

分担研究報告書

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証」

分担研究報告書

脳症発症と 酸化障害の関連性に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部小児科学 教授）
研究協力者 長谷川有紀（島根大学医学部小児科学 助教）
小林弘典（島根大学医学部小児科学 助教）
山田健治（島根大学医学部小児科 医科医員）
高橋知男（島根大学医学部小児科学 大学院生）
坊 亮輔（島根大学医学部小児科 医科医員）

研究要旨

インフルエンザの重症化（または急性脳症）に、後天的因子による 酸化障害が関与するという仮説のもとに、培養細胞とタンデムマスを用いて 酸化能を評価する *in vitro* probe (IVP) assay で種々の要因を検討した。その結果、以下の成果が得られた。

環境温度は 酸化に影響を与える、すなわち高温下では長鎖脂肪酸の 酸化障害が増強し、低温下では 酸化障害を緩和する可能性がある。解熱剤の一部（本研究ではサリチル酸とジクロフェナク）は 酸化を抑制して急性脳症への発展のリスクを高める。一方アセトアミノフェンは 酸化に影響を与えない。これまで知られてきた臨床疫学的な現象を裏付ける。食中毒を引き起こすセレウス菌の毒素セレウリドは 酸化を抑制し、酸化異常症のような発症形態をとる可能性が示唆された。これらを踏まえて急性脳症発症の予防、或いは軽減のための戦略を考える必要がある。

A．研究目的

小児期にはインフルエンザ脳症や急性脳症のように発熱を契機に急速に重篤化する疾患がある。このような病態に陥ると死亡したり、後遺症を残すことが少なくない。一方、先天性脂肪酸 酸化異常症（酸化異常症）も、正常と変わらぬ生活をしてきた小児が、感染などを契機に急激に悪化して急性脳症、乳幼児突然死様の経過をとることがよく知られている。インフルエンザ脳症等と発症形

態において類似点がある。そこで、ヒト培養細胞を用いて 酸化能を評価する *in vitro* probe (IVP) assay を用いて、培養細胞の温度条件、解熱剤の種類、および食中毒毒素と 酸化能の関連性について検討した。

B．方法

1) *in vitro* probe (IVP) assay による酸化能評価
培養細胞の 酸化能を評価するために *in*

in vitro probe (IVP) assay を用いた。IVP assay では、培養皮膚線維芽細胞を特殊なメディウム（ブドウ糖、遊離脂肪酸欠乏かつカルニチン過剰）で培養し、酸化を亢進させた状態で、パルミチン酸などの脂肪酸を添加してメ

ディウム中に分泌されるアシルカルニチンをタンデムマスで測定した。これにより培養細胞の酸化能、および障害部位を評価した。アシルカルニチンはタンデムマスによって測定した。その原理を図1に示す。

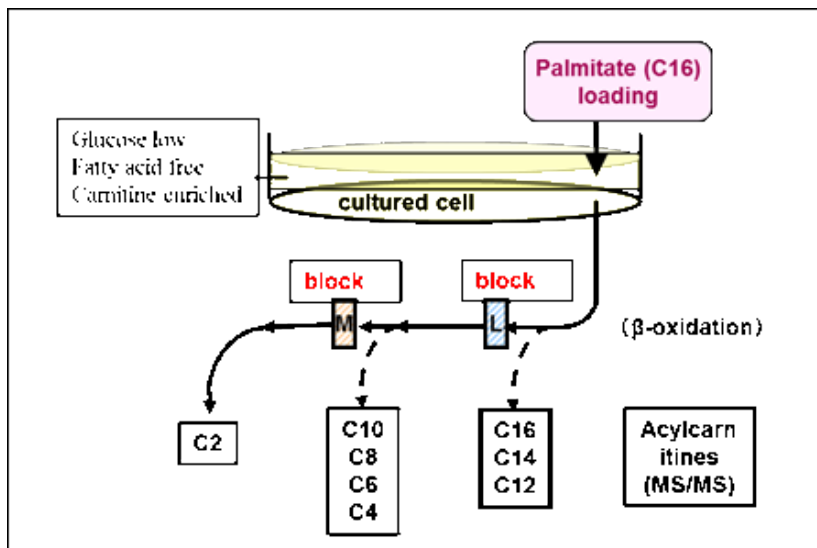


図1 . In vitro probe assay の原理

M、L=それぞれ中鎖と長鎖脂肪酸をさす。中鎖酸化(M)が障害されると、中鎖アシルカルニチン(C4、C6、C8、C10)が増加する。長鎖脂肪酸酸化(L)が障害されると長鎖アシルカルニチン(C12、C14、C16)が増加する。アシルカルニチンはタンデムマス(MS/MS)によって測定する。

2) 環境温度の影響

培養環境を、高温下(41)と低温下(33)および37環境下で培養してIVP assayを行った。正常および酸化異常症の細胞における酸化能の変化を検討した。

3) 解熱剤による酸化への影響

小児の感染症ではライ症候群等の危険性のために使用されなくなっている解熱剤がある。解熱剤の酸化系に対する影響を調べるために、正常細胞を用いてサリチル酸(アスピリン代謝産物)5mM、ジクロフェナク0.3mM、およびアセトアミノフェン7.5mMの存在下でIVP assayを行った。

4) 食中毒セレウス菌のセレウリド毒素による酸化への影響

症例：前日作り保存していたチャーハンを温めなおして食べた30分後から、食べた家族が激しい嘔吐が始まった。この家族の臨床経過を表1に示している(Shiota S, et al: Pediatrics, 2010;25:e951-e955)。

症例1：弟(1才)は、激しい嘔吐が始まり、ぐったりして、けいれん意識障害に陥り、高カリウム血症、低血糖、肝機能障害をきたして6時間後に死亡した(突然死)。

症例2：姉(2才)は、発熱、おう吐、意識障害に陥ったが、血漿交換によって救命し

て、1週間後に退院した。急性期の検査所見は、低血糖と高アンモニア血症がみられた。

ったが、輸液のみで翌日には回復して退院した。

症例3:母親(26才)は激しい嘔吐が始ま

表1. セレウス菌食中毒のを起こした一家族のプロフィール

症例	家族	症状	検査所見	転帰
1	弟 (1才)	嘔吐 ぐったり 急性脳症	高カリウム血症 低血糖 肝機能障害	6時間後 死亡
2	姉 (2才)	発熱 嘔吐 意識障害	低血糖 高アンモニア	輸液 血漿交換 1週間後退院
3	母親 (26才)	激しい嘔吐		翌朝回復

Shiota S, et al: Pediatrics, 2010;25:e951-e955

C. 結果

1) IVP assay による 酸化能評価の有効性の確認

IVP assay によって正常コントロールと種々の 酸化異常症の細胞をテストした。結果を図2に示す。正常コントロール(図2A)ではC2(アセチルカルニチン)のみが有意なピークとして観察された。MCAD 欠損症(図

2B)では、C4、C6、C8、およびC10(短鎖・中鎖のアシルカルニチン)の増加がみられた。VLCAD 欠損症(図2C)では、C12、C14、およびC16(長鎖アシルカルニチン)の増加がみられた。CPT2 欠損症(図2D)では、長鎖アシルカルニチン(C16)のみが増加していた。以上のように、IVP assay によって 酸化の障害の有無、障害部位が評価できることを確認した。

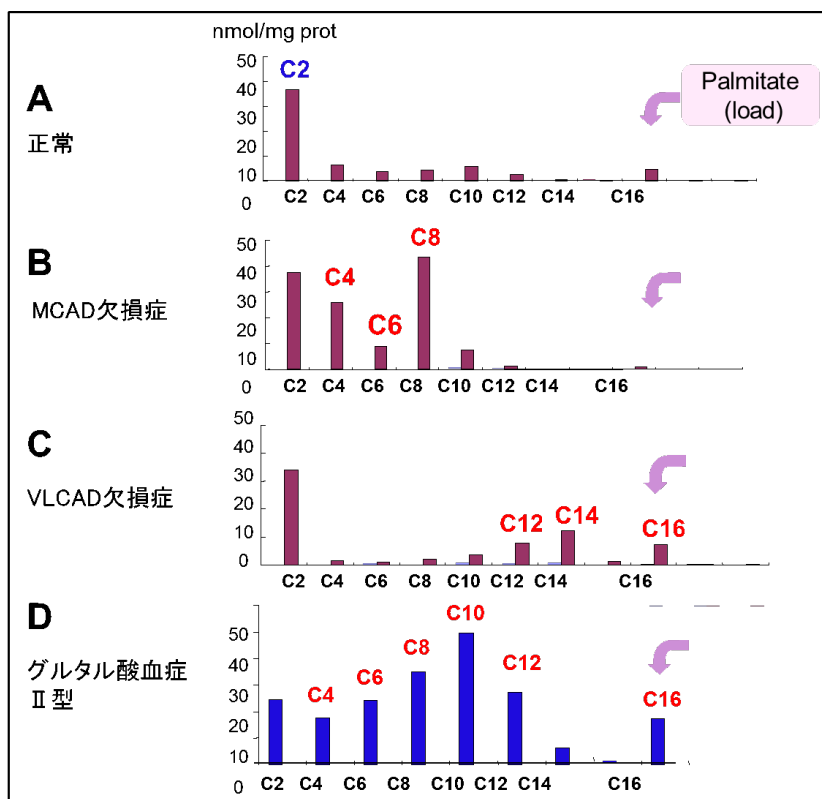


図2 . IVP assay による 酸化能評価の有効性の確認

縦軸はアシルカルニチン (nmol / mL) 横軸はアシルカルニチンの炭素鎖長を示す。

略字 : MCAD = 中鎖アシル - CoA 脱水素酵素 ; VLCAD = 極長鎖アシル - CoA 脱水素酵素 ;

CPT2 = カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ- ; GA2 = グルタル酸血症 型。

2) 培養環境の温度による 酸化能の変化

33 (低温下)、37、および 41 (高温下)の環境下で細胞を培養して IVP assay を行った。その結果、図3に示すように、VLCAD 欠損症では、41 (高温下)で、C12、C14、C16のアシルカルニチンが増加した。一方33 では、C14、C16は低下した。

広範囲の酸化障害の起こる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)では、長鎖を含む

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も長鎖脂肪酸の酸化は高温下ではむしろ悪化した。GA21においては中鎖短鎖の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酸化障害は悪化し、低温下ではすべての鎖長の酸化障害が緩和すると推測された。

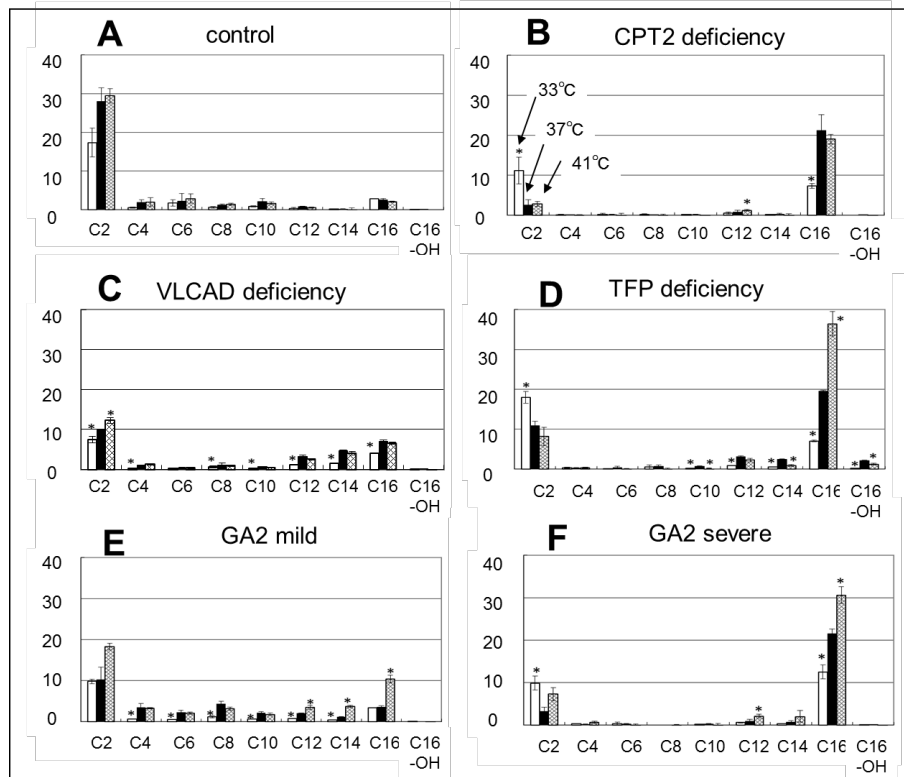


図3. 温度環境による 酸化能の変化 (IVP assay)

33、37、および41 で培養した。略字は図2と同じ。TFP = ミトコンドリア三頭酵素。

3) 解熱剤の 酸化能への影響

IVP assay の実験系では図4に示すように、サリチル酸とジクロフェナクを添加した時、中鎖～長鎖のアシルカルニチン (C6～C12) の増加が認められた。この結果は、サリチル

酸とジクロフェナクは 酸化を障害する可能性があることを示した。一方、安全とされているアセトアミノフェンでは 酸化への影響はなく、経験的な情報を裏付ける結果を示した。

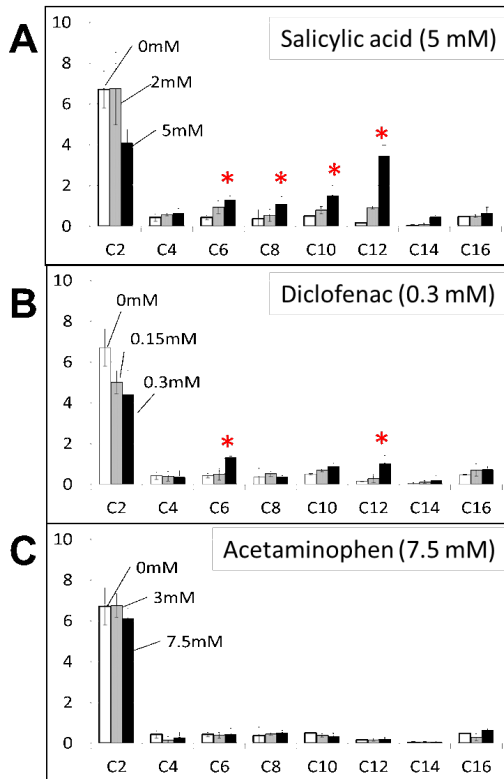


図4. 解熱剤の 酸化能への影響

A=サリチル酸 ; B=ジクロフェナク ; C=アセトアミノフェン。*印のアシルカルニチンは有意に増加したことを示す。

4) セレウリド存在下における 酸化能の変化

正常細胞を用いて、セレウリドを添加 (100 ng/mL と 50 ng/mL) して IVP assay を

行った。図5に示すように、セレウリド存在下では、C2が減少し、C16の増加が顕著であった。このことはセレウリドが長鎖脂肪酸の酸化を抑制することを示唆した。

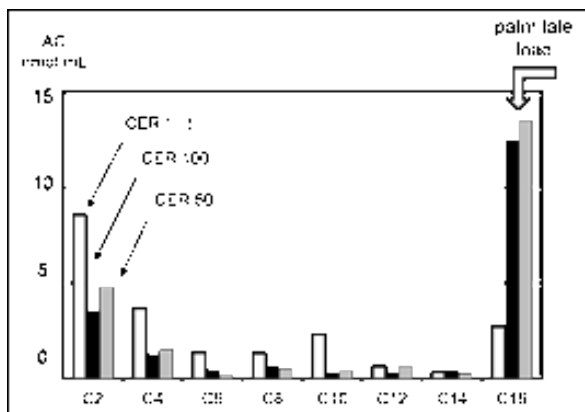


図5. セレウリドの 酸化への影響

セレウリドの濃度 50ng/mL と 100ng/mL でテストした。

D . 考察

それまで正常と変わらぬ生活をしていた小児が発熱を契機に電撃的に発症し、急性経過をとる点でインフルエンザ脳症と先天性酸化異常症の発症形態に類似点がある。前年度に引き続いて、培養細胞を用いる IVP assay の手法によって、培養環境の酸化への影響を調べた。

環境温度は酸化に影響を与えることが分かった。すなわち高温下では長鎖脂肪酸の酸化障害が増強する；高温下では全体として酸化そのものは促進される；低温下では長鎖酸化障害は緩和される；低温下では一部はアセチル-CoA 産生が改善するが、他方では長鎖も短鎖も酸化自体が抑制されることもある

解熱剤の一部が小児でライ症候群のリスクがあることは知られていた。本研究によって、アスピリン（代謝産物のサリチル酸）とジクロフェナクは酸化を抑制する傾向があり、アセトアミノフェンは酸化に影響を与えないことが観察された。これは疫学的情報と一致する。

セレウス菌による急性食中毒で突然死した小児例の報告があるが、セレウス菌の毒素セレウリドは酸化障害を引き起こし、急性脳症の原因になることが推定された。そのパターンは、CPT2 欠損症またはグルタル酸血症型のパターンに類似していた。すなわち細菌毒素が酸化に影響を及ぼす危険性を示す。

本年度の研究成果によって、小児の後天的要因に基づくインフルエンザ脳症などの急性脳症が、発熱ストレスや解熱剤、或いは細菌毒素による酸化障害を介して発症する可能性を示した。これらの事実をふまえた対策によって急性脳症の予防、重篤化予防に役

立つ可能性がある。

E . 結論

インフルエンザ脳症など小児の急性脳症発症に、後天的要因による酸化障害が関与をしている可能性があることが明らかになった。一方低温下では酸化障害が緩和される可能性がある。また一部の解熱剤は小児に対して急性脳症（またはライ症候群）を引き起こす可能性のあることが示された。

F . 研究発表

1. 発表論文

- 1) Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N: Mutations in HADHB, which encodes the β -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *American Journal of Medical Genetics A* 164(5): 1180-1187, 2014 (May)
- 2) Yasuno T, Osafune K, Sakurai H, Asaka I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H: Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448(2): 175-181, 2014 (May)
- 3) Shioya A, Takuma H, Yamaguchi S, Ishii A, Hiroki M, Fukuda T, Sugiee H, Shigematsu Y, Tamaoka A: Amelioration of

- acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Journal of The Neurological Sciences* 346(1-2): 350-352, 2014 (November)
- 4) Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyoe P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain and Development*, in press
 - 5) Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto YI: ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome. *Human Mutation*, in press
 - 6) Kobayashi T, Minami S, Mitani A, Tanizaki Y, Booka M, Okutani T, Yamaguchi S, Ino K: Acute fatty liver of pregnancy associated with fetal mitochondrial trifunctional protein deficiency. *J Obstet Gynaecol Res*, in press (November)
 - 7) 山口清次, 長谷川有紀: 小児栄養性ビタミン欠乏症の有機酸分析による診断- ビタミン B1 欠乏症、ビタミン B12 欠乏症、ビオチン欠乏症. *小児科臨床* 67(5): 787-794, 2014 (5月)
 - 8) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの社会的意義と課題. *公衆衛生情報* 44(3): 5-8, 2014 (6月)
 - 9) 山口清次: ミトコンドリア脂肪酸酸化異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第2版) -その他の神経疾患を含めて- - 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p627-631, 2014 (6月, 883)
 - 10) 山口清次: 有機酸代謝異常. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第2版) -その他の神経疾患を含めて- - 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p622-626, 2014 (6月, 883)
 - 11) 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.31 神経症候群 (第2版) -その他の神経疾患を含めて- - てんかん症候群 全般てんかんおよび症候群 症候性 特異症候群 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p205-211, 2014 (12月)
- ## 2. 学会発表
- 1) Yamaguchi S: Organic Acidaemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014
 - 2) Yamaguchi S: Pediatric emergency and inborn metabolic disease. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014
 - 3) Yamaguchi S: Current topics in mass screening and collaboration studies with Asian countries. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014
 - 4) Yamaguchi S, Liu L, Furui M, Yamada K, Taketani T, Shibata N,

Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S:
Improvement of fatty acid oxidation
capacity of cells from fatty acid
oxidation defects at low temperature:
evaluation by in vitro probe assay.
Annual Symposium of the Society for
the Study of Inborn Errors of
Metabolism. Innsbruck, Austria,
September 2014

- 5) Vatanavicharn N, Taketani T,
Nabangchang C, Yamaguchi S:
Isolated sulfite oxidase deficiency: A
rare metabolic disorder with
neuroimaging mimicking perinatal
asphyxia. 第56回日本先天代謝異常学
会. 仙台, 11 2014
- 6) 長谷川有紀, 古居みどり, 小林弘典, 山
田健治, 高橋知男, 竹谷 健, 山口清
次: ミトコンドリア三頭酵素 (TFP) 欠
損症の出生前診断 5 症例の経験. 第 11
回中国四国出生前医学研究会. 岡山,
2014 年 2 月
- 7) 長谷川有紀, 小林弘典, 山田健治, 高橋
知男, 新井真理, 室谷浩二, 山口清次:
尿中有機酸分析によりトルエン中毒が
疑われた 5 ヶ月男児例: 虐待の疑いの
ある ALTE 症例. 第 20 回日本 SIDS・
乳幼児突然死予防学会. さいたま市,
2014 年 3 月
- 8) 坊 亮輔, 山田健治, 小林弘典, 長谷川
有紀, 山口清次: 管理に難渋している
CPT-2 欠損症の 4 か月女児例. 第 93 回
山陰小児科学会. 米子, 2014 年 9 月
- 9) 高橋知男, 坊亮輔, 山田健治, 小林弘典,
長谷川有紀, 山口清次: 解熱剤の脂肪
酸 酸化に対する影響: サリチル酸、
ジクロフェナクナトリウム、アセトア
ミノフェンの評価. 第 56 回日本先天代

謝異常学会. 仙台, 2014 年 11 月

- 10) 山田憲一郎, 内木美紗子, 星野伸, 北浦
靖之, 近藤雄介, 下澤伸行, 山口清次,
下村吉治, 三浦清邦, 若松延昭:
HIBCH 欠損症の同定と変異タンパク
質の生化学的解析. 第 56 回日本先天代
謝異常学会. 仙台, 2014 年 11 月

G. 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

