

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

インフルエンザ脳症の患者血清を用いた代謝物プロファイリング

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 インフルエンザ脳症の新規バイオマーカーを探索する目的で、インフルエンザ脳症22例と神経合併症のないインフルエンザ22名の急性期・回復期の血清検体中の代謝物プロファイリングをメタボローム解析により行った。CE-TOFMS装置による測定結果から、174ピークに候補物質が付与され、49の物質で定量が可能であった。脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して、4種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、3種類で有意な低下が認められ、これらの代謝物が早期診断の新規バイオマーカー候補と考えられた。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症では、感染に伴って惹起されるサイトカインなどの炎症性物質が病態に関与するとの報告があるが、なぜ脳症が起こるのか、どのようにして病態が進展するのかは明らかにされていない。病態に関連する新規のバイオマーカーの探索は臨床上的意義が大きい。メタボローム解析は、代謝物質の網羅的挙動を解析することにより、臓器障害の影響を評価できるため、疾患関連バイオマーカーの探索手法として注目されている。私共は、本症における中枢神経障害の早期診断・予後予測に関する新規バイオマーカーの探索を目的として、本症患者の血清検体を用いてメタボローム解析を行った。本症で血清中の低分子代謝物質の網羅的解析を行った報告はなく、新しい側面から本症の解析をすることが期待される。

B. 研究方法

1. インフルエンザ脳症と診断した患者 12 名と神経合併症のないインフルエンザ患者(コントロール群)22名の急性期および回復期血清を採取し、比較検討した(計 68 検体)。
2. CE-TOFMS 装置(キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析、Agilent Technologies)を用いてカチオンモード、アニオンモードによる測定を行った。
3. 検出されたピークは自動積分ソフトウェアを用いて、ピーク情報を得た後、代謝物質データベースに登録された物質との照合・検索を行った。
4. 主成分分析、階層クラスター分析、代謝経路の描出を行った。
5. 定量系のあるものでは定量値を算出し同様

に比較を行った。

6. 解析結果を群間で比較し、バイオマーカー候補の検討を行った。

C. 研究結果

1. 血清 68 検体について、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行い、174 ピークに候補物質が付与された。
2. 検出されたピークを用いて主成分分析を行った(Data not shown)。階層クラスタリングを行い、HeatMap 表示させた結果を図 1 に示した。
3. 候補化合物について、解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路および各種アミノ酸代謝経路に描画した(Data not shown)。
4. 49 の物質で定量が可能であった。これらのうち、脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して、N⁸-Acetylspermidine など 4 種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、β-Ala を含む 3 種類で有意な低下が認められた(図 2)。

D. 考察

メタボローム解析により、コントロール群と比較して脳症群で有意に変動していた物質は、インフルエンザ脳症の早期診断のバイオマーカー候補と考えられた。バイオマーカー候補物質のなかで、代謝物質の経路図から、その意義が推定できるものについては、単独の定量系を構築し、検体数を増やすことにより、その意義を検証していくことが重要と考えられる。

E. 結論

インフルエンザ脳症の患者血清を用いた代謝物プロファイリングを行い、脳症群で有意な変動を示した代謝物は、新しいバイオマーカー候補と考えられた。今後、より詳細な解析を行い、その意義を確認する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 T-cells. *J Invest Dermatol* 132(5):1401-1408, 2012
- 2) 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*, 6(3):278-282, 2012
- 3) Kawabe S, Ito Y, Gotoh K, Kojima S, Matsumoto K, Kinoshita T, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H. Application of flow cytometric in situ hybridization assay to Epstein-Barr virus-associated T/natural killer cell lymphoproliferative diseases. *Cancer science* 103(8):1481-1488, 2012
- 4) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis / encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci*, 320:145-148, 2012.
- 5) Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Fukushima N, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R. Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Clin Cancer Res*, 18(15):4183-4190, 2012
- 6) Kawada J, Arai N, Nishimura N, Suzuki M, Ohta R, Ozaki T, Ito Y. Clinical

Characteristics of Norovirus Gastroenteritis among Hospitalized Children in Japan. *Microbiol Immunol*, 56(11):756-759, 2012

- 7) Ito Y, Kawamura Y, Iwata S, Kawada J, Yoshikawa T, Kimura H. Demonstration of type II latency in T lymphocytes of Epstein-Barr Virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric blood & cancer*, published online: 7 September 2012
- 8) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human Herpesvirus 6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome. *Neuropediatrics*, published online: 03 October 2012
- 9) Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N. Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. *Rheumatology*, published online: October 30, 2012
- 10) Kato K, Otake H, Tagaya M, Takahashi Y, Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S, Nakashima T. Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child. *Am J Otolaryng.* 34(1):89-92, 2013
- 11) Kawada J, Kitagawa Y, Iwata N, Ito Y. Clinical characteristics of influenza virus infection in juvenile idiopathic arthritis patients treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol*. published online: Oct 16. 2012

2. 学会発表

- 1) 伊藤嘉規、鳥居ゆか、森内浩幸、木村宏、先天性・周産期感染症 (TORCH) に関する全国アンケート調査、第 115 回日本小児科学会学術集会、福岡、2012.4.21-22
- 2) 河野好彦、木村宏、後藤研誠、鈴木道雄、鳥居ゆか、伊藤嘉規、患者血漿中 EB ウイルス由来 mRNA 定量を応用した EB ウイルス関連疾患バイオマーカーの探索、第 86 回日本感染症学会総会、長崎、2012.4.25-26
- 3) Kawano Y, Iwata S, Gotoh K, Suzuki M,

- Torii Y, Kawada J, Kimura H, Ito Y, Plasma viral microRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active EBV infection. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Seoul, Korea, 2012.5.17-19
- 4) Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N, Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. International Congress on Oncogenic Herpesvirus and Associated Disease, Philadelphia, USA, 2012.8.1-4
 - 5) Honma K, Imai K, Kanae C, Ishida H, Ito Y, Kojima S, Yokosuka T, Kanegane H, Morio T, Sasahara Y, Fujikawa T, Harigae H, Hayashi Y, Ohara O, Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in Japan, 15th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies, Florence, Italy, 2012.10.3-6
 - 6) Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Kimura H, Ito Y, Plasma viral microRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection. IDWeek 2012, San Diego, USA, 2012.10.17-22
 - 7) Horiuchi H, Torii Y, Ito Y, Kimura H, Clinicoepidemiological States of Congenital Cytomegalovirus Infections: A Nationwide Survey in Japan. CMV meeting 2012, San Francisco, USA, 2012.10.29-11.2
 - 8) 河野 好彦、岩田 誠子、川田 潤一、神谷 泰子、鈴木 道雄、鳥居 ゆか、木村 宏、伊藤 嘉規、慢性活動性 EB ウイルス感染症における EB ウイルス由来 miRNA 血漿中バイオマーカーとしての応用、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.13-15
 - 9) 伊藤嘉規、河村吉紀、岩田誠子、川田潤一、吉川哲史、木村宏、EB ウイルス関連血球貧食性リンパ組織球症例におけるウイルス感染細胞の性状を中心とした病態解析、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012.11.24-25
 - 10) 鈴木道雄、鳥居ゆか、神谷泰子、河野好彦、川田潤一、木村宏、伊藤嘉規、肝移植後小児におけるインフルエンザワクチンの有効性・安全性の検討(成人例との比較)、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012.11.24-25
 - 11) 河辺慎司、川田潤一、伊藤嘉規、木村宏、岩田直美、水痘罹患後に血球貧食性リンパ組織球症を続発した1例、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012.11.24-25
 - 12) 加納友環、吉松豊、村上佳津美、森口直彦、内野清子、田中智之、伊藤嘉規、ヒトパルボウイルス B19 脳炎の1女児例、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012.11.24-25
 - 13) Kato S, Miyata T, Ito Y, Tomita A, Kinoshita T, Nakamura S, A case of cytotoxic molecule-positive Epstein-Barr virus (EBV)-associated T-cell lymphoma followed by chronic active EBV infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder 14 years later, T-cell lymphoma forum, San Francisco, USA, 2013.1.24-26

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