

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

- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 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

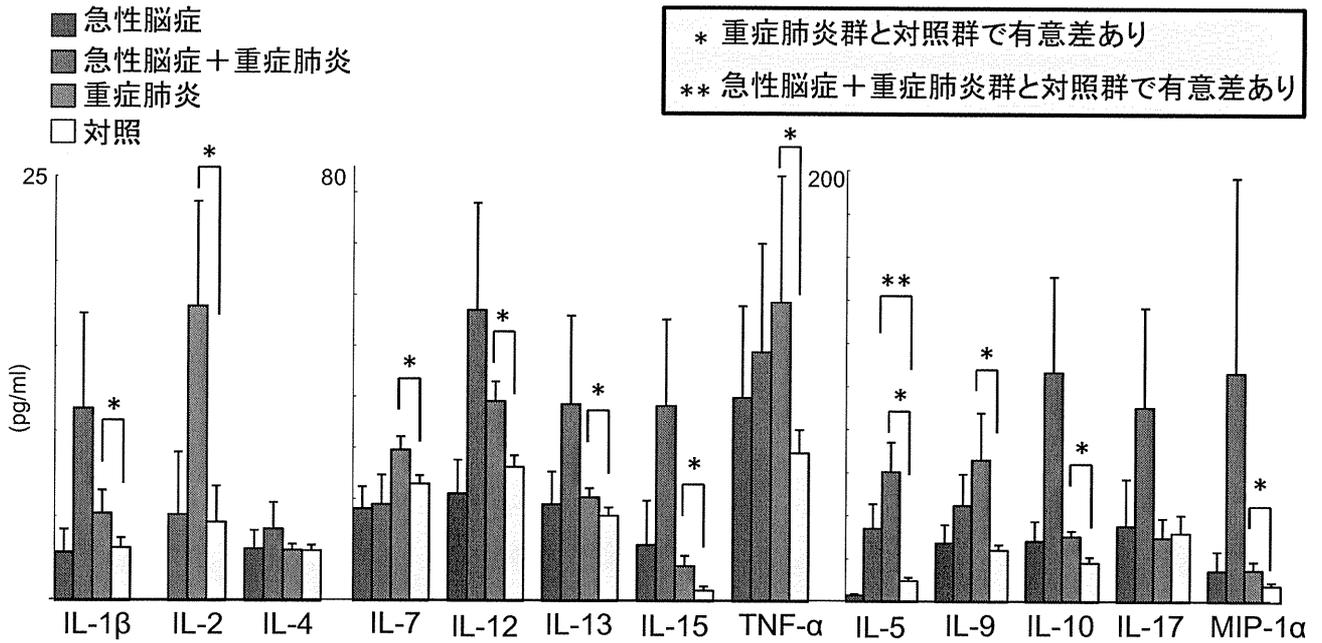
2. 実用新案登録

特になし

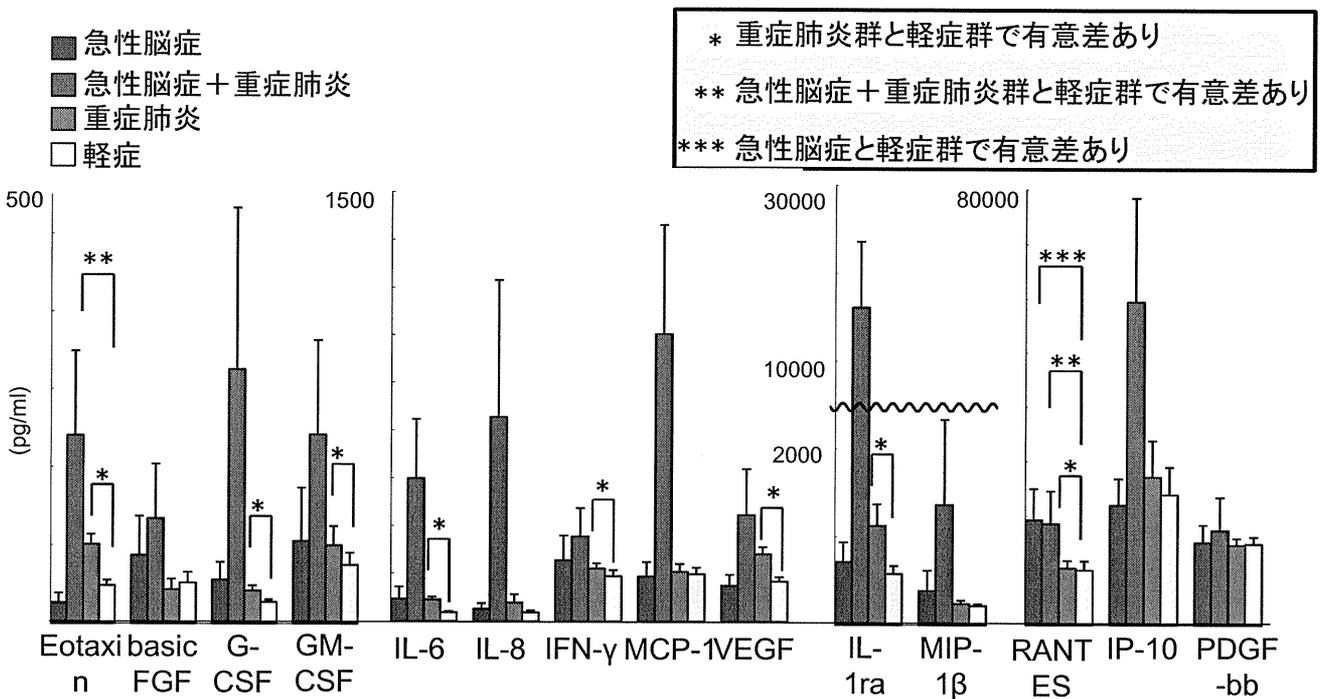
3. その他

特になし

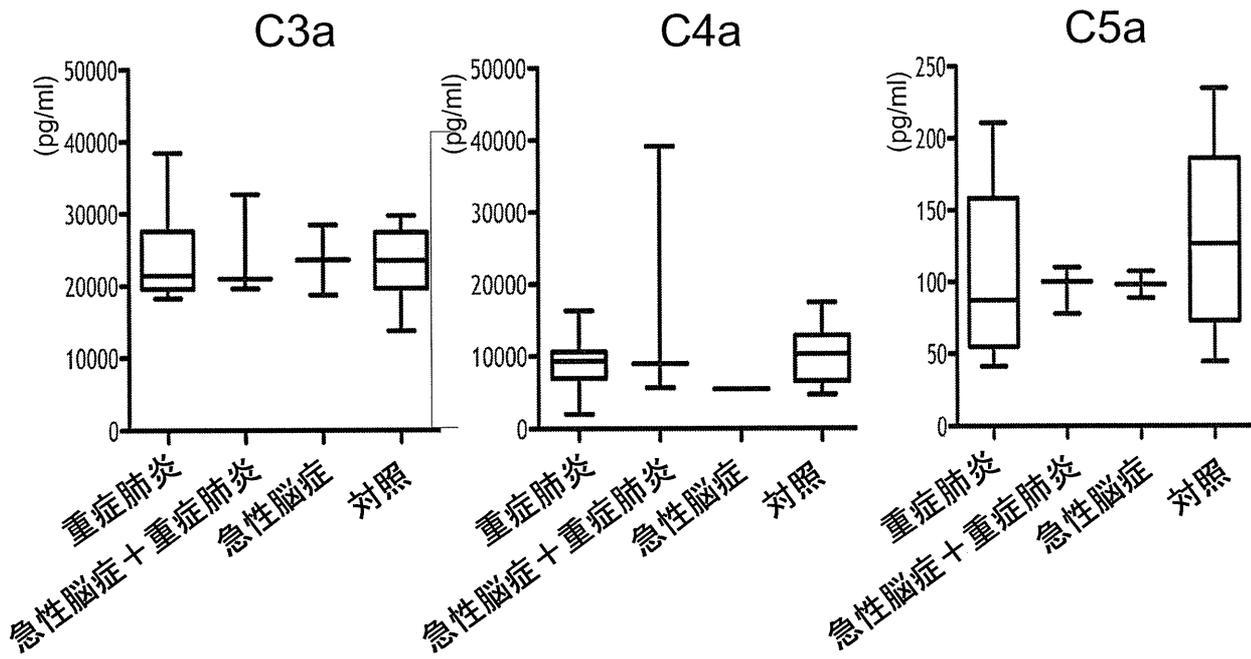
(図1) 血清中サイトカイン濃度



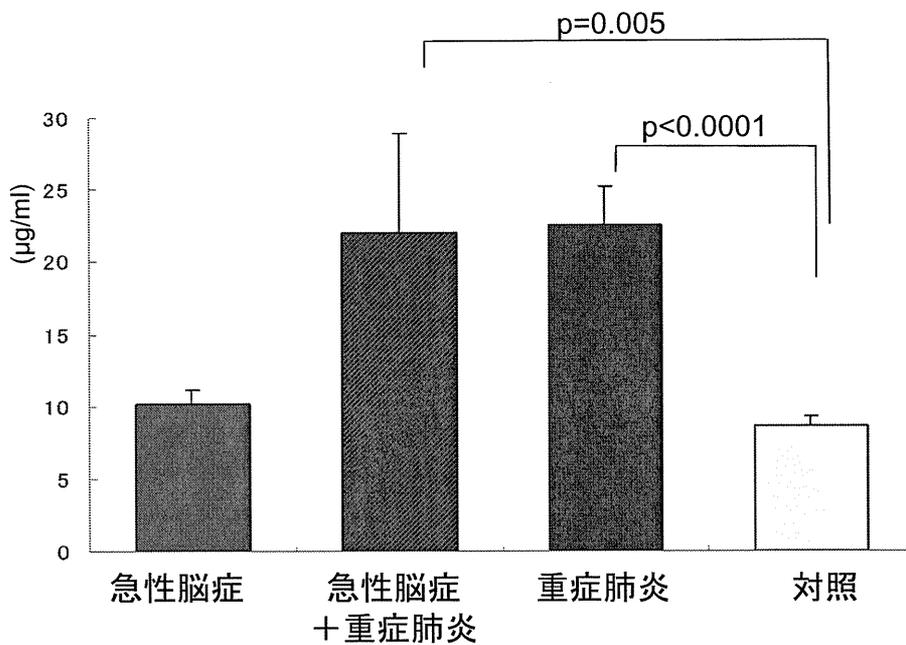
(図1) 血清中サイトカイン濃度



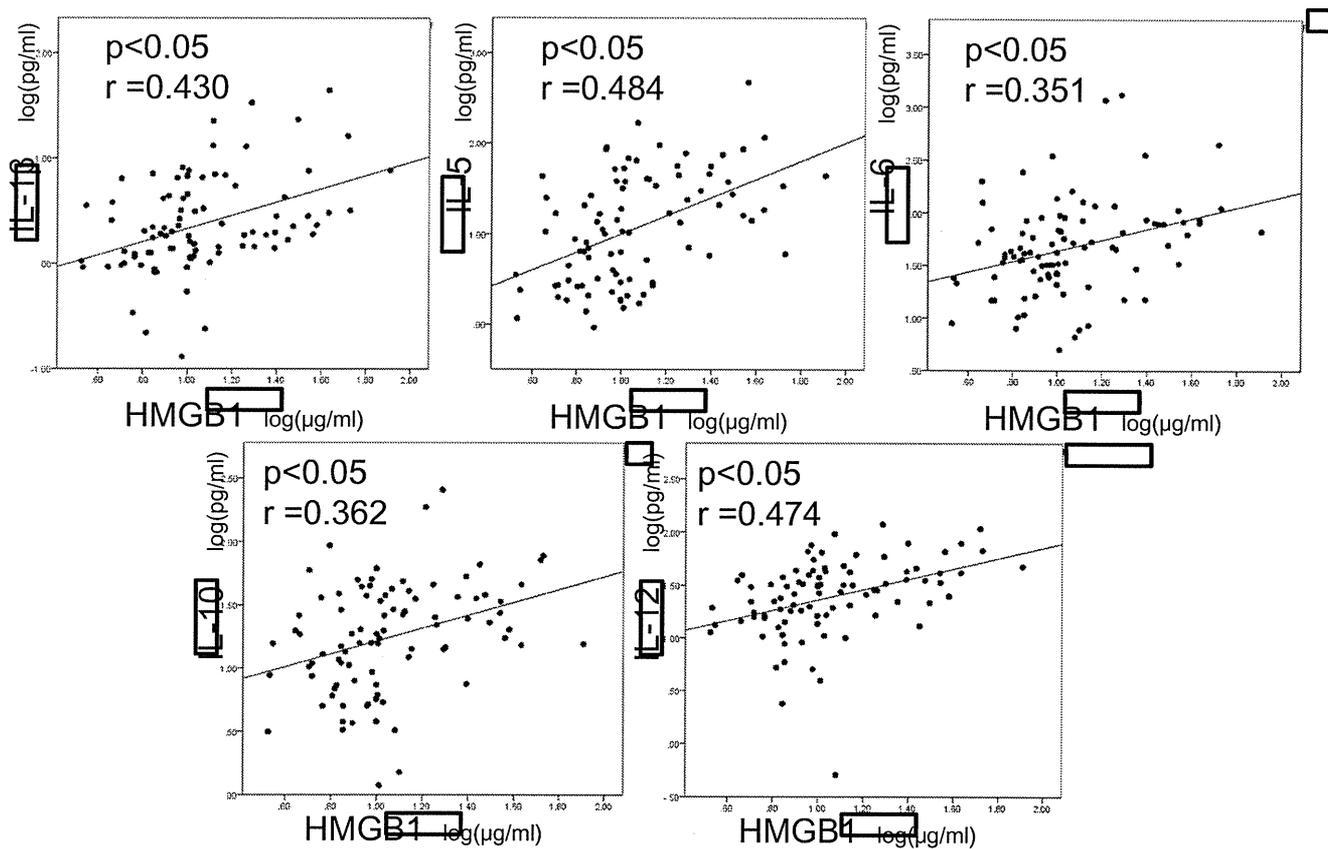
(図2) 血清中アナフィラトキシン濃度



(図1) 血清中HMGB1濃度



(図4) 血清中サイトカインとHMGB1濃度の相関



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(平成 21 年度～23 年度)

「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、八代将登、長岡義晴、津下 充
山下信子、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: 林 優子、山本倫子(岡山大学医歯薬学総合研究科)、市山高志(山口大学医学部)
川谷正男(福井大学医学部)、松原康策(西神戸医療センター)、長坂博範(宝塚市立病院)、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や血清中の生体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。

病初期における脳障害マーカー(S100B、GFAP、Tau)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。すなわち、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、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)計測で十分と考えられた。また、脳脊髄液中や血清中の酸化ストレスマーカーの計測は迅速診断(ベッドサイド検査)が可能のため臨床的意義が大きかった。これら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や血清中の生体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

<研究 1: 脳障害マーカー>

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た。2 群間の比較には ANOVA (Bonferroni/Dunn)、t 検定が用い、 $P < 0.05$ で有意と判定した。データは平均(SD)あるいは範囲で表した。

<研究 2: 酸化ストレスマーカー>

血清 NOx、ADMA、8-OHdG 濃度の高値基準を対照計測値の(平均+1.5SD)以上として求めた。NOx、ADMA、8-OHdG は Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay (Cayman Chemical)、ADMA-ELISA (DLD Diagnostics)、8-OHdG check (Institute for the Control of Aging)を用いて計測した。脳脊髄液 (CSF) 8-OHdG、acrolein-lysine 濃度の高値基準も同様の方法で求めた。これらは 8-OHdG check、ACR Lysine-ELISA (NOF Corporation)にて計測した本研究者の過去の研究成果を用いた (Tsukahara H, et al. Redox Rep 2000; Life Sci 2002)。

小型迅速検査機器を用いた迅速診断についても検討を進めた。8-OHdG (単位は ng/ml) は ICR-001 (Techno Medica)があり、100 μ l の検体量で計測できる。dROMs (酸化度の指標; 単位は U CARR)、BAP (抗酸化力の指標; 単位は μ mol/L) は FRAS-4 (Diacron)があり、それぞれ 10 μ l の検体量で計測できる。

<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

<研究 1: 脳障害マーカー>

(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。急性脳炎・脳症-予後良好群(後遺症がないか軽度)は 13 例、平均 4.8(4.9)歳(0.4~15.8 歳)、M/F: 6/7、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。

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。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

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。

(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。

(4) 脳障害マーカーの点数表示の和による重症度評価

(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。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。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。

<研究 2: 酸化ストレスマーカー>

(1) 酸化ストレスマーカーの高値基準

血清 NOx、ADMA、8-OHdG、CSF 8-OHdG、acrolein-lysine の高値基準を下に示した。

・血清 NOx $\geq 67.9 \mu\text{M}$

・血清 ADMA $\geq 0.84 \mu\text{M}$

(Tsukahara H, et al. Metabolism 2008)

・血清 8-OHdG $\geq 0.30 \text{ ng/ml}$

・CSF 8-OHdG $\geq 3.4 \text{ ng/ml}$

(Tsukahara H, et al. Redox Rep 2000)

・CSF Acrolein-lysine(ACR) $\geq 7.0 \mu\text{M}$

(Tsukahara H, et al. Life Sci 2002)

(2) 8-OHdG の迅速診断

急性白血病患者児では尿中 8-OHdG が異常高値を示し、頸部リンパ節腫脹などを呈する良性疾患との鑑別の点でも有用であった(日本小児科学会学術集会 2011 で発表)。また、重症インフルエンザ脳症(死亡)の CSF では 5.5 ng/ml であり、対照(<0.5 ng/ml)と比べて著しい高値を示した。

(3) dROMs、BAP の迅速診断

下線は dROMs で高値、BAP で低値を示す。

dROMs-BAP 値 <Ratio>

対照群

4yM	240-2610<0.092>
9yM	240-2329<0.103>
12yF	213-2249<0.095>

患者群

6yM ALL(増悪時)	409-1311<0.312>
9yM ALL(発症時)	812-2406<0.337>
6yM HO 欠損症	967-2305<0.420>
4yF JIA(発症時)	433-2119<0.204>
(治療中)	293-2355<0.124>
4yM 自己免疫性肝炎	673-2322<0.290>
(治療中)	284-2322<0.122>
14yF 潰瘍性大腸炎	417-2124<0.196>
1yF 痙攣重積型脳症	629-(n.d.)
4yM けいれん重積	382-(n.d.)
7yM けいれん重積	341-(n.d.)
7yM けいれん重積	415-(n.d.)
13yF けいれん(重積なし)	287-(n.d.)
1yM 胃腸炎関連けいれん	376-(n.d.)
13yM 熱譫妄(インフル A)	318-(n.d.)

D. 考察

病初期に脳脊髄液中の脳障害マーカー S100B、GFAP、Tau を計測して、対照群の対数変換値の平均+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。実際的には、S100B+Tau で十分と考えられた。

酸化ストレスマーカーについては、小児での血清 NOx、ADMA、8-OHdG、CSF 8-OHdG、acrolein-lysine の高値基準が設定された。これらの生体マーカーの計測により、小児疾患の NO-ADMA 系、酸化ストレス環境が低侵襲的に経時的に評価することが可能になった。

CSF 8-OHdG の高値基準が小型迅速検査機器 ICR-001(Techno Medica)で計測できるレベルにあった。ICR-001により中枢神経系における酸化ストレス環境を迅速に(ベッドサイドで)評価できる可能性が示された。

dROMs、BAP により全身レベルの酸化ストレス環境が迅速に計測できることも示された。重度炎症病態での dROMs の高値、BAP の低値と治療による正常化も的確に評価できた。

dROMs と BAP の Ratio は生体の酸化的疲弊度を表すが、それも的確に評価できた。また、けいれん重積状態が酸化ストレス亢進と関連することも示唆された。

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。

8-OHdG、dROMs、BAP については迅速検査への道が開かれた。今後も対象患者を増やして検討を進めたい。酸化ストレスマーカーはヒト以外の動物にも使用でき、動物モデルを用いた Translational Researchでの応用も可能であることを強調したい。

F. 研究発表

- (1) Nagasaka H, Tsukahara H, Yorifuji T, et al. Evaluation of endogenous nitric oxide synthesis in congenital urea cycle enzyme defects *Metabolism* 58 (3): 278-282, 2009
- (2) Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, et al. Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin-deficiency even during the silent period *Mol Genet Metab* 97 (1): 21-26, 2009
- (3) Nagasaka H, Takayanagi M, Tsukahara H. Children's toxicology from bench to bed - Liver Injury (3): Oxidative stress and anti-oxidant systems in liver of patients with Wilson disease *J Toxicol Sci* 34 (Special Issue II): SP229-236, 2009
- (4) Nagasaka H, Okano Y, Aizawa M, et al. Altered metabolisms of mediators controlling vascular function and enhanced oxidative stress in asymptomatic children with congenital portosystemic venous shunt *Metabolism* 59 (1): 107-113, 2010
- (5) Tsukahara H, Nagasaka H, Tokuriki S, Mayumi M. Coupling of the citrulline recycling to endothelial NO production *Mol Genet Metab* 99 (4): 438, 2010
- (6) Kawatani M, Nakai A, Okuno T, et al. Detection of cytomegalovirus in preserved umbilical cord from a boy with autistic disorder *Pediatr Int* 52 (2): 304-307, 2010
- (7) 塚原宏一. 窒素(N)と酸素(O)の化学・生物学 日本臨床高気圧酸素・潜水医学会雑誌 7 (1): 1-8, 2010

(8) 塚原宏一, 吉本順子, 眞弓光文, 長坂博範.
小児科領域における一酸化窒素および酸化ストレスに関連する生体マーカーの現況
発達腎研究会誌 18 (1): 23-28, 2010

(9) 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 (1): 45-46, 2011

(10) Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, et al. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria.
Mol Genet Metab 103 (3): 220-225, 2011

(11) Tsukahara H, Fujii Y, Hayashi Y, Morishima T. Multiple biomarkers for oxidative stress in patients with brain disorders

J Neurol Sci 313 (1-2): 196, 2012

(12) Kawatani M, Hiratani M, Kometani H, et al. Focal EEG abnormalities might reflect neuropathological characteristics of pervasive developmental disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder
Brain Dev 2012 (in press)

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

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背景疾患として、発症形態に類似点のある有機酸・脂肪酸代謝異常をスクリーニングした。インフルエンザ脳症と代謝異常の関連性を調べるために、インフルエンザ脳症患者の代謝スクリーニングと、培養細胞を使ってサイトカインの脂肪酸 β 酸化能に及ぼす影響を測定した。2001年～2011年の間にインフルエンザ脳症（Flu脳症）として代謝スクリーニングの依頼を受けた症例数は225例であった。これに対してインフルエンザ以外の急性脳症患者（non-Flu脳症）の依頼は395例であった。この2群を比較すると、Flu脳症はnon-Flu脳症に比べて、年齢が高いこと、季節的偏りが著しいことがあげられた。これに対し、背景疾患として発見された代謝異常はnon-Flu脳症の方がFlu脳症よりも頻度が高かった（Flu脳症1.7%、non-Flu脳症4.1%）。Flu脳症で発見された疾患は、メチルマロン酸血症、CPT2欠損症、全身性カルニチン欠乏症、およびフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ（FBPase）欠損症であった。

サイトカインの β 酸化能に及ぼす影響は、正常コントロールと中鎖アシル-CoA脱水素酵素（MCAD）欠損症では影響はみられなかった。これに対し、極長鎖アシル-CoA脱水素酵素（VLCAD）欠損症とグルタル酸血症2型では、IL-1とTNF α が欠損酵素部位の代謝能の障害を増強した。一方IFN γ とIL-6では有意な影響は観察されなかった。 β 酸化系の酵素異常症または代謝の脆弱な体質のヒトでは、サイトカインストームが β 酸化系に影響を与える可能性がある。

研究協力者

山田健治、Purevusren J、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）

インフルエンザ脳症は、インフルエンザ感染による高熱とともに電撃的に発症する。一方、先天代謝異常である有機酸・脂肪酸代謝異常症では、それまで元気にみえていた小児が感染などを契機に急性脳症のような形態で発症することがある。発症形態でインフルエンザ脳症と類似点がある。そこ

A. 研究目的

でインフルエンザ脳症の背景疾患としてこのような代謝異常が隠れていないかどうかをみるため、有機酸・脂肪酸代謝異常症のスクリーニングを行った。またインフルエンザ脳症の病態として「サイトカインストーム」が問題視されている。サイトカインが代謝障害を介して急性脳症を引き起こす可能性を検討するため、インフルエンザ脳症で増加すると報告されている4種類のサイトカインを培養細胞の培地に添加して、脂肪酸 β 酸化能への影響を検討した。

B. 研究方法

1. インフルエンザ脳症とその他の脳症の発症形態の比較

2001年～2011年の期間に島根大学に代謝異常スクリーニングを依頼された症例のうち、インフルエンザ脳症とそれ以外の脳症について、患者の動向、発見された疾患、代謝プロフィールを比較、検討した。

2. サイトカインの β 酸化能への影響評価のための基礎実験

① β 酸化能の評価：皮膚繊維芽細胞とタンデムマスを用いる *in vitro* probe assay がある (Li H, Yamaguchi S, et al., Brain & Development, 2010)。この方法は、培養液に基質としてパルミチン酸を加えて96時間培養して培養液中に分泌されたアシルカルニチンをタンデムマス法で測定することによって、 β 酸化能をみる方法である。：4種類のサイトカイン (INF γ 、TNF α 、IL-1 および IL-6) をそれぞれ 10 ng/mL の濃度で添加した。

②サイトカインの安定性：INF γ (1～10 pg/mL)、TNF α 、IL-1 および IL-6 (1～10 ng/mL) を培養液に添加し 37°C で96時間に放置して、安定性を調べた。

③培養細胞：正常コントロール(正常者)、

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、臨床現場から診断のために血液や尿の分析を依頼された症例数の調査であり、患者さんの個人情報に含まれていない。また、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. インフルエンザ脳症とその他の脳症の発症形態の比較

①検査依頼患者数

2001年～2011年の期間に代謝スクリーニングを依頼された症例数は、インフルエンザ脳症 225 例、それ以外の急性脳症 395 例であった (表 1)。

②季節的変動

図 1 に示すように、情報の明らかな 174 例のインフルエンザ脳症の依頼件数は 1 月～3 月に多いのに対して、372 例のインフルエンザ以外の急性脳症では季節的偏りはほとんど見られなかった。

③年齢分布

図 2 に示すように、情報の明らかな 179 例のインフルエンザ脳症では 1 歳未満が 6% で、1～3 歳が 33%、3～6 歳が 29%、6 歳以上が 32% であった。一方、インフルエンザ以外の急性脳症患者数は 1 歳未満が 24%、1～3 歳が 36%、3～6 歳が 19%、6 歳以上が 21% であった。インフルエンザ脳症はそれ以外に比べて年齢が高い傾向が

みられた。

2. 代謝スクリーニングの結果

表2に示すように、インフルエンザ脳症で明らかな先天代謝異常が同定された症例は225例中4例(1.7%)、先天代謝異常症の疑いを含めると19例(8.4%)であった。先天代謝異常の疑いの内訳は、カルニチン欠乏疑い5例、 β ケトチオラーゼ欠損症の疑い、グルタル酸血症2型疑い、およびメチルマロン酸血症疑いなどであった。

一方、インフルエンザ脳症以外の急性脳症で明らかな先天代謝異常が同定された症例は395例中16例(4.1%)、先天代謝異常症の疑いを含めると43例(10.9%)であった。インフルエンザ脳症以外の急性脳症から先天代謝異常の発見される頻度が高かった。

先天代謝異常と診断された患者の臨床所見として、高アンモニア血症、肝機能異常14例、血中CK高値などが多くみられた。

検査項目は、タンデムマスによる血中アシルカルニチン分析、GC/MSによる尿中有機酸分析を行ったが、両方を同時にスクリーニングできなかった症例も少なくない。またすべてが急性期とは限らず、安定期の症例も含まれている。臨床的重症度や検体採取のタイミングを統一する必要がある。いずれにせよ、インフルエンザ脳症、それ以外の急性脳症に限らず、これらの代謝スクリーニングの臨床的意義は大きいので救急現場等に周知する必要がある。

3. サイトカインの β 酸化能への影響評価

①サイトカインの安定性

皮膚繊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 (IVP assay)を用いて β 酸化能を評価した。培養液中に添加したサイトカインの安定性

を調べた。その結果、図3、4、5、6に示すように、 $\text{INF}\gamma$ は少なくとも50 pg/mLで96時間までは十分に検出でき、 $\text{TNF}\alpha$ 、 IL-1 、 IL-6 は少なくとも1 ng/mLで96時間で十分に検出できることを確認した。

インフルエンザ脳症のサイトカインストームにおけるサイトカイン濃度は、報告によると $\text{INF}\gamma$ は ~ 0.1 ng/mL、 $\text{TNF}\alpha$ は0.6 ~ 31 ng/mL、および IL-6 は最高16 ng/mLまで上昇する可能性がある。そこで、これらのサイトカインを10 ng/mLの濃度に添加して実験を行った。

②各疾患のサイトカインを添加しない時の β 酸化能：IVP assayによるアシルカルニチンプロファイル

(a)正常コントロール(図7A)

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。

(b)中鎖アシル-CoA脱水素酵素(MCAD)欠損症(図7B)

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。

(c)極長鎖アシル-CoA脱水素酵素(VLCAD)欠損症(図7C)

正常と比較すると、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。

(d)グルタル酸血症2型(GA2)(図7D)

正常と比較すると、C4 \sim 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 \sim 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。

以上のように、IVP assayで β 酸化障害が同定できることを確認した。

③サイトカインを添加した時の β 酸化能への影響(IVP assay)

(a) 正常コントロール (図 8)

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 γ 、IL-6、IL-1、および TNF α のいずれでも、有意な変化はみられなかった。

(b) 中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 (図 9)

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 γ 、IL-6、IL-1、および TNF α 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。

(c) 極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 (図 10)

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 γ 、IL-6 による影響はみられなかった。一方、IL-1 によって C14 が増加し、TNF α 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 α は VLCAD 欠損症において長鎖脂肪酸 β 酸化の障害を増強させる可能性がある。

(d) グルタル酸血症 2 型 (GA2) (図 11)

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 γ 、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 α 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 α が広範囲にわたって β 酸化障害を増強させる可能性を示す。

今後の課題として、このほかのサイトカインの検討、高熱下での評価 (41°C)、あるいはカルニチンの生理的濃度または低下状態での代謝への影響などがある。

D. 結論

1) インフルエンザ脳症の患者を対象にその発症形態に類似点がある有機酸、脂肪酸代謝異常のスクリーニングを行った。その結果、明らかに先天代謝異常が同定できたのは 225 例中 4 例 (1.7%) に過ぎなかった。これに対してインフルエンザ以外の急性脳症患者では 395 例中 16 例 (4.1%) で、インフルエンザ脳症で発見される頻度はむしろ低かった。

2) また、インフルエンザ脳症とそれ以外の急性脳症の発症時の季節や年齢を比較したところ、インフルエンザ脳症では季節に偏りがあること、年齢が高い症例が多く、1 歳未満の乳児では少ない傾向がみられた。

3) インフルエンザ脳症で増加することが報告されているサイトカインのうち、IL-6、INF γ は、 β 酸化に影響を与えない。また正常コントロールと MCAD 欠損症の細胞では、検査したサイトカイン 4 種類ともに、 β 酸化に影響はみられなかった。一方 IL-1 と TNF α は、VLCAD 欠損症で長鎖脂肪酸 β 酸化の障害を増強し、GA2 では β 酸化全般に障害が増強した。すなわち、 β 酸化系の脆弱な体質では、IL-1 と TNF α が β 酸化を抑制する可能性がある。

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)
- 6) Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi T: Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *Journal of Chromatography B* 878(13-14): 942-948, 2010 (April)
- 7) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S: Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain & Development* 32: 409-411, 2010 (May)
- 8) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial β -oxidation: Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain & Development* 32: 362-370, 2010 (May)
- 9) Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S.: In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type2. *Journal of Chromatography B* 878: 1673-1676, 2010 (Jun)
- 10) Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N: Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221(3): 191-195, 2010 (Jun)
- 11) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Heat Stress Deteriorates Mitochondrial β -Oxidation of Long-chain Fatty Acids in Cultured Fibroblasts with Fatty Acid β -Oxidation Disorders. *Journal of Chromatography B* 878(20):

- 1669-1672, 2010 (Jun)
- 12) Kawana S, Nakagawa K, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique. *Journal of Chromatography B* 878: 3113-3118, 2010 (November)
- 13) 長谷川有紀, 山口清次: 新生児突然死の原因と予防. *産婦人科治療* 100(増刊): 793-796, 2010年(4月)
- 14) 栗野宏之, 八木麻理子, 起塚庸, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 坂本修, 大浦敏博, 竹島泰弘, 松尾雅文: 幼児期に繰り返す嘔吐発作で発症したメチルマロン酸血症の同胞例. *日本小児科学会雑誌* 114(6): 961-965, 2010年(6月)
- 15) 小林弘典, 山口清次: 新しい新生児マススクリーニング: タンデムマスの導入. *Neonatal Care* 23(9): 889-894, 2010年(9月)
- 16) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Li H, Fukuda S, Shigematsu Y, Fukao T, Yamaguchi S: A novel molecular aspect of Japanese patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD): c.449-452delCTGA is a common mutation in Japanese patients with MCADD. *Molecular Genetics and Metabolism* 96(2): 77-79, 2009 (February)
- 17) 四本由郁, 長谷川有紀, 小林弘典, 内田由里, 山口清次, 石川順一, 塩見正司: 脂肪酸代謝障害の所見を示したセレウス菌食中毒に伴う急性脳症の5歳例. *日本小児科学会雑誌* 113(1): 75-78, 2009(1月)
- 18) 竹谷 健, 吉川陽子, 内田由里, 葛西武司, 安田謙二, 金井理恵, 山口清次: 小児の発熱性疾患におけるプロカルシトニンの臨床的意義の検討. *小児科臨床* 62(6): 1129-1135, 2009(6月)
- 19) 小林弘典, 虫本雄一, 山口清次: ESI-MS/MS と培養細胞を用いた in vitro probe acylcarnitine profiling assay による脂肪酸β酸化能の評価. *JSBMS Letters* 34(2): 21-26, 2009(6月)
- 20) Korematsu S, Kosugi Y, Kumamoto T, Yamaguchi S, Izumi T: Novel mutation of early, perinatal-onset, myopathic-type very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatric Neurology* 41(2): 151-153, 2009 (August)
- 21) Purevsuren J, Fukao T, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 98(4): 372-377, 2009 (December)
- 22) Mushimoto Y, Hasegawa Y, Kobayashi H, Li H, Purevsuren J, Nakamura I, Taketani T, Fukuda S, Yamaguchi S: Enzymatic evaluation of glutaric academia type I by an in vitro probe assay of acylcarnitine profiling using fibroblasts and electrospray ionization /tandem mass spectrometry (MS/MS). *Journal of Chromatography B* 877: 2648-2651, 2009 (July)
- 23) 山口清次: 新生児突然死の予防: タンデムマスによる早期発見. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 45(4): 973-976,

2009 (12月)

- 24) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 坂本 修, 大浦敏博, 山口清次: 経過中血液ろ紙分析でカットオフ値を下回った極長鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損症の2例: 血清分析の必要性. 日本マス・スクリーニング学会誌 19(3): 255-259, 2009 (12月)
- 25) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李紅, 福田誠司, 近藤陽一, 脇口 宏, 藤枝幹也, 高杉尚志, 山口 結, 吉良龍太郎, 原 寿郎, 山口清次: 中鎖アシルCOA脱水素酵素欠損症日本人5症例の発症形態の検討. 日本小児科学会雑誌 113(12): 1800-1804, 2009 (12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β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β酸化異常症に対する効果の評価. 第36回日本医用マス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
- 8) Yamaguchi S: Heat Stress and Acute Encephalopathy in Childhood due to Inherited Organic and Fatty Acid Disorders. International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases. Taipei, Taiwan, 2010
- 9) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Li H, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Developed diagnostic method for carnitine cycle disorders using in vitro acylcarnitine probe assay. The

- 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Fukuoka, March 2010
- 10) Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S: Toxic effect of cereulide of bacillus cereus on mitochondrial fatty acid oxidation. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, October 2010
 - 11) Yamaguchi S: Pediatric emergency and nutritionally treatable inborn errors of metabolism. 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening, Lecture. Indonesia, October 2010
 - 12) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李紅, プレブスレンジャミヤン, 山口清次: 末梢リンパ球とタンデム質量分析を用いた簡便な脂肪酸代謝異常症の酵素活性評価. 第113回日本小児科学会. 岩手, 2010年4月
 - 13) 塩田光隆, 齊藤景子, 西田仁, 熊倉啓, 水本洋, 吉岡孝和, 羽田敦子, 虫本雄一, 山口清次, 奏大資: 死亡例も認めたセレウス菌による嘔吐型食中毒の3症例. 第113回日本小児科学会. 岩手, 2010年4月
 - 14) 山口清次: 小児突然死を引き起こすような代謝異常とタンデムマスによる予防. 第2回こども急性疾患学寄附講座「こどもの救急医療のこれから」講演. 神戸, 2010年6月
 - 15) 長谷川有紀, 虫本雄一, 小林弘典, プレブスレン ジャミヤン, 山口清次: 乳幼児期に嘔吐発作で発症した有機酸・脂肪酸代謝異常症患者の検討. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010年10月
 - 16) 小林弘典, プレブスレン ジャミヤン, 李紅, 虫本雄一, 長谷川有紀, 山口清次: ミトコンドリア三頭酵素欠損症に対するベサフィブレードの効果に関する In vitro probe assay での検討. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010年10月
 - 17) Purevsuren J, 長谷川有紀, 山口清次: Acute encephalopathy due to emetic toxin bacillus cereus and mitochondrial fatty acid oxidation disturbance. 第42回日本小児感染症学会. 仙台, 2010年11月
 - 18) Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Li H, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Development of a diagnostic method of systemic carnitine deficiency by in vitro probe acylcarnitine assay using tandem mass spectrometry and fibroblasts. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. New York, August 2009
 - 19) Yamaguchi S, Mushimoto Y, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S: Comparison of clinical onset and prognosis in Japanese patients with MCAD deficiency detected by symptomatic and presymptomatic screening. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. New York, August 2009
 - 20) Yamaguchi S: Expanded newborn screening program by tandem mass spectrometry in Japan. Medical Genetics Symposium commemorating the 10th anniversary of inauguration of Medical Genetics Clinic & Laboratory. Seoul, November 2009
 - 21) 長谷川有紀, 小林弘典, 虫本雄一, 山口清次: 尿中有機酸分析を契機に発見

- された小児のビタミン欠乏症について
—背景と臨床的特徴—。第 112 回日本
小児科学会。奈良，2009 年 4 月
- 22) 小林弘典，長谷川有紀，虫本雄一，山
口清次，重松陽介：タンデムマスによ
る新生児マス・スクリーニング発見例
と発症後診断例の臨床像の検討。第
112 回日本小児科学会。奈良，2009 年
4 月
- 23) 齋藤敦郎，虫本雄一，小林弘典，長谷
川有紀，山口清次：脂肪酸代謝異常症
の尿中有機酸分析所見の検討。第 112
回日本小児科学会。奈良，2009 年 4 月
- 24) 山口清次：新生児マススクリーニング
の新しい動き：タンデムマスの導入。
第 86 回日本小児科学会山形地方会 特
別講演。山形，2009 年 5 月
- 25) 山口清次：小児救急の場で知っておく
べき代謝性疾患。第 6 回和歌山小児救
急研究会 講演。和歌山，2009 年 6 月
- 26) 山口清次：新生児突然死の予防：タン
デムマス導入による早期発見。第 45 回
日本周産期・新生児医学会総会・学術
集会 教育講演。名古屋，2009 年 7 月
- 27) 和田啓介，金井理恵，小林弘典，長谷
川有紀，安田謙二，鬼形和道，山口清
次，沖本民生，及川馨：激しい筋痛と
低カルニチン血症から脂肪酸代謝異常
の疑われた Becker 型筋ジストロフィ
ー6 歳男児例。第 84 回山陰小児科学会。
米子，2009 年 10 月
- 28) 美根 潤，小池大輔，岸 和子，小林弘
典，山口清次：バルプロ酸投与中に高
アンモニア血症を来した 4 ヶ月乳児例
の血中カルニチンの推移。第 61 回中国
四国小児科学会。岡山，2009 年 10 月
- 29) 虫本雄一，小林弘典，長谷川有紀，李
紅，プレプスレン ジャミヤン，伊藤道
徳，大浦敏博，芳野 信，渡邊睦房，山
口清次：リンパ球とタンデム質量分析
を用いた *in vitro* probe assay による
グルタル酸血症 2 型の脂肪酸 β 酸化能
評価。第 51 回日本先天代謝異常学会。
東京，2009 年 11 月
- 30) 小林弘典，虫本雄一，長谷川有紀，
Prevusren J，李 紅，山口清次：タン
デムマス導入による新生児マススクリ
ーニングの新時代 *In vitro* probe
assay による脂肪酸代謝異常症の代謝
能評価。第 51 回日本先天代謝異常学会
シンポジウム。東京，2009 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

表 1. インフルエンザ脳症とそれ以外の急性脳症の代謝検査依頼件数 (2001~2011 年)

インフルエンザ脳症 (抗原迅速検査陽性者)	225 例
インフルエンザ以外の急性脳症	395 例

表 2. 代謝異常検査の結果

所見	インフルエンザ脳症 (n=225)		その他の急性脳症 (n=395)			
1)メチルマロン酸血症	1	4 (1.7%)	19 (8.4%)	3	16 (4.1%)	43 (10.9%)
2)尿素回路異常症	0			4		
3)βケトチオラーゼ欠損症	0			1		
4)高乳酸血症	0			1		
5)GPT2欠損症	1			1		
6)VLCAD欠損症	0			2		
7)MCAD欠損症	0			2		
8)全身性カルニチン欠乏症	1			1		
9)FDPase欠損症	1			1		
10)その他の疑い例	15			27		
11)遊離カルニチン低値		15		36		
12)高乳酸血症?		2		1		

図 1. 検査依頼数の季節的変動

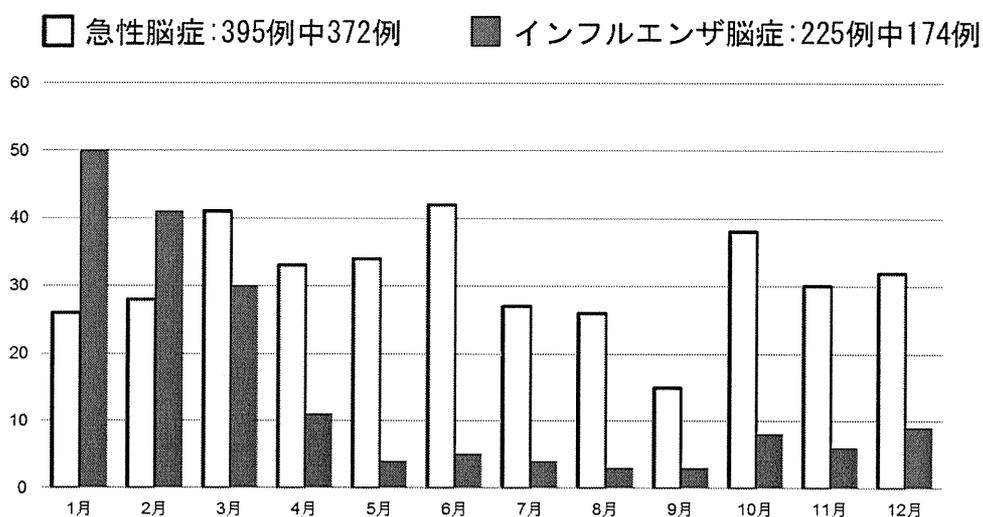
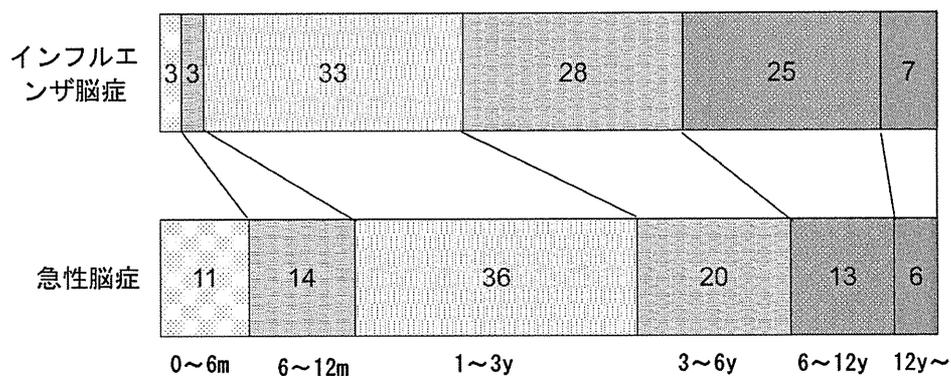


図2. 検査依頼の年齢別内訳



インフルエンザ脳症：177例、インフルエンザ以外の急性脳症375例
 単位は%、横軸は年齢。

図3. INF γ の培養液中の安定性

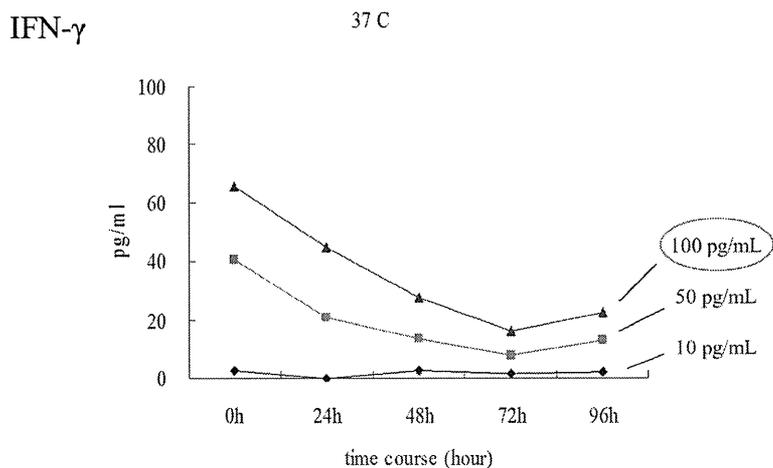


図4. TNF α の安定性

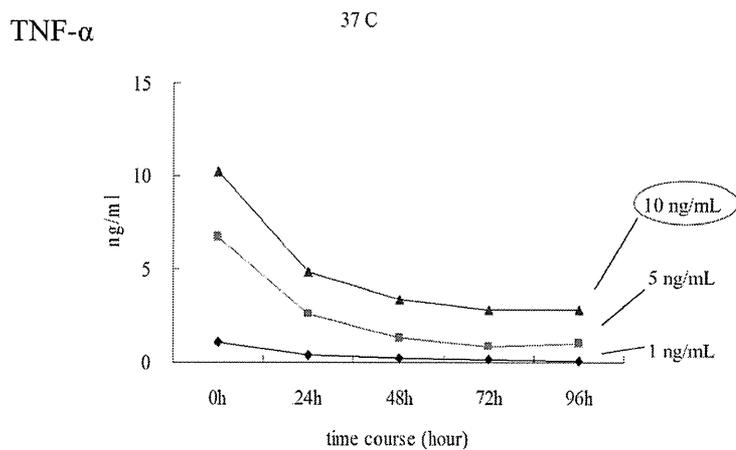


図5. IL-1の安定性

