Morikawa A. Sera from patients with Kawasaki disease induce intercellular adhesion molecule-1 but not Fas in human endothelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:250-5.

8. Leung DY, Collins T, Lapierre LA, Geha RS, Pober JS. Immunoglobulin M antibodies present in acute phase of Kawasaki syndrome lyse cultured vascular endothelial cells stimulated by gamma interferon. *J Clin Invest* 1986;77:1428-35.
9. Takeshita S, Nakatani K, Kawase H, Seki S, Yamamoto M, Sekine I, et al. The role of bacterial lipopolysaccharide-bound neutrophils in the pathogenesis of Kawasaki disease. *J Infect Dis* 1999;179:508-12.
10. Drauz K, Waldmann H. Enzyme catalysis in organic synthesis : a comprehensive handbook . In: Drauz K, Waldmann H. 2nd ed. New York; Wiley-VCH; 2002, p.54-60.
11. Donovan KL, Davies M, Coles GA, Williams JD. Relative roles of elastase and reactive oxygen species in the degradation of human glomerular basement membrane by intact human neutrophils. *Kidney Int* 1994;45:1555-61.
12. Piowar A, Knapik-Kirdecka M, Warwas M. Concentration of leukocyte elastase in plasma and polymorphonuclear neutrophil extracts in Type 2 Diabetes. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1257-61.
13. Chohen JR, Keegan L, Sarfati I, Danna D, Ilardi C, Wise L. Neutrophil chemotaxis and neutrophil elastase in the aortic wall in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Invest Surg* 1991;4:423-30.
14. Inamo Y, Okuni M, Takeuchi S. Studies on serum elastase activity in patients with Kawasaki disease during the acute stage. *Acta Paediatr Jpn* 1984;26:113.
15. Inamo Y, Harada K, Okuni M, Kimoto K, Takeuchi S, Sakurabayashi I. Immunoreactive polymorphonuclear leukocyte

- elastase in complex with alpha<sub>1</sub>-antitrypsin in Kawasaki disease. *Acta Paediatr Jpn* 1987;29:202-5.
16. Zaitzu M, Hamasaki Y, Tashiro K, Matsuo M, Ichimaru T, Fujita I, et al. Ulinastatin, an elastase inhibitor, inhibits the increased mRNA expression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase-type 2 in Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2000;181:1101-9.
  17. RESEARCH COMMITTEE ON KAWASAKI DISEASE: Report of the subcommittee on standardization of diagnostic criteria and reporting of coronary artery lesions in Kawasaki disease. Tokyo, Ministry of Health and Welfare; 1984.
  18. Yutani C, Go S, Kamiya T, Hirose O, Misawa H, Maeda H, et al. Cardiac biopsy of Kawasaki disease. *Arch Pathol Lab Med* 1981;105:470-3.
  19. Fujiwara T, Fujiwara H, Nakano H. Pathological features of coronary arteries in children with Kawasaki disease in which coronary arterial aneurysm was absent at autopsy. Quantitative analysis. *Circulation* 1988;78:345-50.
  20. Yonesaka S, Nakada T, Sunagawa Y, Tomimoto K, Naka S, Takahashi T, et al. Endomyocardial biopsy in children with Kawasaki disease. *Acta Paediatr Jpn* 1989;31:706-11.
  21. Yutani C, Okano K, Kamiya T, Oguchi K, Kozouka T, Ota M, et al. Histopathological study on right endomyocardial biopsy of Kawasaki disease. *Br Heart J* 1980;43:589-92.
  22. Silver MA, Kowalczyk D. Coronary microvascular narrowing in acute murine coxsackie B<sub>3</sub> myocarditis. *Am Heart J* 1989;118:173-4.
  23. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ Jr, et al. Myocarditis: a histopathologic definition and

- classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1985;1:3-14.
24. Liu AM, Ghazizadeh M, Onouchi Z, Asano G. Ultrastructural characteristics of myocardial and coronary microvascular lesions in Kawasaki disease. *Microvasc Res* 1999;58:10-27.
  25. Sole MJ, Liu P. Viral myocarditis: a paradigm for understanding the pathogenesis and treatment of dilated cardiomyopathy. *JACC* 1993;22:99A-105A.
  26. Kao CH, Hsieh KS, Wang YL, Chen CW, Liao SQ, Wang SJ, et al. Tc-99m HMPAO labeled WBC scan for the detection of myocarditis in different phases of Kawasaki disease. *Clin Nucl Med* 1992;17:185-90.
  27. Farah B, Vuilleminot A, Lecompte T, Bara L, Pasquier C, Jebara V, et al. Myocardial neutrophil sequestration and activation related to the reperfusion of human heart during coronary artery surgery. *Cardiovasc Res* 1994;28:1226-30.
  28. Tiefenbacher CP, Ebert M, Niroomand F, Batkai S, Tillmanns H, Zimmermann R, et al. Inhibition of elastase improves myocardial function after repetitive ischemia and myocardial infarction in the rat heart. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1997;433:563-70.
  29. Yang BC, Williams JC, Mehta JL. Protective effect of elastase inhibition against myocardial dysfunction and injury induced by ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1996;1:31-40.
  30. Ueno M, Moriyama Y, Toda R, Yotsumoto G, Yamamoto H, Fukumoto Y, et al. Effect of a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046 Na) on ischemia/reperfusion injury using the left-sided heterotopic canine heart transplantation model. *J Heart Lung*

Transplant 2001;208:889-96.

31. Lee JK, Zaidi SH, Liu P, Dawood F, Cheah AY, Wen WH, et al. A serine elastase inhibitor reduced inflammation and fibrosis and preserves cardiac function after experimentally-induced murine myocarditis. Nat Med 1998;4:1383-91.
32. Zaidi SH, Hui CC, Cheah AY, You XM, Husain M, Rabinovitch M. Targeted overexpression of elafin protects mice against cardiac dysfunction and mortality following viral myocarditis. J Clin Invest 1999;103:1211-9.

## Abstract

### Changes of the elastase activity in plasma and neutrophil extracts in Kawasaki disease

Ja Hyun Hong

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jun Hee Sul)

Kawasaki disease is a systemic vasculitis that occurs in early childhood. A serious problem of Kawasaki disease is that about 10% of patients suffer from cardiovascular complications even after infusion of intravenous immunoglobulin(IVIG). According to previous reports, the histologic characteristics of Kawasaki disease are similar to that of viral myocarditis. HNE(Human Neutrophil Elastase) plays a significant role in myocardial injury caused by viral myocarditis. The objective of this study is to investigate the role of HNE in myocardial injury due to Kawasaki disease and the effect of IVIG in prevention of cardiovascular complication. 10 patients diagnosed with Kawasaki disease in Yonsei University medical center were examined from November, 2001 to January, 2002. In addition, 15 patients with other febrile diseases were examined. Echocardiography was done in patients with Kawasaki disease 1) before IVIG infusion (stage1), 2) 1 day after IVIG infusion (stage2) and 3) 4 weeks after disease onset (stage 3). At each stage, venous samples were drawn and separated into plasma and leukocytes. In patients with other febrile diseases, samples were drawn on admission. Elastase activity in plasma and neutrophil extracts was measured. And the following results were obtained.

1. The plasma elastase activity of patients with Kawasaki disease was significantly higher than that of patients with other febrile diseases.
2. Compared to stage 1, elastase activity was decreased in plasma and increased in neutrophil extracts in stage 2.
3. Compared to stage 2, elastase activity was increased in plasma and decreased in neutrophil extracts in stage 3.
4. There were no evidence of cardiac involvement of Kawasaki disease in echocardiography.

On the basis of this study, it is possible to conclude that HNE plays a role in myocardial injury caused by Kawasaki disease and IVIG suppresses the progress of myocardial injury by inhibition of elastase secretion from neutrophils.

---

**Key Words** : human neutrophil elastase, kawasaki disease, myocardial injury, intravenous immunoglobulin