

中に分泌されるアシルカルニチンを測定し、 $\beta$ 酸化能、および障害部位を評価した。これを In vitro probe (IVP) assay という。アシルカルニチンはタンデムマスによって測定した(図 1)。インフルエンザ脳症のリスク因子、あるいは緩和因子を探索するために、IVP assay の系に以下のような環境変化、薬剤添加等によって  $\beta$ 酸化能の変化を評価した。

## 2) 高脂血症薬ベザフィブラート (BEZ)

Peroxisome proliferating receptor (PPAR) アゴニストとして知られ、高脂血症薬として使用されている BEZ (400 nmol/mL) の存在下で、 $\beta$ 酸化異常症患者の細胞を培養し、 $\beta$ 酸化能改善効果を評価した。

## 3) 環境温度の影響

培養環境を、高温下 (41°C) と低温下 (33°C) にして、37°C 環境下での  $\beta$ 酸化能と比較した。

## 4) サイトカインの影響

インフルエンザで増加するといわれるサイトカイン (IL1, IL6, INF $\gamma$  および TNF $\alpha$ ) 存在下で  $\beta$ 酸化能の変化を評価した。

# C. 結果

## 1) IVP assay の結果

IVP assay による結果を図 2 に示す。正常コントロール (図 2A) におけるアシルカルニチンプロファイルは、アセチルカルニチン (C2) のみが主なピークで、他のアシルカルニチンは低い。これに対し、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 (図 2B) では、代謝障害部位に対応して、C4、C6、C8 の増加がみられ、中鎖脂肪酸の代謝障害を反映している。極長鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 (図 2C) では、長鎖脂肪酸の代謝障害を反映して C12、C14、C16 の長鎖アシルカルニチンの増加がみられた。

## 2) ベザフィブラート (BEZ) の $\beta$ 酸化異常症への影響

図 3 に、VLCAD 欠損症とグルタル酸血症 II 型 (GA2) の IVP assay の結果を示している。VLCAD 欠損症では長鎖脂肪酸の代謝障害を示し、一方 GA2 では、広範囲の  $\beta$ 酸化障害の病態を反映して、C4 から C16 まで全体的に増加している。

これに対し BEZ 存在下で培養した時のアシルカルニチンプロファイルは、図 3 の下段のように異常ピークが正常化している。このことから BEZ は、 $\beta$ 酸化異常症における代謝異常を改善する効果が推測された。

種々の  $\beta$ 酸化異常症の培養細胞で同様の実験を行ったところ、図 4 に示すようにほとんどすべての  $\beta$ 酸化異常症の細胞で  $\beta$ 酸化能の改善が認められた。

## 3) 環境温度の影響

33°C (低温下)、37°C、および 41°C (高温下) で  $\beta$ 酸化異常症の細胞を用いて IVP assay を行った。その結果、図 5 に示すように、VLCAD 欠損症では、41°C (高温下) で、C12、C14、C16 のアシルカルニチンが増加した。一方 33°C では、C14、C16 は低下した。

広範囲の  $\beta$ 酸化障害の起こる GA2 では、高温下では C12~C16 アシルカルニチンは増加し、C4~C10 の中鎖アシルカルニチンは低下した。一方、低温下 (33°C) では、長鎖アシルカルニチンを含むすべての炭素鎖長のアシルカルニチンが低下した。

高温環境と低温環境で対照的な結果を示した。すなわち、VLCAD 欠損症も GA2 も長鎖脂肪酸の  $\beta$ 酸化は高温下では悪化した。GA2 においては中鎖短鎖の  $\beta$ 酸化は改善しているかのような所見を示した。すなわち高温環境では長鎖脂肪酸の  $\beta$ 酸化障害は悪化し、低温下ではすべての鎖長の  $\beta$ 酸化障害が緩和すると推測された。

## 4) サイトカインによる $\beta$ 酸化への影響

インフルエンザで上昇するサイトカインのうち、 $\text{INF}\gamma$ 、 $\text{IL1}\beta$ 、 $\text{IL6}$ 、および  $\text{TNF}\alpha$  をそれぞれ 10 ng/mL の濃度で添加して IVP assay を行った。結果はアシルカルニチンの C2 に対する比で表した。インフルエンザ脳症等による死亡例で報告されているサイトカイン濃度は以下のとおりである： $\text{IF}\gamma$  0.1~0.15 ng/mL； $\text{IL1}\beta$  22.6 $\pm$ 4.7 pg/mL； $\text{IL6}$  1.1~16.1 ng/mL； $\text{TNF}\alpha$  8.8~315 ng/mL。

図 6 に示すように、正常細胞ではサイトカインの有無によって  $\beta$  酸化能は影響を受けなかった(図 6A)。MCAD 欠損症では、C8 は 4 種類のサイトカインの存在下で増加し、C10 は  $\text{IL1}$  と  $\text{TNF}\alpha$  の存在下で増加した(図 6B)。

VLCAD 欠損症では、 $\text{IF}\gamma$  と  $\text{IL6}$  による影響はみられなかったが、 $\text{IL1}\beta$  と  $\text{TNF}\alpha$  存在下で C14 と C16 の増加がみられた(図 6C)。GA2 では、 $\text{IF}\gamma$  と  $\text{IL6}$  による影響はみられなかったが、 $\text{IL1}\beta$  と  $\text{TNF}\alpha$  存在下で C4~C16 のすべてのアシルカルニチンの増加がみられた(図 6D)。

検査した 4 種類の  $\text{INF}\gamma$ 、 $\text{IL1}\beta$ 、 $\text{IL6}$ 、および  $\text{TNF}\alpha$  のうち、 $\text{IF}\gamma$  と  $\text{IL6}$  による  $\beta$  酸化への影響は少なく、 $\text{IL1}\beta$  と  $\text{TNF}\alpha$  は、 $\beta$  酸化異常症の障害部位の代謝を悪化させる可能性が高い。

#### D. 考察

インフルエンザ脳症のように電撃的に急性経過を取る疾患が、 $\beta$  酸化障害を介して起こるといふ仮説のもとに、種々の薬剤や環境による変化を評価した。 $\beta$  酸化異常症のように代謝の脆弱な体質の個体では、感染などを契機に急性経過を取ることが少なくない。今回の検討の結果、高脂血症薬の BEZ は  $\beta$  酸化異常症を改善する可能性のあることを示した。その機序として、BEZ は PPAR アゴニストとして働き、PPAR は  $\beta$  酸化酵素の上流の配列に結合して酵素の転写を促進

し、このために酵素タンパクの量を増加させ残存活性を上昇させることが考えられている。 $\beta$  酸化は連続して働く代謝経路であり、もしも正常な酵素も同じように増加させるならば、変異タンパクの増加量とのアンバランスが起こることも考えられる。BEZ の作用機序については *in vivo* も含めて、さらに検討が必要であろう。

環境温度による影響をみた研究では、長鎖脂肪酸の代謝の脆弱な個体(または  $\beta$  酸化異常症)では、高温下では長鎖脂肪酸代謝が悪化する可能性がある。一方中鎖~短鎖の  $\beta$  酸化は高温下では促進される。一方低温下では、長鎖  $\beta$  酸化の異常も緩和されることが推測された。この機序として、変異タンパクでも低温下では立体構造が比較的保たれて安定化するために、酵素活性が保存されたことが考えられる。

インフルエンザで上昇するサイトカインのうち 4 種類の  $\beta$  酸化に対する影響を調べた実験では、 $\text{IF}\gamma$  と  $\text{IL6}$  の  $\beta$  酸化への影響は少なく、 $\text{IL1}\beta$  と  $\text{TNF}\alpha$  では、 $\beta$  酸化異常症を悪化させる可能性が高いことが分かった。インフルエンザはウイルスそのものの毒性というよりもサイトカインストームが病態を悪化するとされており、今後さらにこの他のサイトカインの影響についても検討する価値がある。

#### E. 結論

インフルエンザの症状のうち、 $\beta$  酸化に影響を与える可能性のある薬剤、環境温度、およびサイトカインの影響を調べた。結論として、BEZ は  $\beta$  酸化異常症を改善する効果が期待される。環境温度では、低温下の方が  $\beta$  酸化にとって良い可能性が高い。またサイトカインの中でも、 $\text{IF}\gamma$  と  $\text{IL6}$  の  $\beta$  酸化への影響は少なく、 $\text{IL1}\beta$  と  $\text{TNF}\alpha$  は、 $\beta$  酸化系を悪化させ

る可能性があるということが明らかになった。この他のインフルエンザに関連した諸因子について検討する価値がある。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics* 131(1): e327-30, 2013 (January)
- 2) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4): 1345-1351, 2013 (February)
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 23(3): 270-276, 2013
- 4) 山口清次: MS解析による代謝障害の診断. *分子消化器病* 10(1): 72-78, 2013
- 5) 山口清次: 新生児スクリーニングの新時代 ; タンデムマス法の導入. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 48(4): 827-829, 2013
- 6) 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次: 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経学* 53(3): 191-195, 2013
- 7) 山口清次: タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断. *小児科臨床* 66(2): 193-198, 2013
- 8) 山口清次: 小児科領域におけるタンデムマスと GC/MS の臨床応用: 最近の進歩. *臨床病理* 61(9): 817-824, 2013
- 9) 山口清次(編): *タンデムマス・ガイドブック*, 診断と治療社, 東京, 2013

### 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. *International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013* 講演. New Delhi, India, April 2013
- 2) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. *International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013* 講演. New Delhi, India, April 2013
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. *2013 Joint Meeting of the*

- Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS&GTS) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013
- 4) Yamaguchi S: Diagnosis and treatment of mitochondrial fatty acid oxidation defects. The Second Forum of International Translational Medicine of Clinical Genetics in Beijing - Development and Application of Genetic Technology 講演. Beijing, China, August 2013
  - 5) Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Fukuda S, Ito M, Yamaguchi S: Responsiveness of bezafibrate for neonatal onset form of glutaric acidemia type II: comparison with milder form using in vitro probe assay. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013
  - 6) Yamaguchi S, Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Ohkubo T, Watanabe M, Tsunemi T, Ishii A, Takuma H, Tamaoka A, Shigematsu Y, Fukuda S: Two Japanese cases of adult onset myopathic form of glutaric acidemia type II. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013
  - 7) Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013
  - 8) Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013
  - 9) Yamaguchi S: Screening, diagnosis, and treatment of organic and fatty acid disorders. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) Educational lecture. Chiba, November 2013
  - 10) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: SIDS, ALTE 様症状で発症し先天代謝異常症と判明した 10 例の検討. 第 40 回日本マス・スクリーニング学会. 大阪, 2013 年 8 月
  - 11) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸の  $\beta$  酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会. 神戸, 2013 年 9 月
- F. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
該当なし
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし

図1. In vitro probe assayの原理

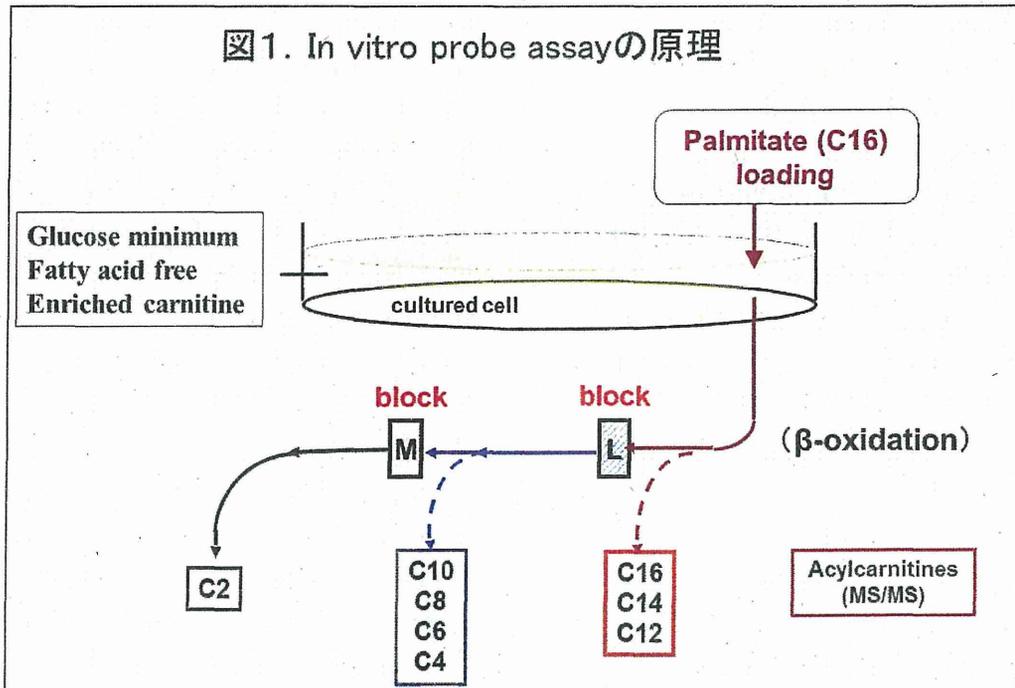


図2. In Vitro Probe Assayの結果の例

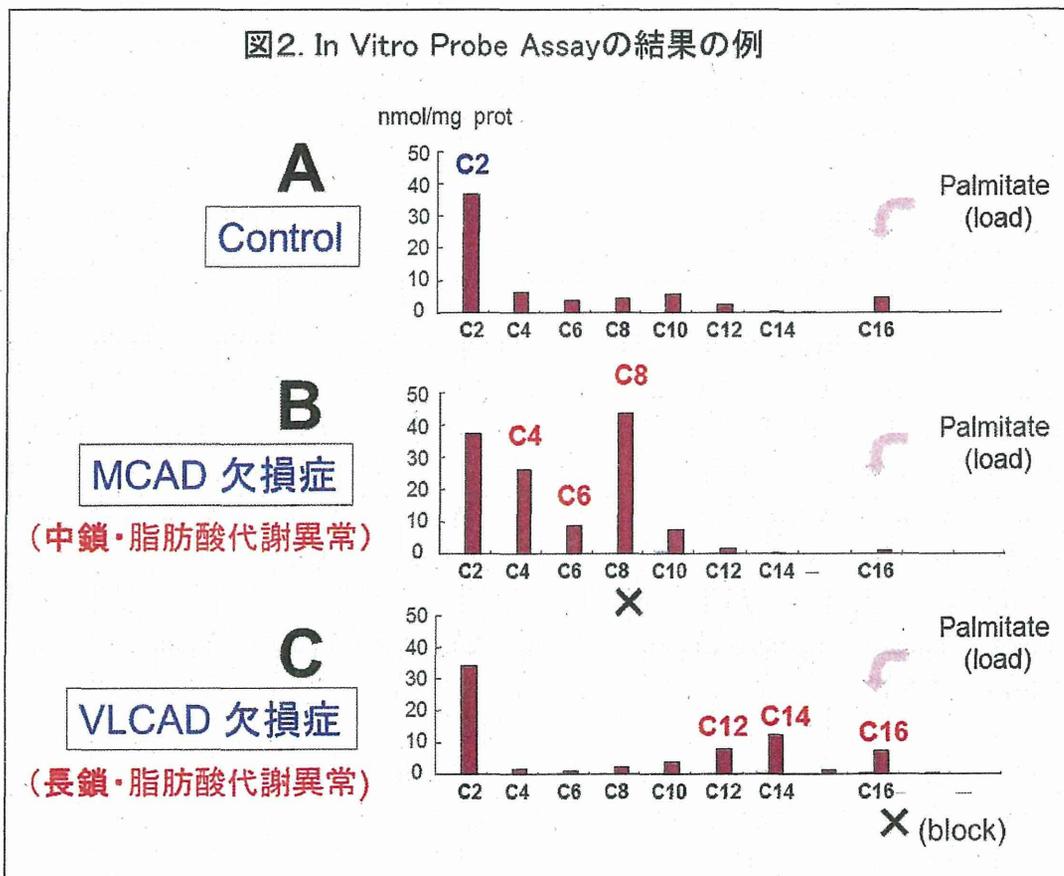


図3. ベザフィブラート添加前後のアシルカルニチンの変化

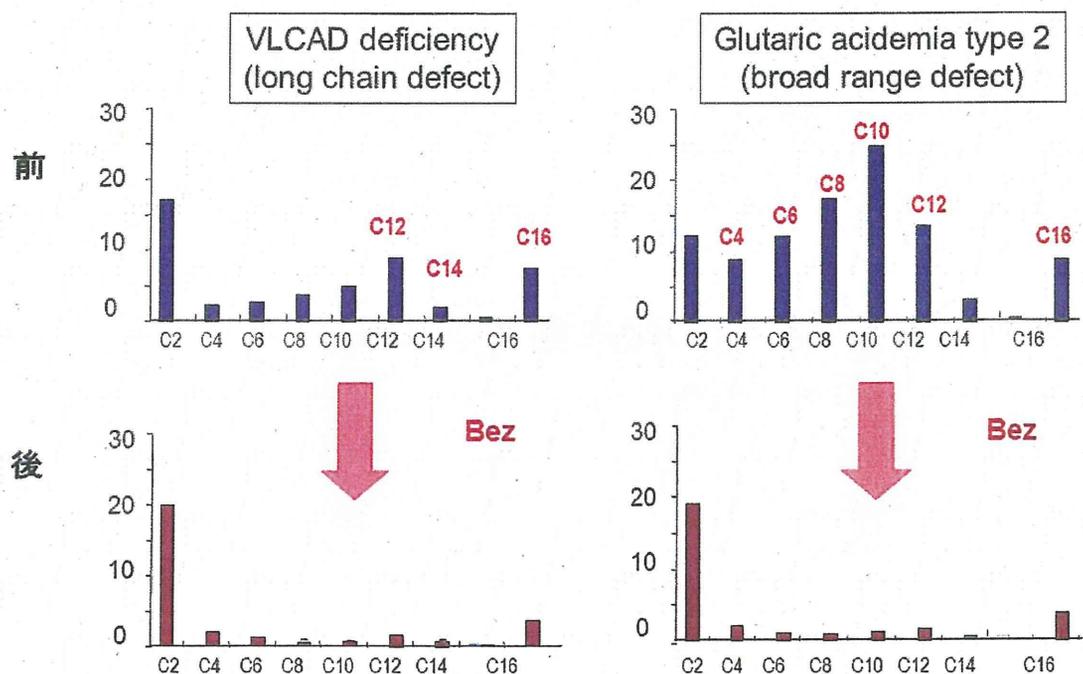
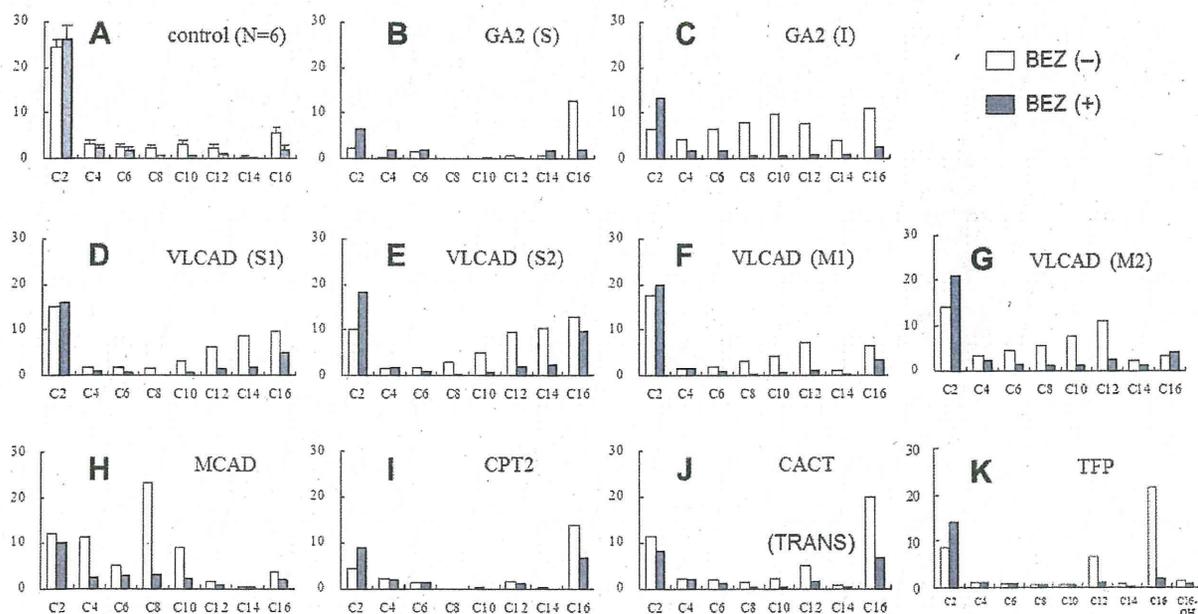


図4. ベザフィブラートの脂肪酸代謝異常改善効果in vitro probe assayによる評価



略字: GA2(S), GA2(I)=グルタル酸血症II型重症型と中間型; VLCAD(S), VLCAD(M)=VLCAD欠損症重症型と軽症型; MCAD=MCAD欠損症; CPT2=CPT2欠損症; CACT=カルニチン・アシルカルニチントランスロカーゼ欠損症; TFP=三頭酵素欠損症

図5. 高温下と低温下のアシルカルニチンの変化 (in vitro probe assay)

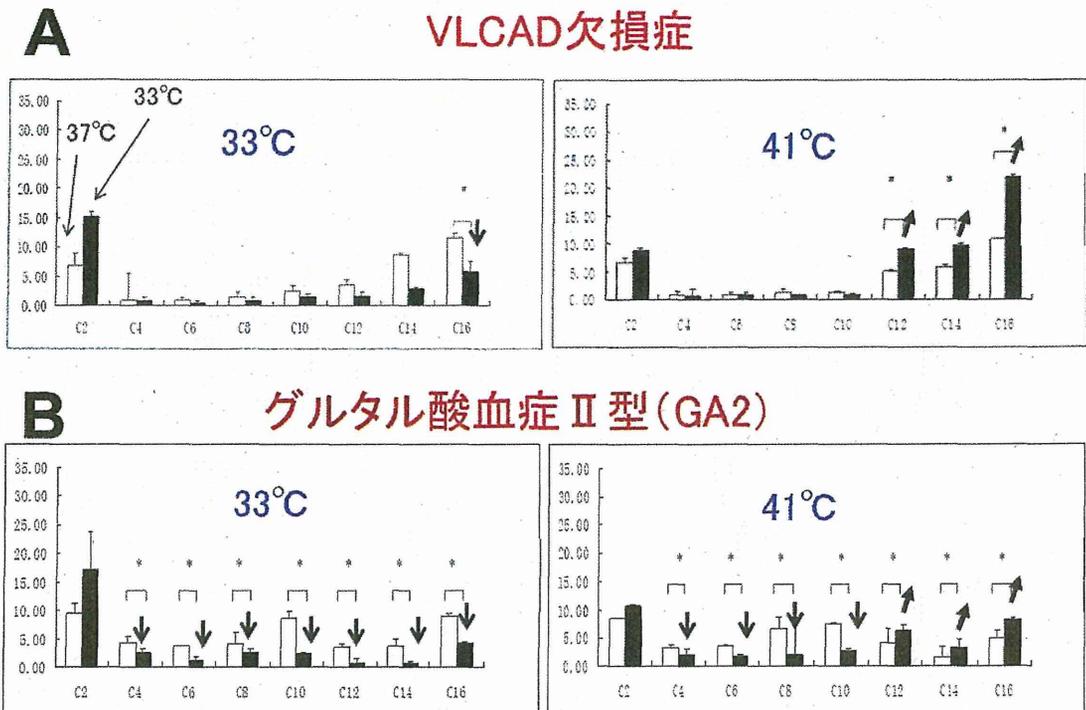


図6A. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

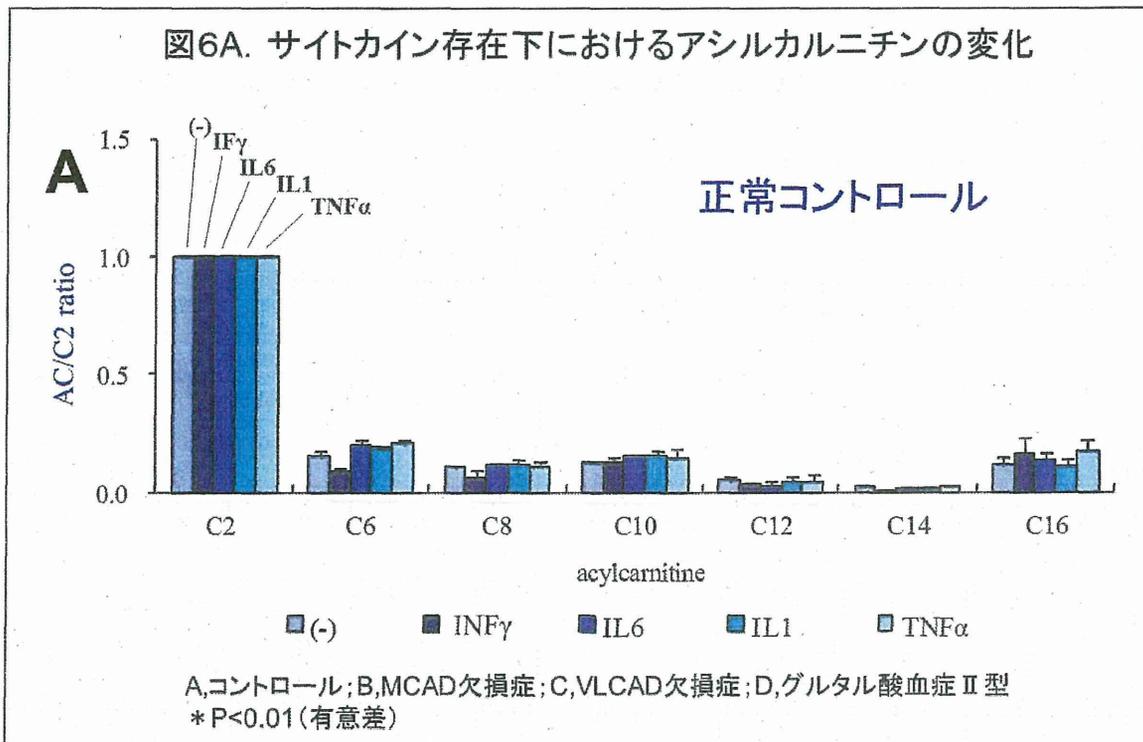


図6B. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

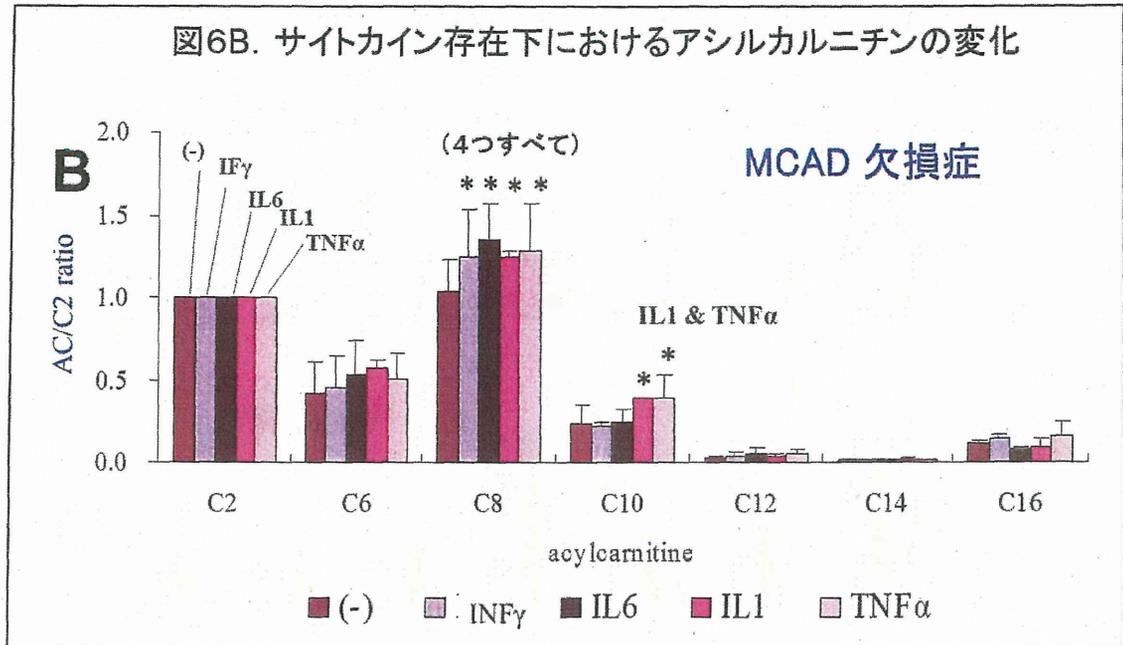


図6C. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化

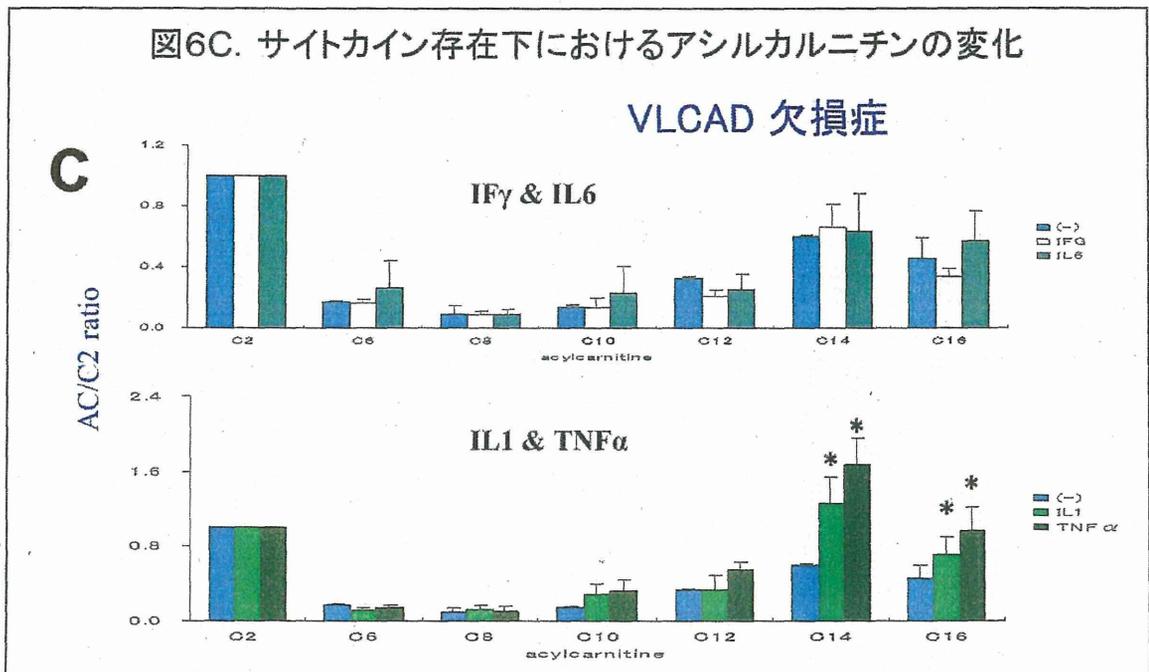
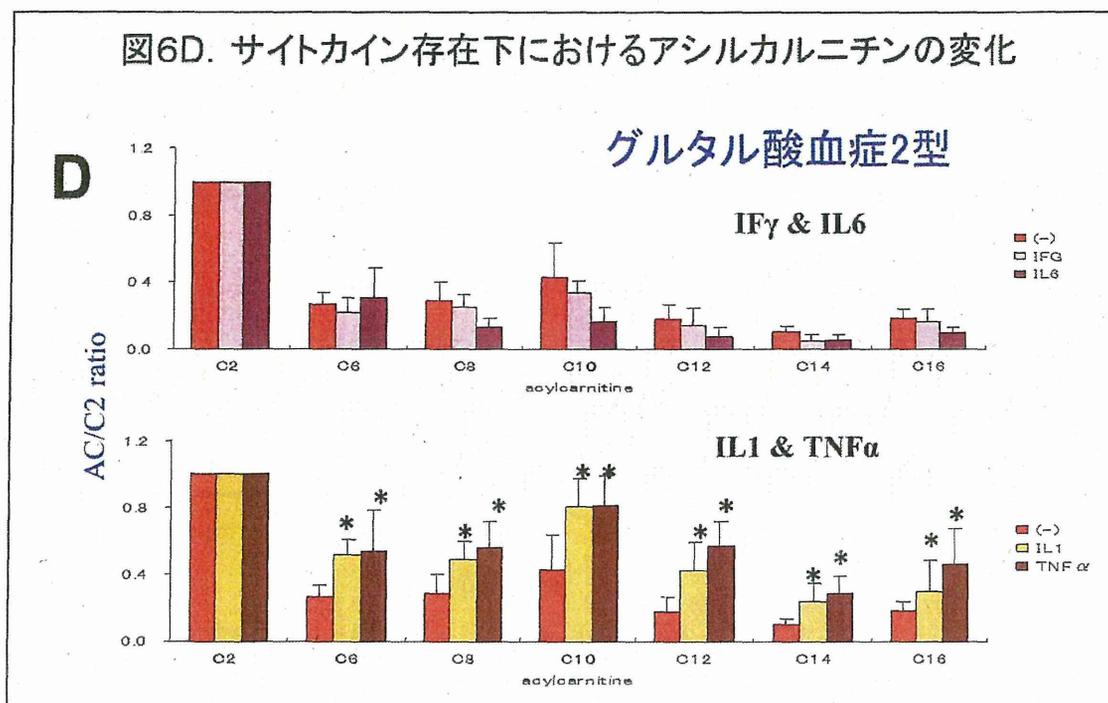


図6D. サイトカイン存在下におけるアシルカルニチンの変化



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐々木 信一	がん性髄膜炎に対 する治療戦略.	大江裕一郎, 加藤晃史, 堀之内秀仁	ガイドライン に載っていない 肺がん Pra ctical Treatment	Medical View社	東京	2014	181-185

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai M, Hirotsu N, Kido H.	Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors: A retrospective analysis.	PLoS ONE	8(7)	e70060	2013
Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, Echigo N, Kido H, Nakamura S, Mashino T, Okutani T, Kuzuhara T.	Anti-Influenza Activity of C60 Fullerene Derivatives.	PLoS ONE	8(6)	e66337	2013
Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Shichijo K, Matushita M, Kido H	Blood lactate/ATP ratio, as an alarm index and real-time biomarker in critical illness.	PLoS ONE	8(4)	e60561	2013

Kimoto T, Mizuno D, Takei T, Kunimi T, Ono S, Sakai S, Kido H.	Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10: Induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses.	Influenza and Other Resp. Viruses	7(6)	1218-1226	2013
Chida J, Kido H.	Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells.	Methods Mol Biol,	1098(1)	21-32	2014
Yamane K, Indalao IL, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H.	Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for multiorgan failure in severe influenza.	PLoS ONE		In press	2014
木戸博、 高橋悦久、 山根一彦	重症インフルエンザ感染の肺炎・脳症の最新知見と治療提案	日本臨床内科医会誌	27(5)	578-583	2013
木戸博	インフルエンザ脳症はここまでわかってきた！ プライマリケアのためのインフルエンザ診療	医薬ジャーナル社		30-35	2013
木戸博	インフルエンザにおけるマクロライドの有効性の機序2：インフルエンザにおける粘膜免疫増強作用と再感染抑制機序	呼吸器内科	24(4)	384-391	2013
木本貴士、 水野大、 堺聡子、 木戸博	肺サーファクタント由来人工合成粘膜アジュバントSF-10の感染防御効果と液性・細胞性免疫誘導効果の検討	日本肺サーファクタント・界面医学会誌	44	59-61	2013
木戸博	アジュバント、予防接種Q & A	小児内科	45	60-64	2013
木戸博、 高橋悦久、 堺聡子	ウイルス性気道感染症における粘膜免疫の重要性	感染と抗菌薬	16(4)	361-367	2013
木戸博、 高橋悦久、 山根一彦	インフルエンザの生体防御	感染症内科	1(6)	544-551	2013
Haga N, Kubota M, Miwa Z.	Epidemiology of hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV and V in Japan.	Am J Med Genet Part A	161(A)	871-874	2013

Shinohara, M, Saitoh, M, Nishizawa, D, Ikeda, K, Hirose, S, Takanashi,JI, Takita J, Kikuchi K, Kubota M et al.	ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus..	Neurology		In press	2013
Kato M, Yamagata T, Kubota M, et al.	Clinical spectrum of early onset epileptic encephalop- athies caused by KCNQ2 mutation.	Epilepsia		doi: 10.2013 1111/ep i.12200	2013
Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi Ji, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, et al.	MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome.	<i>Am J Med Genet</i>	Part A 161A	2234- 2243	2013
Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Kubota M et al.	De novo mutations in <i>GN AO1</i> , Encoding a Gao Subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy.	The Am J Hum Genet	93	1-10	2013
Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M.	Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders.	Brain Dev		in press	2013
Shigematsu S, Hayashi H, Yasui K, Matsuyama T	SAM domain- containing N-terminal region of SAM HD1 plays a crucial role i n its stabilization and res triction of HIV-1 infection.	Acta Med Nagasaki,		in press	2014

Kakoki K, Shinohara A, Izumida M, Koizumi Y, Honda E, Kato G, Igawa T, Sakai H, Hayashi H, Matsuyama T, Morita T, Koshimoto C, Kubo Y.	Susceptibility of muridae cell lines to ecotropic murine leukemia virus and the cationic amino acid transporter 1 viral receptor sequences: implications for evolution of the viral receptor.	<i>Virus Genes</i>		Epub 2014 Jan 28	2014
Chua KJ, Kubo Y, Ma Y, Yasui K, Matsuyama T, Hayashi H	A short variant BTBD2 as a novel negative regulator of IRF- associated signalling.	<i>Int J Integr ative Biol.</i>	14	31-38	2013
Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y.	CXCR4-Tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit.	<i>AIDS Res Hum Retro viruses</i>	29(2)	279-288.	2013
Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N.	Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases.	<i>Adv Virol.</i>		640894	2012
Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H.	Serum starvation activates NF- $\kappa$ B through G protein $\beta$ 2 subunit-mediated signal.	<i>DNA Cell Biol</i>	31(11)	1636- 1644	2012
Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T.	Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication.	<i>Pediatrics</i>	131(1)	e327- 330	2013

Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S.	Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1.	Anal Bioanal Chem	405(4)	1345- 1351.	2013
Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y	Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-Co A dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan.	日本マススクリーニング学会誌	23(3)	270-276	2013
山口清次	MS解析による代謝障害の診断	分子消化器病	10(1)	72-78	2013
山口清次	新生児スクリーニングの新時代; タンデムマス法の導入.	日本周産期・新生児医学会雑誌	48(4)	827-829	2013
山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次	成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討.	臨床神経学	53(3)	191-195	2013
山口清次	タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断.	小児科臨床	66(2)	193-198	2013
山口清次	小児科領域におけるタンデムマスとGC/MSの臨床応用: 最近の進歩.	臨床病理	61(9)	817-824	2013
Nagashima O, Ohashi R, Yoshioka Y, Inagaki A, Tajima M, Koinuma Y, Iwakami S, Iwase A, Sasaki S, Tominaga S, Takahashi K.	High prevalence of gene abnormalities in young patients with lung cancer.	J Thorac Dis	5	27-30	2013

Mori T, Tajima K, Hirama M, Sato T, Kido K, Iwakami S, Sasaki S, Iwase A, Shiomi K, Maeda M, Hino O, Takahashi K.	The n-erc index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma.	J Thorac Dis	5	145-148	2013
門屋講太郎, 吉岡 泰子, 難波由喜子, 桂 蓉子, 高 遼, 小池 建吾, 吉岡 正剛, 佐々木信一, 富永 滋, 高橋 和久.	肺膿瘍・膿胸7例における菌周病細菌PCR検査の臨床的意義の検討.	日本呼吸器学会雑誌	2	79-84	2013
南條友央太, 佐々木信一, 松野 圭, 石森絢子, 牧野文彦, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 富永 滋, 山口哲生.	<i>Nocardia wallacei</i> が検出され、ST合剤投与で軽快した気管支拡張症の1例.	Therapeutic Research	34	759-760	2013
磯部 全, 佐々木 信一, 富永 滋, 前野 敏孝, 倉林 正彦.	喘鳴を伴わずに発症した好酸球性細気管支炎の1例.	日本呼吸器学会誌	2	607-611	2013
Takashita E, Ejima M, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M.	A community cluster of influenza A(H1N1)odm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013.	Euro Surveill.	19	pii=20666	2014
Nguyen, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishihara M, Matsui.	Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinic in Iwaki, Fukushima, Japan.	Am J Infection Control		in press	2014
Nishimura H, Sakata S, Kaga A	A new methodology for studying dynamics of aerosol particles in sneeze and cough using a digital high-vision, high-speed video system and vector analyses.	PLoS ONE	8	e80244	2013

Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R	Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	Arch. Pharm. Res. Arch Pharm Res.		[Epub ahead of print]	2013
Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Nadine L, Kubo H, Nagatomi R	Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	Physiological Reports	1	e00041.	2013
Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, Ahiko T	Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011.	Microbiol. Immunol.	57	400-405	2013
山口育男, 青山知枝, 山本優, 木下恵子, 伊藤由美, 西村秀一	免疫クロマト法インフル エンザウイルス抗原検出キ ットBDペリターシステムFlu における機器判定の感度と その目視判定に対する優越 性の検討	日本臨床微 生物学雑誌	23	39-44	2013
中澤裕美子, 前川貴伸, 小穴慎二, 石黒精, 太田さやか, 寺嶋宙, 柏井洋文, 久保田雅也, 堤 義之, 中澤温子, 師田信人, 阪井裕一	脳幹部腫瘍との鑑別に組織 生検が有用であった多発性 硬化症の11歳男児例	日本臨床免 疫学会誌	36	175-179	2013
磯部 全, 佐々木信一, 神戸将彦, 相澤智弘, 原 健一郎, 前野敏孝	咯血を主訴とし、びまん性肺 胞出血との鑑別を要した気 管支管気管支骨軟骨形成症の1 例.	気管支学	36	73-77	2014

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷（主なもの）

# Immunomodulator Clarithromycin Enhances Mucosal and Systemic Immune Responses and Reduces Re-Infection Rate in Pediatric Patients with Influenza Treated with Antiviral Neuraminidase Inhibitors: A Retrospective Analysis

Wakako Shinahara<sup>1</sup>, Etsuhisa Takahashi<sup>1</sup>, Takako Sawabuchi<sup>1</sup>, Masaru Arai<sup>2</sup>, Nobuo Hirotsu<sup>3</sup>, Yoshio Takasaki<sup>4</sup>, Shizuo Shindo<sup>5</sup>, Kyoko Shibao<sup>6</sup>, Takashi Yokoyama<sup>7</sup>, Kiyoshi Nishikawa<sup>8</sup>, Masahiro Mino<sup>9</sup>, Minako Iwaya<sup>10</sup>, Yuji Yamashita<sup>11</sup>, Satoshi Suzuki<sup>12</sup>, Dai Mizuno<sup>1</sup>, Hiroshi Kido<sup>1\*</sup>

**1** Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima, Japan, **2** Arai Clinic, Chichibu, Japan, **3** Hirotsu Clinic, Kawasaki, Japan, **4** Takasaki Children's Clinic, Fukuoka, Japan, **5** Shindo Children's Clinic, Fukuoka, Japan, **6** Shibao Clinic, Fukuoka, Japan, **7** Yokoyama Children's Clinic, Kasuga, Japan, **8** Nishikawa Clinic, Zentsuji, Japan, **9** Mino Children's Clinic, Kannonji, Japan, **10** Iwaya Children's Clinic, Fukuoka, Japan, **11** Yamashita Children's Clinic, Maebaru, Japan, **12** Nagoya City Jouhoku Hospital, Nagoya, Japan

## Abstract

**Background/Aims:** Treatment with antiviral neuraminidase inhibitors suppresses influenza viral replication and antigen production, resulting in marked attenuation of mucosal immunity and mild suppression of systemic immunity in mice. This study investigated the effects of immunomodulator clarithromycin (CAM) supplementation on mucosal and systemic immunity in pediatric patients with influenza treated with neuraminidase inhibitors.

**Methods:** A retrospective, non-randomized case series study was conducted among five treatment groups of 195 children aged  $5.9 \pm 3.3$  years infected with influenza A in 2008/2009 season. The five treatment groups were oseltamivir (OSV), zanamivir (ZNV), OSV+CAM, ZNV+CAM and untreated groups. Anti-viral secretory IgA (S-IgA) levels in nasal washes and IgG levels in sera were measured. The re-infection rate was analyzed among the same five treatment groups in the 2009/2010 season.

**Results:** Treatment of influenza with OSV and ZNV for 5 days attenuated the induction of anti-viral S-IgA in nasal washes and anti-viral IgG in serum, compared with the untreated group. The combination of CAM plus OSV or ZNV boosted and restored the production of mucosal S-IgA and systemic IgG. The re-infection rates in the subsequent season were significantly higher in the OSV and ZNV groups than the untreated, while CAM+OSV and CAM+ZNV tended to reduce such rate.

**Conclusions:** CAM restored the attenuated anti-viral mucosal and systemic immunity and reduced the re-infection rate in the subsequent year in pediatric patients with influenza treated with OSV and ZNV.

**Citation:** Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, Arai M, Hirotsu N, et al. (2013) Immunomodulator Clarithromycin Enhances Mucosal and Systemic Immune Responses and Reduces Re-Infection Rate in Pediatric Patients with Influenza Treated with Antiviral Neuraminidase Inhibitors: A Retrospective Analysis. PLoS ONE 8(7): e70060. doi:10.1371/journal.pone.0070060

**Editor:** Dennis W. Metzger, Albany Medical College, United States of America

**Received:** February 17, 2013; **Accepted:** June 17, 2013; **Published:** July 17, 2013

**Copyright:** © 2013 Shinahara et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported in part by a Grant in-Aid (21249061), the Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology of Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and SENTAN Japan Science and Technology Agency. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: kido@ier.tokushima-u.ac.jp.

## Introduction

Influenza is a worldwide public health problem, particularly with emerging new strains to which vaccines are ineffective, limited, or unavailable. The antiviral neuraminidase inhibitors oseltamivir (OSV) and zanamivir (ZNV) are important treatment options for seasonal influenza infections [1,2], and are being stockpiled in many countries as part of their pandemic response

planning. These inhibitors impair the release of new influenza virions from infected cells by blocking the actions of viral neuraminidases [2], resulting in effective suppression of viral RNA replication and viral antigen production. In contrast to the therapeutic effects of OSV, we reported recently that OSV significantly suppressed the production of mucosal antigen (Ag)-specific secretory IgA (S-IgA) antibody and Ag-specific IgA-forming cells in the mouse airway, probably due to the suppressed

viral antigen production, but it did not seriously suppress the production of systemic anti-viral IgG and IgG-forming cells in the spleen [3].

In order to prevent complications and aggravation of the flu symptoms, it is not uncommon, in Japan, to prescribe clarithromycin (CAM) developed by modification of erythromycin [4], an immunomodulator macrolide antibiotic [5–8] with antiviral activities [9,10], in combination with OSV or ZNV. In this regard, we previously reported that administration of CAM in influenza A virus (IAV)-infected mice suppressed tumor necrosis factor alpha production and augmented interleukin-12 production in the blood [11,12], resulting in alleviation of the flu symptoms, while oral treatment with OSV attenuated the induction of respiratory anti-IAV specific secretory IgA (S-IgA) immune responses [3]. Furthermore, we have verified in IAV-infected children that oral CAM augments the nasopharyngeal mucosal immune responses, while OSV suppresses the production of mucosal anti-IAV S-IgA [13]. Of interest, we have also reported that 75% of patients treated with the combination of CAM and OSV show increases in S-IgA production to levels similar to those seen in patients treated with CAM alone and untreated patients. In addition, we recently determined the molecular mechanisms responsible for the enhanced induction of mucosal IgA class switching recombination in CAM-treated mice [14]. The obtained data indicated that CAM significantly enhances the expression levels of B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) molecule on mucosal dendritic cells as well as those of activation-induced cytidine deaminase and  $\text{I}\mu\text{-C}\alpha$  transcripts on B cells [14]. The results indicated that CAM enhances S-IgA production through the induction of IgA class switching recombination in IAV-infected mice.

In previous clinical studies [13] on the immunomodulatory and boost effects of CAM on the nasopharyngeal mucosal immune response in pediatric patients with influenza treated with OSV, several questions remain to be answered: (i) Do antiviral neuraminidase inhibitors other than OSV, such as ZNV, an orally inhaled powder, also suppress the adaptive respiratory S-IgA response? (ii) Do the antiviral neuraminidase inhibitors also affect serum IgG responses in pediatric influenza? (iii) Do antiviral neuraminidase inhibitors, with and without CAM, affect the rate of future influenza virus re-infection? The present retrospective and non-randomized case series study was conducted to provide answers to these questions in 195 children infected with IAV. We report here that treatment with ZNV suppressed airway mucosal immunity and systemic immunity in pediatric influenza in a manner similar to OSV. The addition of CAM induced a mild boost and tended to restore the suppressed mucosal anti-viral S-IgA response in the OSV- and ZNV-treated patients, and also boosted serum IgG response, with a significant improvement in anti-IAV-specific IgG production in the ZNV-treated group. In addition, CAM tended to decrease, albeit insignificantly, the re-infection frequency in the OSV- and ZNV-treated groups.

## Methods

### Ethics Statement

After explanation of the purpose of this clinical study, written informed consent was obtained from each parent of pediatric patients for enrollment in the study and for the use of stored nasopharyngeal aspirates and blood for quantitative analyses of anti-IAV antibodies. Permission to perform clinical studies and ethical approval of the study protocol were granted by the Ethics Committee of Tokushima University Hospital (Permit Number, #463). The study was conducted under the supervision of the

pediatricians involved (MA, NH, YT, SS, KS, TY, KN, MM, MI, YY and SS), and parents were advised of risks, benefits and the right to withdraw their children from further involvement in the study at any point without repercussions. All data, particularly patient identification data, were physically and electronically secured throughout the study.

### Study population

The study subjects were 195 children (age,  $5.9\pm 3.3$  years, mean  $\pm$  SD, range, 0–14 years), who were infected with IAV between October 2008 through March 2009 in 11 Pediatric Clinics and Children's Hospitals in the mid-west region of Japan. A descriptive survey study on re-infection was conducted for the same children from October through March of 2009/2010. The inclusion criteria were the followings: patients who presented to the Pediatric Clinics and Children's Hospitals and diagnosed with the rapid diagnosis Espline Influenza A&B-N kit (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan) and whose treatment was initiated within 48 hours of the onset of fever. Patients with congenital defects and those with co-morbid chronic diseases were excluded. Since the number of Japanese infected with influenza B in the 2008/2009 season was not large [15], and the antigen of influenza B/Victoria lineage prevailing in the season was not commercially available for the analysis of antibody titers, statistical analysis was conducted only on data of patients who presented with IAV.

### Treatment regimens

Patients diagnosed with IAV infection were divided into five groups according to the prescription of each pediatrician involved: the no-treatment group ( $n=68$ ), the OSV group (70 patients treated orally twice daily with OSV at 2 mg/kg body weight for 5 days), OSV+CAM group (20 patients treated orally twice daily with OSV at 2 mg/kg body weight for 5 days plus oral CAM at 5.0–7.5 mg/kg body weight for 5 days), the ZNV group (27 patients older than 4 years treated twice daily with orally inhaled ZNV powder at 10 mg for 5 days) and ZNV+CAM group (10 patients treated twice daily with orally inhaled ZNV powder at 10 mg for 5 days plus oral CAM at 5.0–7.5 mg/kg body weight for 5 days). There were no outbreaks of *Mycoplasma* or *Chlamydia* at the time of the study. All patients were followed for 5 days.

### Collection of biological samples

All children suspected clinically to have influenza underwent both nasopharyngeal aspiration and serum collection. Nasopharyngeal aspiration was conducted on each nostril for 1 minute, through a silicon tube, and the aspirate collected in a centrifuge tube connected to an evacuator, as described previously [16,17]. The isolated specimens were immediately cooled on ice, homogenized by sonification for 20 seconds on ice, in a model 250, 20% duty, 2-cycle Sonifier<sup>®</sup> (Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT), and the insoluble materials were removed by centrifugation at  $2000\times g$  for 5 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatants of nasopharyngeal specimens and serum were stored at  $-30^{\circ}\text{C}$  until use.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The concentrations of total IgA, IgG and anti-IAV-specific S-IgA in nasopharyngeal specimens and anti-IAV-specific IgG in sera were measured by ELISA, as described previously [13,17]. For measurement of anti-IAV-specific antibody, the prevalent IAV strains were selected as coating ELISA antigens: In the 2008/2009 flu season before May 2009, IAV/Brisbane/59/2007(H1N1)-like and IAV/Uruguay/716/2007(H3N2)-like subtypes were prevalent in Japan [15]. Since the affinity purified human anti-IAV-specific