

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

H1N1 2009 pdm による呼吸器合併症の病態に関する研究

研究分担者 市山高志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・教授

研究要旨

【目的】 H1N1 2009 pdm により、小児において多くの重篤な呼吸器合併症が発症した。特に気管支喘息などアレルギー疾患を有する児が重症合併症を呈した。本研究は、その病態解明のため、培養細胞を用いた季節性インフルエンザウイルスとの比較および喘息モデルマウスでの検討を行った。

【方法】 気道上皮細胞 (A549) に H1N1 2009 pdm (JNARITA/01/2009) または季節性 H1N1 (A/Beijing/262/95) を感染させ、サイトカイン遺伝子および蛋白質の発現を real-time PCR、cytometric bead array, ELISA で検討した。卵白アルブミン (OVA) 感作 BALB/c マウスを作成し、H1N1 2009 pdm 経鼻感染による気管支洗浄液中のサイトカインを ELISA 法で評価した。非感作マウスとの差異も検討した。

【結果】 気道上皮細胞では、H1N1 2009 pdm は季節性 H1N1 に比し、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA の発現が少なかった。培養上清では、季節性 H1N1 に比し、H1N1 2009 pdm では IL-6 の産生が少なく、IL-8 の産生が多かった。喘息モデルマウスでは、非喘息マウスに比し、H1N1 2009 pdm 経鼻感染による気管支洗浄液中の IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  産生が多く、interferon- $\gamma$  産生は少なかった。

【結論】 H1N1 2009 pdm は季節性 H1N1 に比し、炎症性サイトカインの産生が少ないが、喘息モデルマウスでは強い炎症を惹起することが示唆された。

A. 研究目的

新型インフルエンザ (H1N1 2009 pdm) の大流行に伴い、脳症も多く報告されたが、気管支喘息大発作など重篤な呼吸器合併症例を多数経験した。今までの季節性インフルエンザウイルス感染流行時にはみられなかった現象である。H1N1 2009 pdm 感染による気管支喘息発作増悪のメカニズムを気道上皮細胞およびマウスモデルを用いて検討した。

B. 研究方法

- 1) 気道上皮培養細胞 (A549) を用いて、国立感染症研究所から供与された H1N1 2009 pdm (JNARITA/01/2009) または季節性 H1N1 (A/Beijing/262/95) を感染させる。感染細胞を用いて IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 の mRNA 発現を real-time PCR 法で検討する。
- 2) 培養上清中の IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$  を cytometric bead array (CBA) で、IL-8 を ELISA 法で検討する。
- 3) 卵白アルブミン (OVA) 感作 BALB/c

マウスを作成し、H1N1 2009 pdm 経鼻感染による気管支洗浄液中のサイトカインを ELISA 法で評価する。非感作マウスとの差異も検討する。

#### (倫理面への配慮)

本研究は培養細胞およびマウスを用いた実験であり、遺伝子研究ではない。人権に関わる研究ではない。動物実験は、山口大学動物実験管理委員会の承認を受け、動物実験の承認法令に従い、動物の生命倫理に配慮し、実験する。動物は専門スタッフにより適切に飼育し指定された区画で適切に行う。ウイルス感染実験については、人へのウイルス感染が起こらないよう安全対策を万全に講じて十分注意して実施する。

### C. 研究結果

1) 気道上皮培養細胞における H1N1 2009 pdm または季節性 H1N1 感染によるサイトカイン遺伝子発現の差異 (real-time PCR)

H1N1 2009 pdm は季節性 H1N1 に比し、IL-1 $\beta$ 、IL-6mRNA の発現が少なかった(図 1)。

2) 気道上皮培養細胞における H1N1 2009 pdm または季節性 H1N1 感染によるサイトカイン産生の差異 (CBA, ELISA)

培養上清において、H1N1 2009 pdm では季節性 H1N1 に比し、IL-6 の産生が少なく、IL-8 の産生が多かった(図 2)。

3) OVA 感作および非感作マウスにおける H1N1 2009 pdm 経鼻感染による気管支洗浄液中のサイトカイン産生の差異

OVA 感作マウスでは、非感作マウスに比し、IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  産生が多く、interferon- $\gamma$  産生は少なかった(図 3)。

### D. 考察

2009 年 H1N1 2009 pdm 感染の大流行に伴い、特にアトピー体質の小児が気管支喘息発作など重篤な呼吸器合併症を呈し

た。本研究はその機序を培養細胞および喘息モデルマウスで検討したものである。H1N1 2009 pdm では季節性 H1N1 に比し、IL-1 $\beta$ 、IL-6mRNA の発現が少なく、IL-6 の産生が少なかったことは炎症の惹起が弱いことが示唆された。一方で、IL-8 の産生が多かったことから炎症局所への好中球浸潤を来たしやすいたことが示唆された。OVA 感作マウスでは、非感作マウスに比し、IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  産生が多く、interferon- $\gamma$  産生は少なかったことは、アトピー体質患児では、より強い炎症が惹起されやすいことを示唆した。

### E. 結論

H1N1 2009 pdm は季節性 H1N1 に比し、炎症性サイトカインの産生が少ないが、喘息モデルマウスでは強い炎症を惹起することが示唆された。

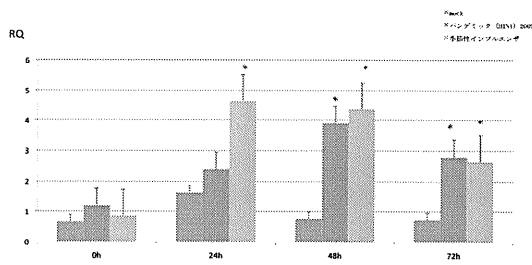
### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Shirabe K, Fukano R, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine* 54: 167-72, 2011.
- 2) Hirano R, Hasegawa S, Hashimoto K, Haneda Y, Ohsaki A, Ichiyama T. Human thymic stromal lymphopoietin enhances expression of CD80 in human CD14+ monocytes/macrophages. *Inflamm Res* 60: 605-10, 2011.
- 3) Haneda Y, Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Ohsaki A, Ichiyama T. Leukotriene D4 enhances tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced vascular endothelial growth factor production in human monocytes/macrophages. *Cytokine* 55:

- 24-8, 2011.
- 4) Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: virus-induced asthma in Japanese children. *Allergy* 66: 1618-20, 2011.
  - 5) Hasegawa S, Mori N, Satomi M, Jiang DP, Hotta H, Matsushige T, Ichiyama T. Interferon production by cells infected with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus or measles virus. *Cytokine* 56: 676-679, 2011.
  - 6) Hasegawa S, Ichiyama T, Sonaka I, Ohsaki A, Hirano R, Haneda Y, Fukano R, Hara M, Furukawa S. Amino acids exhibit anti-inflammatory effects in human monocytic leukemia cell line, THP-1 cells. *Inflamm Res* 60: 1013-9, 2011.
  - 7) Hasegawa S, Ichiyama T, Sonaka I, Ohsaki A, Okada S, Wakiguchi H, Kudo K, Kittaka S, Hara Furukawa S. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 167: 269-274, 2012.
  - 8) Inoue H, Orita T, Matsushige T, Hasegawa S, Ichiyama T. Klinefelter's syndrome complicated with West syndrome in a 4-month-old boy. *Brain Dev* 34: 148-50, 2011.
  - 9) Tanaka N, Emoto T, Suda H, Kunihiro Y, Matsunaga N, Hasegawa S, Ichiyama T. High-resolution computed tomography findings of influenza virus pneumonia: a comparative study between seasonal and novel (H1N1) influenza virus pneumonia. *Jpn J Radiol* in press.
  - 10) Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol* in press.
  - 11) Yüksel D, Ichiyama T, Yilmaz D, Anlar B. Cerebrospinal fluid apolipoprotein e levels in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* in press.
2. 学会発表
- 1) 市山高志. シンポジウム. 自己免疫性小脳失調 (opsoclonus-myoclonus syndrome を含む). 第 53 回日本小児神経学会. 横浜. 2011. 5. 26-28
  - 2) 市山高志. シンポジウム. 感染症. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 東京. 2011. 8. 12-14
  - 3) 長谷川俊史, 平野玲史, 脇口宏之, 工藤敬子, 岡崎史子, 市山高志. 気管支喘息発作におけるエンテロウイルス 68 型の関与の検討. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 東京. 8 月 12-14 日. 2011 年.
  - 4) 市山高志. シンポジウム. 病態を踏まえた脳炎・脳症治療. 第 43 回日本小児感染症学会. 岡山. 2011. 10. 29-30
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## IL-1 $\beta$ mRNA



## IL-6 mRNA

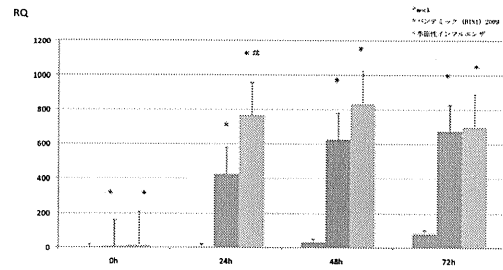


図1 A549におけるH1N1 2009 pdmまたは季節性H1N1感染でのIL-1 $\beta$  mRNA, IL-6 mRNA 発現

\*: mock に比し  $p < 0.05$  #: H1N1 2009 に比し  $p < 0.05$

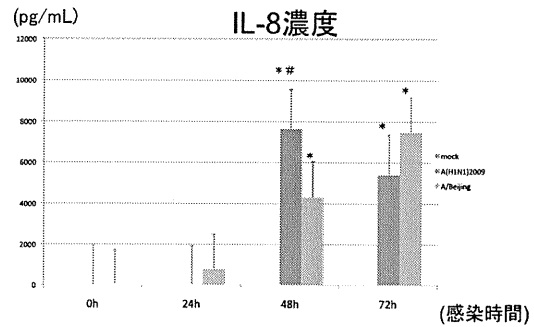
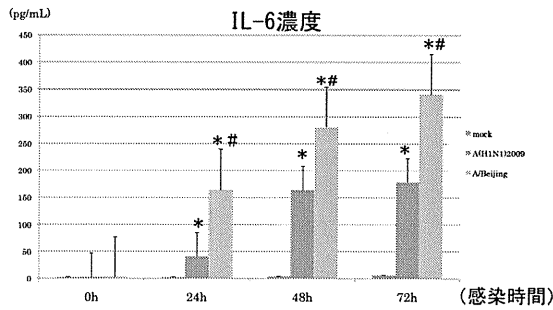
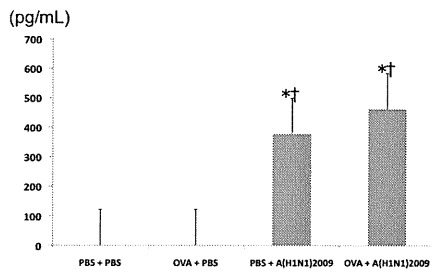


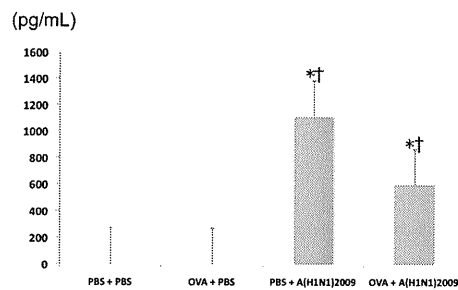
図2 A549におけるH1N1 2009 pdmまたは季節性H1N1感染でのIL-6 (A), IL-8 (B) 産生

\*: mock に比し  $p < 0.05$  #: H1N1 2009 に比し  $p < 0.05$

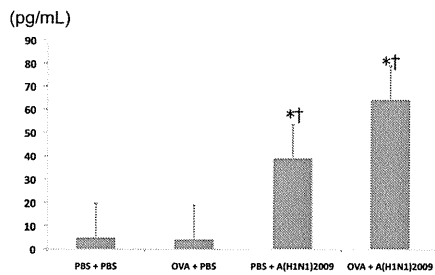
## IL-6



## IFN- $\gamma$



## TNF- $\alpha$



## IL-10

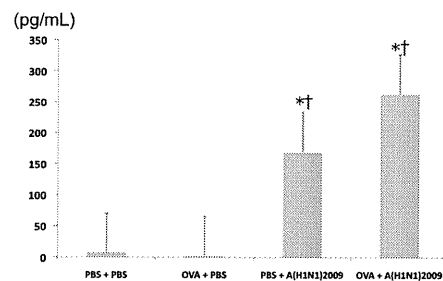


図3 OVA感作および非感作マウスにおけるH1N1 2009 pdm 経鼻感染による気管支洗浄液中のIL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 濃度

\*  $p < 0.05$  vs. PBS+PBS.

†  $p < 0.05$  vs. OVA+PBS

# 厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

## 分担研究報告書

### 重症肺炎・急性脳症を合併したインフルエンザ小児例における 補体アナフィラトキシンの関与

分担研究者 伊藤 嘉規 名古屋大学医学部小児科学・講師

**研究要旨** 2009 H1N1 インフルエンザの重症合併症(重症肺炎・急性脳症)の病態について検討する目的で、2009 H1N1 インフルエンザインフルエンザ25例(重症肺炎または急性脳症を合併した群15例、および合併症のないインフルエンザ群10例)について、急性期・回復期の血清検体中のアナフィラトキシン(C5a, C4a, C3a)濃度を測定した。さらに、既に報告した同一検体中(急性期)の27種類のサイトカインおよび血清中のhigh mobility group box-1(HMGB1)濃度と比較検討した。その結果、アナフィラトキシンの過剰産生が重症化へ関与する結果は得られなかったが、数種類の炎症性物質(IL-2、IL-1ra、Eotaxin、MCP-1、PDGFbb、VEGF、IFN- $\gamma$ )の産生増大に関与することが示唆された。

#### A. 研究目的

いわゆる新型インフルエンザ(2009 H1N1)では、流行の拡大に伴って、重症肺炎・急性脳症の報告が増大した。2009 H1N1 インフルエンザに伴う急性脳症は小児科領域での患者の割合が多く、治療法の確立のために病態の解明が重要な課題である。昨年までに、2009 H1N1 インフルエンザ脳症の急性期の髄液・血清のペア検体を用いて、炎症性サイトカイン・high mobility group box-1(HMGB1)等の分子の濃度を測定し、Th2 サイトカインが重症肺炎の病態に特徴的でHMGB1はこれらのサイトカイン産生の重要な因子であること、急性脳症合併例では血清中のサイトカイン濃度と髄液中のサイトカイン濃度は異なるプロファイルであることを報告した。今回は、感染防御に重要な役割を果たす補体関連分子の動態を検討した。

#### B. 研究方法

- 2009-10 シーズンに2009 H1N1 インフルエンザに感染した小児で、急性脳症あるいは重症肺炎を合併した15例(重症合併症群)と合併症のないインフルエンザ群10例(対照群)を比較検討した。急性期および回復期の血清を用いた。
- 上記検体中のアナフィラトキシン(C5a, C4a, C3a)濃度をAnaphylatoxin ELISA kit(BD)にて測定した。また、昨年の検討で測定した27種類のサイトカイン・ケモカイン濃度(Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay Beads Assayで測定)および

HMGB1濃度(ELISAキット、シノテストで測定)との相関を検討した。27種類のサイトカインは、IL-1 $\beta$ 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、Basic FGF、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IP-10、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、PDGF-BB、RANTES、TNF- $\alpha$ 、VEGF。

#### C. 研究結果

- 血清中C5a、C4a、C3aの濃度は重症化群とコントロール群で有意な差は認められなかった(図1)。
- 回復期の血清での結果と比較したところ、回復期においてC3aは有意に低下を示した( $p=0.029$ )。一方、C5a、C4aは急性期と回復期で有意な差は認められなかった。
- アナフィラトキシンと、27種のサイトカイン及びHMGB1の相関を調べた。C5aにおいて、IL-2と相関が認められた( $P=0.025$ ,  $R^2=0.200$ )。C4aについては、IL-1raと強い相関が認められ( $P<0.0001$ ,  $R^2=0.725$ )、Eotaxin( $P<0.0001$ ,  $R^2=0.547$ )、MCP-1(MCAF)( $P<0.0001$ ,  $R^2=0.495$ )、PDGFbb( $P=0.004$ ,  $R^2=0.307$ )、VEGF( $P=0.008$ ,  $R^2=0.272$ )とも相関が認められた。C3aにおいては、IL-2( $P=0.003$ ,  $R^2=0.320$ )とIFN- $\gamma$ ( $P=0.016$ ,  $R^2=0.226$ )に相関が認められた(表1)。

#### D. 考察

今回用いたELISAでのアナフィラトキシン測定

方法では、不活化型 C5a-desArg, C4a-desArg、C3a-desArg と、活性化型 C5a, C4a, C3a を区別することはできない。補体反応は、ウイルス感染初期に即時的に増幅され、発熱から3日以内の血清では、活性化型と不活化型が混在する状態であると考えられるため、重症化群とコントロール群で差が認められなかったと推察される。

アナフィラキシンとサイトカインやHMGB1の相関を検討したところ、C5a・C4a・C3aそれぞれに相関するサイトカインが存在した。過剰な補体活性化によるアナフィラトキシンの過剰産生は、炎症性物質の産生増大に関与することが推察された。

#### E. 結論

2009 H1N1 インフルエンザの小児例において、急性期・回復期の血清検体におけるアナフィラキシンの濃度を比較した。アナフィラトキシンの過剰産生が、炎症性物質の産生増大に関与することが示唆されたが、重症化への関与を示唆する結果は得られなかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Torii Y, Kimura H, Ochi N, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated 2009 H1N1 influenza vaccine in pediatric liver transplant recipients. *Vaccine*, 29: 4187-4189, 2011
- 2) Kaneko K, Ito Y, Ono Y, Tainaka T, Tsuchiya H, Shimoyama Y, Ando H. Gene expression profiling reveals upregulated UCA1 and BMF in gallbladder epithelia of children with pancreaticobiliary maljunction. *JPGN* 52(6): 744-750, 2011
- 3) Kunitomi A, Kimura H, Ito Y, Naitoh K, Noda N, Iida H, Sao H. Unrelated bone marrow transplantation induced long-term remission in a patient with life-threatening Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Exp Hematol Pathol* 52(1): 57-61, 2011
- 4) Ikeno M, Okumura A, Ito Y, Abe S, Saito M, Shimizu T. Late-Onset Sensorineural Hearing Loss Due to Asymptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection Retrospectively Diagnosed by Polymerase Chain Reaction Using Preserved Umbilical Cord. *Clin Pediatr* 50(7): 666-668, 2011
- 5) Ito Y, Kawabe S, Kojima S, Nakamura F, Nishiyama Y, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27<sup>+</sup> memory B cells in patients after transplantation. *The Journal of general virology* 92(11):2590-2595, 2011.
- 6) Ukeba-Terashita Y, Saita Y, Ito Y, Kanegane H, Kimura H, Kobayashi I. Chronological changes in Epstein-Barr virus genome and subsets of peripheral mononuclear cells in a case of HLH. *Open Journal of Pediatrics* 1:30-33,2011.
- 7) Ito Y, Torii T, Ohta O, Imai M, Hara S, Kawano Y, Matsubayashi T, Inui A, Yoshikawa T, Nishimura N, Ozaki T, Morishima T, Kimura H. Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children. *Cytokine* 56: 180-187, 2011.
- 8) Gotoh K, Ito Y, Maruo S, Takada K, Mizuno T, Teranishi M, Nakata S, Nakashima T, Iwata S, Goshima F, Nakamura S, Kimura H. Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. *PLoS One* 6(10): e25490, 2011.
- 9) Iwata S, Saito T, Ito Y, Kamakura M, Gotoh K, Kawada J, Nishiyama Y, Kimura H. Antitumor activities of valproic acid on Epstein-Barr virus-associated T and natural killer lymphoma cells. *Cancer Sci* 103(2): 375-381, 2012.
- 10) Kawada J, Iwata N, Kitagawa Y, Kimura H, Ito Y. Prospective monitoring of Epstein-Barr virus and other herpesviruses in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate and tocilizumab. *Mod Rheumatol*. In press.
- 11) Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected CD4<sup>+</sup> T-cells. *J Invest Dermatol* in press
- 12) Isobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y, Ito Y, Kimura H, Hamano Y, Sugimoto K, Komatsu N. T/NK cell type chronic active Epstein-Barr virus disease in adults: an underlying condition for Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoma. *J Clin Pathol*, in press
- 13) Kimura, H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikuta A, Sawada A, Kawa K, Koichi O,

Nakamura S. Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases, Blood in press

## 2. 学会発表

- 1) 鳥居ゆか、伊藤嘉規、河野好彦、吉川哲史、西村直子、尾崎隆男、木村宏、2009HINI インフルエンザの重傷化における炎症性メディエーターの関与、第85回日本感染症学会総会学術講演抄録、東京、2011.4.21-22
- 2) 新川泰子、鈴木道雄、河野好彦、鳥居ゆか、小島勢二、伊藤嘉規、木村宏、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法による再治療を行った C 型慢性肝炎の2小児例、第252回日本小児科学会東海地方会、名古屋、2011.5.22
- 3) 伊藤嘉規、後藤研誠、丸尾聖爾、岩田誠子、鈴木道雄、河野好彦、高田賢藏、五島典、木村宏、Epstein-Barr Virus 感染ヒト組織モデルを用いた感染初期病態の解析、第26回ヘルペスウイルス研究会、大阪、2011.6.2-4
- 4) 伊藤嘉規、マルチプレックス PCR 法によるヘルペスウイルス感染症診断、第52回日本臨床ウイルス学会、津、2011.6.11-12
- 5) 川田潤一、木村宏、伊藤嘉規、メントレキセートで治療されている関節型若年性特発性関節炎患者での EB ウイルスの再活性化の検討、第52回日本臨床ウイルス学会、津、2011.6.11-12
- 6) 河邊慎司、伊藤嘉規、後藤研誠、岩田誠子、小島勢二、木村宏、FISH 法による非侵襲性 EBV 感染細胞同定/定量法の EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患への応用、第114回日本小児科学会学術集会、東京、2011.8.12-14
- 7) Kimura H, Gotoh K, Maruo S, Takada K, Iwata S, Goshima F, Nishiyama Y, Ito Y. Establishment of *ex vivo* primary EBV infection model using human tonsil tissue explants. 15th international Conference on the Immunobiology and Prophylaxis of Herpesvirus Infections. San Servolo, Venice, Italy, 2011.10.12-16
- 8) 市村卓也、井上裕文、松重武史、伊藤嘉規、長谷川俊史、市山高志、体重増加不良を景気に診断に至ったヘルペス脳炎の24生日男児例、第43回日本小児感染症学会総会、岡山、2011.10.29-30
- 9) 伊藤嘉規、鳥居ゆか、森内浩幸、木村宏、日本における新生児ヘルペスの現状～先天性・周産期感染症(TORCH)の実態に関する全国アンケート調査二次アンケート結果より～、第43回日本小児感染症学会総会、岡山、2011.10.29-30
- 10) 鳥居ゆか、伊藤嘉規、森内浩幸、木村宏、日本における先天性サイトメガロウイルス感染症の現状～先天性・周産期感染症(TORCH)の実態に関する全国アンケート調査二次アンケート結果より～、第43回日本小児感染症学会総会、岡山、2011.10.29-30
- 11) 橘高節明、伊藤嘉規、松重武志、梶本まどか、長谷川俊史、市山高志、大淵典子、青木 宜治、古賀まゆみ、中司謙二、河野祥二、鈴木英太郎、HHV-6 関連熱性けいれん患者における血清 MMP-9 および TIMP-1 の検討、第43回日本小児感染症学会総会、岡山、2011.10.29-30
- 12) 河野好彦、伊藤嘉規、後藤研誠、鈴木道雄、鳥居ゆか、木村宏、血漿中の EB ウイルスがコードする miRNA 定量による EB ウイルス関連疾患診断への応用、第43回日本小児感染症学会総会、岡山、2011.10.29-30
- 13) 鈴木道雄、鳥居ゆか、河野好彦、木村宏、伊藤嘉規、肝移植直後の成人および小児例におけるインフルエンザワクチン接種の有効性・安全性についての検討、第15回日本ワクチン学会学術集会、東京、2011.12.10-11

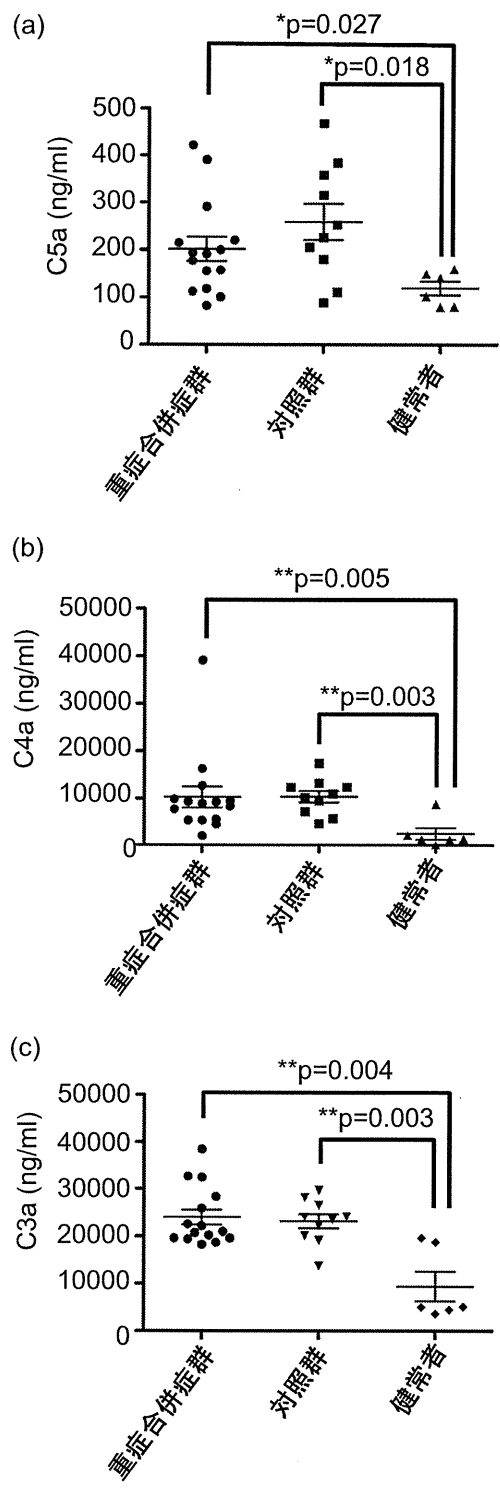
## G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得  
特になし

2. 実用新案登録  
特になし

3. その他  
特になし

(図1)重症合併症の有無とアナフィラトキシンの濃度の比較





(表1) アナフィラキシンと炎症性物質の相関

	C5a		C4a		C3a	
	P value	R <sup>2</sup>	P value	R <sup>2</sup>	P value	R <sup>2</sup>
IL-1 $\beta$	0.739	0.005	0.142	0.091	0.492	0.021
IL-1ra	0.776	0.004	***< 0.001	0.725	0.118	0.103
IL-2	*0.025	0.200	0.546	0.016	**0.003	0.320
IL-4	0.668	0.008	*0.047	0.160	0.160	0.084
IL-5	0.152	0.087	0.769	0.004	0.469	0.023
IL-6	0.725	0.005	0.448	0.025	0.834	0.002
IL-7	0.344	0.039	0.927	0.000	0.878	0.001
IL-8	0.904	0.001	0.975	0.000	0.654	0.009
IL-9	0.299	0.047	0.064	0.141	0.439	0.026
IL-10	0.738	0.005	0.561	0.015	0.766	0.004
IL-12(p70)	0.691	0.007	*0.030	0.189	0.458	0.024
IL-13	0.945	0.000	0.35	0.038	0.877	0.001
IL-15	0.756	0.004	**0.001	0.365	0.051	0.156
IL-17	0.594	0.013	0.424	0.028	0.971	0.000
Eotaxin	0.954	0.000	***< 0.001	0.547	0.061	0.144
Basic FGF	0.785	0.003	0.474	0.022	0.768	0.004
G-CSF	0.336	0.040	0.068	0.137	0.940	0.000
GM-CSF	0.750	0.005	0.174	0.079	0.668	0.008
IFN- $\gamma$	0.658	0.009	0.056	0.149	*0.016	0.226
IP-10	0.843	0.002	0.367	0.036	0.967	0.000
MCP-1(MCAF)	0.637	0.010	***< 0.001	0.495	0.409	0.030
MIP-1 $\alpha$	0.926	0.000	0.779	0.003	0.628	0.010
MIP-1 $\beta$	0.930	0.000	0.921	0.000	0.551	0.016
PDGF-bb	0.612	0.011	**0.004	0.307	0.081	0.127
RANTES	0.426	0.028	0.297	0.047	0.706	0.006
TNF- $\alpha$	0.851	0.002	0.456	0.024	0.409	0.030
VEGF	0.370	0.035	**0.008	0.272	0.489	0.021
HMGB1	0.364	0.036	*0.041	0.170	0.467	0.023

## 「生体マーカーを用いた脳炎・脳症患者の病態評価」

研究分担者 塚原宏一、藤井洋輔、山田睦子、斎藤有希恵、長岡義晴、津下 充、森島恒雄

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学)

研究協力者: 市山高志(山口大学医学部)、松原康策(西神戸医療センター)、毎原敏郎(塚口病院)、

羽田敦子(北野病院)、梶 俊策(津山中央病院)、後藤振一郎(高知医療センター)

### 研究要旨

小児の脳炎・脳症患者において病初期に脳脊髄液中の脳障害マーカーを計測した結果と臨床経過・予後の関連性を調べることで、重度後遺症発現の推定や治療効果の判定に有効な手段になるかどうか検討した。

結果: 病初期に脳脊髄液中の S100B、GFAP、Tau を計測した。対照群の結果に基づいて点数表示(1 マーカーで 0 点~3 点、2 マーカーで 0 点~6 点、3 マーカーで 0 点~9 点)した。脳炎・脳症患者では 1 マーカーでは S100B、Tau の 3 点、2 マーカー(S100B + Tau)の 4 点以上、3 マーカーの 6 点以上が予後不良の指標になることが示された。実際的には 2 マーカー(S100B + Tau)で十分と考えられた。

結論: 病初期における脳障害マーカーの計測は重度後遺症発現を推定する上で有効であることが示された。この手法の実地臨床への応用が期待される。

### A. 研究目的

本研究の目的は、小児の脳炎・脳症患者において病初期に脳脊髄液中の脳障害マーカーを計測した結果と臨床経過・予後の関連性を調べることで、後遺症発現や治療効果の判定に有効な手段を見つけ出すことである。

### B. 研究方法

病初期に計測された脳障害マーカーは脳脊髄液 S100B (BioVendor Human S100B ELISA)、GFAP (SPI bio Human GFAP ELISA)、Tau (Invitrogen Human Tau ELISA) であった。S100B、GFAP はグリア細胞障害、Tau は神経細胞障害のマーカーである。

単位は pg/ml で(計測値が測定感度未満の場合は最小感度の 1/2 値を用いた)、対数 ( $\log_{10}$ ) 変換した値が統計学的解析に用いられた。2 群間の比較には ANOVA (Bonferroni/Dunn)、t 検定が用いられ、 $P < 0.05$  で有意と判定された。データは平均(SD)あるいは範囲で表された。

### <倫理面への配慮>

被験者の保護者に研究の目的と内容を詳しく説明し、同意が得られた方のみを対象にした。検体はすべて暗号で表示しなおしてから検査を開始した。データ保存についても個人が特定されないように十分に配慮した。

### C. 研究結果

#### (1) 対照群、急性脳炎・脳症-予後良好群、急性脳炎・脳症-予後不良群の比較

対照群は 27 例、平均 4.7(3.9)歳(0.6~13.0 歳)、M/F: 15/12 であった。内訳は感染症-けいれんなし: 16 例、熱性けいれん: 9 例、神経麻痺: 1 例、心身症: 1 例であった。全例、脳脊髄液所見に異常はなかった。

急性脳炎・脳症-予後良好群(後遺症がなければ軽度)は 13 例、平均 4.8(4.9)歳(0.4~15.8 歳)、M/F: 6/7 であった。内訳はインフルエンザ: 6 例、HHV6: 3 例、HSV: 1 例、不明: 3 例であった。

急性脳炎・脳症-予後不良群(日常介護が必要(7 例)か死亡(3 例))は 10 例(平均 4.2(4.3)歳(0.3~13.0 歳)、M/F: 6/4 であった。内

訳はインフルエンザ: 1例、EV71: 1例、アデノ: 1例、ノロ: 1例、不明: 6例であった。

対数変換後の平均値(SD)は、対照群で S100B: 1.91(0.19)、GFAP: 2.66(0.38)、Tau: 2.22(0.26)、急性脳炎・脳症-予後良好群で S100B: 1.95(0.41)、GFAP: 2.37(0.61)、Tau: 2.29(0.90)、急性脳炎・脳症-予後不良群で S100B: 3.08(0.50)、GFAP: 3.23(0.94)、Tau: 3.66(0.64)であった。

すべてのマーカーにおいて、急性脳炎・脳症-予後不良群が他の群よりも有意に高値を示した(S100B、Tauでは $P < 0.0001$ 、GFAPではvs. 対照群で $P < 0.05$ 、vs. 予後良好群で $P < 0.005$ )。対照群と急性脳炎・脳症-予後良好群では有意差は認められなかった。

#### (2)急性脳炎・脳症-予後不良群における生存群と死亡群の比較

予後不良群 10例の中で生存群 7例(平均 3.6(3.6)歳(0.3~10.0歳)、M/F: 2/1)と死亡群 3例(平均 5.5(6.6)歳(1.0~13.0歳)、M/F: 4/3)を比較した。

対数変換後の平均値(SD)は、生存群で S100B: 2.84(0.18)、GFAP: 2.91(0.95)、Tau: 3.76(0.59)、死亡群で S100B: 3.64(0.58)、GFAP: 3.97(0.32)、Tau: 3.43(0.84)であった。S100Bのみ有意差が認められた( $P < 0.01$ )。

#### (3)脳障害マーカーの点数表示とそれによる重症度評価

対照群の対数変換値の平均、+1SD、+2SD、+3SDは、S100B: 1.91(実数は81、以下同じ)、2.10(126)、2.30(200)、2.49(309)、GFAP: 2.66(457)、3.04(1096)、3.42(2630)、3.80(6310)、Tau: 2.22(166)、2.49(309)、2.75(562)、3.01(1023)であった。

各脳障害マーカーについて、対数変換した値が対照群の平均+1SD未満で0点、平均+1SD~+2SDで1点、平均+2SD~+3SDで2点、平均+3SD以上で3点として点数表示した。S100B、GFAP、Tauは対照群で0~1、0~1、0~1、急性脳炎・脳症-予後良好群で0~3、0~2、0~3、急性脳炎・脳症-予後不良群で3、0~3、1~3であった。対照群ではすべてのマーカーが0~1点、予後不良群ではS100Bはすべて3点であった。

脳炎・脳症患者のみ(23例)を対象にして、マーカーごとに3点で「予後不良」と判定すれば、S100Bでは感度100%(=10/10)、特異度92%(=12/13)、GFAPでは感度40%(=4/10)、特異度100%(=13/13)、Tauでは感度70%(=7/10)、特異度85%(=11/13)であった。

たとえばTauを用いて「陽性尤度比」(結果が陽性の時に、その病気である確率が検査前と比べてどのくらい高くなるか)を計算すれば、

「陽性尤度比」= 感度/(1-特異度) =  $0.70 / (1 - 0.85) = 4.67$ 、検査前確率が50%ならば、検査前オッズは1であり、検査結果が陽性ならば、検査後オッズ =  $1 \times 4.67 = 4.67$ 、検査後確率 =  $4.67 / (1 + 4.67) = 82\%$ になる。

Tauを用いて「陰性尤度比」(結果が陰性の時に、その病気である確率が検査前と比べてどのくらい低くなるか)を計算すれば、

「陰性尤度比」= (1-感度)/特異度 =  $(1 - 0.70) / 0.85 = 0.35$ 、検査前確率が50%ならば、検査前オッズは1であり、検査結果が陰性ならば、検査後オッズ =  $1 \times 0.35 = 0.35$ 、検査後確率 =  $0.35 / (1 + 0.35) = 26\%$ になる。

#### (4)脳障害マーカーの点数表示の和による重症度評価

急性脳炎・脳症-予後不良群と他群との差が特に顕著であったS100B、Tauの点数の和を求めた(最低0点~最高6点)。対照群は平均0.33(0.56)点(0~2点)、急性脳炎・脳症-予後良好群は平均1.23(1.36)点(0~3点)、急性脳炎・脳症-予後不良群は平均5.60(0.70)点(4~6点)であった。各群間で有意差が認められた(予後不良群 vs. 他群で $P < 0.0001$ 、予後良好群 vs. 対照群で $P < 0.005$ )。

脳炎・脳症患者のみ(23例)を対象にして4点以上で「予後不良」と判定すれば、感度・特異度はともに100%であった。

さらに、S100B、GFAP、Tauの点数の和を求めた(最低0点~最高9点)。対照群は平均0.52(0.64)点(0~2点)、急性脳炎・脳症-予後良好群は平均1.54(1.81)点(0~5点)、急性脳炎・脳症-予後不良群は平均7.20(1.40)点(6~9点)であった。各群間で有意差が認められた(予後不良群 vs. 他群で $P < 0.0001$ 、予後良好群 vs. 対照群で $P < 0.05$ )。

脳炎・脳症患者のみ(23例)を対象にして6点以上で「予後不良」と判定すれば、感度・特異度はともに100%であった。

#### D. 考察

病初期に脳脊髄液中の脳障害マーカーS100B、GFAP、Tauを計測し、対数変換した値が対照群の平均+1SD未満で0点、平均+1SD~+2SDで1点、平均+2SD~+3SDで2点、平均+3SD以上で3点として点数表示した。

脳炎・脳症患者を対象にして、単独計測では3点で「予後不良」と判定すれば、S100Bは感度、GFAPは特異度が100%であった。S100B、Tauは特異度に優れていた(92%、85%)。GFAPは感度が劣っていた(40%)。

S100B + Tauの複合計測では、4点以上で「予後不良」と判定すれば、感度・特異度はと

もに100%であった。S100B + GFAP + Tauの複合計測では、6点以上で「予後不良」と判定すれば、感度・特異度はともに100%であった。実際的な予後判定には、複合計測による評価ではS100B + Tauで十分と考えられた。

## E. 結論

病初期に脳脊髄液中の脳障害マーカーS100B、GFAP、Tau、とりわけS100B、Tauを計測し点数表示することは、急性脳炎・脳症の重度後遺症発現を推定するための有効な手段であることが示された。この手法の実地臨床への応用が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kawatani M, Tsukahara H, Mayumi M. Evaluation of oxidative stress status in children with pervasive developmental disorder and attention deficit hyperactivity disorder using urinary-specific biomarkers. *Redox Rep* 16: 45-6, 2011.
- (2) Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 103: 220-5, 2011.
- (3) Kawatani M, Nakai A, Okuno T, Tsukahara H, Ohshima Y, Mayumi M. A case of intracranial saccular aneurysm after primary varicella zoster virus infection. *Brain Dev* 34: 80-2, 2012.
- (4) Tsukahara H, Fujii Y, Hayashi Y, Morishima T. Multiple biomarkers for oxidative stress in patients with brain disorders. *J Neurol Sci* 313: 196, 2012.
- (5) Morishita N, Tsukahara H, Chayama K, Ishida T, Washio K, Miyamura T, Yamashita N, Oda M, Morishima T. Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2012 (in press).
- (6) Kawatani M, Hiratani M, Kometani H, Nakai A, Tsukahara H, Tomoda A, Mayumi M, Ohshima Y. Focal EEG abnormalities might reflect

neuropathological characteristics of pervasive developmental disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Brain* 2012 (in press).

## 2. 学会発表

- (1) 山本倫子, 塚原宏一, 宮村能子, 鷺尾佳奈, 藤井洋輔, 中村亮介, 森島恒雄. 小児血液腫瘍患者における尿中8-Hydroxy-deoxyguanosine排泄の計測. 第114回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011年(8月).
- (2) 八代将登, 藤井洋輔, 斉藤有希恵, 長岡義晴, 津下 充, 山下信子, 塚原宏一, 松川明博, 森島恒雄. インフルエンザ感染におけるレドックス制御蛋白チオレドキシシン(TRX)の治療効果. 第114回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011年(8月).
- (3) Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Annual Symposium 2011, Geneva, Switzerland, 2011年(9月).
- (4) 塚原宏一, 吉本順子, 宮島悠子, 長岡義晴, 林 優子, 山田睦子, 山下信子, 長坂博範, 森島恒雄. 酸化ストレスマーカーの臨床応用 - 最近の進歩. 第23回腎とフリーラジカル研究会, 徳島, 2011年(10月).
- (5) 塚原宏一. (教育講演)酸化ストレスの生体マーカー - 最近の進歩. 第43回小児感染症学会学術集会, 岡山, 2011年(10月).
- (6) 塚原宏一. 小児科領域におけるレドックスマーカー検査の現況. 第58回日本臨床検査医学会学術集会, 岡山, 2011年(11月).

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## 代謝異常における脳症の関与

～サイトカインの $\beta$ 酸化系に及ぼす影響～

研究分担者 山口清次

島根大学医学部小児科・教授

### 研究要旨

インフルエンザ脳症の重要な病態としてサイトカインストームが注目されている。インフルエンザ脳症では、サイトカインが直接毒性を持つか神経興奮を引き起こす可能性が考えられている。一方、インフルエンザ脳症と先天性脂肪酸代謝異常の発症形態には類似点がある。そこで、サイトカインが $\beta$ 酸化系に何らかの影響を与えて、 $\beta$ 酸化異常症に似た発症形態をとる可能性もあるという仮説を立てて、培養細胞にいくつかのサイトカインを添加して、in vitro probe assay によって細胞の $\beta$ 酸化能を評価した。インフルエンザ脳症で増加すると報告されているサイトカインのうち4つ（ $\text{INF}\gamma$ 、IL-6、IL-1、および $\text{TNF}\alpha$ ）について検討した。

その結果、正常コントロールと MCAD 欠損症の細胞では、検討した4種類のサイトカインに関しては影響はみられなかった。一方 VLCAD 欠損症と GA2 の細胞では、 $\text{INF}\gamma$  と IL-6 は有意な影響はなかったが、IL-1 と  $\text{TNF}\alpha$  は $\beta$ 酸化障害を増強する所見がみられた。すなわち、生まれつき $\beta$ 酸化能の脆弱な体質のヒトでは、サイトカインのいくつかは $\beta$ 酸化障害を増悪させて急性経過をとらせる可能性があることを示唆した。

### 研究協力者

高橋知男、Purevusren J、山田健治、虫本雄一、小林弘典、長谷川有紀

(以上 島根大学医学部小児科学)

市山高志

(山口大学医学部小児科学)

のそれと類似点がある。

急性脳症の発症機序として、感染に伴う何らかの有毒因子が神経細胞障害あるいは神経興奮を引き起こすなどが考えられている。我々は、インフルエンザ感染によるサイトカインストームが脂肪酸 $\beta$ 酸化に影響を及ぼして急性脳症に発展するという仮説を立て、その可能性を検討するために、培養細胞とタンデムマスを用いる in vitro probe (IVP) assay で実験を行った。すなわち、サイトカイン存在下で皮膚繊維芽細胞を培養し、IVP assay によって脂肪酸 $\beta$

### A. 研究目的

インフルエンザ脳症の発症形態は、インフルエンザ発症から短時間のうちに、けいれん、意識障害などに発展する点で、先天代謝異常の一つである脂肪酸 $\beta$ 酸化異常症

酸化能の変化を評価した。

## B. 研究方法

### 1. IVP assay

皮膚線維芽細胞とタンデムマスを用いてβ酸化能を評価する *in vitro* probe assay を用いた (Li H, Yamaguchi S, et al., Brain & Development, 2010)。この方法を用いて、培養液中にサイトカインを添加した後、パルミチン酸を 0.2 mM の濃度で負荷して 96 時間培養後、培養液上清液中のアシルカルニチンをタンデムマスにより分析した。

### 2. 添加したサイトカイン

IL-1、IL-6、IFN $\gamma$ 、および TNF $\alpha$  をそれぞれ 10 ng/mL の濃度になるよう添加した。サイトカインの安定性は 1~10 mg/mL の濃度で確認している (平成 22 年度森島班報告書)。

### 3. 培養細胞

正常コントロール、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症、極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症、およびグルタル酸血症 2 型 (GA2) 患者の細胞を用いた。MCAD 欠損症は中鎖脂肪酸の代謝障害があり、VLCAD 欠損症は長鎖脂肪酸の代謝障害、および GA2 は短鎖から長鎖まで広範囲にβ酸化の障害される疾患である。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子検査を実施する研究ではなく、遺伝学的検査関連のガイドラインには該当しない。

## C. 研究結果と考察

1. 各疾患のβ酸化能 : *In vitro* probe assay によるアシルカルニチンプロファイル

### 1) 正常コントロール (図 1A)

アセチルカルニチン (C2) が主なピークであり、その他のアシルカルニチンは少量

ずつ検出される程度である。

### 2) 中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 (図 1B)

正常に比べ、C4、C6、C8、および C10 の増加がみられた。特に C8 と C4 の増加が著明であった。これは、中鎖脂肪酸のβ酸化が障害されていることを示す。

### 3) 極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 (図 1C)

C16、C14、および C12 の増加がみられた。これは、長鎖脂肪酸のβ酸化が障害されていることを示す。

### 4) グルタル酸血症 2 型 (GA2) (図 1D)

正常と比較すると、C4~ C16 の短鎖から長鎖までのアシルカルニチンが増加していた。この所見は、短鎖~長鎖のアシル-CoA に働く脱水素酵素の障害される本症の病態に一致している。

## 2. 正常コントロール細胞に対するサイトカインの影響 (図 2)

アシルカルニチンプロファイルを、アセチルカルニチン (C2) に対する各アシルカルニチンの比で表した。IFN $\gamma$ 、IL-6、IL-1、および TNF $\alpha$  のいずれでも、有意な変化はみられなかった。

## 3. MCAD 欠損症細胞に対するサイトカインの影響 (図 3)

MCAD 欠損症は中鎖脂肪酸の代謝が障害される疾患であるが、IFN $\gamma$ 、IL-6、IL-1、および TNF $\alpha$  のいずれでも、アシルカルニチンプロファイルに有意な変化はみられなかった。

## 4. VLCAD 欠損症細胞に対するサイトカインの影響 (図 4)

VLCAD 欠損症は長鎖脂肪酸の代謝が障害される疾患であるが、IFN $\gamma$ 、IL-6 による影響はみられなかった。一方、IL-1 によつ

てC14が増加し、TNF $\alpha$ によってC12、C14、およびC16のアシルカルニチンが有意に増加した。すなわちIL-1、およびTNF $\alpha$ はVLCAD欠損症において長鎖脂肪酸 $\beta$ 酸化の障害を増強させる可能性がある。

#### 5. グルタル酸血症2型(GA2)細胞に対するサイトカインの影響(図5)

GA2では、電子伝達フラビンタンパク(ETF)、またはETF脱水素酵素(ETFDH)の欠損によって、短鎖~長鎖までアシル-CoA脱水素酵素が広範囲に障害される疾患である。サイトカイン添加実験では、IFN $\gamma$ 、およびIL-6は有意な影響はみられないが、一方、IL-1、およびTNF $\alpha$ はC4~C16まですべてのアシルカルニチンの増加がみられた。すなわちGA2では、IL-1、およびTNF $\alpha$ が広範囲にわたって $\beta$ 酸化障害を増強させる可能性を示す。

#### D. 結論

インフルエンザ脳症で増加すると報告されたサイトカインのうち4種類のサイトカインを添加して、培養皮膚線維芽細胞の $\beta$ 酸化能に及ぼす影響を調べた。正常コントロールとMCAD欠損症の細胞ではこれらのサイトカインによる影響は観察されなかった。一方VLCAD欠損症とGA2の細胞では、IFN $\gamma$ とIL-6は有意な影響は観察されなかったが、IL-1とTNF $\alpha$ は $\beta$ 酸化障害を増強する所見がみられた。すなわち、生まれつき $\beta$ 酸化能の脆弱な体質のヒトでは、サイトカインのいくつかは $\beta$ 酸化障害を増悪させて急性経過をとらせる可能性がある。インフルエンザ脳症のサイトカインストームは、サイトカインによる神経細胞に対する直接毒性という機序の他に、 $\beta$ 酸化障害を介して急性脳症に発展するという機序も可能性としてありうる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S.: Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1. *Molecular Genetics and Metabolism* 102(3): 343-348, 2011 (March)
- 2) Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R.: Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy: The importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening. *Molecular Genetics and Metabolism* 102(4): 399-406, 2011 (April)
- 3) 虫本雄一, 山口清次: 新生児突然死とその予防. *産婦人科治療* 102(4): 317-321, 2011 (4月)
- 4) 久保田一生, 深尾敏幸, 堀友博, 小林弘典, 船戸道徳, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2欠損症のろ紙血血清のアシルカルニチンプロファイルの経時的変化. *日本小児科学会雑誌* 115(5): 956-960, 2011 (5月)
- 5) 山口清次: タンデムマス導入による拡大スクリーニングの諸問題. *日本先天代謝異常学会雑誌* 27(1): 36-41, 2011 (8月)

##### 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y,

- Fukao T, Fukuda S: A hypolipidemic drug, bezafibrate, can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research. Denver, USA, April 2011
- 2) Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Okamoto A, Ohta M, Yamaguchi S: Emetic toxin of bacillus cereus that associates with reye-like syndrome severely inhibits mitochondrial fatty acid oxidation. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Geneva, Switzerland, August 2011
  - 3) 山口清次: ベザフィブレードのミトコンドリア  $\beta$  酸化異常症に対する治療-in vitro probe assay による評価-. 第 53 回日本小児神経学会総会. 横浜, 2011 年 5 月
  - 4) 南憲明, 岸和子, 美根潤, 金井理恵, 山口清次, 高橋幸利: 再燃する自己免疫性辺縁系脳炎にタクロリムスが有効であった 5 歳男児例. 第 88 回山陰小児科学会. 米子, 2011 年 9 月
  - 5) 山口清次, 李紅, Purevsuren J, 古居みどり, 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 深尾敏幸, 福田誠司: タンデムマスと培養細胞を用いる in vitro probe assay の応用: ベザフィブレードのミトコンドリア  $\beta$  酸化異常症に対する効果の評価. 第 36 回日本医用マスペクトル学会年会. 大阪, 2011 年 9 月
  - 6) プレブスレン ジャミヤン, 長谷川有紀, 小林弘典, 虫本雄一, 山田健治, 市山高志, 山口清次: Effect of IAE related cytokines on mitochondrial fatty acid oxidation. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 東京, 2011 年 11 月
  - 7) 小林弘典, 山田健治, プレブスレン ジャミヤン, 虫本雄一, 高橋知男, 長谷川有紀, 伊藤道徳, 山口清次: ベザフィブレードが有効であった遅発型グルタル酸尿症 2 型の男児例. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 東京, 2011 年 11 月

#### F. 知的所有権の取得状況

特許取得、実用新案登録: 該当なし



図1. In vitro probe assayによるアシルカルニチンプロファイル  
 (サイトカインを添加していない状態)

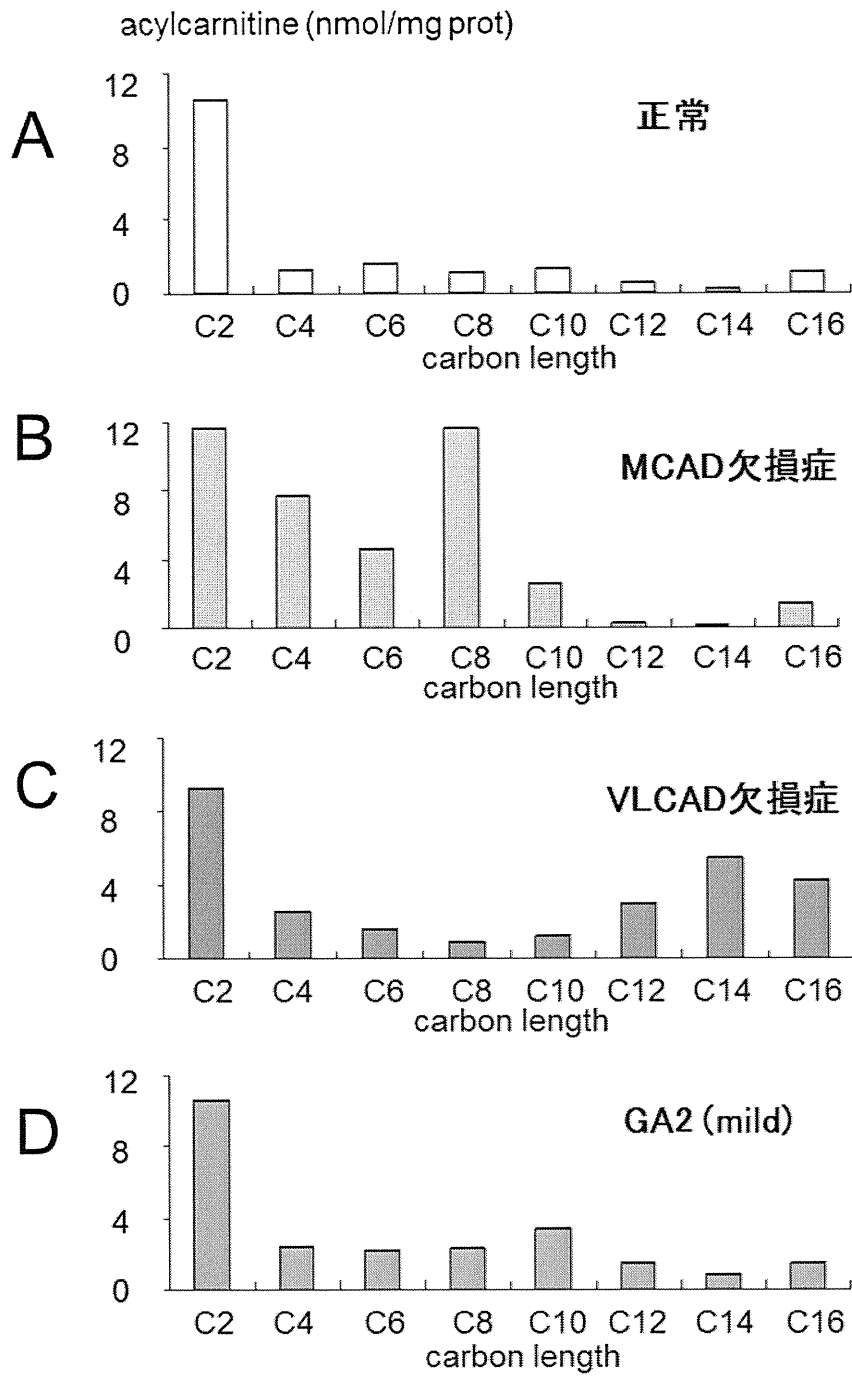
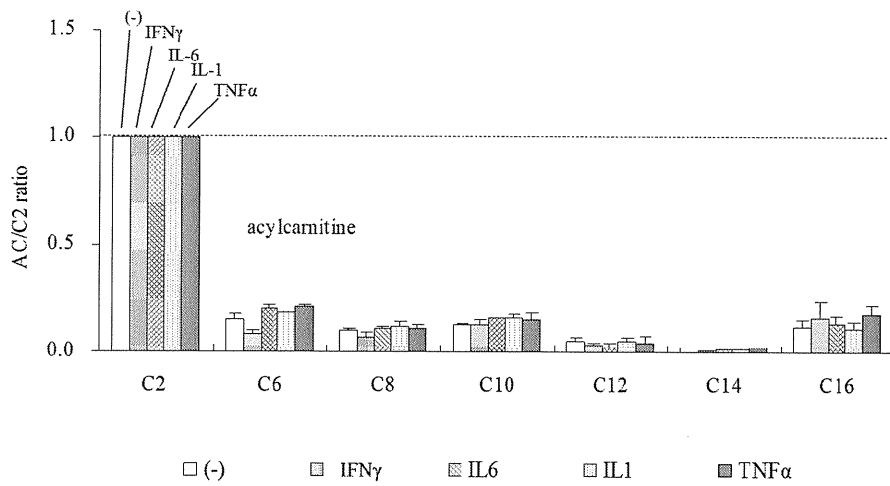


図2. 正常細胞のβ酸化能に対するサイトカインの影響



アセチルカルニチンに対する各アシルカルニチンの比で表した。

図3. MCAD 欠損症細胞に対するサイトカインの影響

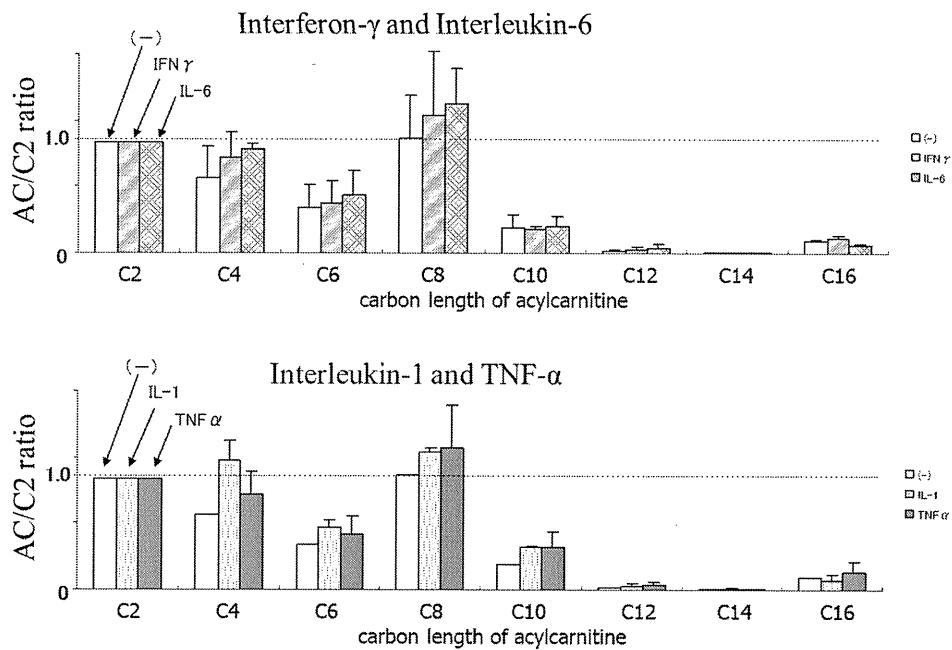
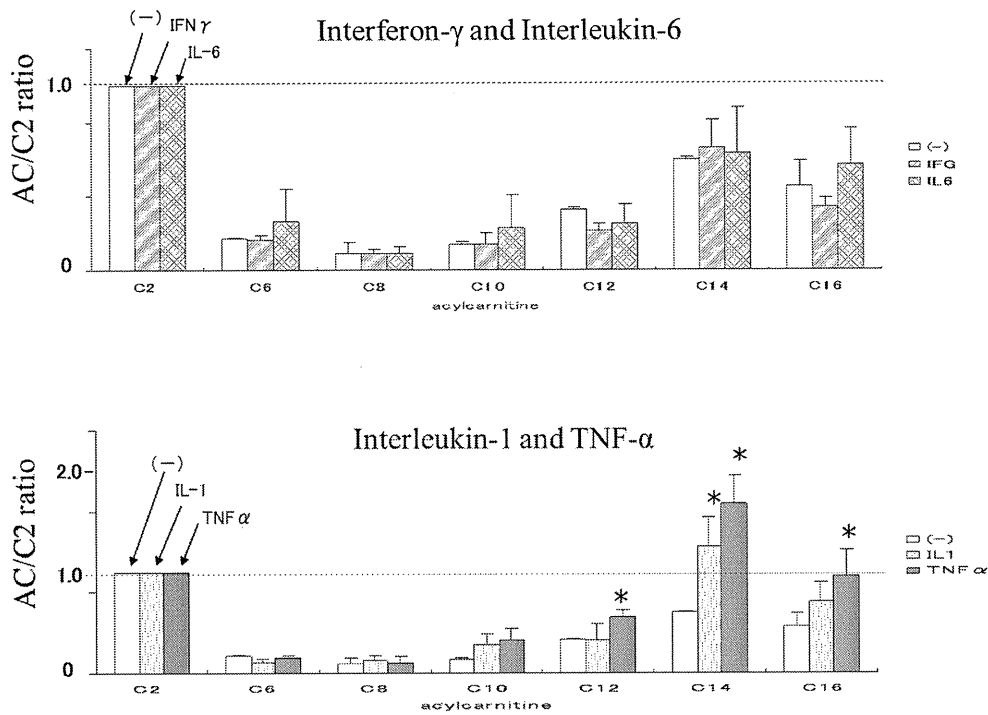
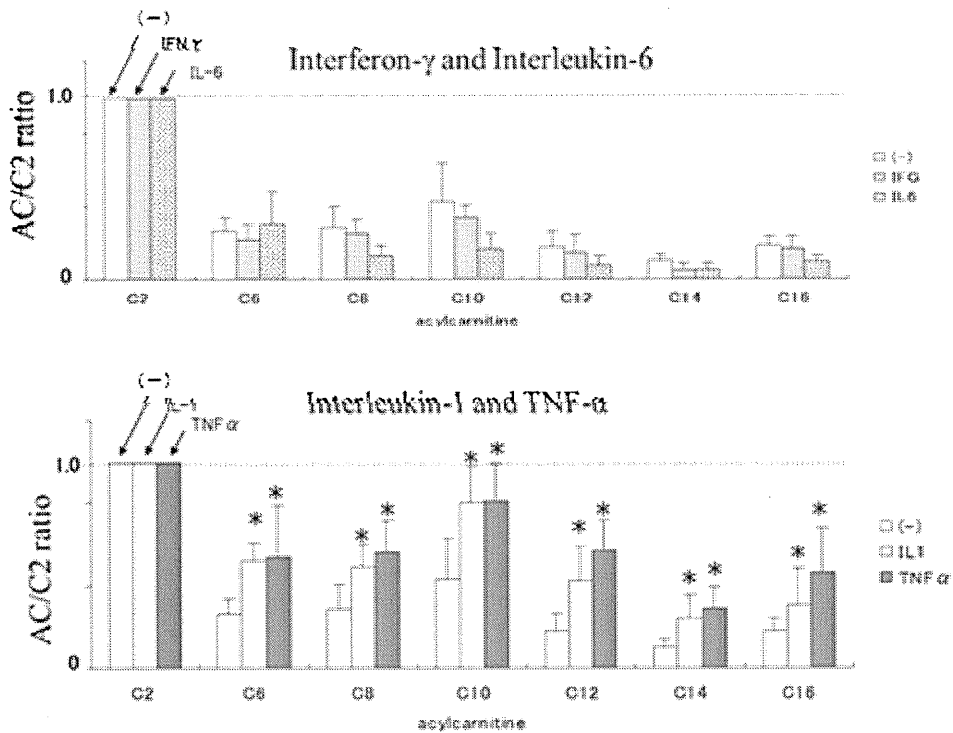


図4. VLCAD 欠損症細胞に対するサイトカインの影響



\*印=有意差 (p<0.1%) であることを示す。

図5. グルタル酸血症2型 (GA2) 細胞に対するサイトカインの影響



\*印=有意差 (p<0.1%) であることを示す。

## H1N1 新型インフルエンザおよび H5N1 鳥インフルエンザの ウイルス学的解析

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

### 研究要旨

H5N1 ウイルスに罹患した患者は、高サイトカイン血症により急性呼吸窮迫症候群や多臓器不全を引き起こす。本研究では、H5N1 ウイルスがサイトカインを過剰に誘導するメカニズムと、サイトカインの過剰誘導が病原性に与える影響を調べた。その結果、PA 蛋白質が、サイトカイン高誘導に関与し、マウスに対する高病原性化に影響を与えていることが明らかとなった。

### A. 研究目的

H5N1 ウイルスがヒトに侵入すると、肺胞上皮 II 型細胞と肺胞マクロファージに感染・増殖する。H5N1 ウイルスに罹患した患者は、高サイトカイン血症により、急性呼吸窮迫症候群や多臓器不全を引き起こす。この高サイトカイン血症には、肺胞マクロファージが大きな役割を果たしていると考えられている。しかし、これまでの実験結果から、H5N1 ウイルスの中には、多量にサイトカインを誘導する株と、季節性のウイルスと同程度しかサイトカインを誘導しない株があることが明らかとなった。そこで、H5N1 ウイルスがサイトカインを過剰に誘導するメカニズムと、サイトカインの過剰誘導が病原性に与える影響を調べた。

### B. 研究方法

サイトカインを多量に誘導する  
A/Vietnam/UT3028II/03 clone 2

(VN3028IIcl2 株) とあまり誘導しない  
A/Indonesia/UT3006/05 (IDN3006 株) およ  
び、それぞれの遺伝子分節を組換えたウイ  
ルスをリバースジェネティクスにより作製  
し、ヒト末梢血由来マクロファージに感染  
させ、サイトカイン誘導量を調べた。さら  
に、マウスでの病原性についても比較検討  
した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ボランティアから採取した血  
液を使用している。本研究内容は、東京大  
学医科学研究所倫理審査委員会の承認を  
受けている。(承認番号：18-15-0129、  
19-24-200430)

動物実験は、東京大学医科学研究所実験  
動物委員会の承認のもと、東京大学動物実  
験規則に従って実施した。

### C. 研究結果および考察