

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

**重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に  
関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証**

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木戸 博

平成27(2015)年 3月

# 目 次

## I . 総括研究報告

- 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証 ----- 5  
木戸 博

## II . 分担研究報告

1. 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：重症化発症機序と早期診断マーカー、Flu Alarminの検索 ----- 29  
木戸 博
2. インフルエンザの重症化とサイトカイン、特にインターフェロン産生の機序解明に関する研究 ----- 39  
林 日出喜
3. 急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序 ----- 45  
高橋 悦久
4. 急性脳症の病態：急性脳症とミトコンドリア病の急性期病態の類似性について ----- 53  
久保田 雅也
5. ICU入室患者における末梢血アデノシン三リン酸(ATP)と転帰との関係に関する研究 ----- 61  
西村 匡司
6. 新型インフルエンザ肺炎・脳症の診断・治療法開発研究 ----- 69  
佐々木 信一
7. 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：検体収集とインフルエンザ重症化バイオマーカーの検索 ----- 79

西村 秀一		
8 . 脳症発症とβ酸化障害の関連性に関する研究	-----	85
山口 清次		
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	95
IV . 研究成果の刊行物・別刷（主なもの）	-----	105

## 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）

### （総括）研究報告書

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：

新規診断・治療に関する提案と検証

研究代表者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター・特任教授

#### 研究要旨

インフルエンザ重症化(肺炎、脳症)発症機序の解明、重症化を早期に診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索、重症化治療薬の検索、の3課題について昨年に続いて解析が行われ、大きな進展があった。中でもインフルエンザの重症化機序については、これまでの機序に加えて新たに多臓器不全の原因となる血管内皮細胞の Adherens junction の崩壊が GSK-3 $\beta$ の活性化が鍵になって発症することを発見して、新たな創薬ターゲット分子を提唱した。これまで提唱してきた「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ (Trypsin, MMP-9)」サイクルに共役する「体内代謝障害 サイトカイン」サイクルでの治療標的酵素に GSK-3 $\beta$ が加わることで、重症化阻止の戦略が充実された。各項目の進展を具体的に示す。

1)重症化機序:インフルエンザウイルスの体内増殖は、「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルによるが、このサイクルのサイトカインを介して「体内代謝障害 サイトカイン」サイクルが共役した時に重症化が発症することを確認した。体内代謝障害の中でも、生命活動に直結しているエネルギー代謝(糖代謝と脂質代謝)が重要で、中でも Pyruvate Dehydrogenase と Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) がサイトカインと密接に関係している。PDK4 がサイトカインストーム治療薬の創薬ターゲット分子として注目される。さらに「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクルの中で、感染で増加する Trypsinogen と共に、Enterokinase (EK: EK-v1, EK-v2) も増加して、速やかに活性型 Trypsin に変換していることが確認された。また、血管内皮細胞の Adherens junction の崩壊機序の解析では、インフルエンザ感染後極めて早期の感染2日目から GSK-3 $\beta$ の活性化による $\beta$ -Catenin の分解が観察されることから、早期の脳浮腫、多臓器不全の発症機序に大きく関与していることが推定された。糖代謝の改善薬に関しては、PDK4 阻害剤のスクリーニングが開始され、有望な新規化合物が同定され、特許申請がなされた。

2)インフルエンザ感染重症化に伴う Flu Alarmin として、これまで血液中に各種サイトカイン、Trypsin、MMP-9、等が検討されたが、最も重症化を的確に示す指標として、乳酸/ATP 比に絞り込まれてきた。ICU 入室した感染症重症患者の予後予測因子、さらに重症患者の経過を的確に捉えるスコアとしての有用性が確認された。インフルエンザ脳症を代表とする急性脳症では、乳酸/ATP 比が熱性痙攣重責症例に比較して有意



に増加して、鑑別診断に有用であることを明らかにした。従来インフルエンザ脳症のリスク因子として、熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) 遺伝子多型を見出してきた。この疾患が当初日本人種に特徴的と言われてきたが、熱不安定性 CPT II 遺伝子多型が東アジア人種に特徴的と推定されたことから、大規模な遺伝子と脳症の発症調査が中国で実施され、この事実が確認され、国際的に注目されている。インフルエンザ脳症の場合、後天性の CPT II 欠損症と PDC の活性低下が重なった結果、重篤なエネルギー危機状態であることが判明した。

3)重症化治療薬の検索では、PDK4 が重症化の創薬ターゲット分子であることを発見したことからさらなる検証が行われ、PDK4 阻害剤がサイトカインストームの治療薬、ウイルス増殖抑制剤として使用できることが示唆された。熱不安定性 CPT II 遺伝子多型を持つインフルエンザ脳症の治療薬として PPAR を介して CPT II の転写を促進する Bezafibrate を提唱していたが、患者の繊維芽細胞を用いた詳細な解析から、高熱下に低下した  $\beta$  酸化を回復させることを明らかにした。また、これまで解熱作用の強い Aspirin、ジクロフェナック、メフェナム酸がライ症候群を引き起こすとして、小児での使用が禁忌とされていたが、本年度の研究で、これらの薬剤が脂肪酸の  $\beta$  酸化を阻害して ATP 産生を抑制することを、脂肪酸の中間代謝産物を解析することで明らかにした。

## 重症化治療の**新展開**: 予防と治療の具体的提案

薬剤	主な作用	重症化: 代謝破綻・ATPクライシス/ 血管透過性亢進/細胞結合崩壊等
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>アプロチニン</b> (牛肺由来: BAYER) トリプシン阻害</li> </ul>		<p> <b>重症化: 代謝破綻・ATPクライシス/ 血管透過性亢進/細胞結合崩壊等</b> </p> <p>           ウイルス            プロテアーゼ            サイトカイン            プロテアーゼ         </p> <p>           PDK4 ↑            ↓  <b>糖代謝抑制 / ATPクライシス</b>  <b>脂肪酸代謝抑制</b> </p> <p>           代謝破綻 サイトカイン         </p> <p>           ・血管内皮細胞障害            ・多臓器不全            ・熱による後天性 CPTII欠損症状態 (エネルギー代謝不全)         </p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ジクロロ酢酸 ジイソプロピルアミン (DADA)</b> PDK4阻害 (サイトカインストームの治療薬) <b>Vit B15</b></li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ベザフィブレート</b> CPT II 転写促進</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 70%炭水化物/中鎖脂肪酸ミルク</li> <li>• 解熱 (一部解熱剤は不可)</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>クラリスロマイシン</b> MMP-9発現抑制</li> </ul>		
<b>重症化の早期診断: Flu Alarmin: Lactate/ATP ratio</b>		

## 研究分担者

- ・木戸博：徳島大学疾患酵素学研究センター・生体防御・感染症病態代謝研究部門・特任教授
- ・林日出喜：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染防因子解析学分野・準教授
- ・高橋悦久：徳島大学疾患酵素学研究センター・生体防御・感染症病態代謝研究部門・特任助教
- ・西村匡司：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部救急集中治療医学分野・教授
- ・久保田雅也：国立成育医療研究センター神経内科・医長
- ・佐々木信一：順天堂大学医学部附属浦安病院呼吸器内科・準教授
- ・山口清次：島根大学医学部小児科学・教授
- ・西村秀一：国立病院機構仙台医療センター・臨床研究部ウイルス疾患研究室長

## A. 研究目的

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症・心筋炎の主要な病因は、血管内皮細胞障害による透過性亢進である。これまでのインフルエンザ感染の治療は、感染による臨床症状が出てから4日以内に抗インフルエンザ薬を5日間投与することだけで、感染後4日を過ぎた患者には対症療法だけであった。そのため感染後4日を過ぎた頃から始まる感染重症化への対策、サイトカインストームへの対策は、これまで有効な治療法の提案がされていなかった。国際的な研究開発状況においても、インフルエンザの増殖を抑制する抗インフルエンザ薬の開発に企業は凌ぎを削っているが、重症化への対策、サイトカインストームへの対策に

関しては、その発症機序の解析が不十分なことからほとんど実施されていないと言っても過言ではない。このような現状から、本研究では重症化に発展する可能性をいち早く捉えて対処できるバイオマーカー、Flu Alarmin の検索を実施すると同時に、重症化の発症機序の解明に根差した有効な治療法の開発、サイトカインストームの治療法の開発、血管内皮細胞の透過性亢進の抑制剤の開発、これらの研究目的の解決を目指した研究を推進する。なお研究推進の基盤となるこれまでの成果に、重症化の機序とウイルス増殖機序を世界に先駆けて解明した「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ」サイクル説 (*J Infect Dis* 202:991, 2010、*Cardiovasc Res* 89:596, 2011) を発表しており、これを基盤に重症化機序とその治療法、Flu Alarmin 検索を進める。具体的には下記の3課題に絞った研究を進める。

- 1) インフルエンザ重症化(肺炎、脳症)発症機序の解明
- 2) 早期に重症化診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索
- 3) 重症化治療薬の検索

## B. 研究方法

1. 【重症化モデル動物実験による“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルの検証、重症化の発症機序の解析、Flu Alarmin 検索、治療薬の検証】  
マウスの重症化モデル動物実験では、重症化しやすい離乳直後の3週齢マウス (C57BL/6CrSlcまたは、BALB/c) 雌を用いて実験した。インフルエンザウイルス株では感染重症化しやすい InfluenzaA/PR/8/34(H1N1)株を用いた。
2. 【培養細胞実験系による“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイク

ルの検証】

1) ヒトの培養細胞から mRNA を調整、cDNA に変換し、I-IV 型トリプシノーゲン (PRSS1, PRSS2, PRSS3-v2, hPRSS3-v1)、及びその活性化する酵素として知られるエンテロキナーゼ (EK)、さらに、細胞膜上に発現しこれまでに IAV-HA を切断、活性化することが知られている HAT、TMPRSS2、及び TMPRSS4 の役割を調べるため、それらの cDNAs をクローニングした。

2) ヒトのいろいろな培養細胞における I-IV 型トリプシノーゲン (PRSS1、PRSS2、PRSS3-v2、PRSS3-v1)、エンテロキナーゼ (EK-v1、v2)、及び細胞膜貫通型セリンプロテアーゼ (HAT、TMPRSS2、TMPRSS4) の発現量を Real-time PCR、及びウェスタンブロットで、調べた。

3) 293T 細胞に、EK-v1、EK-v2、hPRSS3-v2 を強制発現させた、安定細胞株 (293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3) を作成し、IAV を感染させ、一定時間後に細胞内、及び培養上清に放出された IAV の量を IAV に対する特異的抗体を用いて測定した。

4) *in vitro* において EK-v1、EK-v2 が PRSS3-v2 を切断し、そのトリプシン活性を上げるか、293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株のライセートを使い、GPR-pNA を基質としてトリプシン活性を測定した。

5) *in vitro* において EK-v1、EK-v2 により切断、活性化された PRSS3 が、TPCK 処理トリプシン放出された IAV の量を IAV-HA に対するトリプシンと同様の IAV-HA のプロセッシングを行うか、IAV を感染、増殖させた U937 細胞ライセートと 293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株のライセートを使って調べた。コントロールとして TPCK 処理トリプシン (TPCKT)、あるいは N 末端-アセチル化

トリプシン (NAT) で処理した後、IAV-HA に対する特異的抗体を使ったウェスタンで調べた。

3. 【急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序の解析実験】

1) 感染：ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に IAV (PR8) を MOI=1 で 1 時間感染させて、培地交換後 28 時間培養した。(2) C57BL/6CrSlc マウスに PR8 を 100 PFU で経鼻感染させて体重をモニターした。動物実験に関しては徳島大学の規定に基づき行った。

2) ウェスタンブロットティング：培養細胞及びマウス肺のホモジネートは RIPA バッファーで作製し使用した。

3) RT-PCR：HUVEC より RNA を抽出し、One-Step RT-PCR Kit を用いて、それぞれの遺伝子発現を検出した。

4. 【インフルエンザ脳症患者臨床検体を用いた Flu Alarmin の解析】

1) 血中乳酸 / ATP 比について：血中 ATP 測定は急性脳症急性期 20 例、熱性けいれん重積急性期 16 例、各種ミトコンドリア病 13 例に対して既報告の方法により測定が行われた。乳酸は ATP 検体採取時に最も近い時刻の値を解析に用いた。

2) 急性脳症、AESD に対する早期 3 剤 (ビタミン B1, B6, および L カルニチン) 投与：国立成育医療研究センターにおいて 2008 年 1 月から 2013 年 12 月までに感染を契機とした急性脳症として入院加療を行った症例をリストアップしたところ 6 年間で合計 82 名を数えた (図 2)。脳症の診断としては、インフルエンザ脳症ガイドラインを参考に、二相目も含め “初期症状発症 24 時間以降の意識障害の遷延を認めた” 症例とした。基礎疾患がなく、有熱時けいれんで発症し、AESD の可能性が考慮されて発症早期より当

院で対応し、結果的に急性脳症と診断された症例に限定すると(1)2008-2010年10名と(2)2011-2013年11名が該当した。この21名に関して以下を比較した。

3) 評価項目：早期ビタミンB1, B6, およびLカルニチン投与の有無(けいれん発症24時間以内から投与開始), 二相目のけいれんの有無、および画像変化(bright tree appearance, BTA)。投与量はビタミンB1 10mg/kg, ビタミンB6 20mg/kg, L-カルニチン 30-100mg/kgである。

#### 5.【ICU入室患者の臨床検体からのFlu Alarmin 解析】

集中治療部に入室した重症患者から血液を経時的に採取し、血液ガス測定装置でpH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, ヘモグロビン値とともに乳酸値を測定した。同時にATP測定用の血液をEDTA含有チューブで20で保存した。重症度評価としては集中治療部に入室24時間でのAPACHE IIスコアを計算し用いた。

#### 6.【呼吸器内科の臨床検体を用いたFlu Alarmin の検索】

患者の鼻腔もしくは咽頭ぬぐい棒検体からインフルエンザ迅速キットで検査し、インフルエンザと診断された症例を対象に、同意を得られた患者より血液もしくは肺胞洗浄液を採取し検査を施行した。ATPの測定は、和光純薬工業株式会社のATP測定キット(AMERIC-ATP Kit)を用いて、患者検体(血液・気管支肺胞洗浄液)から測定。同時に採取した検体から各種検査(アルブミン、グルコース、乳酸、LDH、尿酸、ケトン体、トリプシン、CRP、IL-6、IL-33、MMP-9、TNF-等)を測定した。具体的には、ATPは当院で患者検体からATP抽出溶液を作成し凍結保存後、SRL社に委託してルミノメーターで測定。同時に採取した血清から、他の項目もSRL社に委託し測定した。

さらに国立病院機構仙台医療センター臨床研究部が収集した検体を用いて、Toll-like Receptorの下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定を試みた。また、重症化にかかわる遺伝子候補の検索においては、脳症を含む多臓器不全の遺伝子解析をCPT2を対象としていたが、重症肺炎症例についても、インフォームドコンセントのもとCPT2検査を試みた。

#### 7.【脂質代謝異常のin vitro probe assay】

1) インフルエンザ脳症の発症機序を視野に、患者のFibroblast培養細胞の酸化能を評価するために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。

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。

(倫理面への配慮)

各実施機関毎に、倫理委員会の承認、その他倫理面での配慮の上で実施した。

## C. 結果

### 1. 【重症化モデル動物実験によるインフルエンザ感染重症化の機序の解析と治療法の検索】

マウスのインフルエンザ感染モデル実験により以下の結果を得た。①インフルエンザ感染による致死性重症化は、“サイトカイン-代謝不全”サイクルと“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ (Trypsin)”のサイクルが、サイトカインを共通の因子として連動して引き起こされる病態であると確認された。②体内代謝の中で糖代謝と脂質代謝が合流してエネルギー産生系に伝達される Acetyl-CoA の産生の係わる酵素として特に Pyruvate Dehydrogenase (PDH) 活性が重要であることが明らかとなった。そこでエネルギー代謝破綻を示すバイオマーカーとして乳酸/ATP 比が検討され、Flu Alarmin としての有用性が明らかになった。他の Flu Alarmin バイオマーカーとして、血中 Trypsin、MMP-9、サイトカイン群の検討を引き続き検討したが、これらは重症化の過程に関与する因子で、しかも様々な因子の影響下にあるため、Flu Alarmin として評価することは困難であると判定した。重症化を的確に示す Flu Alarmin はエネルギー代謝の最終産物の ATP と、貯蔵される中間代謝産物の乳酸との組み合わせが的確なバイオマーカーと判定された。③重症化の治療薬と予防薬の提案：重症化に先立つ PDH の活性低下、これを導く PDH Kinase (PDK) 4 の選択的増加が糖代謝破綻と脂質代謝破綻を導くことを見出し、安全な PDK4 阻害剤を既存薬 (Diisopropylamine dichloroacetate, DADA) に新たに見出すことに成功した。これにより、糖代謝と脂質代謝が補正されることで、サイトカイン産生量が低下して、インフルエ

ンザ-サイトカイン-プロテアーゼサイクルの回転が抑制され、生存率の改善に極めて効果的であると判明した。さらに、DADA よりも効果的な PDK4 阻害剤の検索を開始して、少なくとも数十倍強力な新規 PDK4 阻害剤を見出した。一方、インフルエンザ脳症の患者で見られる熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) の治療薬として、Bezafibrate を長鎖脂肪酸代謝酵素の転写促進因子として見出しており、その有効性をミトコンドリア機能、エネルギー代謝の改善を指標に確認した。

従来から CPT II の熱不安定性 SNP が発症リスク因子になることを見出して発表してきたが、インフルエンザ脳症が日本人に特有な疾患では無く、東アジア人種に特徴的な疾患で、その発症も CPT II の熱不安定性 SNP が原因になることを、中国人の患者を対象とした中国の研究者との共同研究で確認して論文発表を行った。

### 2. 【培養細胞実験系による“インフルエンザ-サイトカイン-プロテアーゼ”サイクルの検証】

1) ヒト培養細胞から、従来報告のあった 25 エクソンからなる EK 遺伝子 (EK-v1) に加え、26 エクソンからなる新たな EK 遺伝子アイソフォーム (EK-v2) の cDNAs をクローニングした。

2) EK の十二指腸上皮以外での発現や役割については不明な点が多かったが、Real-time PCR 法で調べたほとんどの培養細胞で EK mRNA の発現が観察されたが、HAT、TMPRSS2 及び TMPRSS4 の発現はある程度限られていた。また、PRSS1 及び PRSS3 も多くの細胞で発現がみられた。

3) EK-v1、EK-v2、PRSS3-v2 を強制発現させた 293T 安定細胞株に、IAV を感染させ、80 時間後に培養上清に放出された IAV の量

を IAV-HA に対する特異的抗体を用いて測定したところ、他の細胞に比べ、293T-EK-v2 細胞内、及び上清に放出されたウイルスを調べたところ、IAV の顕著な増殖と IAV-HA プロセッシングの更新がみられた。

4) 293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3 細胞株、及び TMPRSS2、TMPRSS4、HAT を一過性に強制発現させた 293T 細胞のライセートを使い、GPK-pNA を基質としてトリプシン活性を測定した。この *in vitro* の系で EK-v1、EK-v2 は PRSS3-v2 トリプシノーゲンを活性化したが、TMPRSS2、TMPRSS4、HAT は PRSS3 を活性化できなかった。

5) *in vitro* で U937 細胞に由来する IAV ライセートを TPCK 処理トリプシン (TPCKT)、あるいは N 末端-アセチル化トリプシン (NAT) で室温 30 分処理すると、65-kDa の IAV-HA<sub>0</sub> が消失し、代わりに 25-kDa の IAV-HA<sub>2</sub> が出現し、IAV-HA のプロセッシングが確認された。PRSS3-v2、EK-v1、EK-v2 のみでは IAV-HA のプロセッシングがみられなかったが、PRSS3-v2 により EK-v1 あるいは EK-v2 を活性化させると、トリプシン処理した場合同様に 65-kDa の IAV-HA<sub>0</sub> が消失し、代わりに 25-kDa の IAV-HA<sub>2</sub> が出現し、IAV-HA のプロセッシングが確認された。これらのことから、従来から報告されていた TMPRSS2、TMPRSS4、HAT を介した IAV-HA の活性化経路に加え、PRSS(トリプシノーゲン)の EK(エンテロキナーゼ)による活性化が、IAV-HA のプロセッシングを促進する新たな IAV の感染経路の存在が示唆された。

### 3. 【急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序の解析実験】

1) アドヘレンスジャンクションにおいて重要な分子である カテニンと VE カドヘリンの発現をウエスタンブロッティングによって検出した。その結果、カテニンの

発現は非感染コントロールと比べて 24% まで低下した。一方、VE カドヘリンの発現に有意な変化は認められなかった。また、遺伝子発現に関しては カテニンの発現に有意な差は認められていないことから、タンパク合成後にプロテアソームによる分解の可能性が示唆された。

2) IAV に感染させた HUVEC 細胞にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを添加することで、カテニンの分解が抑制され、未処理と比べて 1.8 倍まで回復した。この結果より、IAV 感染で、プロテアソームによる分解が増強されることが明らかとなった。

3) カテニンは、活性化した GSK-3 によってリン酸化されることでユビキチン化されてプロテアソームの分解を受けるが、IAV に感染することで不活性型である phospho-GSK-3 の発現が有意に低下したが全体の GSK-3 の発現には有意差は認められなかった。更に、GSK-3 をロックダウンすると カテニンの発現が回復した。これらの結果から PR8 に感染した HUVEC において、アドヘレンスジャンクションでの VE カドヘリンと カテニンの複合体形成の制御には GSK-3 が関与していることが明らかとなった。

4) マウスに PR8 を経鼻感染させた時、非感染コントロールと比べて 3 日目より体重の減少が認められた。また、NP 抗体で検出した肺のウイルス量は 2 日目から増加し始めて 3 日目にピークを迎えた。肺における カテニンは 2 日目から 6 日目まで減少が続き、それに伴い不活性型の phospho-GSK-3 の減少が認められた。

### 4. 【インフルエンザ脳症患者臨床検体を用いた Flu Alarmin の解析】

1) 乳酸 / ATP 比について：各疾患の乳酸 / ATP 比を検討した。急性脳症 20 例の急性期

( $5.65 \pm 5.55$ )は熱性けいれん重積 16 例急性期( $1.65 \pm 1.01$ )よりも有意に乳酸 / ATP 比は高値であった。また急性脳症急性期の乳酸 / ATP 比はミトコンドリア病 13 例のそれ( $5.65 \pm 5.85$ )と比較し有意差は認めなかった。

2 )AESD に対する早期 3 剤(ビタミン B1, B6, および L カルニチン)投与 : 2008-2013 年を (1)2008-2010 年と(2)2011-2013 年に分けて比較すると通常の脳症治療に加えた早期 3 剤(ビタミン B1, B6, および L カルニチン)投与により AESD の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加していることがわかった。つまり AESD の予防および軽症化に上記 3 剤投与が有効である可能性が考えられた。この 2 群に男女比や発症月齢に有意差はなかった。

#### 5 .【ICU 入室患者の臨床検体からの Flu Alarmin 解析】

これまで臨床で使用されてきた APACH II 等の重症度スコアは必ずしも患者予後を反映しない。そこで、重症患者の重症度の変化を簡便に経時的、客観的にとらえることが可能となれば、重症患者の治療効果を早期に把握することができ、予後改善にも役立つ可能性がある。本研究では ATP、乳酸 / ATP 比(A-LES, ATP-lactate energy risk score)を測定し、重症患者の予後および APACH II スコアとの関連を検討した。

その結果、平均年齢、性別、基礎疾患には死亡患者と生存患者で差はなかった。死亡患者は生存患者と比較して有意に入室 24 時間での APACHE II スコアが高いと言う結果が得られた。

#### 6 .【呼吸器内科の臨床検体を用いた Flu Alarmin の検索】

順天堂大学倫理委員会の承認 (浦倫 2 4 - 4 3 号 : 「重症のインフルエンザによる肺

炎・脳症の診断・治療に関する研究 : 新規診断・治療に関する提案と検証」)を元に、計 23 例のインフルエンザ患者等から同意を得、患者血液検体から各種 marker を測定した。検討対象は A 型インフルエンザ : 5 例、B 型インフルエンザ : 3 例、対称として各種呼吸器疾患 : 細菌性肺炎 : 4 例、間質性肺炎急性増悪 : 5 例、PCP : 1 例、CVD-IP : 2 例、過敏性肺炎 : 1 例、薬剤性肺炎 : 1 例、放射線肺炎 : 1 例で検討した。多くの症例で IL-6、MMP-9 や TNF- $\alpha$  といったサイトカインの高値が認められた。血中の乳酸を ATP の値で割った ATP-lactate energy risk score (A-LES) の値は、正常者の既報値 (< 2.00) より高値を示した。特に B 型インフルエンザ症例 2 例で著明な高値を示した (値 : 91.7、40.4)。A-LES 値と各種サイトカインの比較検討では、CRP と IL-6 で弱い相関が認められた。重症度別での検討では、重症度が高いほど、ATP 低値、A-LES 値高値の傾向が認められた。

国立病院機構仙台医療センター・臨床研究部ウイルス疾患研究室では、以下の結果が得られた。

1) 臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液の収集 : 前回の 2013-2014 年インフルエンザシーズンは、A/H1N1pdm09 亜型の再出現があり、このウイルス感染による成人の肺炎症例が全国で見られ、その中で当院に寄せられたいくつかの症例について、ペア血清ならびに急性期全血を確保し、それらについて Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定ならびに、CPT2 についての遺伝子解析のため徳島に送付できたが、本シーズンは、既往症を有する高齢者の肺炎が多く、全シーズンのような健康成人での重症肺炎例は少



ない（毎年検体を送ってくれる臨床医の印象）。そのためか、ほとんど検体の確保ができなかった。

一方、比較的高齢者でヒトパラインフルエンザ3型やヒトメタニューモウイルスやRSウイルスによる肺炎入院例は多数経験しており、それらの検体の気管支洗浄液や血清の確保はできている。

2) 病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養とその不死化の試み：

昨年度は協力研究者の山谷がつくった3人のドナー由来の、気管支上皮細胞でレンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子等の導入による不死化を何度か試みたが、結果的に成功しなかった。この不成功を受け、本年度はさらにLarge T抗原遺伝子に加えて、c-mycあるいはH-ras遺伝子の導入による不死化を試みた。しかし、また一時的には成功したかのように見えることがしばしばあったものの、最終的にはどれも培養を継続できず、現在に至るまで成功していない。

3) 外科手術材料由来の十二指腸および扁桃腺上皮細胞の初代培養と、その不死化の試み：昨年度から本年度にかけ、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養の試みを3度行い、うち2回で培養に成功し、十二指腸上皮細胞の培養法を習得した。

それらの細胞についても凍結保存をするとともに、レンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子の導入による不死化と、それらの細胞のウイルス感受性の検討を試み成功している。本年度、本細胞については、インフルエンザウイルスを含む種々のウイルスに対する感受性を検討してきたが、残念ながら未だインフルエンザを含めた特定のウイルスに対する感受性

は見出せていない。

さらに本年度開始した、扁桃腺上皮細胞の培養は、一応初代培養まで成功したが、その不死化には至らず、また継代培養しているうちに最終的に繊維芽細胞に置き替わってしまった。

4) インフルエンザウイルスに感染性を与えるセリンプロテアーゼTMPRSS2の初代ヒト気管上皮細胞における発現を、蛍光抗体法で確認した。さらに、培養上清を材料とするELISAで調べたところ、膜結合型である同酵素が、前立腺がん細胞での所見と同様、培養上清中に50 - 100ng/mlという濃度で検出された。また、同細胞に対するインフルエンザウイルス感染によってIL6が誘導され、そのIL6自体が同細胞に障害を引き起こすことを見出した。

## 7.【脂質代謝異常のin vitro probe (IVP) assay】

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。正常コントロールでは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。

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、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。

3) 解熱剤の 酸化能への影響: IVP assay の実験系では、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。

#### D. 考察

1. 【重症化モデル動物実験によるインフルエンザ感染重症化の機序の解析と治療法の検索】

インフルエンザ感染重症化機序では、発症の重要な引き金の因子としてエネルギー代謝不全があり、この代謝不全はサイトカインレベルと密にリンクして、“サイトカイン代謝不全” サイクルを形成している。さらにこのサイトカインを介して、ウイルス増殖を制御する “インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクル” に大きな影響を与えていることが確認された。本

プロジェクトにおいて、“サイトカイン代謝不全” サイクルの中核となっている PDK4 阻害剤として DADA が見いだされ、さらに強力な PDK4 阻害剤が見いだされ、その薬効が確認されている。今後、前臨床試験を実施して治験を目指す。なお、サイトカインストームの治療に PDK4 阻害剤が有効なことから、インフルエンザ以外の各種感染症の治療、さらには癌の悪液質、心不全、糖尿病治療への応用も可能と推定される。一方、インフルエンザ脳症の発症リスク因子として発見していた CPT II の熱不安定性 SNP が、日本以外に中国でも脳症のリスク因子として確認された。この遺伝子を高い頻度で保有する東アジア人種に共通なリスク因子と言える。

2. 【培養細胞実験系による “インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ” サイクルの検証】

EK が IAV 感染の成立、重症化に関わる新たなトリプシン様タンパク質分解酵素の一つと考えられた。in vitro においては EK-v1, EK-v2 とともに PRSS を活性化する酵素活性、および IAV のプロセッシング能は同程度有していたが、in vivo では EK-v2 が顕著な IAV 感染促進作用を示したことから、新たに発見した EK-v2 が、IAV 感染の成立、重症化に強く関わっている可能性がある。EK-v2 と EK-v1 の違いは 30 アミノ酸の挿入の有無だけで、その部位は細胞の外からアクセスできるため、今後、この 30 アミノ酸部位を中心に EK 分子をターゲットとして、IAV 感染の抑制ができるかどうか検討したい。

3. 【急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序の解析実験】

ノイラミニダーゼ阻害剤がインフルエンザ治療薬として一般的に使用されている。

しかし、“インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼ(トリプシン、MMP-9)”サイクルを通して起こる循環不全、低酸素血症、内皮細胞における血管透過性の亢進による重症化の治療には効果は期待できない。そこで、重症化の新たな治療法のターゲットとして血管透過性亢進機序の解明を行った。血管内皮細胞ではVEカドヘリンが発現しており、細胞間接着において

カテニンと複合体を形成することで重要な役割を果たしている。本研究では、IAV感染によりカテニンの分解が亢進されることを明らかとし、その制御がGSK-3の活性化により起こることを証明した。更にGSK-3ノックダウンによりカテニンの分解が抑制されたことからGSK-3に対して新たな阻害剤を探索することがインフルエンザ重症化の治療につながると考えられる。

#### 4.【インフルエンザ脳症患者の病態解析と診断バイオマーカー】の検索。

乳酸/ATP比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化した。また急性脳症との鑑別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映している。その値は重症例の予後と相関した。

乳酸/ATP比が急性脳症急性期と種々のミトコンドリア病の患者での値と有意差がなかったことはミトコンドリアを場とする共通のenergy failureが起こっている可能性を示唆する。

AESDの発症の遺伝的素因として、*CPT11*や*ADORA2A*の遺伝子多型、*SCN1A*の遺伝子変異などが判明してきており、患者により発症の引き金となる病因が異なる可能性がある。今回の検討では一般的な抗けいれん薬に加えて、*CPT*が関与する代謝障害に対す

る治療(ビタミンB1, Lカルニチン), および*ADORA2A*に関連してはテオフィリンによりアデノシン受容体同様に抑制性的の影響を受けるビタミンB6を, 間接的な効果を期待して投与を行った。ビタミンB6に関しては, 既にAESD予防効果として推奨されており, AESDの病態の一つとされる興奮毒性に関して, グルタミン酸脱炭酸酵素を介してのグルタミン酸減少効果も期待した。

AESDの早期治療介入に関しては, ビタミンB6投与, 脳低温療法が報告されているが, 現時点は早期診断が難しいことから, その介入効果の判断も難しい。通常の脳症治療に加えた早期3剤(VB1, VB6, L-カルニチン)投与によりAESDの割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加した。AESDの予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。今回の3剤はミトコンドリアレスキューにもなっており興味深い。脳の血管内皮(脳血管関門)のミトコンドリア密度は他の臓器よりも高く、小児期の体重あたりの血管内皮のミトコンドリア密度は成人よりも高い。そのため種々のenergy failureにより小児の脳血管内皮は機能低下に陥りやすい。急性脳症の最初の障害はニューロンではなく血管内皮に起こるとするのが我々の仮説である。ただし厚生労働科学研究・水口班の調査結果からは, 2010年までの統計では急性脳症の中でAESDの頻度が最も高かったとされているが, それ以降の疫学は不明であり, 今回の結果の解釈は注意を要すると思われる。

#### 5.【ICU入室患者の臨床検体からのFlu Alarmin解析】

インフルエンザ感染症では重症化機序に熱不安定性フェノタイプによるATP産生不全が関与していると報告されている。熱中症患者の重症化にも同様の機序の関与が示

唆されている。これら以外の疾患でも同様に重症化の機序に ATP 産生不全が関与している可能性は十分にある。ICU に入室する患者は呼吸・循環動態が不安定なことが多い。肺での酸素取り込み、心不全による酸素供給の問題から、組織での酸素利用が障害される。一般的に末梢組織での酸素不足を見るには嫌気性代謝の産物である乳酸を測定する。しかし、理論的には乳酸よりも ATP は酸素供給に対し、より鋭敏な反応を示すはずである。

今回、ICU 入室患者の ATP および A-LES の予後判定効果を検討した。ATP、A-LES ともに対象患者全員では生存患者と死亡患者で差を認めなかった。基礎疾患により酸素供給、末梢組織での酸素利用が異なることが原因と考えられる。従来用いられている重症度評価スコアである。APACHE II スコアは死亡患者で高く、ICU 入室患者の予後判定としての APACHE II スコアの精度を示す結果となった。しかし、APACHE II スコアの計算には 24 時間を要するという欠点がある。ATP 及び A-LES の測定は入室時に可能であり、その後も経過を追って変化をとらえることができる。入室時と翌日の検査値の変化を評価した結果でも生存患者と死亡患者で有意差は認めなかったが、生存患者では ATP は増加傾向、A-LES は減少傾向、死亡患者では反対の傾向が認められた。患者数を増やすことで経時的変化の意義が明らかになると期待できる。

感染症患者を対象とすると A-LES の予後判定予測値は最も良好であった。敗血症は集中治療室で管理する患者群の中では予後不良の疾患である。敗血症は細菌感染が原因で臓器不全が起きる病態である。抹消組織での酸素利用障害が病態生理の一つとして考えられている。敗血症患者で発症する

多臓器不全に ATP 産生不全が関与しているか可能性は高い。これが感染症患者で A-LES の予後判定予測が良好であった理由の一つと考えられる。全ての患者に当てはまるわけではないが、A-LES は簡便に測定できるとともに、経時的変化を追うことができる点で優れている可能性がある。

## 6.【呼吸器内科の臨床検体を用いた Flu Alarmin の検索】

Chida らは、ICU 入室した症例に対して、血中 ATP と乳酸値を測定し、その比である Lactate/ATP Ratio (A-LES 値) が real time の予後因子として有用であることを報告した。(Chida J, et al. Blood lactate/ATP ratio, as an alarm index and real-time biomarker in critical illness. PLoS One 2013; 8: e60561.) 本研究におけるインフルエンザ患者の A-LES 値は、他の呼吸器疾患と同等かそれ以上に上昇傾向が認められ、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。今回の検討では、症例数が少なく、正常コントロールが取られていないという limitation がある。今後、検討症例を増やすと共に、健常者のコントロールも確認し、詳細に解析予定である。

また臨床応用可能な、最適な Flu Alamin の同定は、インフルエンザ等の急性感染症罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液等の臨床検体の収集と解析を今後も粘り強く継続していくことが必要である。

ヒトの気管支上皮ならびに十二指腸と扁桃腺上皮の初代培養細胞に成功し、一部は今後の応用のために凍結保存を完了しており、また通常種々の実験に頻繁に使えるように不死化を試みている。だが、不死化に成功した小腸上皮と思われた細胞は、未だインフルエンザを含め特定のウイルスに対する感受性は見出せておらず、また気管上

皮と扁桃腺上皮の不死化は未だ成功していない。これらの試みは、あきらめることなく継続していく必要がある。

#### 7.【脂質代謝異常の in vitro probe (IVP) assay】

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。

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

【重症化モデル動物実験によるインフルエンザ感染重症化の機序の解析と治療法の検

索】

インフルエンザ感染重症化機序として、“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルにカップルした“サイトカイン-代謝不全”サイクルの重要性が確認された。このネットワーク機構の中で、代謝不全を誘導するターゲット分子として PDK4 が明らかになり、PDK4 阻害剤として DADA と新規化合物が見いだされた。これらの阻害剤は、PDK4 活性の阻害効果から糖代謝、脂質代謝不全を正常化し、サイトカインストームへの治療効果を示した。また、従来我が国でのみインフルエンザ脳症が発症すると言われていたが、その発症リスク因子が CPT II の熱不安定性 SNP であることを発見したことから、日本以外に中国でもインフルエンザ脳症のリスク因子として確認され、東アジア人種に共通なリスク因子として明らかになった。

【培養細胞実験系による“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルの検証】

新たな EK-v2 PRSS HA プロセシングの経路が、IAV 感染の成立、重症化に関わる可能性が高いことが示唆された。この経路をターゲットとした新たな IAV 感染治療薬の開発につながることを期待される。

【急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序の解析実験】  
インフルエンザに感染させた HUVEC で VE カドヘリンと複合体を形成する カテニンが減少することが明らかとなった。IAV 感染によって カテニンのプロテアソームによる分解が亢進されたためであった。これらの結果から、VE カドヘリン- カテニンの結合がインフルエンザ重症化発症機序の一つである可能性が示唆された。ユビキチン-プロテアソーム経路の GSK-3 によって調節さ

れることが明らかとなったことで、新たな創薬ターゲットになり得ると考えられる。

【インフルエンザ脳症患者の病態解析と診断バイオマーカー】の検索

乳酸 / ATP 比は急性脳症急性期の有用なバイオマーカーの可能性がある。また急性脳症急性期の早期 3 剤 (VB1, VB6, L-カルニチン) 投与により AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。いずれも急性脳症の病態として特に脳血管内皮のミトコンドリア機能不全が病態と深く関連することを示唆すると思われる。

【ICU 入室患者の臨床検体からの Flu Alarmin 解析】

重症患者で ATP、A-LES を測定した。重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。さらに感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

【呼吸器内科の臨床検体を用いた Flu Alarmin の検索】

血中 ATP 値、ならびに乳酸値との比である A-LES 値は、インフルエンザのバイオマーカーとして、その有用性が示唆された。また、今回行ったヒト気管上皮初代細胞を用いた解析のような、蛋白分解酵素や IL6 に関する仕事は、治療薬の選択も視野に入れつつ、今後も *in vitro*, *in vivo* で継続していく必要がある。

【脂質代謝異常の *in vitro* probe (IVP) assay】

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. 健康被害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Min Yao, Min Cai, Dengfu Yao, Xi Xu, Rongrong Yang, Yuting Li, Yuanyuan Zhang, Hiroshi Kido, Dengbing Yao. Abbreviated half-lives and impaired fuel utilization in carnitine palmitoyltransferase II variant fibroblasts. *PLoS ONE*, 2015; 10(3), e0119936.
- (2) Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Hiroshi Kido. Oral administration of lactobacillus pentosus strain S-PT84 enhances anti-influenza virus specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice. *J Vaccine Immunol* 2015; 2(1):5.
- (3) Mineyoshi Hiyoshi, Irene L Indalao, Mihiro Yana, Kazuhiko Yamane, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 $\beta$ -mediated  $\beta$ -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. *Arch Virol* 2015; 160: 225-234.
- (4) Hai-Yan Pan, Hua-Mei Sun, Lu-Jing Xue, Min Pan, Yi-Ping Wang, Hiroshi Kido, Jian-Hua Zhu. Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated

- cardiomyopathy after influenza A virus infection. *Am J Physiol Circ Physiol* 2014; 307: H922-H932.
- (5) 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*, 2014; 9(5): e98032.
- (6) 木戸博、インフルエンザ感染症の予防と治療に関する新展開 インフルエンザ 2014; 16(2): 5-6.
- (7) 木戸博 インフルエンザ脳症と CPT-II 熱不安定性遺伝子多型 クリニシアン 2014; 61(634): 13-16.
- (8) 木戸博 インフルエンザ感染症の重症化メカニズム *J Otolaryngo Head Neck Surgery* 2014; 30(11): 1540-1544.
- (9) 木戸博 インフルエンザ感染の重症化機序、肺炎・脳症の最新知見と治療法の提案 *都耳鼻会報* 2014; 143: 41-46.
- (10) 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* 2014; 36:489-95.
- (11) Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita T, Saitsu H, Matsumoto M. Novel compound heterozygous PIGT mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. *Neurogenetics* 2014 DOI 10.1007/s10048-014-0408-y
- (12) Shimada S, Shimojima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, Kubota M et al. Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. *Brain Dev* 2014 in press.
- (13) Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Changes in Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Human Herpesvirus-6-Associated Acute Encephalopathy/Febrile Seizures. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation* Volume 2014, Article ID 564091, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/564091>
- (14) Hoshino H, Kubota M. Canavan disease: Clinical features and recent advances in research. *Pediatrics International* 2014; 56: 477-483.
- (15) Haga N, Kubota M, Miwa Z. Hereditary sensory and autonomic neuropathy types IV and V in Japan. *Pediatrics International*. 2014 (in press)
- (16) Kakoki K, Kamiyama H, Izumida M, Yashima Y, Hayashi H, Yamamoto N, Matsuyama T, Igawa T, Sakai H, Kubo Y. Androgen-independent proliferation of LNCaP prostate cancer cells infected by xenotropic murine leukemia virus-related virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 447, 216-22 (2014).
- (17) Shigematsu S, Hayashi H, Yasui K,

- Matsuyama T. SAM domain-containing N-terminal region of SAMHD1 plays a crucial role in its stabilization and restriction of HIV-1 infection. *Acta Med Nagasaki*, 58, 103-111 (2014).
- (18) 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. *Virus Genes*. Epub 2014 Jan 28.
- (19) 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  $\beta$ -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *American Journal of Medical Genetics A* 164(5): 1180-1187, 2014 (May)
- (20) 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)
- (21) 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 (ETFHDH) gene. *Journal of The Neurological Sciences* 346(1-2): 350-352, 2014 (November)
- (22) 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 2015
- (23) 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 2015
- (24) 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) 2015
- (25) 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)
- (26) 山口清次: タンデムマスを導入した新

- 生児マスキングの社会的意義と課題. 公衆衛生情報 44(3): 5-8, 2014 (6月)
- (27) 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)
- (28) 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)
- (29) 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)
- (30) N. Nagano, Y. Nagano, M. Toyama, T. Nakazawa, S. Sasaki, K. Shibayama, Y. Arakawa. Successful detection of blaNDM-1-harboring but modified Hodge test-negative *E. coli* by modified SMA-Disk method, and first characterization of XDR-klebsiella pneumonia harboring blaNDM-1 and/or blaOXA-181 from a foreigner visited to Japan. *Jpn J Infect Dis* 2015; Manuscript under review.
- (31) S. Sasaki, Y. Yoshioka, R. Ko, Y. Katsura, Y. Namba, T. Shukuya, K. Kido, S. Iwakami, S. Tominaga, K. Takahashi. Diagnostic significance of cerebrospinal fluid EGFR mutation analysis for non-small cell lung cancer patients harboring an active EGFR mutation with leptomeningeal metastasis following gefitinib therapy failure. *Respir Investig* 2015; Manuscript under review.
- (32) 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例における歯周病細菌 PCR検査の臨床的意義の検討. *日本呼吸器学会雑誌* 2013; 2: 79-84.
- (33) 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. *Nocardia wallacei* 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* 2013; 34: 759-760.
- (34) 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* 2013; 2: 607-611.
- (35) 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、びまん性肺泡出血との鑑別を要した気管支管支骨軟骨形成症の1例. *気管支学* 2014; 36: 73-77.
- (36) 井上貴昭, 中澤武司, 麻生恭代, 成田久美, 秋田美佳, 中村美子, 石井幸, 佐々木信一, 田中裕. 多職種 ICT ラウンドがもたらす効果について. *日臨救医学会誌* 2014; 17: 25-31.
- (37) Nishimura H, Okusa Y. A verification of an overestimation of “deaths associated with influenza pandemic of 1918-1919, Japan” claimed in a



- demographic study. *JJID*, in press, 2014.
- (38) Katsushima Y, Katsushima F, Suzuki Y, Seto J, Mizuta K, Nishimura H, Matsuzaki Y. Characteristics of mycoplasma pneumoniae infection identified by culture in a pediatric clinic. *Pediatr Int*. 2014, 57: doi: 10.1111/ ped. 12513.
- (39) M Yamaya, LK Nadine, C Ota, H Kubo, T Makiguchi, R Nagatomi, H Nishimura: Magnitude of influenza virus replication and cell damage is associated with interleukin-6 production in primary cultures of human tracheal epithelium. *Resp Physiol Neurol*. 2014, 202, 16-23.
- (40) E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, H Nishimura. Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing. *PLOS ONE*, 2014, 9(8), e103560. doi: 10.1371.
- (41) 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*. 2014, 37: 520-529.
- (42) Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R. Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Resp Invest*. 2014, 52, 251-260.
- (43) M Yamaya, L Nadine, H Kubo, K Saito, R Saito, H Nishimura: Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells. *J Med Virol* 2014, DOI: 10.1002/jmv. 23974.
- (44) 小山田厚子、三木祐、鈴木克之、佐々木悟、深瀬真由美、伊藤洋子、大宮卓、他 ICT メンバー、西村秀一。地域流行前の一病棟内でのインフルエンザ集団発生と対応、医療（印刷中）2015
- (45) 大宮卓、佐々木純一、西村秀一。イムノクロマト法を原理とする種々のアデノウイルス迅速抗原検出キットの、ウイルス検出感度の比較。医学検査（印刷中）2015
- (46) 菊地祐樹、鈴木優子、伊藤洋子、西村秀一。噴霧式インフルエンザ生ワクチンの力価についての検討。仙台医療センター医学雑誌 2014, 4: 39-41.
- (47) 菱川容子、橋本真帆、倉橋宏和、別府玲子、大谷可菜子、西村秀一。重症心身障害児（者）施設におけるヒトメタニューモウイルスの集団感染と重症例の発生。日本重症心身障害学会誌, 2014, 39: 379-383.

## 2. 学会発表

- (1) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. PDK4 inhibitor suppresses cytokine storm and multiple organ failure induced by lethal doses of influenza A virus infection through restoration of energy metabolic disorder. 第 87 回日本生化学会大会。平成 2

6年10月15日 10月18日(京都国際会議場)

(2) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. インフルエンザウイルスの体内複製を増強する trypsin の臓器内発現量は「代謝障害 サイトカイン」サイクルの調節下にある:PDK4 阻害剤の有効性 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会。平成26年8月8日 8月9日(千里ライフサイエンスセンター)

(3) インターフェロン $\gamma$ によるレトロウイルス感染抑制に關与する新規細胞性因子の同定、久保嘉直、泉田真生、安井潔、林日出喜、松山俊文、第62回日本ウイルス学会学術総会、平成26年11月10~12日(パシフィコ横浜)

(4) Yamaguchi S: Organic Acidaemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014

(5) 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

(6) 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

(7) 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

(8) 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

(9) 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

(10) 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

(11) 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

(12) 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

(13) 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

(14) 佐々木信一, 南條友央太, 中澤武司, 木下綾子, 成田久美, 岩崎沙奈美, 飯田美奈子, 月山智美, 古田あずさ, 金森由和, 玉野知佐, 伊藤友美, 鈴木俊介, 唐島孝彰, 米山桂一: 声帯部カポジ肉腫の生検時にキシロ

カインショックを生じ、治療に難渋した全身性カポジ肉腫合併 AIDS の一例. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.03

(15) 岸井 絢, 吉岡泰子, 推名健太郎, 荒野直子, 関本康人, 栗山祥子, 南條友央太, 村木慶子, 佐々木信一, 富永 滋: 癌性髄膜炎に対し、VP shunt と WBRT、erlotinib 投与を施行し長期生存を得た EGFR 陽性肺線癌の一例 第 212 回日本呼吸器学会関東地方会, 横浜, 2014.11.22

(16) 村木慶子, 吉岡泰子, 鎌崎恵理子, 推名健太郎, 松野 圭, 栗山祥子, 南條友央太, 佐々木信一, 富永 滋: EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における EGFR-TKI 耐性獲得後の 2 次変異検索の有用性. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.16

(17) 推名健太郎, 高橋史行, SFariz Nurwidya, 小林 功, 宿谷威仁, 村上明子, 朝尾哲彦, 金丸良太, 柳下薫寛, 加藤元康, 村木慶子, 大橋里奈, 小山 良, 高橋元美, 嶋田奈緒子, 吉岡泰子, 佐々木信一, 富永 滋, 高橋和久: 非小細胞肺癌の EGFR-TKI 耐性獲得における ZEB1 の発現検討. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.16

(18) 推名健太郎, 佐々木信一, 宿谷威仁, 松野 圭, 堤 建男, 栗山祥子, 南條友央太, 村木慶子, 吉岡泰子, 長岡鉄太郎, 富永 滋, 高橋和久: EML4-ALK 陽性非腺癌非小細胞肺癌に対するクリゾチニブ投与の 4 症例の検討. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.14

(19) 南條友央太, 佐々木信一: 脊椎への直接浸潤をきたした菌球型肺アスペルギルス症の一例. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014.10.31

(20) 佐々木信一, 南條友央太: インフルエンザウイルス感染症におけるバイオマーカーの検討. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014.10.31

(21) 鈴木洋平, 南條友央太, 推名健太郎, 松野 圭, 村木慶子, 吉岡泰子, 佐々木信一,

富永 滋: 若年女性で緑膿菌と *M.kansasii* 共感染により肺膿瘍を形成した一例. 第 209 回日本呼吸器学会関東地方会, 幕張, 2014.05.24

(22) 吉岡泰子, 松野 圭, 推名健太郎, 鈴木洋平, 南條友央太, 村木慶子, 佐々木信一, 富永 滋: Bepridil が原因と考えられた薬剤性間質性肺炎の 3 例. 第 54 回日本呼吸器学会総会, 大阪, 2014.04.25

(23) 中澤武司, 南條友央太, 井上貴昭, 佐々木信一, 西田香南, 大出恭代, 三澤 成毅, 横山栄二, 菊池 俊: 肝膿瘍より分離された *Desulfovibrio desulfuricans* の 1 例. 第 44 回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術講演会, 那覇, 2014.02.22

(23) 長野則之, 長野由紀子, 外山雅美, 佐々木信一, 中澤武司, 堀 賢, 柴山恵吾, 荒川宜親: NDM-1 メタロ-βラクタマーゼ, OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の出現. 第 25 回日本臨床微生物学会総会, 名古屋, 2014.02.01

(24) 中村美子, 中澤武司, 秋田美佳, 成田久美, 井上貴昭, 大日方薫, 佐々木信一: 選択培地を用いた *Acinetobacter* の環境リザーバーに関する環境調査. 第 29 回日本環境感染学会総会, 品川, 2014.02.15

(25) 松岡遊貴, 吉岡泰子, 松野圭, 推名健太郎, 鈴木洋平, 南條友央太, 村木慶子, 佐々木信一, 二川俊郎, 富永 滋: リンパ管シンチと胸腔鏡により漏出部位を確認した乳糜胸の 1 例. 第 208 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2014.02.22

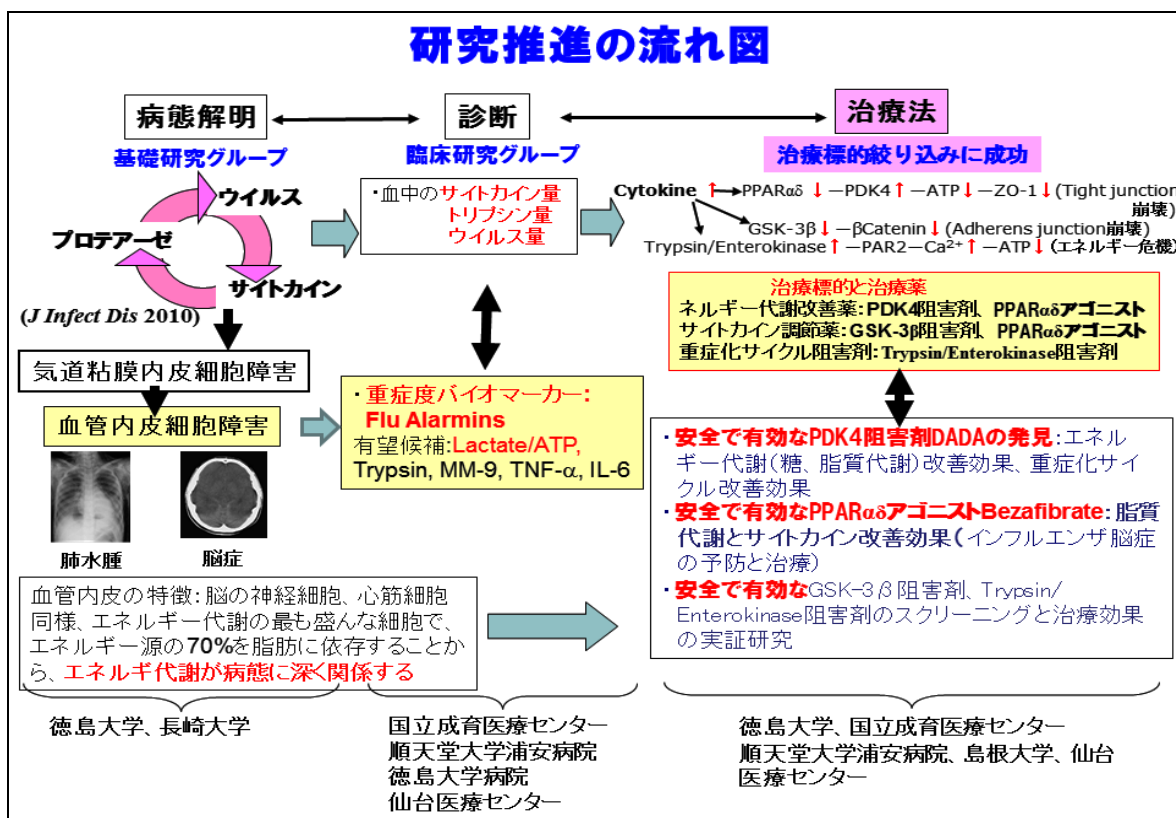
(26) 中澤武司, 南條友央太, 井上貴昭, 佐々木信一, 西田香南, 大出恭代, 三澤 成毅, 横山栄二, 菊池 俊: 肝膿瘍より分離された *Desulfovibrio desulfuricans* の 1 例. 第 44 回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術

3. 著書

(1) 佐々木信一. がん性髄膜炎に対する治療戦略. 編集: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 Practical Treatment. 東京:Medical

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.



研究組織図

## 分担研究報告書

平成 24 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

重症化モデル動物実験によるインフルエンザ肺炎・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

研究分担者 木戸博（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授）  
研究協力者 高橋悦久（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教）  
山根一彦（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）  
Irene Lorinda Indalao（徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生）  
榎本奈緒子（徳島大学疾患酵素学研究センター 研究員）

### 研究要旨

インフルエンザ重症化(肺炎、脳症)発症機序の解明、重症化を早期に診断するためのバイオマーカー、Flu Alarmin の検索、重症化治療薬の検索について、昨年に続いて解析が行われ、これまで提唱してきた「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ (Trypsin, MMP-9)」サイクルに共役する「体内代謝障害 サイトカイン」サイクルが確認され、重症化阻止の戦略が明確になった。体内代謝障害の中でも、生命活動に直結しているエネルギー代謝の中で、特に Pyruvate Dehydrogenase と Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) がサイトカインと密接に関係しており、PDK4 阻害剤の治療効果が確認された。抗インフルエンザ薬とこの PDK4 阻害剤の併用で、半数致死量の 20 倍の極めて高濃度のウイルス感染でも生存率 100%が達成され、その治療効果が注目された。昨年報告した PDK4 阻害剤の Diisopropylamine Dichloroacetate 以外のより強力な PDK4 阻害剤がスクリーニングされ、有望な新規化合物が数種同定された。

従来インフルエンザ脳症リスク因子として、熱不安定性 Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) 遺伝子多型を見出してきた。インフルエンザ脳症が当初日本人種に特徴的と言われてきたが、大規模な遺伝子解析と脳症調査が中国で我々との共同研究で実施され、熱不安定性 CPT II と脳症との関係が海外でも確認された。この事から熱不安定性 CPT II によるインフルエンザ脳症は、東アジア人種に共通する疾患と考えられた。さらに、全血を用いて診療の現場で熱不安定性 CPT II SNP を 30-40 分以内に診断する方法として、理化学研究所が開発した SMART AMP 法を用いて検証することで、実用化が可能と判定された。

### A. 研究目的

重症インフルエンザ感染による肺炎・脳症・心筋炎の主要な病因は、血管内皮細胞障

害による血管透過性亢進と多臓器不全にある。発症機序として、これまでに本研究グループでは「インフルエンザ サイトカイン

プロテアーゼ”ウイルス増殖サイクルを見出し、さらに昨年度の研究によりウイルス増殖サイクルと重症化の発症を結びつける“サイトカイン-代謝不全”サイクルを見出した。図1に示す2つのサイクルがサイトカインを介して共役したときに重症化が発症すると考えられることから、早期重症化診断と治療に関する検討を実施した。昨年までの研究から、エネルギー代謝を改善する図2に示す Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) 阻害剤がこの2つのサイクルを効果的に阻害して、サイトカインストームを治療すると共に、“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”ウイルス増殖サイクルを抑制することが判明している。これらを基盤に、①抗インフルエンザ薬のタミフルと PDK4 阻害剤の diisopropylamine Dichloroacetate (DADA) との併用効果を検討した。② DADA は肝臓保護薬として約50年前から使用されてきた既存薬であるが、DADA より強力な PDK4 阻害剤の検索を実施した。③ 小児のインフルエンザ重症化にインフルエンザ脳症がある。この疾患が日本で最初に発見されたことから、従来日本人に特有な疾患として位置付けられてきた。しかし、この疾患の発症リスク因子として、ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素の Carnitine Palmitoyltransferase (CPT II) の熱不安定性 SNP が原因であることを突き止めたことから、日本人に特徴的な疾患では無く、東アジア人種の CPT II SNP を背景とする可能性が考えられた。そこで、中国人でのインフルエンザ脳症の発症と、CPT II SNP を調査した。④ インフルエンザ脳症は、脳の血管内皮細胞の機能不全が病気の本態であると推定されるため、機能不全になる前に早期に診断して治療に着手する必要がある。そこで、高熱が持続することで障害の起きやすい患者に、診療の現場で熱不安定性

CPT II SNP を調べる方法の開発に取り組んだ。

## B. 研究方法

マウスの重症化モデル動物実験では、重症化しやすい離乳期直後の3週齢マウス (C57BL/6CrSlcまたは、BALB/c) 雌を用いて実験した。インフルエンザウイルス株によって感染重症化の程度が異なるため、重症化しやすい Influenza A/PR/8/34(H1N1) 株を用いた。なお、タミフルと DADA との併用実験では、半数致死量の20倍を示す極めて高濃度のウイルスの経鼻投与で検討した。

DADA より強力な PDK4 阻害剤の検索では、北里大学生命科学研究所の創薬ライブラリーを動員して、北里大学生命科学研究所が共同で実施した。中国のインフルエンザ脳症患者の Fibroblast を用いた熱不安定性 CPT II SNP の性状解析は、南通医学院との共同研究として実施された。

### (倫理面への配慮)

動物実験に当たっては、徳島大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに沿って実施した。

## C. 研究結果

### ①抗インフルエンザ薬のタミフルと DADA との併用によるインフルエンザ感染重症化の阻止効果

インフルエンザ感染後の生体応答として各種サイトカインの誘導が感染2-3日目より生じ、生体防御系としての液性免疫誘導が感染4日目より開始されるが、代謝不全が明らかになる時期は感染7日目前後で、この時期から個体の死亡が出始める。図3は、半数致死量の20倍量、致死量120 PFUの10倍量の高濃度ウイルス(1200 PFU)を経鼻感染させて DADA の効果を検討した。この過酷な感染条件でも DADA 単独で生存率50%が得られた。また

この条件でヒト治療量のタミフル (10 mg/kg/day) はマウスに対して生存率 70%を示したが、タミフルの量を増やしてもさらなる効果は期待できなかった (data not shown)。この条件下で、タミフルと DADA を併用するとマウスの生存率は 100%を達成した。なお、タミフルと DADA の併用療法は、感染初日から投与した時の効果を示しており、できるだけ早期の治療開始が好ましいと推定された。

### 新規 PDK4 阻害剤のスクリーニング

DADA は、PDK4 に対して  $IC_{50} = 50.9 \mu\text{M}$  を示し、類似アイソマーの PDK2 には  $IC_{50} = 636.0 \mu\text{M}$  を示して、PDK4 に対する高い特異性を示した。これらの値は、従来 PDK 阻害剤として知られていた Dichloroacetate (DCA) の示す  $IC_{50} = 57.8 \mu\text{M}$  (PDK4)、 $IC_{50} = 676.0 \mu\text{M}$  (PDK2) とほぼ同等の阻害効果と考えられる。そこで、これまでに報告されている PDK4 の X 線結晶構造解析データから、活性中心の立体構造と ATP 結合部位の構造を参考に、活性中心部位に入りうる化合物のサイズを推定して、Protein Kinase 阻害剤とその類縁体をスクリーニングして、誘導体作成に適したリード化合物をスクリーニングした。毒性が低くより強い PDK4 阻害活性を示す 4 種の化合物が選択されたが、これらの中で、各種誘導体の作成に有利な KIS-012 (Vit K3) を選択して、各種誘導体の作成を実施し、DADA の約 100 倍強力な PDK4 新規阻害剤を数種類見出すことに成功した。

### 中国人におけるインフルエンザ脳症のリスク因子、熱不安定性 CPT II SNP の再現性の検証

インフルエンザ脳症は日本で最初に発見されたことから、日本人に特有な疾患として位置付けられてきた。しかし、この疾患の発

症リスク因子として、ミトコンドリアの脂肪酸代謝酵素の Carnitine Palmitoyl-transferase (CPT II) の熱不安定性 SNP が原因であることを我々が突き止めたことから、東アジア人種に特徴的な疾患の可能性を推定して、詳細な検討を中国で実施した。中国、南通医学院でインフルエンザ脳症と診断された 12 名の患者の白血球から、遺伝子診断でこれまでに日本で報告されていた 3 型の CPT II SNP を確認できた。具体的には、[c.1102 G>A (p.V368I)] (heterozygous)、[c.1102 G>A (p.V368I)] (homozygous)、[c.1055T>G (p.F352C)] (heterozygous)+ [c.1102 G>A (p.V368I)] (homozygous) の 3 型であった。患者のファイibroプラストを用いて、酵素の熱不安定性、細胞内 Half-life、ミトコンドリアでの  $\beta$ -酸化と ATP 産生量の測定を実施した。

その結果、図 5 に示すように、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) では、 $37^\circ\text{C}$  では Control の wild type に比較して約 63% に酵素活性は減少し、さらに  $41^\circ\text{C}$  の高熱条件下では、32% に減少した。V368I (homozygous)、V368I (heterozygous) では、 $37^\circ\text{C}$  において wild type (WT) に比較して有意な減少は観察されず、 $41^\circ\text{C}$  の高熱条件下で僅かに減少して約 82% を示した。以上のことから、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) の熱不安定性 SNP が確認された。さらに、細胞内の蛋白を [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine で 2 時間 Pulse ラベルした後、細胞を洗浄して Chase 実験を実施した。図 6 に示すように、WT CPT II は half-life=18 時間を示したが、V368I (homozygous) は 10 時間を、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous) の half-life は 4 時間を示した。このような状況下における細胞内ミトコンドリアの  $\beta$ 酸化と ATP 産生レベルを測定した結果を図 7 に示

す。F352C (heterozygous) + V368I (homozygous)では、β酸化とATP 産生レベルは共に 37 °C で WT の 75%を、41 °C で WT の 52%を示した。ATP レベルは、40-50%以下で致命的であり、F352C (heterozygous) + V368I (homozygous)の SNP を持つ細胞では 41 °C の条件下では危険な状態にあることが判る。

#### ④ CPT II SNP の迅速診断

CPT II の熱不安定性に係わる因子は、図 5、6、7 に示すように、F352C であることから、F352C (heterozygous)、F352C (homozygous)と WT を迅速に外来で判定する方法の開発を検討した。これまでに理化学研究所では、全血を用いて DNA の抽出操作なしに 30-40 分以内に遺伝子増幅する SMART AMP システムを開発している。そこで本プロジェクトではこの迅速性と簡易性に注目して、F352C の遺伝子解析を SMART AMP システムで検討した。図 8 に示すように、F352C と F352C の homozygous と heterozygous を 30-40 分以内に解析が可能であることが確認された。

#### D. 考察

平成 26 年度の研究により、サイトカインを介して共役する“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルと“サイトカイン 代謝不全”サイクルが、重症化発症の主要な原因であることが確認され、治療薬として PDK4 阻害剤の DADA を介する糖代謝の改善、CPTII 発現を促進する Bezafibrate による長鎖脂肪酸代謝の改善が、有効であることが確認された。これらを基盤に、抗インフルエンザ薬と DADA の併用効果が検討され、感染早期からの両薬剤の併用で著明な重症化阻止効果を示すことが判明した。

さらに小児のインフルエンザ重症化の代

表的疾患であるインフルエンザ脳症において、日本人種に特徴的な疾患といわれていたが、この疾患の発症原因が CPT II の熱不安定性 SNP にあることを、中国人のインフルエンザ脳症患者でも確認することができた。

インフルエンザ脳症は、脳の血管肺皮細胞の血液脳関門が開いてからでは治療が困難になるため、早期の診断が重要である。そこで外来でインフルエンザ脳症のリスク因子の熱不安定性 SNP、F352C を患者の全血で 30-40 分以内に診断する方法を明らかにしており、今後の医療現場での応用が期待される。

#### E. 結論

インフルエンザ感染重症化機序として、「インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼサイクルにカップルしたサイトカイン-代謝不全サイクル」が確認された。このネットワーク機構の中で、抗インフルエンザ薬と糖代謝不全の治療薬の DADA との併用による著明な治療効果が確認された。

従来インフルエンザ重症化の発症リスク因子として見出していた CPT II の熱不安定性 SNP が、中国のインフルエンザ脳症患者でも共通して見いだされたことから、東アジア人種に共通したリスク因子になることを確認し、その迅速診断法を確立した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Min Yao, Min Cai, Dengfu Yao, Xi Xu, Rongrong Yang, Yuting Li, Yuanyuan Zhang, Hiroshi Kido, Dengbing Yao. Abbreviated half-lives and impaired fuel utilization in carnitine



- palmitoyltransferase II variant fibroblasts. *PLoS ONE*, 2015; 10(3), e0119936.
- (2) Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Hiroshi Kido. Oral administration of lactobacillus pentosus strain S-PT84 enhances anti-influenza virus specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice. *J Vaccine Immuno* 2015; 2(1):5.
- (3) Mineyoshi Hiyoshi, Irene L Indalao, Mihiro Yana, Kazuhiko Yamane, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 $\beta$ -mediated  $\beta$ -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. *Arch Virol* 2015; 160: 225-234.
- (4) Hai-Yan Pan, Hua-Mei Sun, Lu-Jing Xue, Min Pan, Yi-Ping Wang, Hiroshi Kido, Jian-Hua Zhu. Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection. *Am J Physiol Circ Physiol* 2014; 307: H922-H932.
- (5) 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*, 2014; 9(5): e98032.
- (6) 木戸博, インフルエンザ感染症の予防と治療に関する新展開 インフルエンザ 2014; 16(2): 5-6.
- (7) 木戸博 インフルエンザ脳症とCPT-II 熱不安定性遺伝子多型 クリニシアン 2014; 61(634): 13-16.
- (8) 木戸博 インフルエンザ感染症の重症化メカニズム *J Otolaryngo Head Neck Surgery* 2014; 30(11): 1540-1544.
- (9) 木戸博 インフルエンザ感染の重症化機序、肺炎・脳症の最新知見と治療法の提案 *都耳鼻会報* 2014; 143: 41-46.
2. 学会発表
- (1) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. PDK4 inhibitor suppresses cytokine storm and multiple organ failure induced by lethal doses of influenza A virus infection through restoration of energy metabolic disorder. 第87回日本生化学会大会。平成26年10月15日 10月18日(京都国際会議場)
- (2) Indalao IL, Yanmane K, Kido H. インフルエンザウイルスの体内複製を増強する trypsin の臓器内発現量は「代謝障害 サイトカイン」サイクルの調節下にある:PDK4 阻害剤の有効性 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会。平成26年8月8日 8月9日(千里ライフサイエンスセンター)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)  
該当なし。

重症化治療の <b>新展開</b> : 予防と治療の可能性	
薬剤	主な作用
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>アプロチニン</b> (牛肺由来: BAYER) <b>トリプシン阻害</b></li> <li>• <b>ジクロロ酢酸</b> <b>PDK4阻害</b> <b>ジソプロピルアミン(DADA)</b> (サイトカインストームの治療薬) <b>Vit B15</b></li> <li>• <b>ベザフィブレート</b> <b>CPT II 転写促進</b></li> <li>• <b>70%炭水化物/中鎖脂肪酸ミルク</b></li> <li>• <b>解熱</b> (一部解熱剤は不可)</li> <li>• <b>クラリスロマイシン</b> <b>MMP-9発現抑制</b></li> </ul>	<p><b>重症化: 代謝破綻・ATPクライシス/血管透過性亢進/細胞結合崩壊等</b></p> <p> <b>プロテアーゼ:</b>  <b>トリプシン↑</b>  <b>MMP-9↑</b> </p> <p> <b>PDK4↑</b>  <b>糖代謝抑制</b>  <b>/ATPクライシス</b>  <b>脂肪酸代謝抑制</b> </p> <p> <b>血管内皮細胞障害</b>  <b>多臓器不全</b>  <b>熱による後天性</b> (エネルギー代謝不全)  <b>CPTII欠損症状態</b> </p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>クラリスロマイシン</b> <b>再感染抑制</b> (粘膜免疫増強)</li> </ul>	<p>⇒ <b>重症化抑制(症状改善)</b> <b>再感染予防</b></p>

図1. 感染重症化のカスケードを構成する“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルにカップルした“サイトカインー代謝不全サイクル”

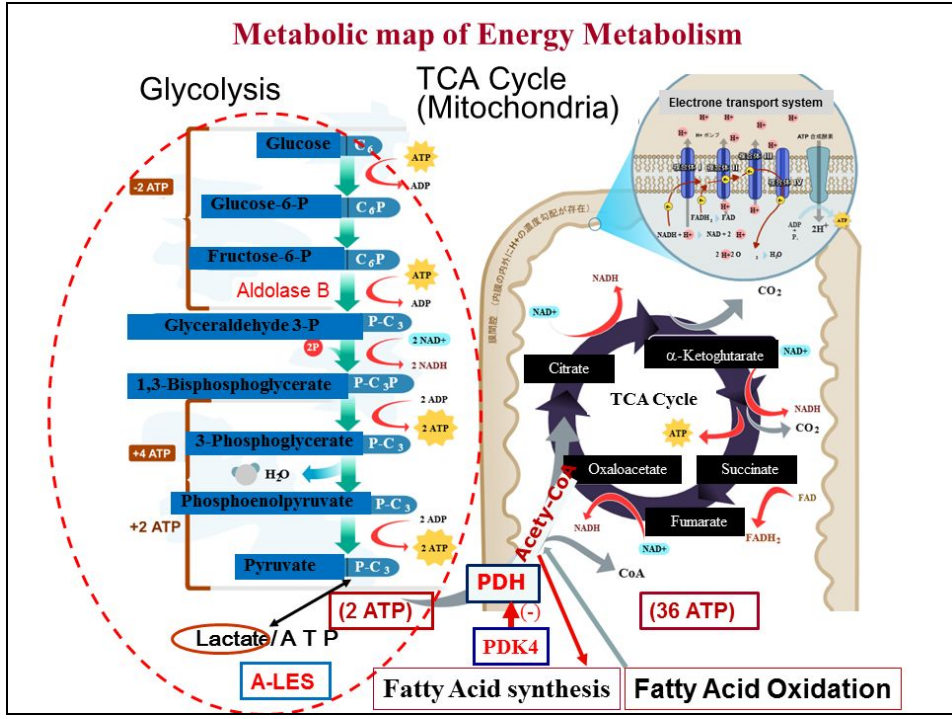


図2. エネルギー産生系と PDH、PDK4

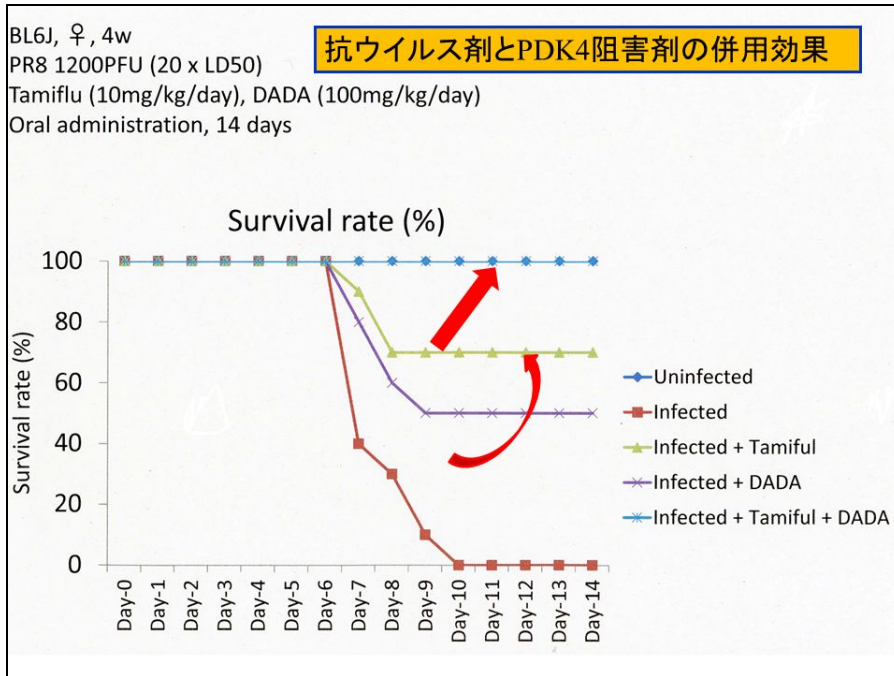


図 3 . 20 × LD50=1200 pfu の高濃度インフルエンザ感染に対する抗インフルエンザ薬 Tamiflu と糖代謝改善薬 DADA の単独効果と併用効果

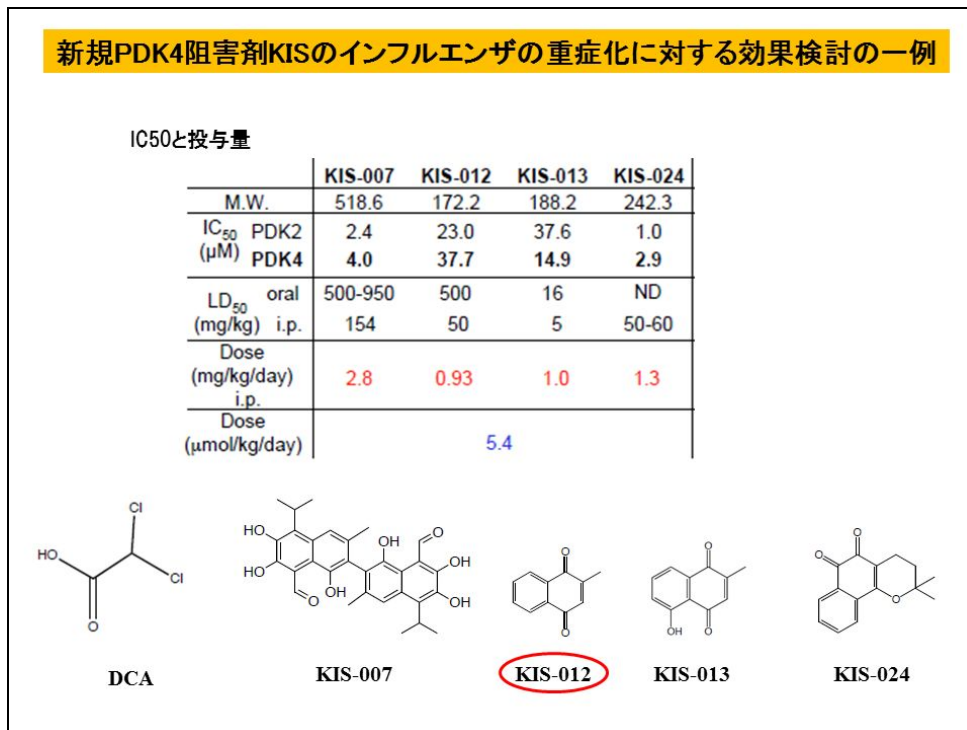


図 3 . PDK4 の活性中心立体構造に結合可能な新規 PDK4 阻害剤開発のためのリード化合物

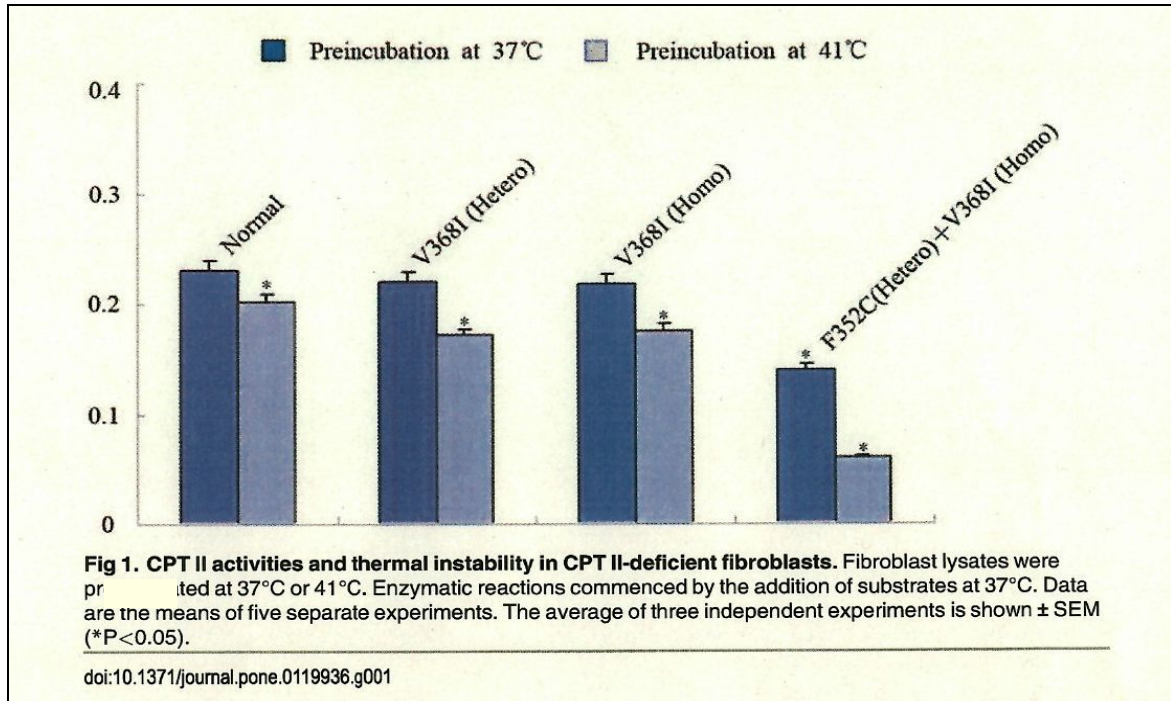


図4 . 中国のインフルエンザ脳症患者に検出された熱不安定性 CPT II SNP とその熱不安定性

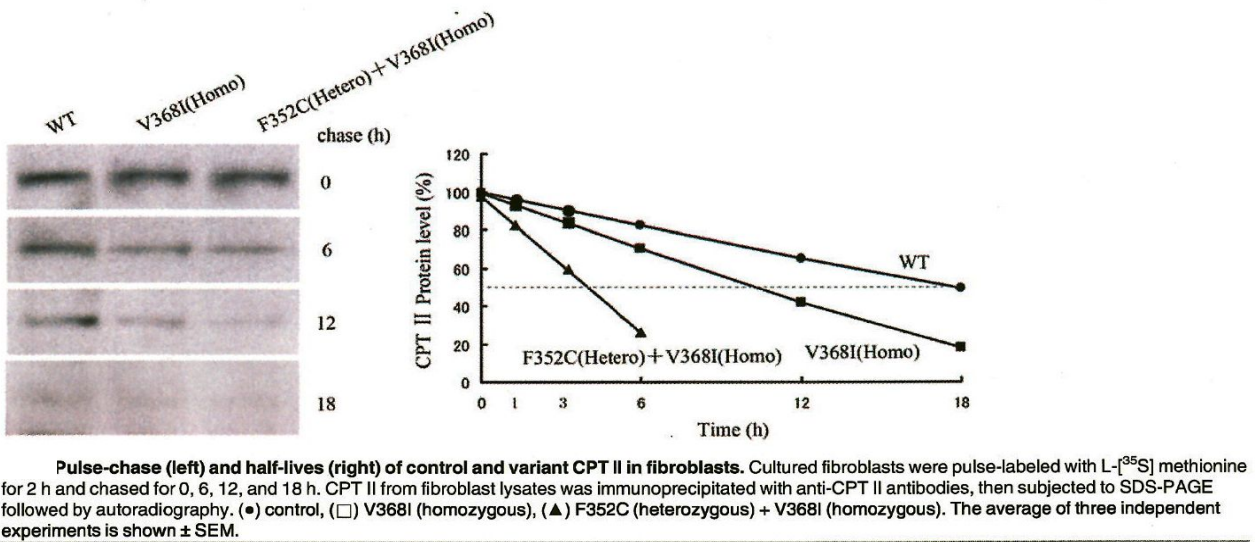


図5 . WT、中国脳症患者ファイブロブラストにおける熱不安定性 CPT II SNP の Half-life



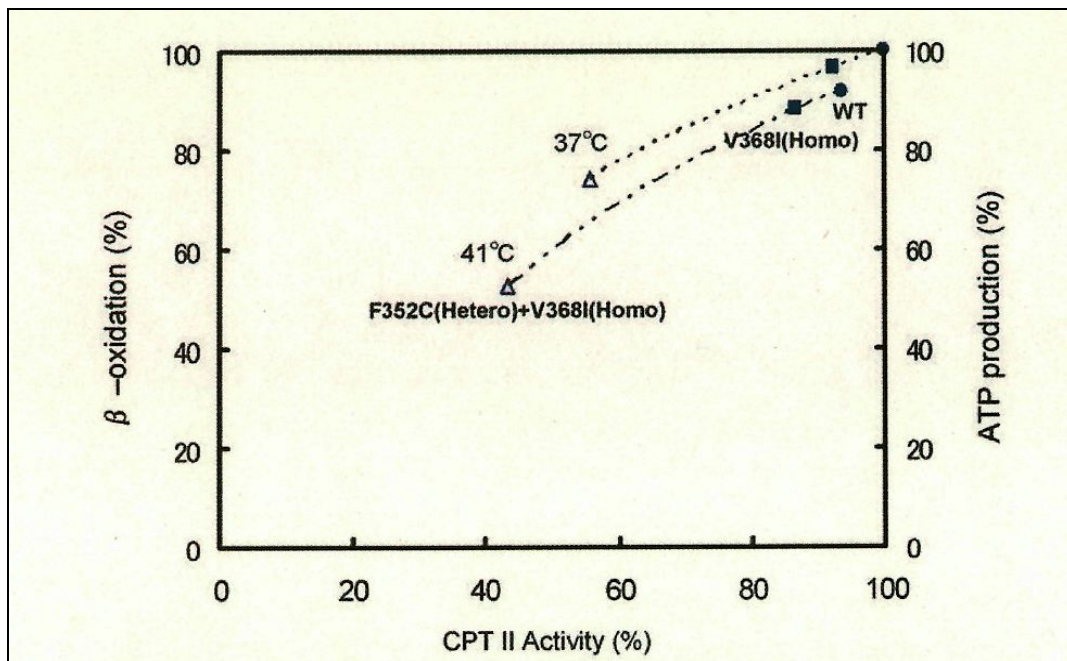


図6 . WT、中国脳症患者ファイブロブラストにおける熱不安定性 CPT II SNP とミトコンドリア内のβ-酸化とATP産生量

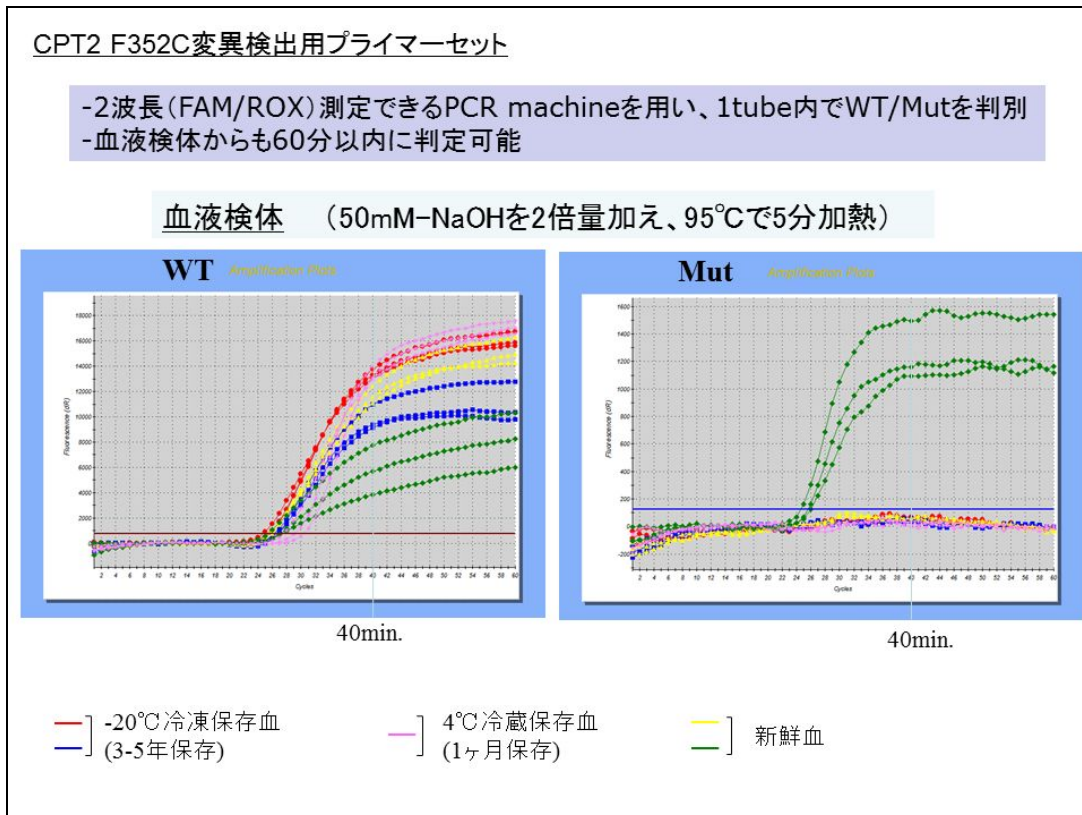


図7 . SMART AMP を用いた熱不安定性 CPT II SNP の迅速診断システム



## インフルエンザの重症化とサイトカイン、特にインターフェロン産生の機序解明 に関する研究

研究分担者 林日出喜 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

### 研究要旨

A 型インフルエンザウイルス (IAV) 感染の成立、重症化の機序には、ウイルス側、宿主側双方の因子が複雑に関与し、多様性が示されている。宿主側の因子のひとつとしてトリプシン様タンパク質分解酵素が IAV 感染の成立、重症化に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。我々は消化酵素として十二指腸上皮で発現しトリプシノーゲンを活性化するエンテロキナーゼ (EK) が、一般のいろいろな培養細胞でも発現しており、トリプシノーゲンを切断、活性化することで、IAV-HA (ヘマグルチニン) のプロセッシングを促進するという、IAV 感染の新たな経路の存在を明らかにした。特に、EK の新しいアイソフォームとして発見した EK-v2 の IAV 感染における役割を明らかにし、その機構を標的とした抗ウイルス薬の開発につながる可能性が示唆された。

### A . 研究目的

我々は消化酵素として十二指腸上皮で発現しトリプシノーゲンを活性化するエンテロキナーゼ (EK) が、一般のいろいろな培養細胞でも発現していることを明らかにした。この EK がトリプシノーゲンを切断、活性化することで、IAV-HA (ヘマグルチニン) のプロセッシングを促進するという、IAV 感染の新たな経路が存在する可能性を示してきた。その際、従来から報告のある EK (ここでは簡便性のため EK-v1 と呼ぶことにする) に加え、その酵素活性を有する細胞膜外ドメインに 30 アミノ酸の挿入がある新規アイソフォーム (EK-v2 と呼ぶことにする) をクローニングした。IAV 感染における EK-v1、EK-v2 の役割を明らかにし、その機構を標的とした抗ウイルス薬の開発につなげることが本研究の目的である。

### B . 研究方法

1 ) ヒトの培養細胞から mRNA を調整、cDNA に変換し、I~IV 型トリプシノーゲン (PRSS1, PRSS2, PRSS3-v2, hPRSS3-v1)、及びその活性化する酵素として知られるエンテロキナーゼ (EK)、さらに、細胞膜上に発現しこれまでに IAV-HA を切断、活性化することが知られている HAT、TMPRSS2、及び TMPRSS4 の役割を調べるため、それらの cDNAs をクローニングした。  
2 ) ヒトのいろいろな培養細胞における I~IV 型トリプシノーゲン (PRSS1、PRSS2、PRSS3-v2、PRSS3-v1)、エンテロキナーゼ (EK-v1、v2)、及び細胞膜貫通型セリンプロテアーゼ (HAT、TMPRSS2、TMPRSS4) の発現量を Real-time PCR、及びウェスタンブロットで、調べた。  
3 ) 293T 細胞に、EK-v1、EK-v2、hPRSS3-v2 を強制発現させた、安定細胞株 (293T-EK-v1、293T-EK-v2、

293T-PRSS3)を作成し、IAVを感染させ、一定時間後に細胞内、及び培養上清に放出されたIAVの量をIAVに対する特異的抗体を用いて測定した。

4) *in vitro*においてEK-v1、EK-v2がPRSS3-v2を切断し、そのトリプシン活性を上げるか、293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3細胞株のライセートを使い、GPR-pNAを基質としてトリプシン活性を測定した。

5) *in vitro*においてEK-v1、EK-v2により切断、活性化されたPRSS3が、TPCK処理トリプシン放出されたIAVの量をIAV-HAに対すプシンと同様のIAV-HAのプロセッシングを行うか、IAVを感染、増殖させたU937細胞ライセートと293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3細胞株のライセートを使って調べた。コントロールとしてTPCK処理トリプシン(TPCKT)、あるいはN末端-アセチル化トリプシン(NAT)で処理した後、IAV-HAに対する特異的抗体を使ったウェスタンで調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学組み換えDNA実験安全委員会の承認を受け、その指針に従い実施した。

## C. 研究結果

1) ヒト培養細胞から、従来から報告のあった25エクソンからなるEK遺伝子(EK-v1)に加え、26エクソンからなる新たなEK遺伝子アイソフォーム(EK-v2)のcDNAsをクローニングした(図1)。

2) EKの十二指腸上皮以外での発現や役割については不明な点が多かったが、Real-time PCR法で調べたほとんどの培養細胞でEK mRNAの発現が観察されたが、HAT、TMPRSS2及びTMPRSS4の発現はある程度限られていた(図

2)。また、PRSS1及びPRSS3も多くの細胞に発現がみられた(図3)。

3) EK-v1、EK-v2、PRSS3-v2を強制発現させた293T安定細胞株(図4)に、IAVを感染させ、80時間後に培養上清に放出されたIAVの量をIAV-HAに対する特異的抗体を用いて測定したところ、他の細胞に比べ、293T-EK-v2細胞内、及び上清に放出されたウイルスを調べたところ、IAVの顕著な増殖とIAV-HAプロセッシングの更新がみられた(図5)。

4) 293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3細胞株、及びTMPRSS2、TMPRSS4、HATを一過性に強制発現させた293T細胞のライセートを使い、GPK-pNAを基質としてトリプシン活性を測定した。この*in vitro*の系でEK-v1、EK-v2はPRSS3-v2トリプシノーゼンを活性化したが、TMPRSS2、TMPRSS4、HATはPRSS3を活性化できなかった(図6、7)。

5) *in vitro*でU937細胞に由来するIAVライセートをTPCK処理トリプシン(TPCKT)、あるいはN末端-アセチル化トリプシン(NAT)で室温30分処理すると、65-kDaのIAV-HA<sub>0</sub>が消失し、代わりに25-kDaのIAV-HA<sub>2</sub>が出現し、IAV-HAのプロセッシングが確認された(図8)。PRSS3-v2、EK-v1、EK-v2のみではIAV-HAのプロセッシングがみられなかったが、PRSS3-v2によりEK-v1あるいはEK-v2を活性化させると、トリプシン処理した場合同様に65-kDaのIAV-HA<sub>0</sub>が消失し、代わりに25-kDaのIAV-HA<sub>2</sub>が出現し、IAV-HAのプロセッシングが確認された。これらのことから、従来から報告されていたTMPRSS2、TMPRSS4、HATを介したIAV-HAの活性化経路に加え、PRSS(トリプシノーゼン)のEK(エンテロキナーゼ)による活性化が、IAV-HAのプロ



セッシングを促進する新たな IAV の感染経路の存在が示唆された(図 9)。

#### D . 考察

EK が IAV 感染の成立、重症化に関わる新たなトリプシン様タンパク質分解酵素の一つと考えられた(図 9)。 *in vitro* においては EK-v1, EK-v2 とともに PRSS を活性化する酵素活性、および IAV のプロセッシング能は同程度有していたが、 *in vivo* では EK-v2 が顕著な IAV 感染促進作用を示した(図 5)ことから、新たに発見した EK-v2 が、 IAV 感染の成立、重症化に強く関わっている可能性がある。 EK-v2 と EK-v1 の違いは 30 アミノ酸の挿入の有無だけで、その部位は細胞の外からアクセスできるため、今後、この 30 アミノ酸部位を中心に EK 分子をターゲットとして、 IAV 感染の抑制ができるかどうか検討したい。

#### E . 結論

新たな EK-v2 PRSS HA プロセッシングの経路が、 IAV 感染の成立、重症化に関わる可能性が高いことが示唆された。この経路をターゲットとした新たな IAV 感染治療薬の開発につながることを期待される。

#### F . 健康危険情報

なし。

#### G . 研究発表 (平成 26 年度)

(ア) 論文発表

1. Kakoki K, Kamiyama H, Izumida M, Yashima Y, Hayashi H, Yamamoto N, Matsuyama T, Igawa T, Sakai H, Kubo Y. Androgen-independent proliferation of LNCaP prostate cancer cells infected by xenotropic murine leukemia virus-related virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 447, 216-22 (2014).

2. Shigematsu S, Hayashi H, Yasui K, Matsuyama T. SAM domain-containing N-terminal region of SAMHD1 plays a crucial role in its stabilization and restriction of HIV-1 infection. *Acta Med Nagasaki*, 58, 103-111 (2014).
3. 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. *Virus Genes.* 48, 448-56 (2014).

(ア) 学会発表

1. インターフェロン $\gamma$ によるレトロウイルス感染抑制に関する新規細胞性因子の同定、久保嘉直、泉田真生、安井潔、林日出喜、松山俊文、第62回日本ウイルス学会学術総会、平成26年11月10~12日 (パシフィコ横浜)

#### H . 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

(ア) 特許取得  
なし  
(イ) 実用新案登録  
なし  
(ウ) その他  
なし

図1. EK(エンテロキナーゼ)遺伝子の構造

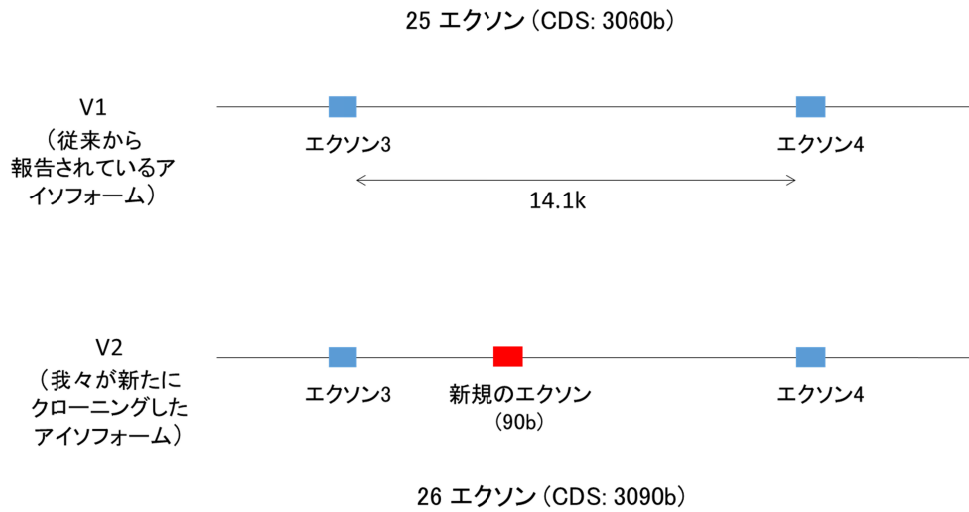


図2. 各種培養細胞における膜貫通型セリンプロテアーゼの発現  
-mRNA (PCR)-

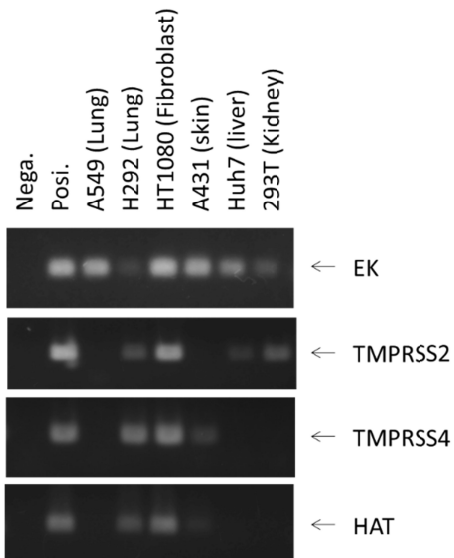


図3. 各種培養細胞におけるトリプシノーゲン遺伝子(PRSSs)の発現  
-mRNA (PCR)-

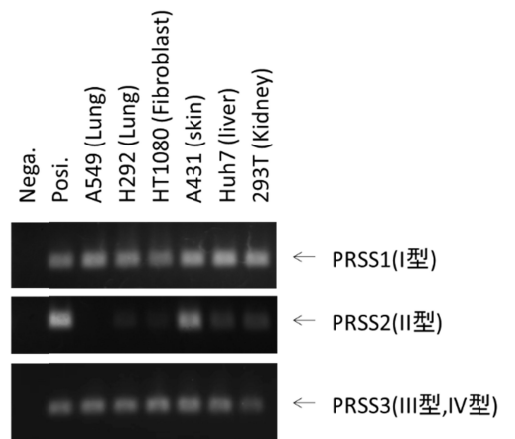


図4. EK-v1,v2を強制発現させた293T細胞

抗EK抗体

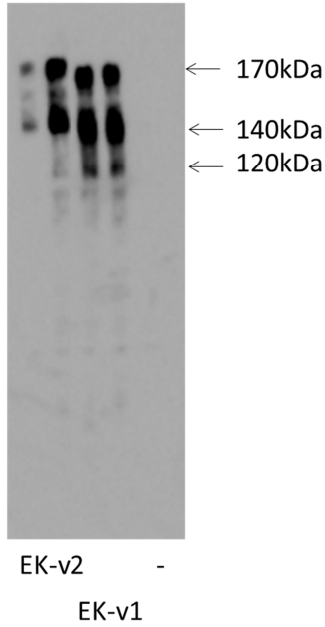


図5. EK-v1、EK-v2及びPRSS3を強制発現させた293T細胞におけるIAV-HAのプロセッシング

抗IAV-HA抗体

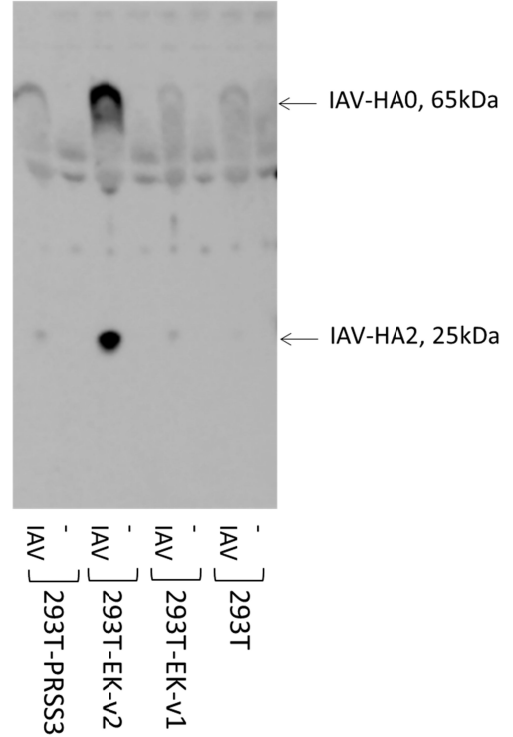


図6. EK-v1、TMPRSS2、TMPRSS4によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

GPR-pNAを基質としたトリプシン活性

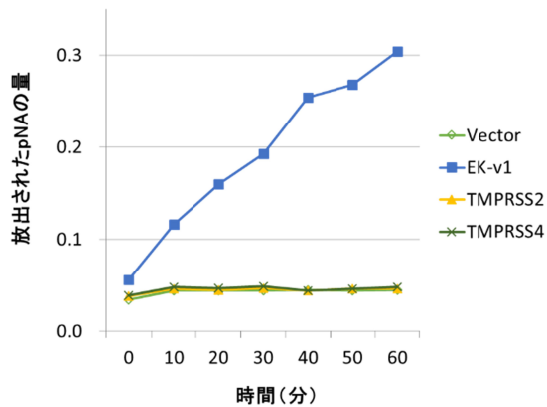


図7. EK-v1、EK-v2によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

GPR-pNAを基質としたトリプシン活性

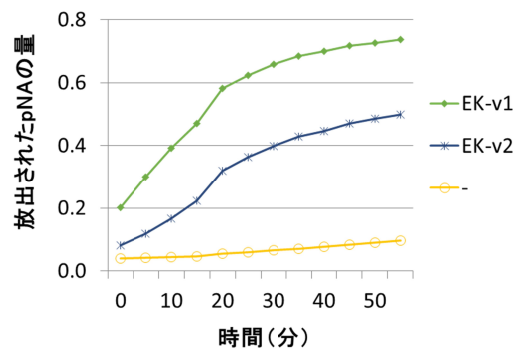


図8. *in vitro*でのIAV-HAプロセッシング

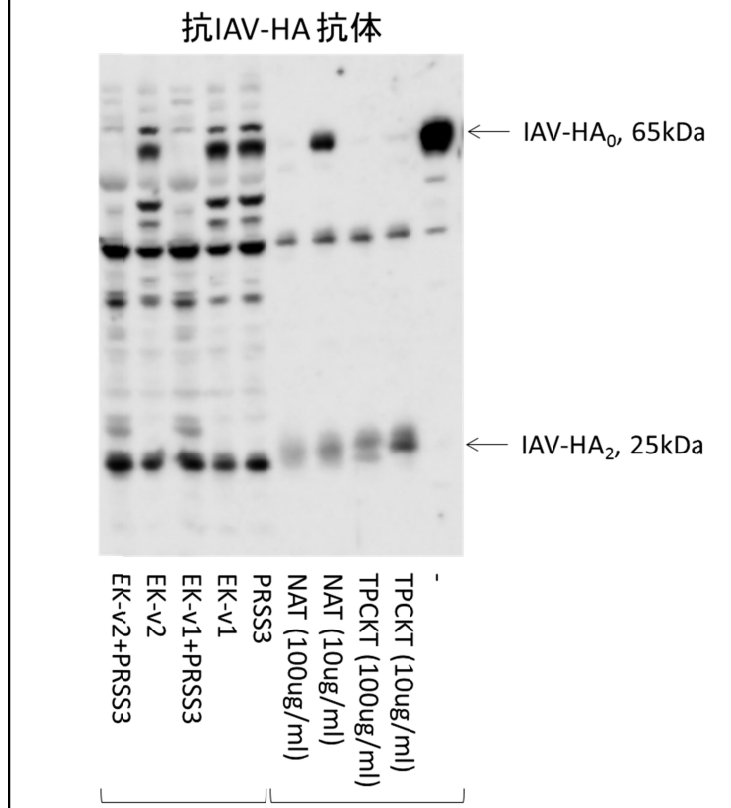
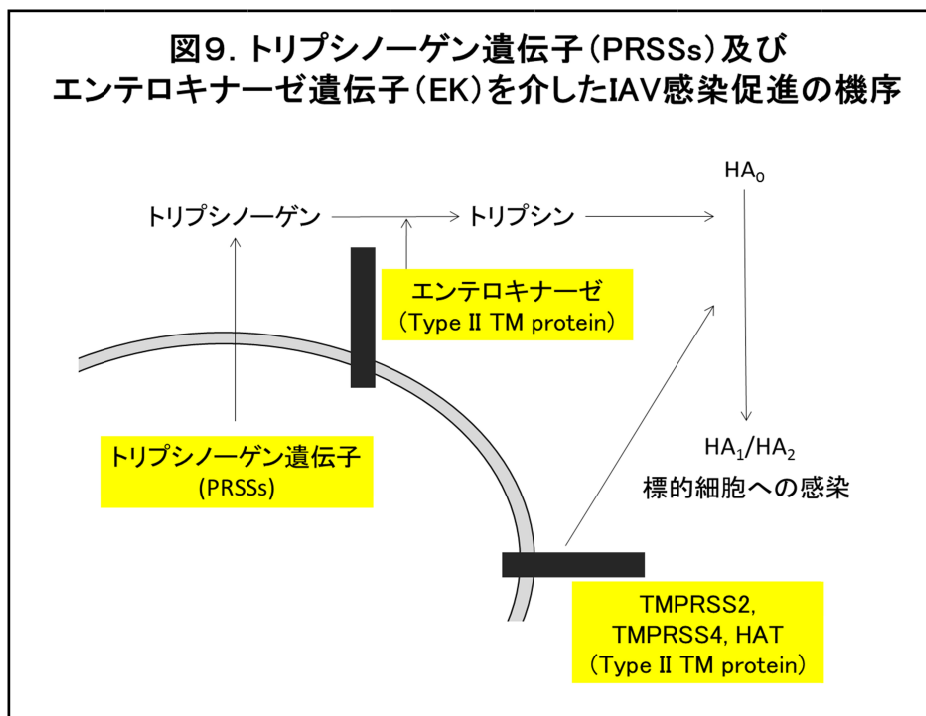


図9. トリプシノーゲン遺伝子 (PRSSs) 及び  
エンテロキナーゼ遺伝子 (EK) を介したIAV感染促進の機序



平成26年度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

**急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序**

研究分担者 高橋 悦久 ( 徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教 )  
研究協力者 Irene Lorinda Indalao ( 徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生 )

**研究要旨**

インフルエンザウイルス肺炎およびインフルエンザ脳症が進行したことによる最終的な結果として血管透過性の亢進による多臓器不全が原因である。このことは高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染でも同様であると考えられる。しかし、インフルエンザウイルス感染により血管内皮細胞の透過性亢進を引き起こす正確な分子メカニズムは解明されていない。我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にインフルエンザウイルス ( IAV ) /Puerto Rico/8/34(PR8)(H1N1) を感染させて透過性亢進のメカニズムを調べた。血管内皮においてカドヘリンと カテニンのレベルは細胞接着複合体を形成するための重要な分子であるが、IAV 感染後にタンパクレベルで カテニンの発現が減少することが明らかとなった。更に、透過性の評価の指標として transendo-thelial electrical resistance (TEER)を用いて測定したところ、血管透過性が亢進したことにより抵抗値の減少が認められた。次に、プロテアソーム阻害剤であるラクタシチンを添加すると カテニンの分解が抑制された。プロテアソームによる分解の開始段階で GSK-3 が示唆されたことから、我々は、HUVEC において GSK-3 をノックダウンしたときの カテニンの抑制の効果を調べた。その結果、IAV 感染によって誘発される カテニンの分解は、GSK-3 -ノックダウン細胞で有意に抑制された。また、カテニンを細胞にトランスフェクションすることで IAV 感染時の透過性亢進が抑制された。この結果は、IAV 感染がアドヘレンスジャンクションにおける GSK-3 を介して カテニンの分解を誘導し、血管の透過性亢進を誘導することを示唆している。更に、マウスをモデルとした動物実験においても同様で、IAV 感染後 0 日目から 6 日目の肺を経時的に調べたところ カテニンの分解と GSK-3 の活性化が確認された。これらの知見から、アドヘレンスジャンクションにおいて GSK-3 を介した カテニン分解がインフルエンザ重症化を引き起こす血管透過性亢進の重要な機構の 1 つであることが示唆された。

**A . 研究目的**

これまでにインフルエンザ脳症、多臓器不全の病態解析から、重症化は血管

内皮と各臓器で誘発される“インフルエンザ サイトカイン プロテアーゼ”サイクルが主要原因で、このサイクルを介する血管内皮細胞障害が多臓器不全の根底にあることを明らかにしてきた(*J. Infect. Dis.* 202:991-1001, 2010、*Cardiovasc. Res.* 89:596-603, 2011)。IAV 感染により血管内皮細胞の透過性が亢進するが、相互作用のメカニズムについては解明されていない。本研究では、アドヘレンスジャンクションにおける細胞間接着分子である VE カドヘリンと カテニンについて IAV 感染との関与を明らかとする。

## B . 研究方法

**感染：**(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に IAV(PR8) を MOI=1 で 1 時間感染させて、培地交換後 28 時間培養した。(2) C57BL/6CrSlc マウスに PR8 を 100 PFU で経鼻感染させて体重をモニターした。動物実験に関しては徳島大学の規定に基づき行った。

**ウェスタンブロットティング：**培養細胞及びマウス肺のホモジネートは RIPA バッファーで作製し、使用した。

**RT-PCR：**HUVEC より RNA を抽出し、One-Step RT-PCR Kit を用いて、それぞれの遺伝子発現を検出した。

## C . 研究結果

### (1) IAV 感染により、血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションにおいてカテニンが有意に減少した

アドヘレンスジャンクションにおいて重要な分子である カテニンと VE カドヘリンの発現をウェスタンブロットティングによって検出した。その結果、

カテニンの発現は非感染コントロールと比べて 24%まで低下した(図 1A)。一方、VE カドヘリンの発現に有意な変化は認められなかった。また、遺伝子発現に関しては カテニンの発現に有意な差は認められていない(図 1B)ことから、タンパク合成後にプロテアソームによる分解の可能性が示唆された。

### (2) IAV 感染細胞においてプロテアソーム阻害剤により カテニンの分解が抑制された

IAV に感染させた HUVEC 細胞にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを添加することで、カテニンの分解が抑制され、未処理と比べて 1.8 倍まで回復した(図 2)。この結果より、IAV 感染で、プロテアソームによる分解が増強されることが明らかとなった。

### (3) IAV 感染により GSK-3 が活性化される

カテニンは、活性化した GSK-3 によってリン酸化されることでユビキチン化されてプロテアソームの分解を受けるが、IAV に感染することで不活性化型である phospho-GSK-3 の発現が有意に低下(図 3)したが全体の GSK-3 の発現には有意差は認められなかった。更に、GSK-3 をロックダウンすると カテニンの発現が回復した(図 4)。これらの結果から PR8 に感染した HUVEC において、アドヘレンスジャンクションでの VE カドヘリンと カテニンの複合体形成の制御には GSK-3 が関与していることが明らかとなった。

### (4) IAV 感染マウスの肺における VE カドヘリンと カテニン及び GSK-3 の発現変化

マウスに PR8 を経鼻感染させた時、非感染コントロールと比べて 3 日目より体重の減少が認められた。また、NP 抗体で検出した肺のウイルス量は 2 日目から増加し始めて 3 日目にピークを迎えた (図 5-A)。肺における カテニンは 2 日目から 6 日目まで減少が続き、それに伴い不活性型の phospho-GSK-3 の減少が認められた (図 5-B)。

#### D . 考察

現在、一般的にノイラミニダーゼ阻害剤がインフルエンザ治療薬として使用されている。しかし、“インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼ (トリプシン、MMP-9)” サイクルを通して起こる循環不全、低酸素血症、内皮細胞における血管透過性の亢進による重症化の治療には適していない。そこで、重症化の新たな治療法のターゲットとして血管透過性亢進機序の解明を行った。血管内皮細胞では VE カドヘリンが発現しており、細胞間接着において カテニンと複合体を形成することで重要な役割を果たしている。本研究では、IAV 感染により カテニンの分解が亢進されることを明らかとし、その制御が GSK-3 の活性化により起こることを証明した (図 6)。更に GSK-3 ノックダウンにより カテニンの分解が抑制されたことから GSK-3 に対して新たな阻害剤を探索することがインフルエンザ重症化の治療につながると考えられる。

#### E . 結論

インフルエンザに感染させた HUVEC で VE カドヘリンと複合体を形成する カ

テニンが減少することが明らかとなった。IAV 感染によって カテニンのプロテアソームによる分解が亢進されたためであった。これらの結果から、VE カドヘリン- カテニンの結合がインフルエンザ重症化発症機序の一つである可能性が示唆された。ユビキチン-プロテアソーム経路の GSK-3 によって調節されることが明らかとなったことで、新たな創薬ターゲットになり得ると考えられる。

#### G . 研究発表 (平成 26 年度) 論文発表

(1) Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Hiroshi Kido; Oral Administration of Lactobacillus pentosus Strain S-PT84 Enhances Anti-Influenza Virus-Specific IgG Production in Plasma after Limited Doses of Influenza Virus Vaccination in Mice, *Journal of Vaccine & Immunotechnology*, Vol.2, Issue 1. 2015.1

(2) Hiyoshi M, Indalao I.L, Yano M, Yamane K, Takahashi E, Kido H; Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3b-mediated b-catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability, *Archives of Virology*, 10.1007/s00705-014-2270-5. 2014.11

図1 インフルエンザ感染によるアドヘレンスジャンクションの カテニンの発現変化

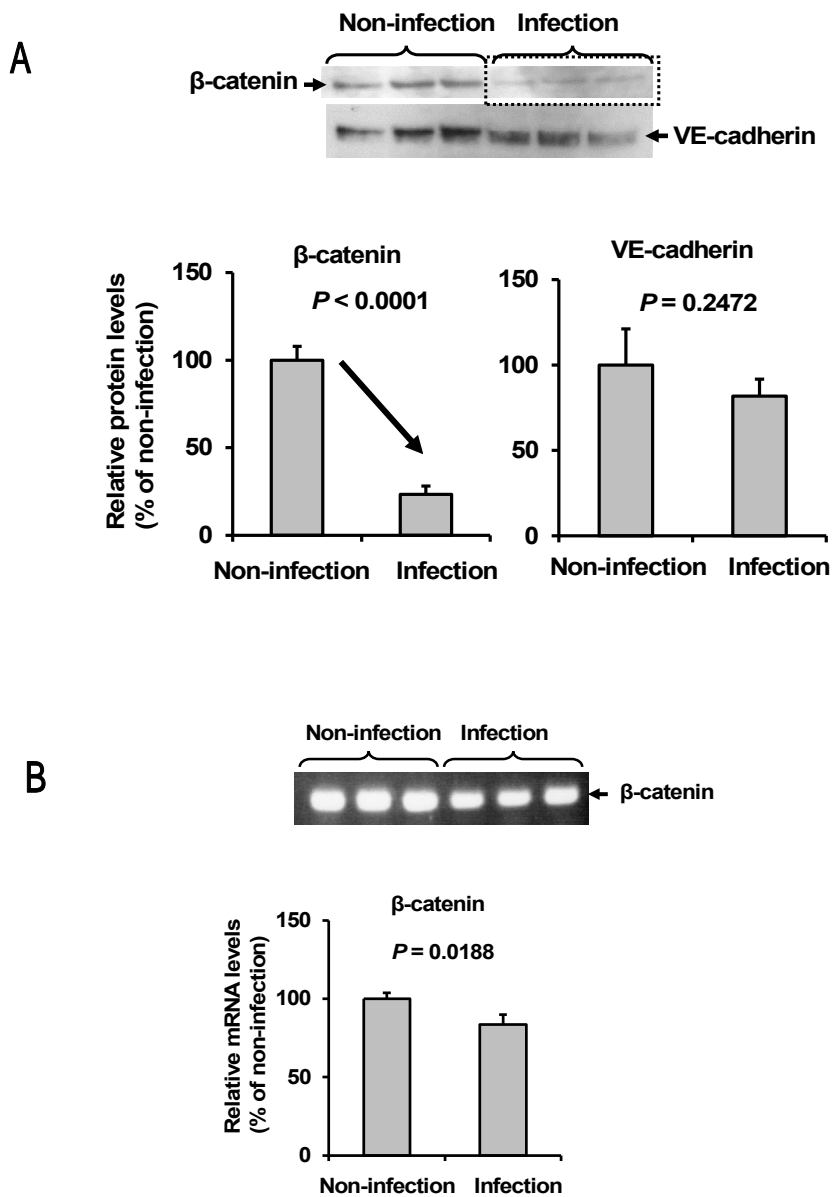




図2 プロテアソーム阻害剤による カテニンの分解抑制

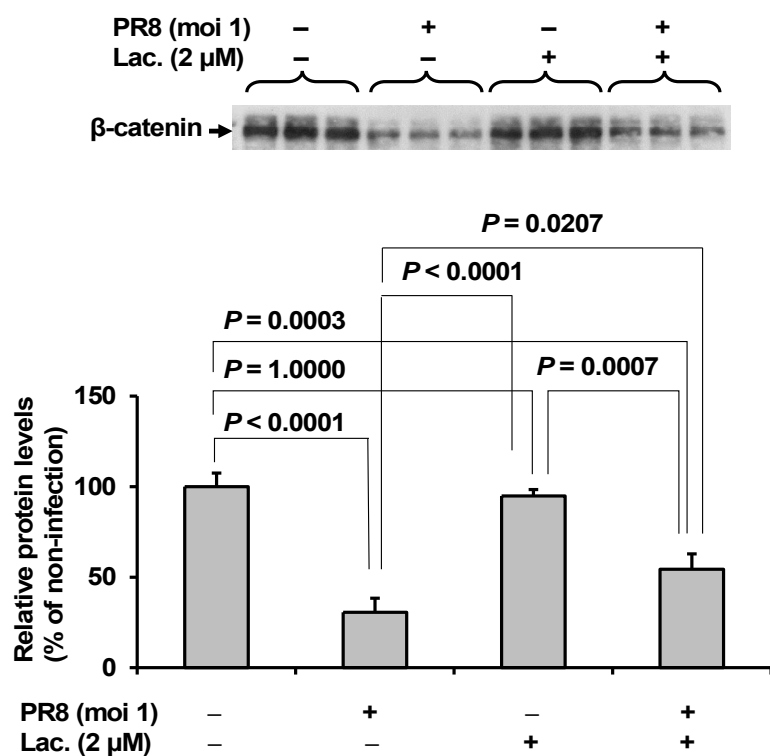


図3 インフルエンザ感染による GSK-3 の活性化

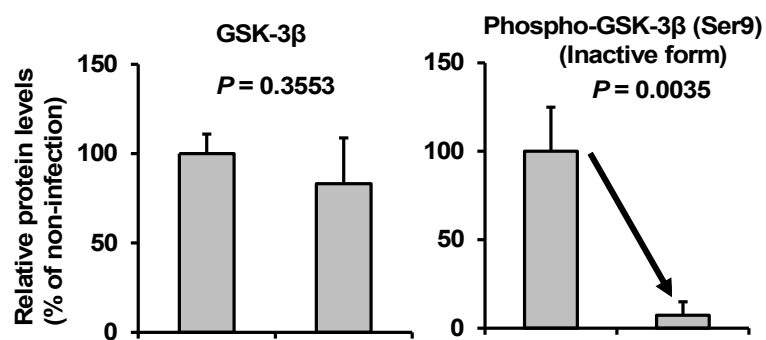
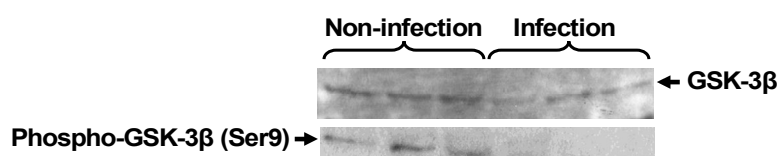


図4 GSK-3 ノックダウンによる カテニンの発現回復

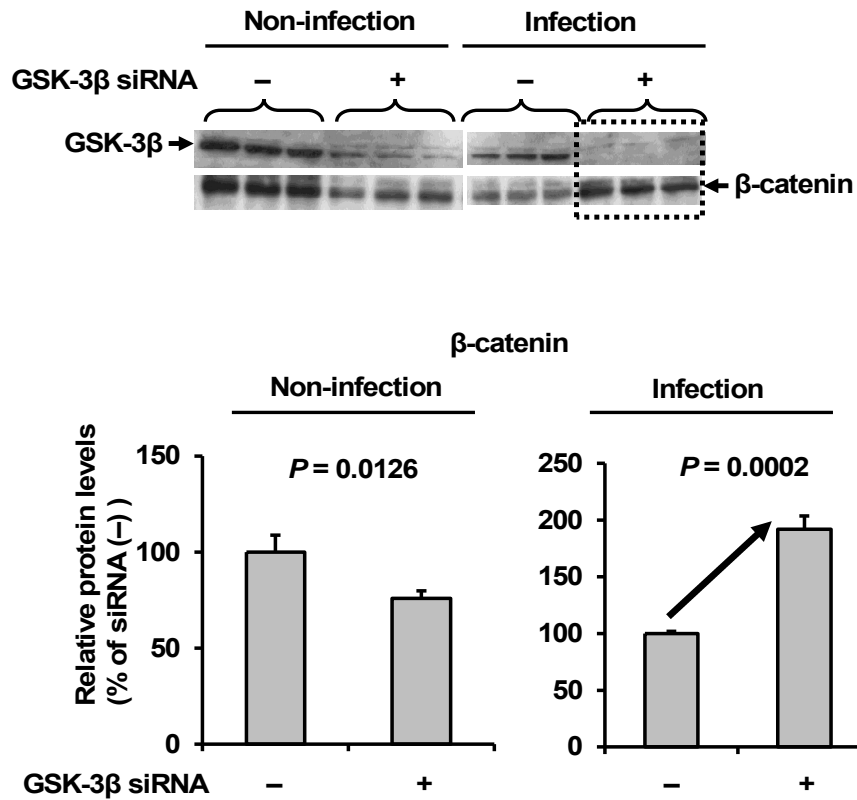
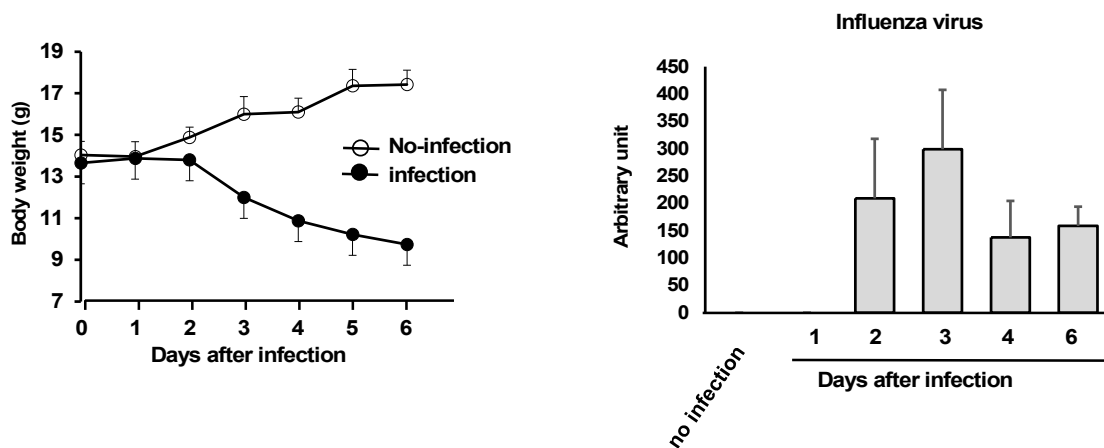


図5 インフルエンザ感染マウスの肺における VE-カドヘリンと β-カテニン及び GSK-3 の発現変化

A



B

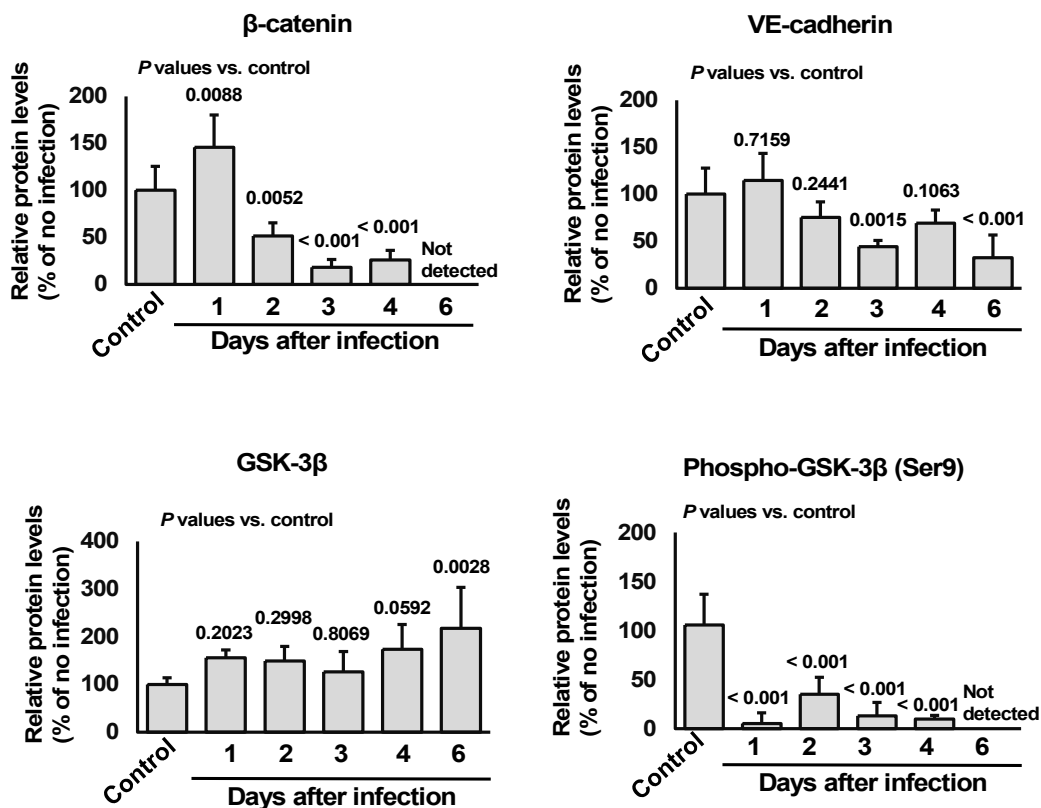
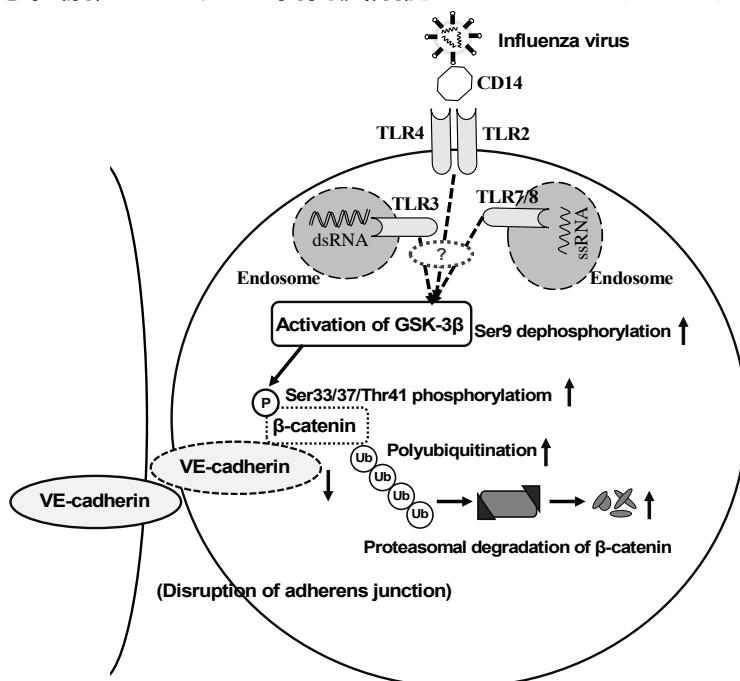


図6 急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機構





# 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

## 急性脳症の病態：急性脳症とミトコンドリア病の急性期病態の類似性について

研究分担者 久保田雅也（国立成育医療研究センター 神経内科医長）

研究協力者 寺嶋宙（国立成育医療研究センター 神経内科医員）

柏井洋文（東京大学 大学院生）

### 研究要旨

インフルエンザ脳症の病態解明のため血中 ATP、乳酸、乳酸 / ATP 比について急性脳症、熱性けいれん重積での解析を行い、病初期バイオマーカーとしての有用性の検討を行った。またミトコンドリア病における解析も行い急性脳症との病態の異同を検討した。乳酸 / ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化するパターンが確認された。また急性脳症との鑑別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映している。乳酸 / ATP 比が急性脳症急性期と種々のミトコンドリア病の患者での値と有意差がなかったことはミトコンドリアを場とする共通の energy failure が起こっている可能性を示唆する。

また通常の脳症治療に加えた早期 3 剤（VB1, VB6, L-カルニチン）投与により遅発性拡散低下をともなう急性脳症(AESD)の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加した。AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。今回の 3 剤はミトコンドリアレスキューにもなっており急性脳症とミトコンドリア病の急性期病態の類似性を示唆する。

### A. 研究目的

急性脳症は我が国の小児に多く、各種のウイルス感染症を契機として急激に発症し、遷延する意識障害を特徴とする。その臨床像は多彩で重症の病型はしばしば難治で、予後も不良である。近年臨床像に加え MRI 所見を加味して細分類が進み、急性壊死性脳症（ANE）、遅発性拡散低下をともなう急性脳症（AESD）などの病態解析がなされつつある。病初期に熱性けいれん重積との鑑別が困難で感度の高いバイオマーカーの検索が重要な課題となっている。昨年に引き続き血中 ATP、乳酸、乳酸 / ATP 比について急性脳症、熱性けい

れん重積での解析を行い病初期バイオマーカーとしての有用性の検討を行った。また各種ミトコンドリア病における解析も同様に行い急性脳症との病態の異同を検討した。

### B. 研究方法

#### ①血中乳酸 / ATP 比について

血中 ATP 測定は急性脳症急性期 20 例、熱性けいれん重積急性期 16 例、各種ミトコンドリア病 13 例に対して既報告の方法により木戸研究室において測定が行われた。乳酸は ATP 検体採取時に最も近い時刻の値を解析に用いた。

## AESD に対する早期3剤(ビタミン B1, B6, および L カルニチン) 投与

国立成育医療研究センターにおいて **2008 年 1 月から 2013 年 12 月まで**に感染を契機とした急性脳症として入院加療を行った症例をリストアップしたところ 6 年間で合計 82 名を数えた(図 2)。脳症の診断としては、インフルエンザ脳症ガイドラインを参考に、二相目も含め“初期症状発症 24 時間以降の意識障害の遷延を認めた”症例とした。基礎疾患がなく、有熱時けいれんで発症し、AESD の可能性が考慮されて発症早期より当院で対応し、結果的に急性脳症と診断された症例に限定すると(1)2008-2010 年 10 名と(2)2011-2013 年 11 名が該当した。この 21 名に関して以下を比較した。

**評価項目**：早期ビタミン B1, B6, および L カルニチン投与の有無(けいれん発症 24 時間以内から投与開始)、二相目のけいれんの有無、および画像変化(bright tree appearance, BTA)。**投与量**はビタミン B1 10mg/kg, ビタミン B6 20mg/kg, L-カルニチン 30-100mg/kg である。

### (倫理面への配慮)

研究及び研究結果の発表にあたっては、患者のプライバシー保護に十分配慮した。

## C. 研究結果

### ①乳酸 / ATP 比について

図 1 に各疾患の乳酸 / ATP 比を示す。急性脳症 20 例の急性期( $5.65 \pm 5.55$ )は熱性けいれん重積 16 例急性期( $1.65 \pm 1.01$ )よりも有意に乳酸 / ATP 比は高値であった。また急性脳症急性期の乳酸 / ATP 比はミトコンドリア病 13 例のそれ( $5.65 \pm 5.85$ )と比較し有意差は認めず。

## AESD に対する早期3剤(ビタミン B1, B6, および L カルニチン) 投与

2008-2013 年を (1)2008-2010 年と

(2)2011-2013 年に分けて比較すると通常の脳症治療に加えた早期3剤(ビタミン B1, B6, および L カルニチン)投与により AESD の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加していることがわかった。(表 1、2、図 3、4)つまり AESD の予防および軽症化に上記 3 剤投与が有効である可能性が考えられた。この 2 群に男女比や発症月齢に有意差はない。

## D. 考察

乳酸 / ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化した。また急性脳症との鑑別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映している。その値は重症例の予後と相関した。

乳酸 / ATP 比が急性脳症急性期と種々のミトコンドリア病の患者での値と有意差がなかったことはミトコンドリアを場とする共通の energy failure が起こっている可能性を示唆する。

AESD の発症の遺伝的素因として、*CPTII* や *ADORA2A* の遺伝子多型、*SCN1A* の遺伝子変異などが判明してきており、患者により発症の引き金となる病因が異なる可能性がある。今回の検討では一般的な抗けいれん薬に加えて、*CPTII* が関与する代謝障害に対する治療(ビタミン B1, L カルニチン)および *ADORA2A* に関連してはテオフィリンによりアデノシン受容体同様に抑制性の影響を受けるビタミン B6 を、間接的な効果を期待して投与を行った。ビタミン B6 に関しては、既に AESD 予防効果として推奨されており、AESD の病態の一つとされる興奮毒性に関して、グルタミン酸脱炭酸酵素を介してのグルタミン酸減少効果も期待した。

**AESD の早期治療介入**に関しては、ビタミン B6 投与、脳低温療法が報告されているが、現時点は早期診断が難しいことから、その介入効果の判断も難しい。通常の脳症治療に加えた早期3剤(VB1, VB6, L-カルニチン)投与により AESD

の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加した。AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。今回の3剤はミトコンドリアレスキューにもなっており興味深い。脳の血管内皮（脳血管関門）のミトコンドリア密度は他の臓器よりも高く、小児期の体重あたりの血管内皮のミトコンドリア密度は成人よりも高い。そのため種々の energy failure により小児の脳血管内皮は機能低下に陥りやすい。急性脳症の最初の障害はニューロンではなく血管内皮に起こるとするのが我々の仮説である。ただし厚生労働科学研究・水口班の調査結果からは、2010年までの統計では急性脳症の中で AESD の頻度が最も高かったとされているが、それ以降の疫学は不明であり、今回の結果の解釈は注意を要すると思われる。

## E. 結論

乳酸 / ATP 比は急性脳症急性期の有用なバイオマーカーの可能性がある。また急性脳症急性期の早期3剤 (VB1, VB6, L-カルニチン) 投与により AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。いずれも急性脳症の病態として特に脳血管内皮のミトコンドリア機能不全が病態と深く関連することを示唆すると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

#### 1. 論文発表

- (1) 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* 2014;36:489-95.
- (2) Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita

T, Saitsu H, Matsumoto M. Novel compound heterozygous PIGT mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. *Neurogenetics* 2014 DOI 10.1007/s10048-014-0408-y

(3) Shimada S, Shimojima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, Kubota M et al. Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. *Brain Dev* 2014 in press.

(4) Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawaguchi H, Kubota M et al. Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline. *Brain Dev* 2014 in press.

(5) Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Changes in Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Human Herpesvirus-6-Associated Acute Encephalopathy/Febrile Seizures. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* Volume 2014, Article ID 564091, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/564091>

(6) Hoshino H, Kubota M. Canavan disease: Clinical features and recent advances in research. *Pediatrics International* 2014;56:477-483.

(7) Haga N, Kubota M, Miwa Z. Hereditary sensory and autonomic neuropathy types IV and V in Japan. *Pediatrics International*. 2014 (in press)

#### 2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

**【特許取得】**

なし

**【特許出願】**

なし



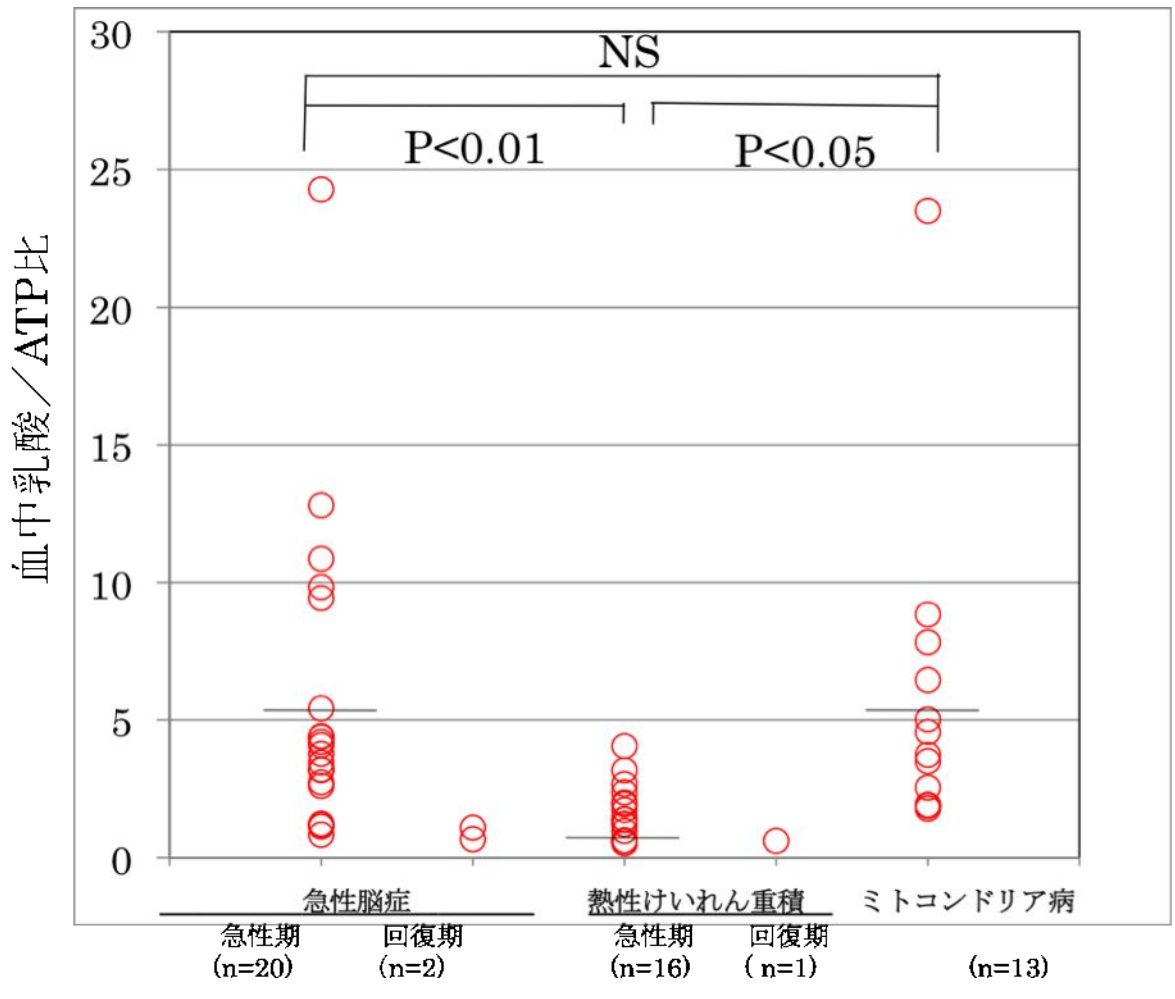


図1 各疾患の乳酸/ATP比

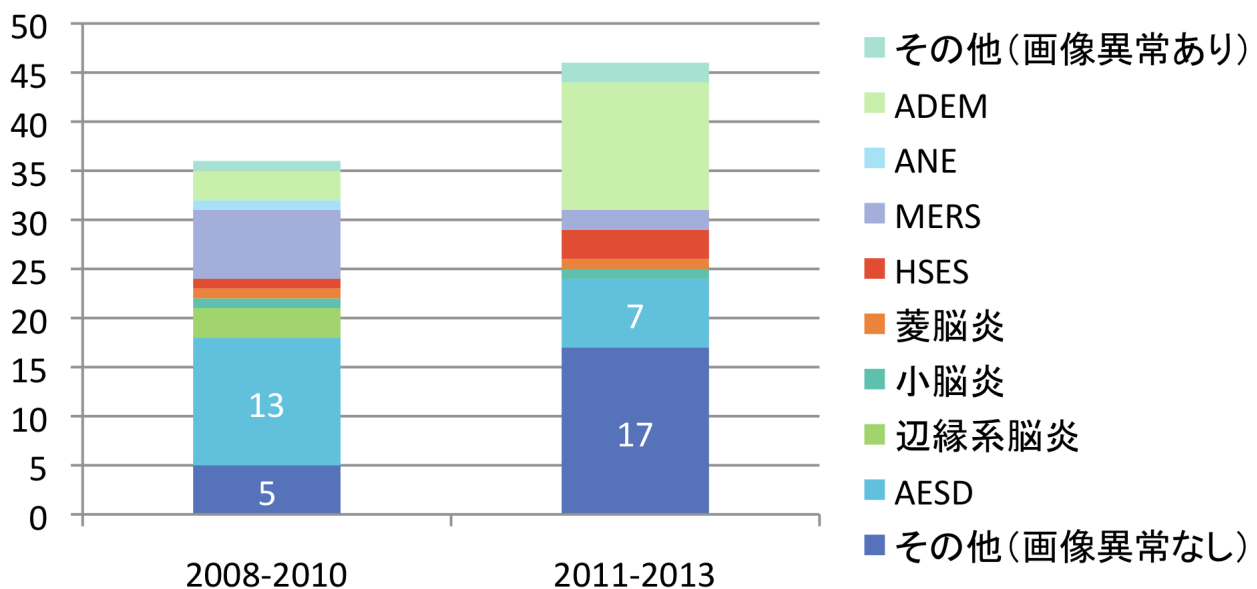


図2 成育医療研究センターにおける急性脳症・脳炎の患者数 6年間で合計82名

症例	性別	入院年	月齢(月)	感染源	けいれん	重積時間(分)	早期逸脱系酵素上昇
1	男	2008	47	flu A	status		++
2	男	2009	12	ND	status	60	++
3	女	2009	15	ND	status	120	+++
4	女	2009	19	RSV	status	>120	-
5	女	2009	21	flu A	単発	数分	-
6	女	2009	33	ND	status	20	-
7	男	2009	48	RSV	status	60	+
8	男	2009	75	fluA	status	30	+++
9	男	2010	11	HHV-6	status	50	-
10	男	2010	20	ND	status	40	++
11	男	2011	23	ND	status		++
12	男	2011	25	VZV	status	60	++
13	男	2012	18	RSV	status	>120	-
14	男	2012	21	RSV	status	50	-
15	女	2012	35	HHV-7	status	60	-
16	男	2013	11	HHV-6	status	80	+
17	男	2013	12	ND	cluster		-
18	男	2013	13	HHV-6	cluster	3回	-
19	女	2013	18	flu A	status	50	-
20	男	2013	23	HHV-6	status	30	+
21	男	2013	25	RSV	cluster		-

表1 対象となった患者のプロファイル (2008-2013年)

基礎疾患がなく、有熱時けいれんで発症し、AESDの可能性が考慮されて発症早期より当院で対応し、結果的に急性脳症と診断された症例21例。青枠はAESDであった症例。

症例	挿管管理	ステロイドパルス	発症3日以内の治療			AEDs	二相目けいれん	二相目MRI	脳症タイプ	予後		
			Vit B6	Vit B1	Lカルニチン					運動障害	知能障害	てんかん
1	+	1~	-	-	-	PB	day7	左BTA	AESD/HHE	+	-	-
2	+	-	-	-	-	PB	day4	BTA	AESD	-	-	-
3	+	1~	-	-	-	PB	day4	BTA	AESD	+	+	+
4	+	2~	-	-	1~	PB	-	-	軽症	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	day5	BTA	AESD	-	+	-
6	+	1~	-	-	-	PHT/CBZ	day4	BTA	AESD	+	+	+
7	+	-	-	-	-	PHT/CBZ	-	-	軽症	+	-	-
8	+	1~	-	-	1~	PB	-	-	軽症	+	+	-
9	+	2~	-	-	1~	PHT/PB	-	-	軽症	一過性	-	-
10	+	1~	-	-	-	PHT/PB	day5	BTA	AESD	+	+	+
11	+	1~	-	1~	1~	PB	day4	BTA	AESD	+	+	+
12	+	1~	1~	1~	1~	PHT	-	-	軽症	一過性	一過性	-
13	+	1~	1~	1~	1~	PHT	-	-	軽症	-	一過性	-
14	+	1~	1~	1~	1~	PHT/PB	-	-	軽症	一過性	-	-
15	+	1~	1~	1~	1~	PHT/PB	-	-	軽症	-	-	-
16	-	3~	1~	1~	1~	FPHT	-	-	軽症	-	-	-
17	+	1~	1~	1~	1~	FPHT	-	-	軽症	-	-	-
18	-	-	-	-	-	FPHT	-	-	軽症	一過性	-	-
19	+	1~	1~	1~	1~	PHT	-	-	軽症	-	-	-
20	+	-	1~	1~	1~	FPHT	-	-	軽症	-	-	-
21	+	2~	1~	1~	1~	FPHT	-	-	軽症	-	-	-

症例1-10：2008-2010、症例11-21：2011-2013

投与量：ビタミンB1 10mg/kg、ビタミンB6 20mg/kg、L-カルニチン 30-100mg/kg

表2 けいれん重積型2相性脳症における早期のVB1、VB6、カルニチン投与による軽症化  
BTA (bright tree appearance), PB (Phenobarbital), PHT (phenytoin), FPHT (fosphenytoin)

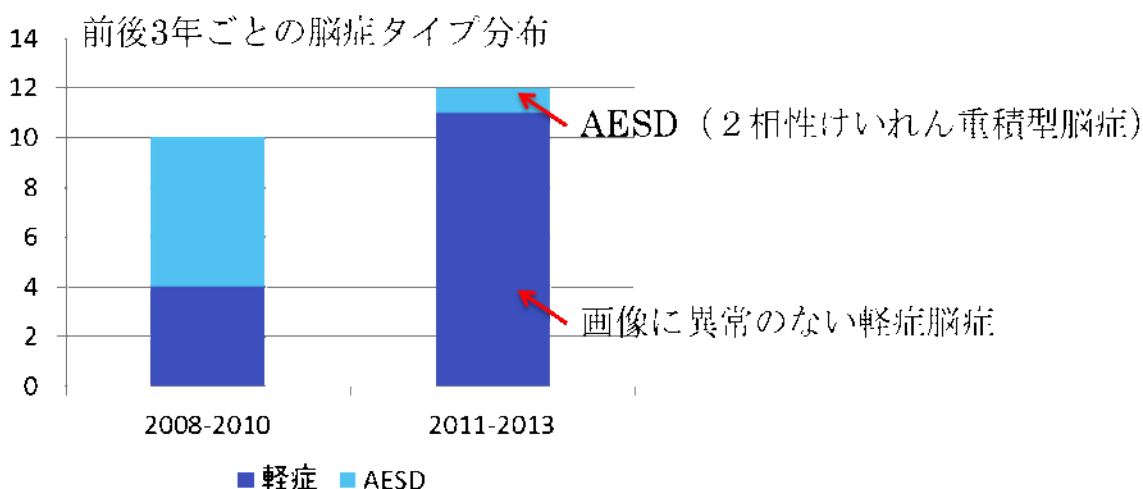


図3 2008-2010年および2011-2013年における脳症のタイプ別人数。早期3剤(VB1, VB6, L-カルニチン)投与を行った2011-2013年ではAESDが減少した。

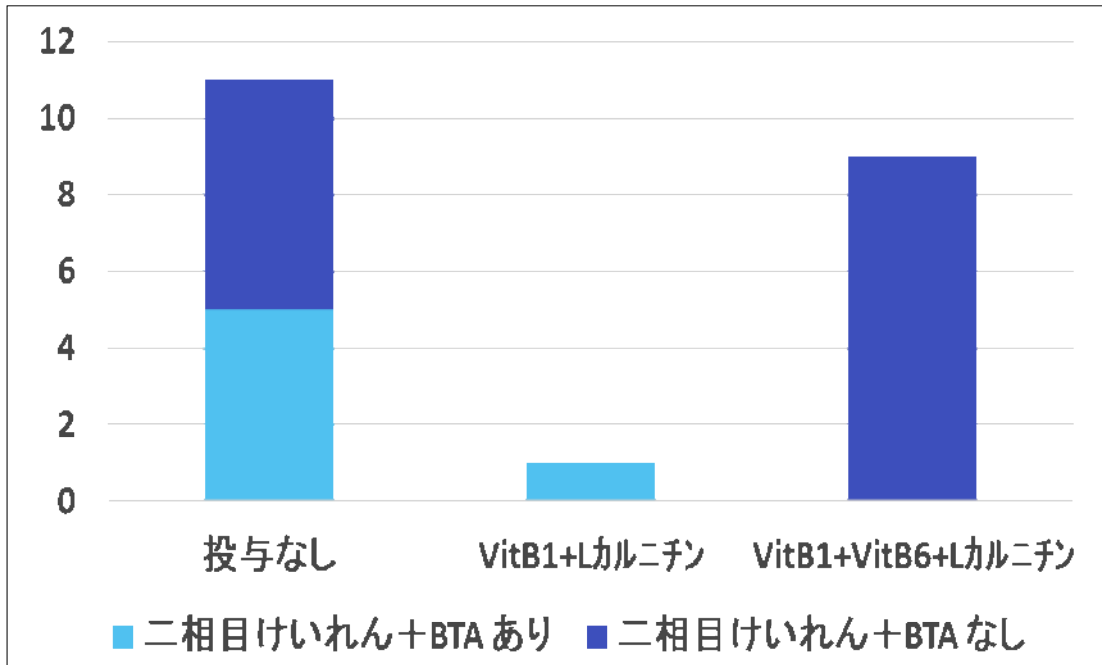


図4 薬剤投与別脳症タイプ分布。3剤投与ではAESD発症(2相目のけいれんとBTA(bright tree appearance))を認めず。

## ICU 入室患者における末梢血アデノシン三リン酸(ATP)と転帰との関係に関する研究

研究分担者 西村匡司 徳島大学大学院救急集中治療医学 教授

### 研究要旨

重症度スコアは必ずしも患者予後を反映しない。また、多くのスコアは経時的な変化をとらえることができない。簡便に重症患者の変化を経時的、客観的にとらえることが可能となれば、重症患者の治療効果を早期に把握することができ、予後改善にも役立つ可能性がある。本研究では ATP、A-LES ( ATP-lactate energy risk score ) を測定し、重症患者の予後および従来のスコアとの関連を検討した。特に予後の悪い敗血症患者についても検討した。ATP、A-LES は重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。特に感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

### 研究協力者

・小野寺 睦雄

徳島大学大学院救急集中治療医学  
講師

### A . 研究目的

集中治療を必要とする患者では、重症度を評価するためさまざまな指標が用いられる。普及率の高いものに APACHE ( acute physiology and chronic health evaluation ) II スコアや SAPS ( simplified acute physiology score ) があり、集中治療室に入室した際の重症度評価は予後と良い相関を示す。これらのスコアと予後が相関しない症例も稀ではない。わが国では APACHE II スコアが一般的であるが、これは集中治療室 ( ICU ) 入室後 24 時間の検査値やバイタルサインから算出するものである。しかし、重症患者のバイタルサインは時々刻々変化していく。簡便、客観的かつ継続的に重症度を評価できる指標があれば、患者管理に有用である。重症患者では呼

吸・循環不全のため抹消組織への酸素供給が悪化することが多い。そのような病態では ATP 産生が低下している可能性がある。しかし、末梢血における ATP 濃度の意義は明らかでない。抹消循環不全、抹消での酸素利用の悪化の指標として乳酸値が良く用いられている。この二つを組み合わせることにより、重症患者の重症度評価がより正確になることが推測される。本研究では判定することが。本研究では末梢血 ATP 濃度、乳酸値、ATP/乳酸比 ( ATP-lactate energy risk score : A-LES ) が重症患者における重症度や予後予測の指標となり得るか検討した。

### B . 研究方法

集中治療部に入室した重症患者から血液を経時的に採取し、血液ガス測定装置で pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, ヘモグロビン値とともに乳酸値を測定した。同時に ATP 測定用の血液を EDTA 含有チューブで 20 で保存した。重症度評

価としては集中治療部に入室 24 時間での APACHE II スコアを計算し用いた。(倫理面への配慮)

本研究は、徳島大学病院倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得た上で実施した。

## C . 研究結果

表 1 に対象となった患者の基本情報を示す。平均年齢、性別、基礎疾患には死亡患者と生存患者で差はなかった。死亡患者は生存患者と比較して有意に入室 24 時間での APACHE II スコアが高かった。

### 1. 入室時の ATP および A-LES

図 1 に示すように、入室時の ATP および A-LES は生存患者、死亡患者で統計学的に有意差を認めなかった。末梢血 ATP は赤血球内に存在すると考えられる。ICU に入室する患者ではヘモグロビン値が正常範囲にない場合が多い。ヘモグロビン値で ATP 値を補正することで標準化する方法をとった。ヘモグロビン 10g/dL あたりで補正した結果を図 2 に示す。入室時の ATP(ヘモグロビン補正後)および A-LES は生存患者、死亡患者で差を認めなかった(それぞれ  $0.43 \pm 0.13$  vs.  $0.40 \pm 0.28$ 、 $9.6 \pm 8.6$  vs.  $16.8 \pm 17.2$ )。

### 2. ATP 及び A-LES と APACHE II スコアの相関

図 - 3 に ATP 及び A-LES と従来利用されている APACHE II スコアの相関を示す。有意な相関を認めなかった。M 抗原間では、ルシフェラーゼ活性に変化は無く、プラトーに達していると判定した。

### 3. ATP 及び A-LES の経時的変化

ATP の特徴は経時的な変化を見る

ことができる点にある。時間経過を生存患者と死亡患者で検討した結果が表 - 2 である。入室翌日の値は ATP では差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で悪化傾向にあった。

## 4. 感染症患者での解析

ICU 入室患者で予後が悪い代表疾患として敗血症がある。感染症に伴う多臓器不全を来す疾患である。基礎疾患として感染症を有する患者で生存患者(17人)と死亡患者(4人)を比較した(図 - 4)。敗血症患者と非敗血症患者での各パラメータの経時変化を図 - 5 に示す。敗血症患者では非敗血症患者より A-LES は低い値で経過した。

ATP は生存患者と死亡患者で差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で有意に高値であった。感染症患者での予後判定予測を APACHE II スコア、ATP、A-LES で比較すると曲線下の面積は APACHE II 0.801、ATP(ヘモグロビン補正) 0.279、A-LES 0.941 で、A-LES で有意に良かった(図 - 6)。

## D . 考察

インフルエンザ感染症では重症化機序に熱不安定性フェノタイプによる ATP 産生不全が関与していると報告されている。熱中症患者の重症化にも同様の機序の関与が示唆されている。これら以外の疾患でも重症化の機序に同様に ATP 産生不全が関与している可能性は十分にある。ICU に入室する患者は呼吸・循環動態が不安定なことが多い。肺での酸素取り込み、心不全による酸素供給の問題から、組織での酸素利用が障害される。一般的に末梢組織での酸素不足を見るには嫌気性代謝の産物である乳酸を測定す

る。しかし、理論的には乳酸よりも ATP は酸素供給に対し、より鋭敏な反応を示すはずである。

今回、ICU 入室患者の ATP および A-LES の予後判定効果を検討した。ATP、A-LES とともに対象患者全員では生存患者と死亡患者で差を認めなかった。基礎疾患により酸素供給、末梢組織での酸素利用が異なることが原因と考えられる。従来用いられている重症度評価スコアである。APACHE II スコアは死亡患者で高く、ICU 入室患者の予後判定としての APACHE II スコアの精度を示す結果となった。しかし、APACHE II スコアの計算には 24 時間を要するという欠点がある。ATP 及び A-LES の測定は入室時に可能であり、その後も経過を追って変化をとらえることができる。入室時と翌日の検査値の変化を評価した結果でも生存患者と死亡患者で有意差は認めなかったが、生存患者では ATP は増加傾向、A-LES は減少傾向、死亡患者では反対の傾向が認められた。患者数を増やすことで経時的変化の意義が明らかになると期待できる。

感染症患者を対象とすると A-LES の予後判定予測値は最も良好であっ

た。敗血症は集中治療室で管理する患者群の中では予後不良の疾患である。敗血症は細菌感染が原因で臓器不全が起きる病態である。抹消組織での酸素利用障害が病態生理の一つとして考えられている。敗血症患者で発症する多臓器不全に ATP 産生不全が関与しているか可能性は高い。これが感染症患者で A-LES の予後判定予測が良好であった理由の一つと考えられる。全ての患者に当てはまるわけではないが、A-LES は簡便に測定できるとともに、経時的变化を追うことができる点で優れている可能性がある。

## **E . 結論**

重症患者で ATP、A-LES を測定した。重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。さらに感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

## **F . 健康危険情報**

なし。

**表 - 1 対象患者の基本情報**

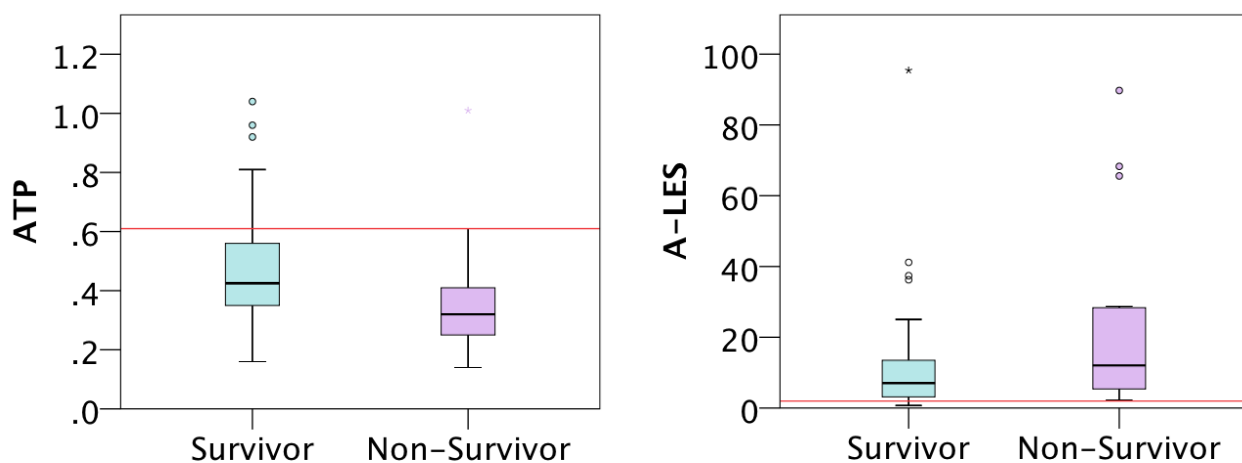
	Survivor (n=74)	Non-survivor (n=18)	P value
年齢	66.0±14.4	66.3±10.3	.918
性別 (男性:女性)	45:29	7:11	.115
APACHE II score	18.3±8.1	27.7±10.6	.000
基礎疾患			
感染症	17	4	
心原性肺水腫	10	0	
虚血性心疾患	8	1	
呼吸器疾患	6	2	
神経系疾患	8	0	
術後	22	1	
熱傷	0	3	
その他	3	7	

**表 - 2 ATP と A-LES の入室日と翌日での比較**

	ATP/Hb*10			A-LES/Hb*10		
	入室日	翌日	変化	入室時	翌日	変化
Survivor	0.43±0.13	0.47±0.15	0.05±0.14	9.6±8.6	4.6±3.3	-4.9±8.0
Non-Survivor	0.40±0.28	0.39±0.28	-0.01±0.16	16.8±17.2	23.8±35.6	7.0±20.2



**図 - 1 入室時の ATP と A-LES**



**図 - 2 ヘモグロビン値で標準化した入室時の ATP と A-LES**

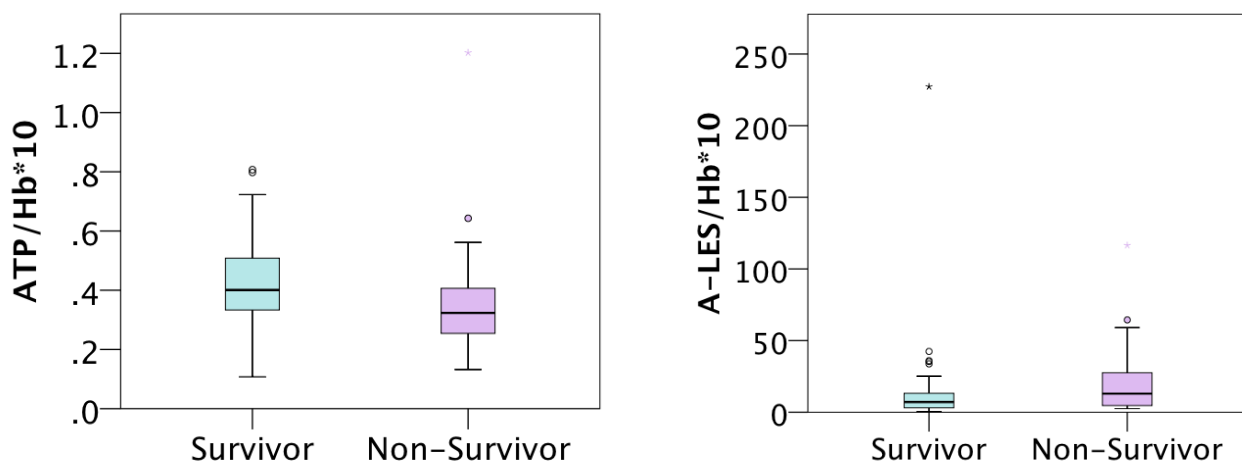


図 - 3 ATP、A-LES と APACHE II スコアの関係

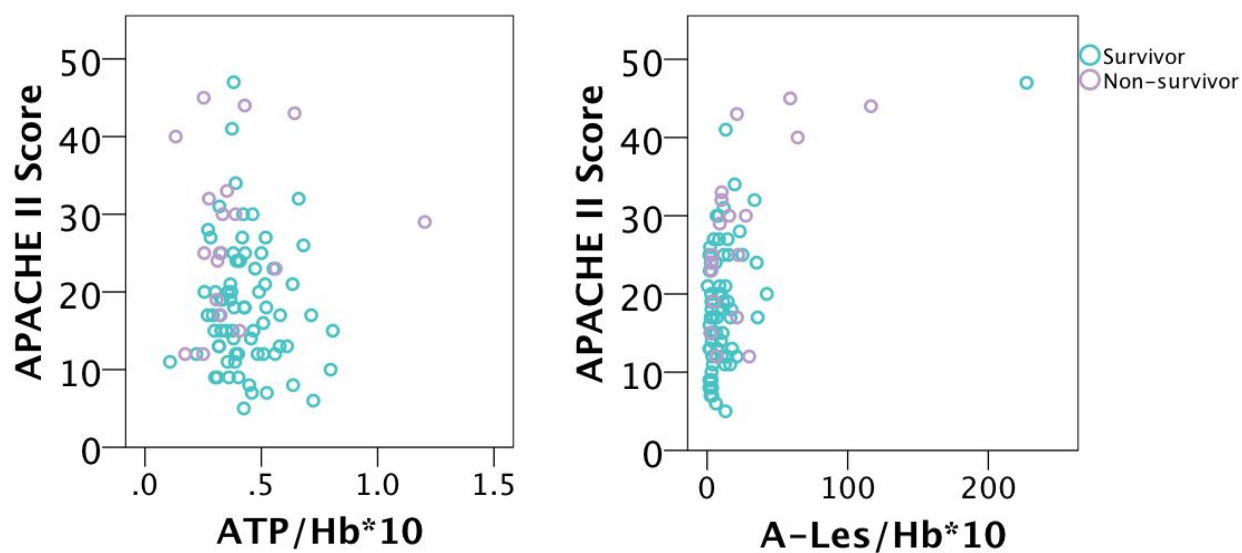


図 - 4 感染症患者のICU入室時ATPとA-LES

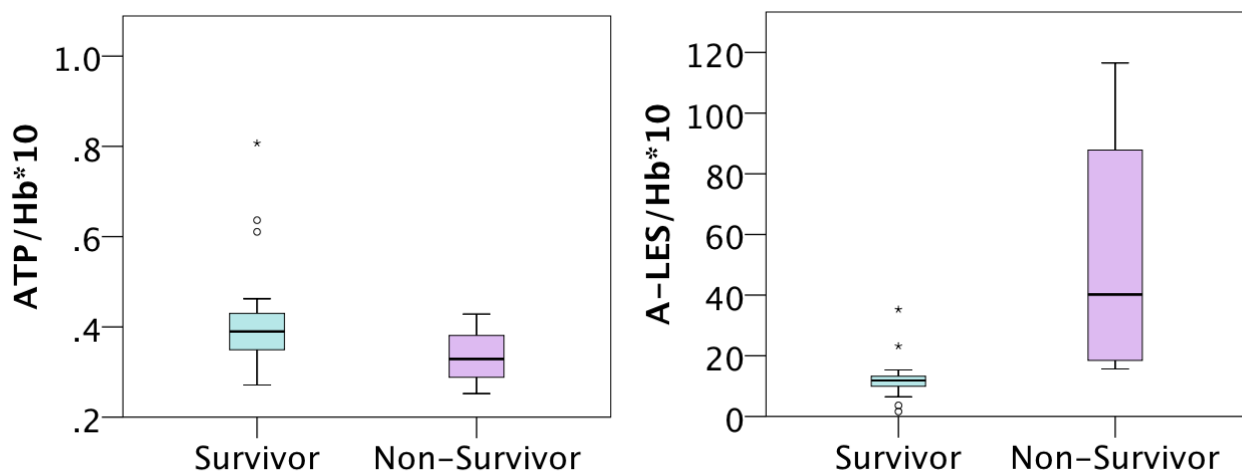


図 - 5 敗血症と非敗血症患者の A-LES 経時変化

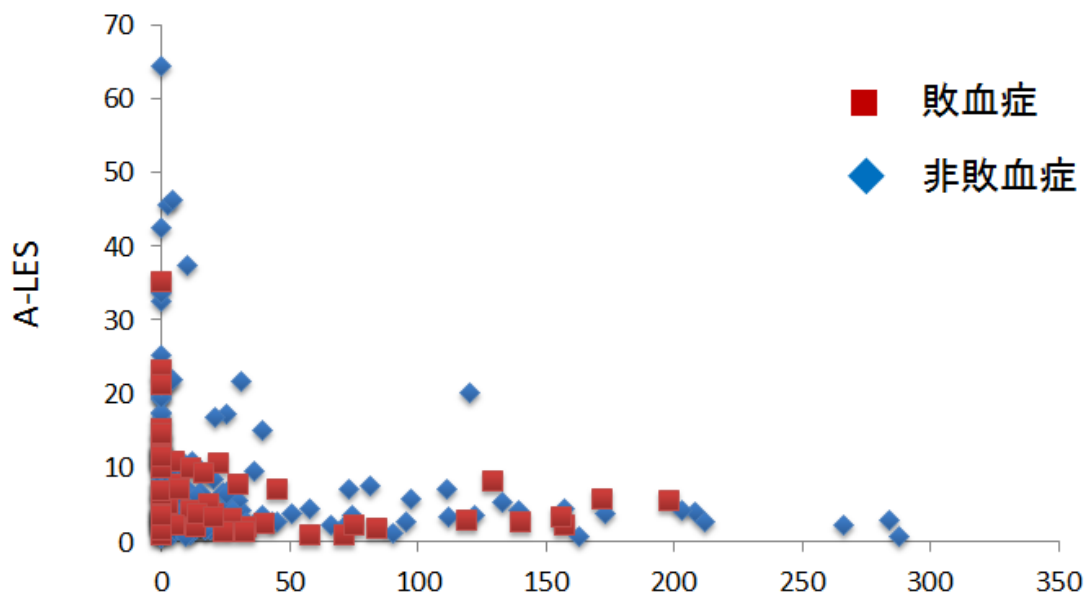
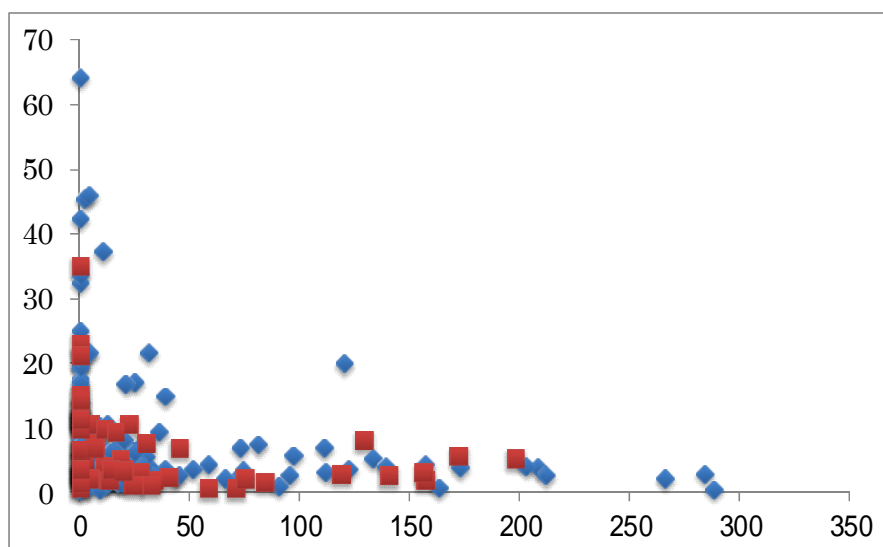
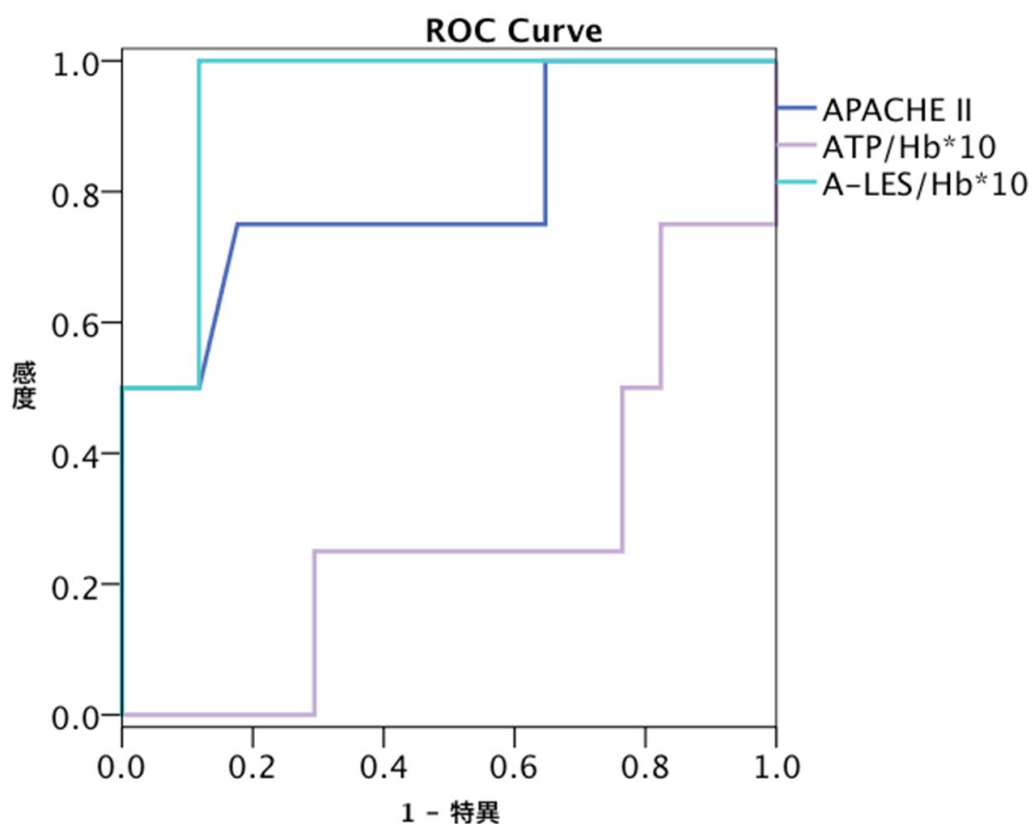


図 - 6 感染症患者の ROC 曲線



研究分担者 佐々木 信一（順天堂大学医学部附属浦安病院 呼吸器内科 准教授）

研究協力者 南條 友央太（順天堂大学医学部附属浦安病院 呼吸器内科 助教）

## 研究要旨

**概要：**インフルエンザ(IFV)脳症、重症肺炎症例をいち早く診断するバイオマーカーの解明と確立を目的とし、インフルエンザ患者血清および気管支肺胞洗浄液検体からの ATP をはじめとした各種バイオマーカー検査体制を整え、インフルエンザ患者を中心に計 23 症例において各種 marker を測定した。

### 結果：

(1) インフルエンザの中等症・重症例および各種呼吸器疾患症例（細菌性肺炎、間質性肺炎急性増悪、ARDS、薬剤性肺障害、膠原病関連肺障害等）で IL-6、MMP-9 や TNF- $\alpha$  といったサイトカインの高値が認められた。

(2) 血中の乳酸を ATP の値で割った ATP-lactate energy risk score (A-LES) の値は、正常者の既報値 (<2.00) より高値を示した。特に B 型インフルエンザ症例 2 例で著明な高値を示した。

(3) A-LES 値と各種サイトカインの比較検討では、CRP と IL-6 で弱い相関が認められた。

(4) 重症度別での検討では、重症度が高いほど、ATP 低値、A-LES 値高値の傾向が認められた。

**結論：**インフルエンザにおける A-LES 値は、他の呼吸器疾患と同等かそれ以上に上昇傾向が認められ、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。

### A. 研究目的

2009 年に勃発した新型インフルエンザ (A/H1N1pdm09) では小児における脳症 (図 1、2) ならびに ARDS に陥る重症肺炎が認められ問題となった。本プロジェクトの主任研究者の木戸らによりインフルエンザ(IFV)脳症、重症肺炎の病態には、血管内皮と臓器に誘発される IFV サイトカインプロテアーゼサイクルが深く関わっていることが解明されてきている。しかしながら、重症化する症例をいち早く診断するバイオマーカーは現在のところ不明で、診断の遅れ

が問題となっている。本年度の研究目的は、これら重症化のバイオマーカー (Flu alarmin) の測定系を確立し、早期診断に向けた戦略を構築することにある。Flu alarmin の候補として、患者末梢血の ATP-lactate energy risk score (ALES)、各種サイトカイン等を測定し、その実用性の検証を行った。

### B. 研究方法

患者の鼻腔もしくは咽頭ぬぐい棒検体からインフルエンザ迅速キットで検査し、インフルエンザと診断された症例を対象に、同意を

得られた患者より血液もしくは肺胞洗浄液を採取し検査を施行した。ATP の測定は、和光純薬工業株式会社の ATP 測定キット (AMERIC-ATP Kit) を用いて、患者検体 (血液・気管支肺胞洗浄液) から測定。同時に採取した検体から各種検査 (アルブミン、グルコース、乳酸、LDH、尿酸、ケトン体、トリプシン、CRP、IL-6、IL-33、MMP-9、TNF-等) を測定した。具体的には、ATP は当院で患者検体から ATP 抽出溶液を作成し凍結保存後、SRL 社に委託してルミノメーターで測定。同時に採取した血清から、他の項目も SRL 社に委託し測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、順天堂大学医学部附属浦安病倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得た上で実施した。

#### C. 研究結果

当院の倫理委員会に諮り、本研究 (浦倫 24 - 43 号:「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究:新規診断・治療に関する提案と検証」) は承認された。これを元に、計 23 例のインフルエンザ患者等から同意を得、患者血液検体から各種 marker を測定した。検討対象は A 型インフルエンザ: 5 例、B 型インフルエンザ: 3 例、対称として各種呼吸器疾患: 細菌性肺炎: 4 例、間質性肺炎急性増悪: 5 例、PCP: 1 例、CVD-IP: 2 例、過敏性肺炎: 1 例、薬剤性肺炎: 1 例、放射線肺炎: 1 例で検討した (表 1)。

多くの症例で IL-6、MMP-9 や TNF- といったサイトカインの高値が認められた (図 1)。

血中の乳酸を ATP の値で割った ATP-lactate energy risk score (A-LES) の

値は、正常者の既報値 (<2.00) より高値を示した。特に B 型インフルエンザ症例 2 例で著明な高値を示した (値: 91.7、40.4) (図 1, 3)。

A-LES 値と各種サイトカインの比較検討では、CRP と IL-6 で弱い相関が認められた (図 2)。

重症度別での検討では、重症度が高いほど、ATP 低値、A-LES 値高値の傾向が認められた (図 4)。

#### D. 考察

Chida らは、ICU 入室した症例に対して、血中 ATP と乳酸値を測定し、その比である Lactate/ATP Ratio (A-LES 値) が real time の予後因子として有用であることを報告した。(Chida J, et al. Blood lactate/ATP ratio, as an alarm index and real-time biomarker in critical illness. PLoS One 2013; 8: e60561.) 本研究におけるインフルエンザ患者の A-LES 値は、他の呼吸器疾患と同等かそれ以上に上昇傾向が認められ、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。今回の検討では、症例数が少なく、正常コントロールが取られていないという limitation がある。今後、検討症例を増やすと共に、健常者のコントロールも確認し、詳細に解析予定である。

#### E. 結論

血中 ATP 値、ならびに乳酸値との比である A-LES 値は、インフルエンザのバイオマーカーとして、その有用性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

## (ア) 論文発表

1. K. Tajima, K. Miura, T. Ishiwata, F. Takahashi, M. Yoshioka, K. Minakata, A. Murakami, **S. Sasaki**, S. Iwakami, T. Annoura, M. Hashimoto, T. Nara, K. Takahashi. Sex hormones alter Th1 responses and enhance granuloma formation in the lung. *Respiration* 2011; 81: 491-8.
2. K. Muraki, R. Koyama, Y. Honma, S. Yagishita, T. Shukuya, R. Ohashi, F. Takahashi, K. Kido, S. Iwakami, **S. Sasaki**, A. Iwase, K. Takahashi. Hydration with magnesium and mannitol without furosemide prevents the nephrotoxicity induced by cisplatin and pemetrexed in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease* 2012; 4: 562-8.
3. T. Mori, K. Tajima, M. Hirama, T. Sato, K. Kido, S. Iwakami, **S. Sasaki**, A. Iwase, K. Shiomi, M. Maeda, O. Hino, K. Takahashi. The N-ERC index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma. *Journal of thoracic disease* 2013; 5: 145-8.
4. O. Nagashima, R. Ohashi, Y. Yoshioka, A. Inagaki, M. Tajima, Y. Koinuma, S. Iwakami, A. Iwase, **S. Sasaki**, S. Tominaga, K. Takahashi. High prevalence of gene abnormalities in young patients with lung cancer. *Journal of thoracic disease* 2013; 5: 27-30.
5. N. Nagano, Y. Nagano, M. Toyama, T. Nakazawa, **S. Sasaki**, K. Shibayama, Y. Arakawa. Successful detection of blaNDM-1-harboring but modified Hodge test-negative *E. coli* by modified SMA-Disk method, and first characterization of XDR-klebsiella pneumonia harboring blaNDM-1 and/or blaOXA-181 from a foreigner visited to Japan. *Jpn J Infect Dis* 2015; Manuscript under review.
6. **S. Sasaki**, Y. Yoshioka, R. Ko, Y. Katsura, Y. Namba, T. Shukuya, K. Kido, S. Iwakami, S. Tominaga, K. Takahashi. Diagnostic significance of cerebrospinal fluid EGFR mutation analysis for non-small cell lung cancer patients harboring an active EGFR mutation with leptomeningeal metastasis following gefitinib therapy failure. *Respir Investig* 2015; Manuscript under review.
7. 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 例における歯周病細菌 PCR 検査の臨床的意義の検討. *日本呼吸器学会雑誌* 2013; 2: 79-84.
8. 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. *Nocardia wallacei* 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* 2013; 34: 759-60.
9. 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* 2013; 2: 607-11.
10. 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骨軟骨形成症の 1 例. *気管支学* 2014; 36: 73-7.
11. 井上貴昭, 中澤武司, 麻生恭代, 成田久美, 秋田美佳, 中村美子, 石井幸, **佐々木信一**, 田中裕. 多職種 ICT ラウンドがもたらす効果について. *日臨救医会誌* 2014; 17: 25-31.

## (イ) 学会発表

1. 高 遼, **佐々木 慎一**, 松野 圭, 石森 絢子, 南條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰子, 富永 滋, 高橋 和久: Fexofenadine は EGFR TKI 投与に伴う interstitial lung disease 発症を抑制する. 第 53 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2013.04.19
2. 石森 絢子, **佐々木 慎一**, 松野 圭, 南條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰子, 中沢 武司, 富永 滋: 幼少期に発症した気管支拡張症の経過観察中に、喀痰培養で *Aspergillus lentulus* を検出した一例. 第 87 回日本感染症学会学術集会, 2013.06.05
3. 笹野仁史, 吉岡泰子, 松野 圭, 石森絢子, 南條友央太, 牧野文彦, 吉岡正剛, **佐々木慎一**, 富永 滋: 早期の PMX-DHP を含む集学的治療を行った amyopathic dermatomyositis 合併急速進行性間質性肺炎の 1 例. 第 205 回日本呼吸器学会関東地方会, 2013.07.13
4. 井上 貴昭, 中沢 武司, 麻生 恭代, 成田 久美, 秋田 美佳, 石井 幸, 田中 裕, 南條 友央太, 大日方 薫, **佐々木 慎一**, 堀 賢: ICU が抱える感染症の諸問題 救命センターに発端をなす 2 剤耐性 *Acinetobacter Baumannii* アウトブレイクとその制御過程. 第 61 回感染症学会東日本地方会, 2013.10.10
5. Yasuko Yoshioka, **Shinichi Sasaki**, Kei Matsuno, Ayako Ishimori, Yuta Nanjo, Humihiko Makino, Keiko Muraki, Shigeru Tominaga, Kazuhisa Takahashi: Two Cases Of Rapidly Progressive Interstitial Pneumonia Associated With Clinically Amyopathic Dermatomyositis Successfully Treated With Early Intensive Therapy. 18th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama, 2013.11.12
6. 南條友央太, **佐々木慎一**, 中澤武司, 木下綾子, 関口康宣, 成田久美, 岩崎沙奈美, 飯田美奈子, 月山智美, 古田あずさ, 金森由和, 玉野知佐, 伊藤友美, 鈴木俊介, 唐島孝彰, 米山桂一, 富永 滋: 当院における ART 導入した HIV 感染症 21 症例の検討. 第 27 回日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20
7. 木下綾子, **佐々木慎一**, 中沢武司, 南條 友央太, 高森建二, 須賀 康: 順天堂大学浦安病院における過去 10 年間の新規 HIV 感染者にともなった皮膚症状の検討. 第 27 回日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20
8. 村木 慶子, 松野 圭, 小池 建吾, 推名 健太郎, 朝尾 哲彦, 本間 裕一郎, 宿谷 威仁, 柴山 里奈, 小山 良, 嶋田 奈緒子, 木戸 健治, **佐々木 慎一**, 富永 滋, 高橋 和久: 順天堂大学におけるクリゾチニブの使用経験. 第 54 回日本肺癌学会総会, 東京, 2013.11.22
9. 長野則之, 長野由紀子, 外山雅美, **佐々木慎一**, 中澤武司, 堀 賢, 柴山恵吾, 荒川宜親: NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ, OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の出現. 第 25 回日本臨床微生物学会総会, 名古屋, 2014.02.01
10. 中村美子, 中澤武司, 秋田美佳, 成田 久美, 井上貴昭, 大日方薫, **佐々木慎一**: 選択培地を用いた *Acinetobacter* の環境リザーバーに関する環境調査. 第 29 回日本環境感染学会総会, 品川, 2014.02.15
11. 松岡遊貴, 吉岡泰子, 松野圭, 推名健太郎, 鈴木洋平, 南條友央太, 村木慶子, **佐々木慎一**, 二川俊郎, 富永 滋: リンパ管シンチと胸腔鏡により漏出部位を確認した乳糜胸の 1 例. 第 208 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2014.02.22
12. 中澤武司, 南條友央太, 井上貴昭, **佐々木慎一**, 西田香南, 大出恭代, 三澤 成



毅, 横山栄二, 菊池 俊: 肝膿瘍より分離された *Desulfovibrio desulfuricans* の 1 例. 第 44 回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術講演会, 那覇, 2014.02.22

13. 吉岡泰子, 松野 圭, 推名健太郎, 鈴木洋平, 南條友央太, 村木慶子, **佐々木信一**, 富永 滋: Bepridil が原因と考えられた薬剤性間質性肺炎の 3 例. 第 54 回日本呼吸器学会総会, 大阪, 2014.04.25

14. 鈴木洋平, 南條友央太, 推名健太郎, 松野 圭, 村木慶子, 吉岡泰子, **佐々木信一**, 富永 滋: 若年女性で緑膿菌と *M.kansasii* 共感染により肺膿瘍を形成した一例. 第 209 回日本呼吸器学会関東地方会, 幕張, 2014.05.24

15. **佐々木信一**, 南條友央太: インフルエンザウイルス感染症におけるバイオマーカーの検討. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014.10.31

16. 南條友央太, **佐々木信一**: 脊椎への直接浸潤をきたした菌球型肺アスペルギルス症の一例. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014.10.31

17. 推名健太郎, **佐々木信一**, 宿谷威仁, 松野 圭, 堤 建男, 栗山祥子, 南條友央太, 村木慶子, 吉岡泰子, 長岡鉄太郎, 富永 滋, 高橋和久: EML4-ALK 陽性非腺癌非小細胞肺癌に対するクリゾチニブ投与の 4 症例の検討. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.14

18. 推名健太郎, 高橋史行, SFariz Nurwidya, 小林 功, 宿谷威仁, 村上明子, 朝尾哲彦, 金丸良太, 柳下薫寛, 加藤元康, 村木慶子, 大橋里奈, 小山 良, 高橋元美, 嶋田奈緒子, 吉岡泰子, **佐々木信一**, 富永 滋, 高橋和久: 非小細胞肺癌の EGFR-TKI 耐性獲得における ZEB1 の発現検討. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.16

19. 村木慶子, 吉岡泰子, 鎌崎恵理子, 推名

健太郎, 松野 圭, 栗山祥子, 南條友央太, **佐々木信一**, 富永 滋: EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における EGFR-TKI 耐性獲得後の 2 次変異検索の有用性. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.16

20. 岸井 絢, 吉岡泰子, 推名健太郎, 荒野直子, 関本康人, 栗山祥子, 南條友央太, 村木慶子, **佐々木信一**, 富永 滋: 癌性髄膜炎に対し、VP shunt と WBRT、erlotinib 投与を施行し長期生存を得た EGFR 陽性肺線癌の一例. 第 212 回日本呼吸器学会関東地方会, 横浜, 2014.11.22

21. **佐々木信一**, 南條友央太, 中澤武司, 木下綾子, 成田久美, 岩崎沙奈美, 飯田美奈子, 月山智美, 古田あずさ, 金森由和, 玉野知佐, 伊藤友美, 鈴木俊介, 唐島孝彰, 米山桂一: 声帯部カポジ肉腫の生検時にキシロカインショックを生じ、治療に難渋した全身性カポジ肉腫合併 AIDS の一例. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.03

#### (ウ) 著書

1. **佐々木信一**. がん性髄膜炎に対する治療戦略. 編集: 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 Practical Treatment. 東京: Medical View 社, 2014; 181-5.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

(ア) 特許取得

なし

(イ) 実用新案登録

なし

(ウ) その他

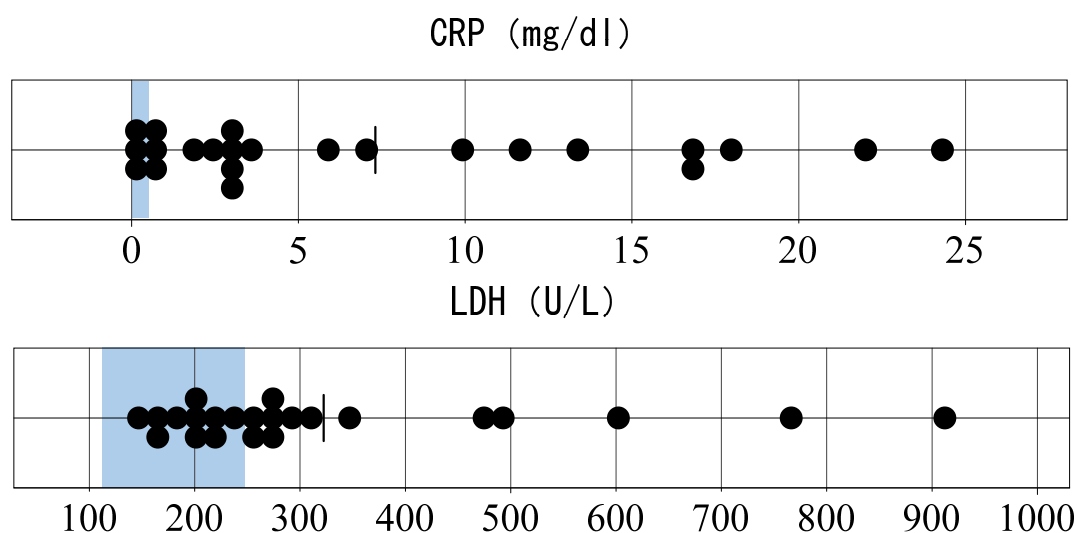
なし

表 1. 患者背景

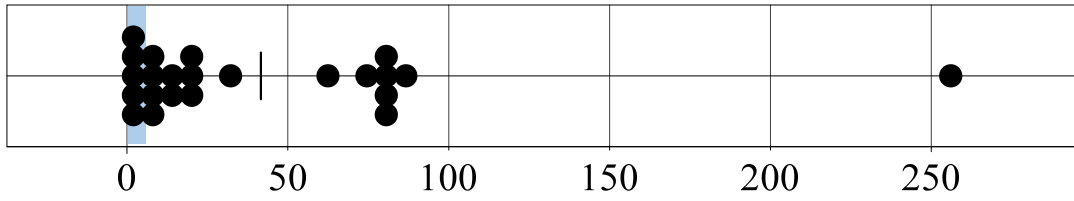
No	Gender	Age	duration from onset	Diag	外来・入院	*severity	temp	Comobities	Outcome
1	F	31	3	A型インフルエンザ	入院	M	39.7	BA	alive
2	F	28	1	A型インフルエンザ	外来	M	38.2	-	alive
3	M	35	4	A型インフルエンザ	外来	M	39.4	-	alive
4	M	31	3	A型インフルエンザ	外来	M	38.7	-	alive
5	F	19	2	A型インフルエンザ	外来	M	38.7	-	alive
6	M	80	2	B型インフルエンザ	入院	I	39.1	LK	alive
7	M	74	9	B型インフルエンザ	入院	I	38.3	COPD	alive
8	F	23	1	B型インフルエンザ	外来	M	38.5	-	alive
9	M	64	7	肺炎球菌性肺炎	外来	M	?	-	alive
10	M	66	9	肺炎球菌性肺炎	外来	M	36.7	-	alive
11	F	65	12	重症肺炎球菌性肺炎	入院	S	37.3	-	alive
12	M	80	1	インフルエンザ桿菌肺炎、COPD急性増悪	外来	S	37.9	COPD	alive
13	M	70	12	IPF急性増悪	外来	M	36.9	RA	alive
14	M	83	5	IPF急性増悪	入院	S	37.1	IP	alive
15	M	80	20	IPF急性増悪	入院	VS	36.7	IPF	dead
16	M	70	7	fNSIP急性増悪	入院	I	36.4	fNSIP	alive
17	M	69	2	CPFE急性増悪(術後)	入院	VS	?	CPFE	dead
18	F	67	5	PCP、ARDS	入院	VS	36.6	fNSIP	dead
19	M	74		CVD-IP	外来	M	36.5	IP	alive
20	F	67	19	MPO-ANCA陽性間質性肺炎	外来	I	37	IP	alive
21	M	70		過敏性肺炎	外来	M	36.8	-	alive
22	M	69	10	薬剤性好酸球性肺炎	入院	I	38.3	-	alive
23	M	80		放射性肺炎	外来	I	?	LK	alive

\*Severity: M; mild, I; intermediate, S; severe, VS; very severe

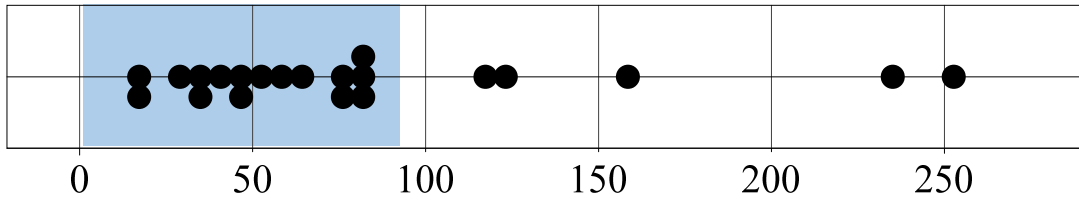
図 1. 各種 marker 一覧



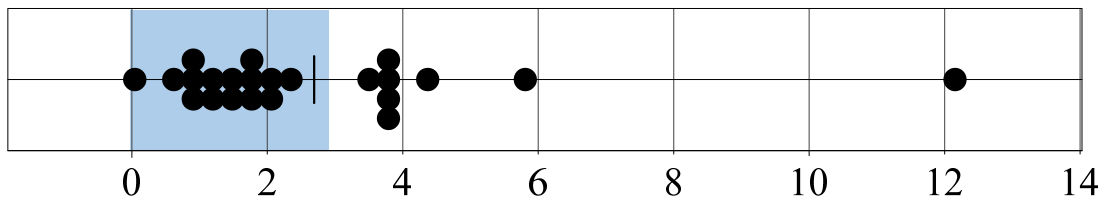
IL-6 (pg/ml)



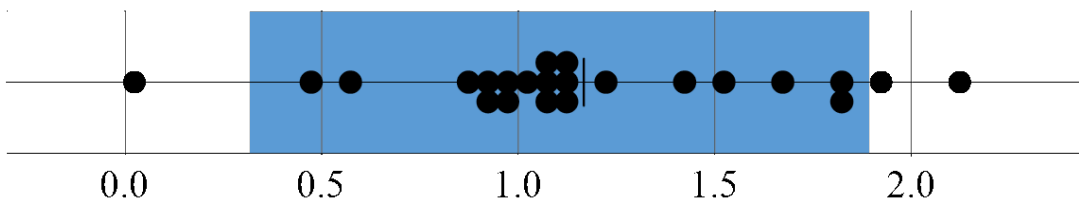
MMP-9 (ng/ml)



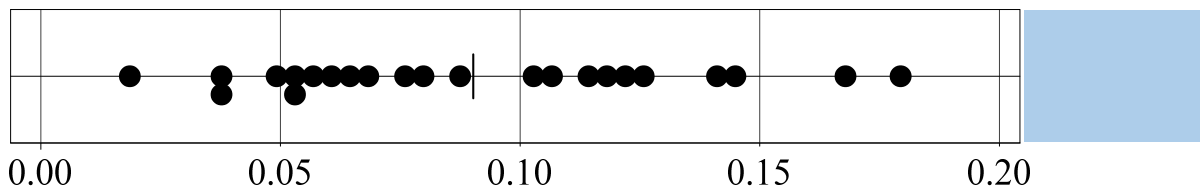
TNF- $\alpha$  (pg/ml)



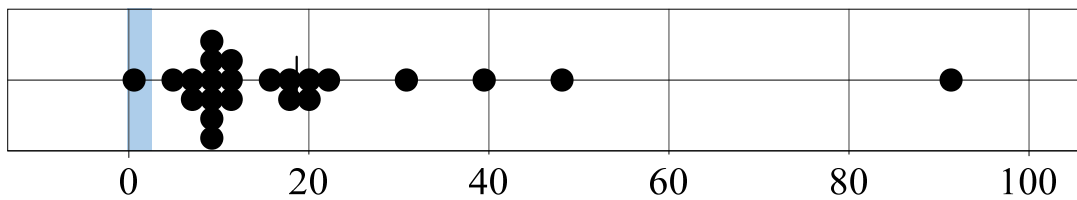
乳酸 (mmol/L)



ATP (mmol/L)

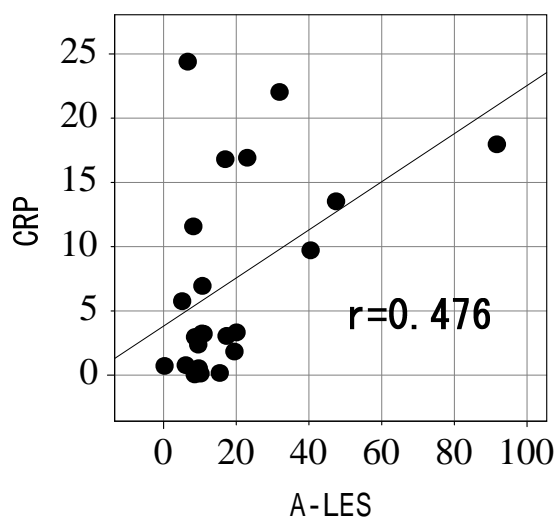


A-LES

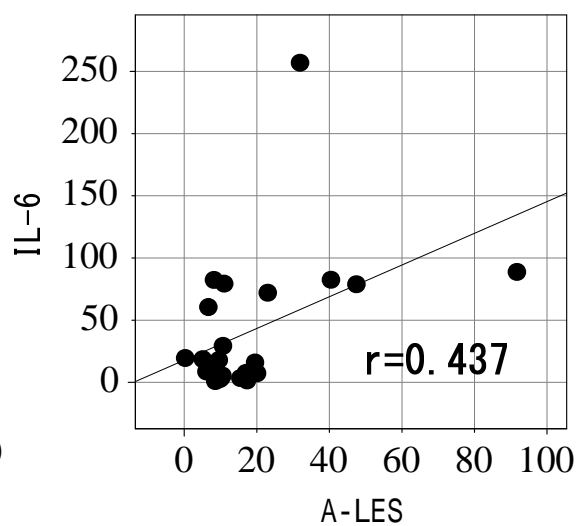


\*A-LES = 血中ATP値 / 血中乳酸値

図 2. 各種 marker と A-LES の相関

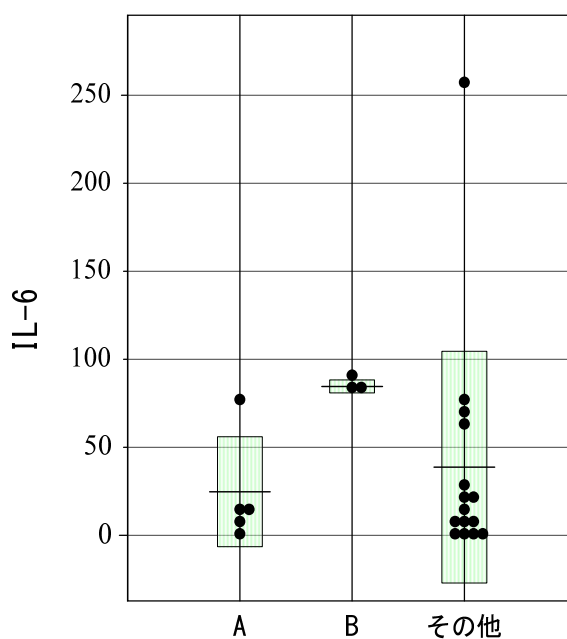
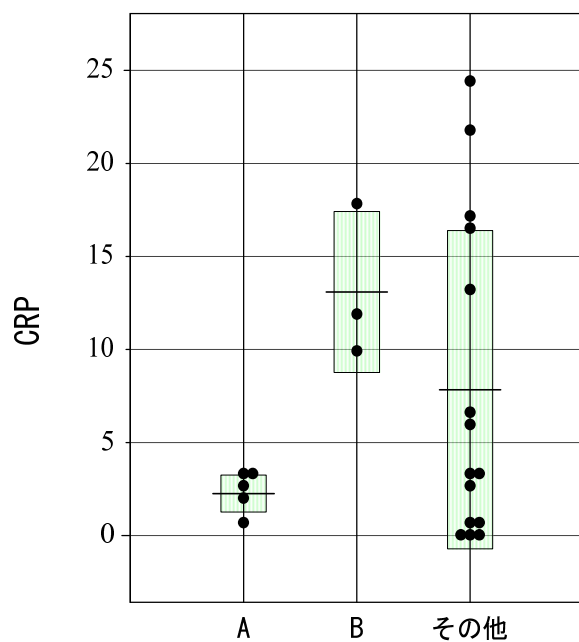


CRP ( mg/dl ) vs A-LES



IL-6 ( pg/ml ) vs A-LES

図 3. A 型、B 型、その他呼吸器疾患における各マーカーの値



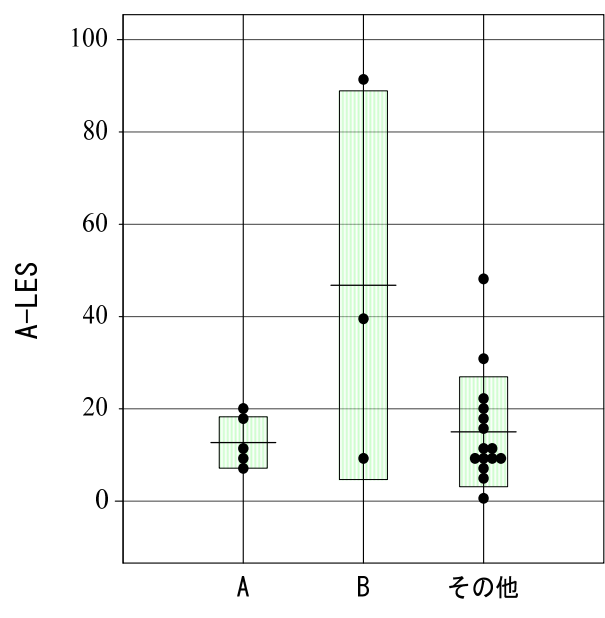
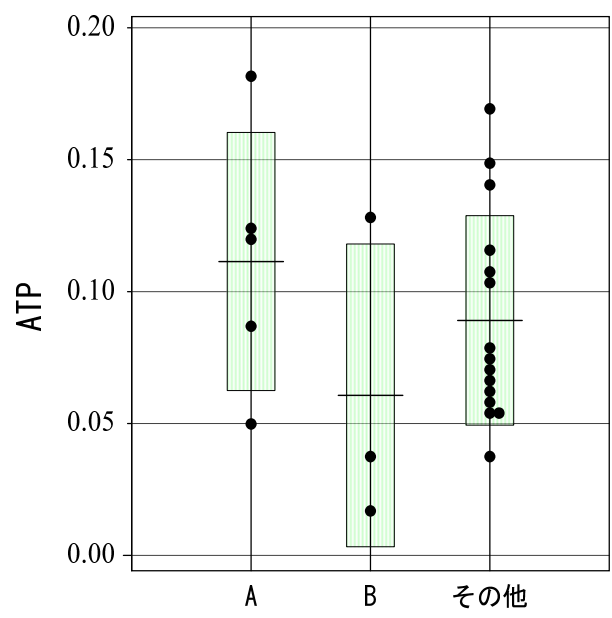
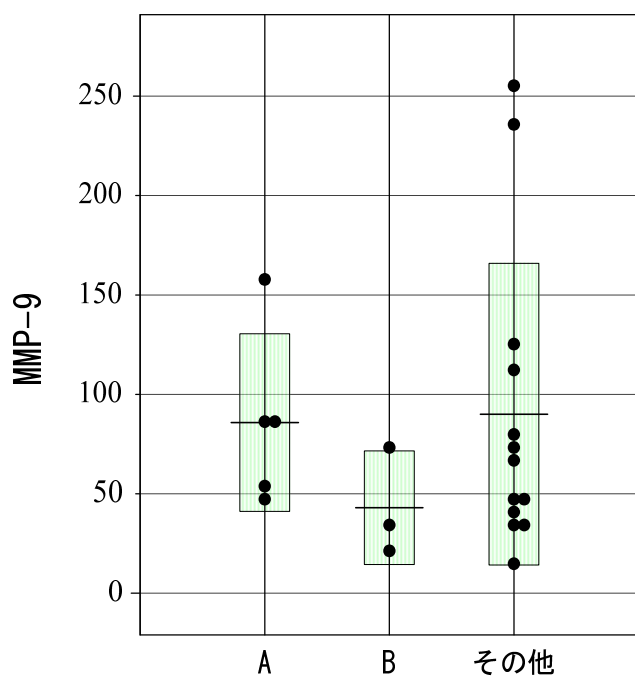
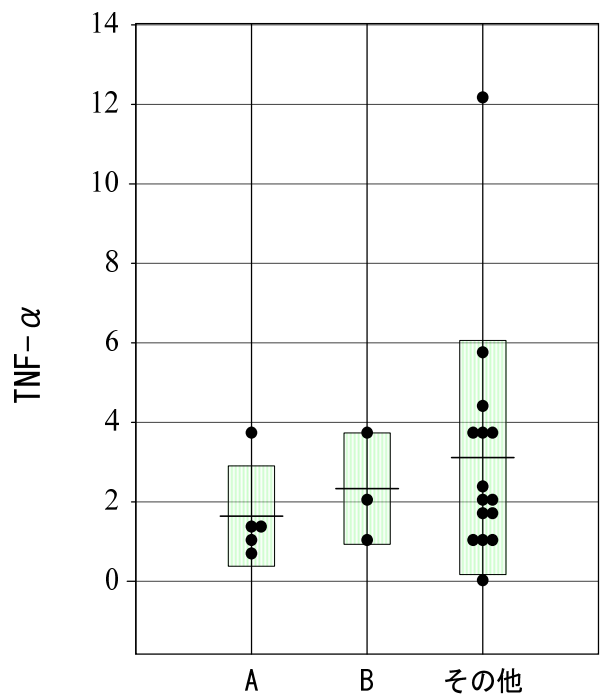
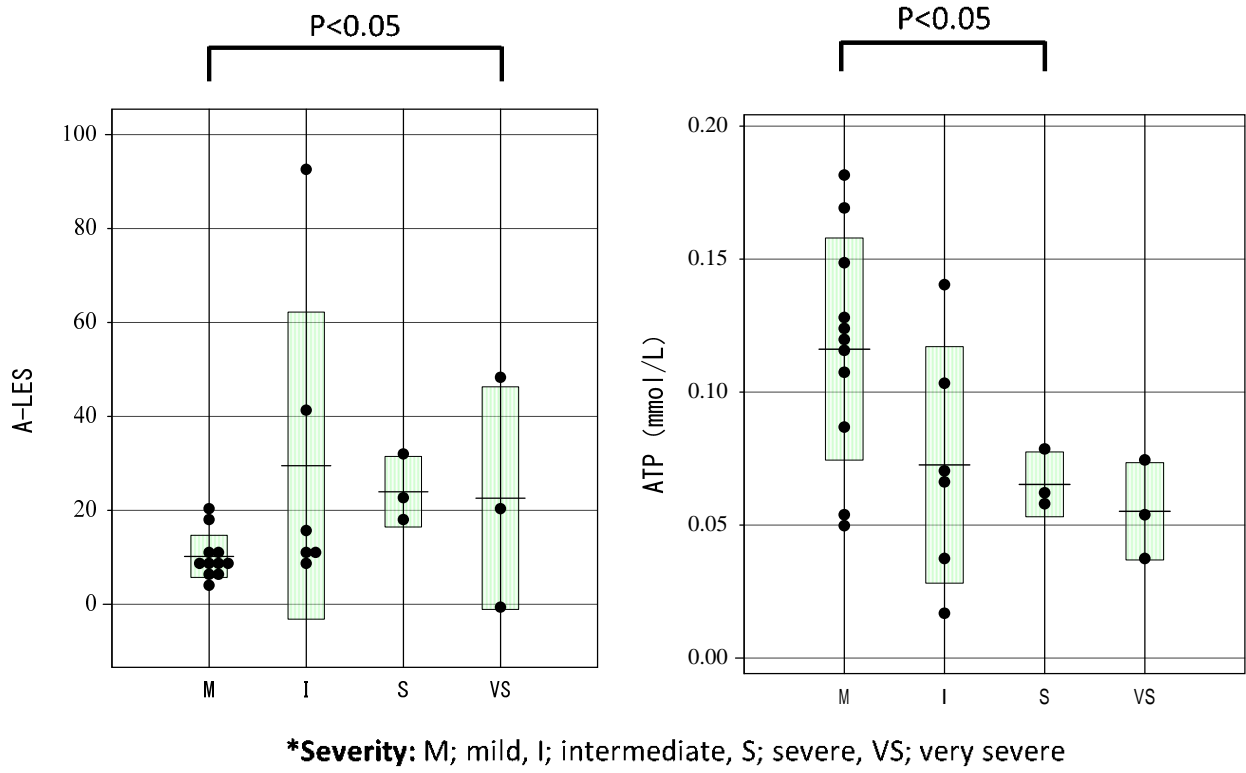


図4. 重症度別各マーカー値



**重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：  
検体収集とインフルエンザ重症化バイオマーカーの検索**

研究分担者 西村秀一

( 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部 ウイルス疾患研究室長 )

研究協力者

山谷睦夫 ( 東北大学大学院医学系研究科先進感染症予防学寄附講座 教授 )

織田慶子 ( 川崎医科大学附属川崎病院小児科 医師 )

高橋洋 ( 宮城厚生協会坂総合病院呼吸器科 部長 )

武田和憲 ( 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部 部長 )

手島伸 ( 国立病院機構仙台医療センター 外科 医長 )

**研究要旨**

1) 実際の患者血清等を対象に、肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子やそれらの病態の早期診断マーカーの候補としての仮称 FluAlarmin を検索するための準備を行った。これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索において、脳症を含む多臓器不全にかかわる因子として検討されてきた CPT2 遺伝子や Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の解析を行う目的で、今年度も小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループや内科の成人・高齢者の肺炎研究グループ等と連携して、多方面で発症急性期の気道分泌液や血液検体等の検体収集ならびに臨床情報の収集を行った。

2) インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織であり、細胞自らが産生する蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られている実際のヒト呼吸器上皮細胞を実験系として得るために、病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養を試み、3 人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。さらに、インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所性トリプシン産生にかかわるエンテロキナーゼを産生する細胞として知られるヒト十二指腸上皮細胞を得る目的で、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の初代培養とその維持を試みた。それらを用いた感染実験を試み、その結果、初代ヒト気管上皮細胞にインフルエンザウイルスに感染性を与えるセリンプロテアーゼ TMPRSS2 の発現を確認した。さらに、膜結合型である同酵素を、前立腺がん細胞での所見と同様、培養上清中に 50 - 100ng/ml という濃度で検出した。また、同細胞に対するインフルエンザウイルス感染によって IL6 が誘導され、その IL6 自体が同細胞に障害を引き起こすことを見出した。

**A . 研究目的**

1) 新型インフルエンザや高病原性鳥インフルエンザの出現とその流行による肺炎・脳症・多臓器不全の多発が危惧され、健康危機管理として

の対策が急がれている。本研究では、実際の患者血清等を対象に、肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子やそれらの病態の早期診断マーカーの

候補としての仮称FluAlarminを検索する。

また、これまでは小児科領域における脳症を対象に研究を行ってきたが、本研究では、成人の肺炎の重症化例について研究範囲を拡げている。

2) ヒト呼吸器上皮細胞は、インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織と考えられる。そこでの増殖においては、細胞自らが産生するトリプシン様蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られている。そしてさらに我々の研究により呼吸器組織以外の異所性産生の同酵素がインフルエンザの脳症において重要な働きをしていることが明らかになっている。一方、膵臓以外のヒト組織細胞における同酵素の産生に関する研究は、ほとんど見あたらず、よって呼吸器上皮細胞が常に供給されるような状態であれば極めて重要な解析実験系となると考えられる。また、そうした細胞がインフルエンザ感染の再産生する何らかの物質がサイトカイン等のFlu Alarmin候補に何らかの影響を与える、あるいはその逆にサイトカイン等の物質が呼吸器系上皮にそのもの、あるいはそこでのインフルエンザ感染に何らかの影響を与える可能性についても検討の価値はあると考えられる。

さらに、そうした細胞にウイルス感染や種々の外的刺激を与えることでインフルエンザ重症化の本体の理解につながる可能性のある何らかの新たな所見が得られる可能性もある。我々は、そうした細胞系を種々の実験に用いることのできる態勢を整えるためのいくつかの試みを開始しているが、本年度もそれを継続した。

3) インフルエンザウイルスの感染に大きく関わる細胞由来のトリプシン

様の蛋白分解酵素の代表的なものにTPMRSS2とHATと膜結合型のセリンプロテアーゼが知られている。ただ、その分布や作用は、実際のヒトの呼吸器系細胞での解析は、ほとんどない。そこで、今年は前者に注目してヒトの初代細胞で検討を開始する。

## B . 研究方法

1) 本年度も引き続き臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液の収集：

1-1) 小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループならびに

1-2) 内科の成人・高齢者の肺炎研究グループとの連携により発症急性期の気道分泌液や血液検体を収集した。

1-3) さらに当ウイルスセンターには、ウイルス感染による重症肺炎や脳症についての検査目的で、仙台市内ならびに全国各地から臨床検体が寄せられており、そうした症例の主治医に対し、急性期ならびに回復期血清やFlu Alarmin 検索のための検体の送付を要請した。

2) これまでのインフルエンザ罹患者の凍結保存検体のピックアップ：Flu Alarmin の候補の検索対象とする目的で、これまでに種々の呼吸器感染症患者や急性脳症患者から採取した急性期血清ならびにペア血清を当院血清ライブラリーからのピックアップを試みた。

3) 上記 1)、2)で収集した検体について Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定を試みた。

また、これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索においては、脳症を含む多臓器不全の遺伝子解析を CPT2 を対象としていたが、重症肺炎症例医についても、イン



フォームドコンセントのもとCPT検査を試みた。

4) ヒト初代細胞の確保は、目的の項目で説明したとおり、インフルエンザの重症化の機序解明の研究材料として大きな可能性を有している。4-1) 協力研究者の山谷らによる病理解剖由来の気管支上皮細胞の培養系について、本年度もその一部凍結保存とライブラリーづくりとを行った。

また、そうした細胞の初代ではないが、その性質をある程度保ったまま長期継代が可能な系を作ることを目的に、上記細胞に対してSV40のLarge T抗原遺伝子導入による不死化を試した。4-2) インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所生産トリプシンがつくられるためには、トリプシノーゲンがPRSS3と呼ばれるエンテロキナーゼの作用によってトリプシンに変わる必要がある。ヒト十二指腸上皮細胞は、このエンテロキナーゼがつくられる組織として知られている。エンテロキナーゼのヒト細胞での種々の動きに関して解析のためには、ヒト十二指腸上皮細胞の初代継代細胞がぜひとも必要である。そこで、本研究では、インフォームドコンセントのもと、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養を試み、それらしき細胞を得、この細胞についても不死化を行い、ウイルス感受性の検討を行った。

また、今年度は耳鼻科の扁桃腺摘出材料からの扁桃腺上皮細胞の培養と不死化も試みた。

4-3) インフルエンザウイルスに感染性を与える膜結合型のセリンプロテアーゼTMPRSS2の初代ヒト気管上皮細胞における発現を、蛍光抗体法での確認を試みた。また、同酵素は、前立腺がんにおいては膜から外れて細

胞外に遊離することが知られており、同様のことが実際の種々のヒト初代細胞においても起きているのかを、培養上清を材料とするELISAで調べた。

## C . 研究結果

1) 臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌物や血液の収集： 前回の2013-2014年インフルエンザシーズンは、A/H1N1pdm09亜型の再出現があり、このウイルス感染による成人の肺炎症例が全国で見られ、その中で当院に寄せられたいくつかの症例について、ペア血清ならびに急性期全血を確保し、それらについてToll-like Receptorの下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定ならびに、CPT2についての遺伝子解析のため徳島に送付できたが、本シーズンは、既往症を有する高齢者の肺炎が多く、全シーズンのような健康成人での重症肺炎例は少ない(毎年検体を送ってくれる臨床医の印象)。そのためか、ほとんど検体の確保ができなかった。

一方、比較的高齢者でヒトパラインフルエンザ3型やヒトメタニューモウイルスやRSウイルスによる肺炎入院例は多数経験しており、それらの検体の気管支洗浄液や血清の確保はできている。

2) 病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養とその不死化の試み：

昨年度は協力研究者の山谷がつくった3人のドナー由来の、気管支上皮細胞でレンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子等の導入による不死化を何度か試みたが、結果的に成功しなかった。この不成功を受け、本年度はさらにLarge T抗原遺伝子に加えて、c-mycあるいはH-ras

遺伝子の導入による不死化を試みた。しかし、また一時的には成功したかのように見えることがしばしばあったものの、最終的にはどれも培養を継続できず、現在に至るまで成功していない。

3) 外科手術材料由来の十二指腸および扁桃腺上皮細胞の初代培養と、その不死化の試み：昨年度から本年度にかけ、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養の試みを3度行い、うち2回で培養に成功し、十二指腸上皮細胞の培養法を習得した。

それらの細胞についても凍結保存をするとともに、レンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子の導入による不死化と、それらの細胞のウイルス感受性の検討を試み成功している。本年度、本細胞については、インフルエンザウイルスを含む種々のウイルスに対する感受性を検討してきたが、残念ながら未だインフルエンザを含めた特定のウイルスに対する感受性は見出せていない。

さらに本年度開始した、扁桃腺上皮細胞の培養は、一応初代培養まで成功したが、その不死化には至らず、また継代培養しているうちに最終的に繊維芽細胞に置き替わってしまった。

4) インフルエンザウイルスに感染性を与えるセリンプロテアーゼTMPRSS2の初代ヒト気管上皮細胞における発現を、蛍光抗体法で確認した。さらに、培養上清を材料とするELISAで調べたところ、膜結合型である同酵素が、前立腺がん細胞での所見と同様、培養上清中に50 - 100ng/mlという濃度で検出された。また、同細胞に対するインフルエンザウイルス感染によってIL6

が誘導され、そのIL6自体が同細胞に障害を引き起こすことを見出した。

## E . 結論

臨床応用可能な、最適なFlu A/Amnの同定にとっては、インフルエンザ等の急性感染症罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液等の臨床検体の収集と解析を今後も粘り強く継続していくことが必要である。

ヒトの気管支上皮ならびに十二指腸と扁桃腺上皮の初代培養細胞に成功し、一部は今後の応用のために凍結保存を完了しており、また通常種々の実験に頻繁に使えるように不死化を試みている。だが、不死化に成功した小腸上皮と思われた細胞は、未だインフルエンザを含め特定のウイルスに対する感受性は見出せておらず、また気管上皮と扁桃腺上皮の不死化は未だ成功していない。これらの試みは、あきらめることなく継続していく必要がある。

今回行ったヒト気管上皮初代細胞を用いた解析のような、蛋白分解酵素やIL6に関する仕事は、治療薬の選択も視野に入れつつ、今後も*in vitro*, *in vivo*で継続していく必要がある。(図1)

## F . 健康危険情報

なし。

## G . 研究発表(平成26年度)

### 論文発表

1) Nishimura H, Okusa Y. A verification of an overestimation of “deaths associated with influenza pandemic of 1918-1919, Japan” claimed in a demographic study. JJID, in press

- 2) Katsushima Y, Katsushima F, Suzuki Y, Seto J, Mizuta K, Nishimura H, Matsuzaki Y. Characteristics of mycoplasma pneumoniae infection identified by culture in a pediatric clinic. *Pediatr Int.* 2014, 57: doi: 10.1111/ ped. 12513
- 3) M Yamaya, LK Nadine, C Ota, H Kubo, T Makiguchi, R Nagatomi, H Nishimura. Magnitude of influenza virus replication and cell damage is associated with interleukin-6 production in primary cultures of human tracheal epithelium. *Resp Physiol Neurol.* 2014, 202, 16-23.
- 4) E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, H Nishimura. Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing. *PLOS ONE*, 2014, 9(8), e103560. doi: 10.1371.
- 5) 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.* 2014, 37: 520-529.
- 6) Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R. Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Resp Invest.* 2014, 52, 251-260.
- 7) M Yamaya, L Nadine, H Kubo, K Saito, R Saito, H Nishimura: Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells. *J Med Virol* 2014, DOI: 10.1002/jmv.23974.
- 8) 小山田厚子、三木祐、鈴木克之、佐々木悟、深瀬真由美、伊藤洋子、大宮卓、他 ICT メンバー、西村秀一. 地域流行前の一病棟内でのインフルエンザ集団発生と対応, 医療 (印刷

- 中)
- 9) 大宮卓、佐々木純一、西村秀一. イムノクロマト法を原理とする種々のアデノウイルス迅速抗原検出キットの、ウイルス検出感度の比較. 医学検査 (印刷中)
- 10) 菊地祐樹、鈴木優子、伊藤洋子、西村秀一. 噴霧式インフルエンザ生ワクチンの力価についての検討. 仙台医療センター医学雑誌 2014, 4: 39-41.
- 11) 菱川容子、橋本真帆、倉橋宏和、別府玲子、大谷可菜子、西村秀一. 重症心身障害児(者)施設におけるヒトメタニューモウイルスの集団感染と重症例の発生. 日本重症心身障害学会誌, 2014, 39: 379-383.

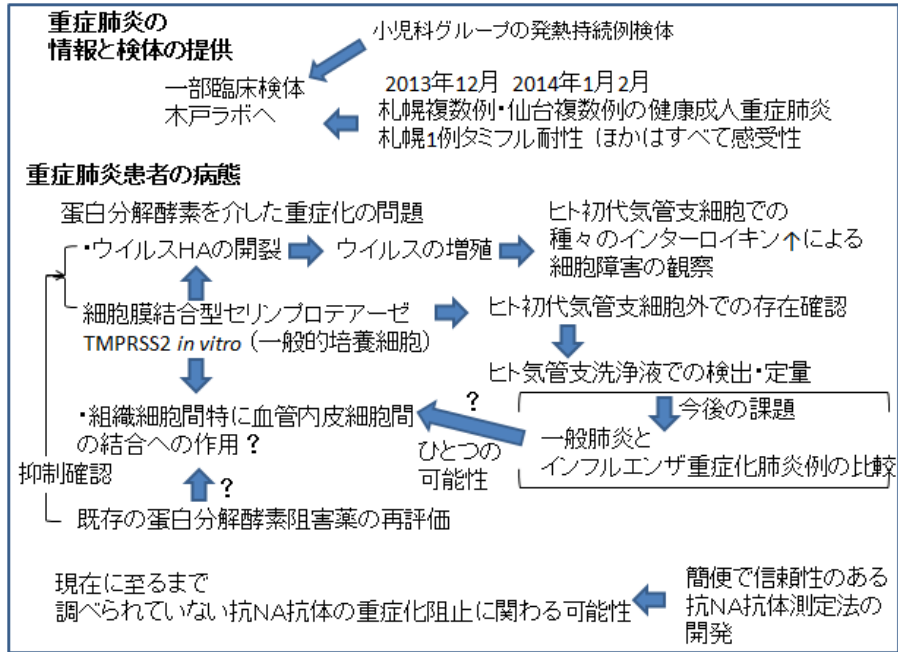
## 学会発表

とくになし

## H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

- 1) 特許取得 特許第 685769 号 登録日 2015 年 1 月 30 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、感染防止ブース
- 2) 特許取得 特許第 5618169 号 登録日 2014 年 9 月 2 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、換気ブース
- 3) 特許取得 特許第 5531340 号 登録日 2014 年 5 月 9 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、換気ブース

図 1 今後の課題



## 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。

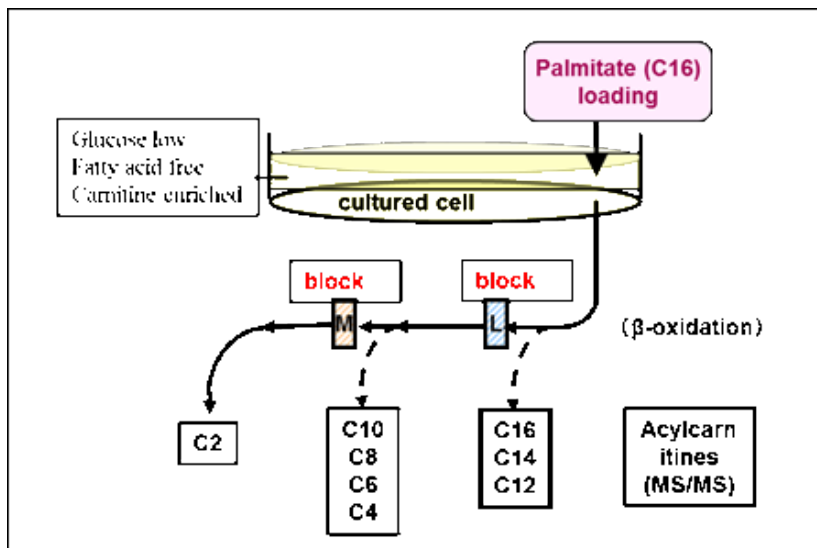


図 1 . In vitro probe assay の原理

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。

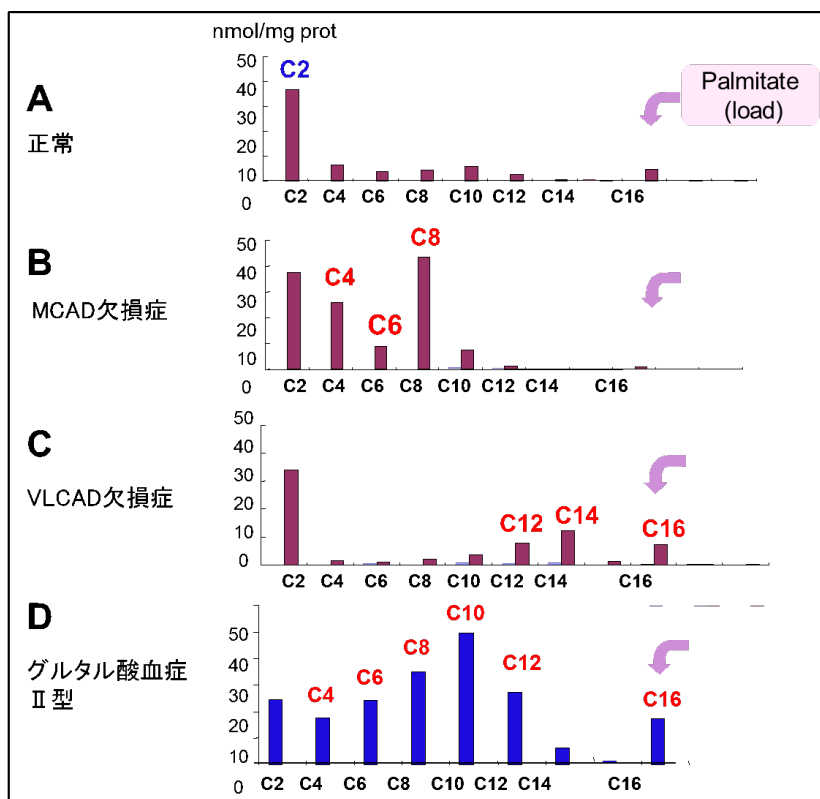


図2 . IVP assay による 酸化能評価の有効性の確認

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。



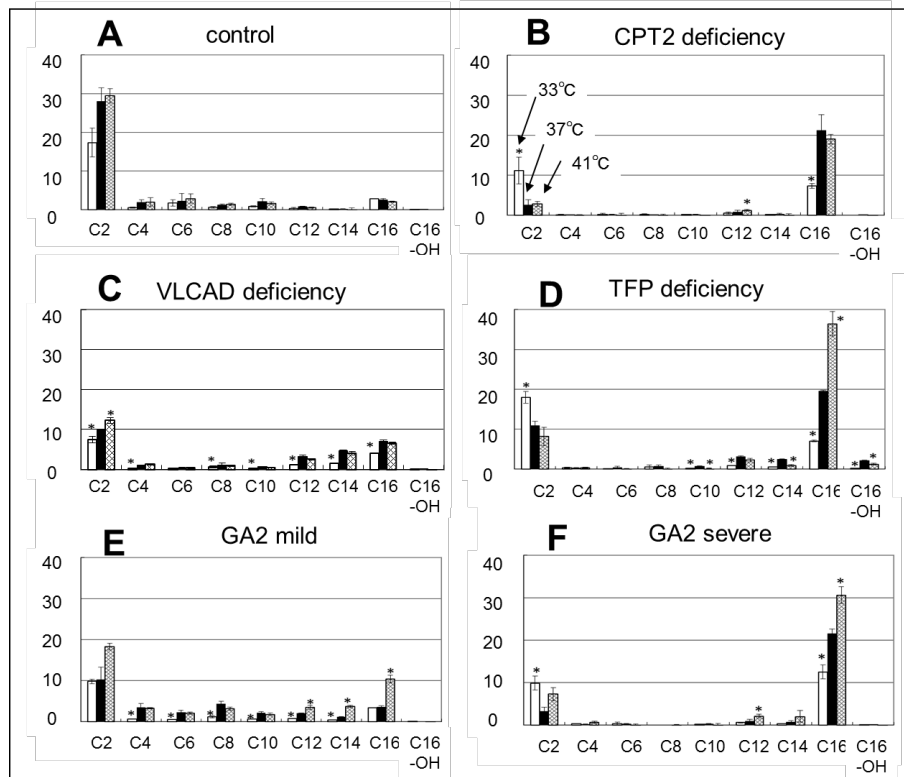


図3. 温度環境による 酸化能の変化 ( IVP assay )

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。

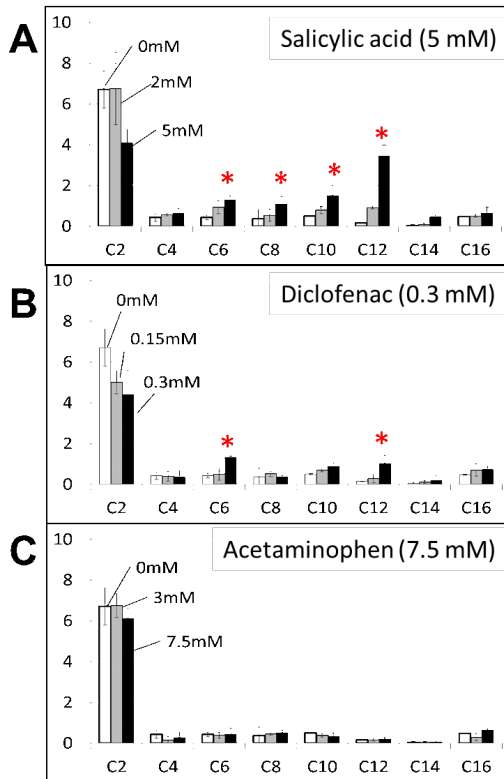


図4. 解熱剤の 酸化能への影響

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。

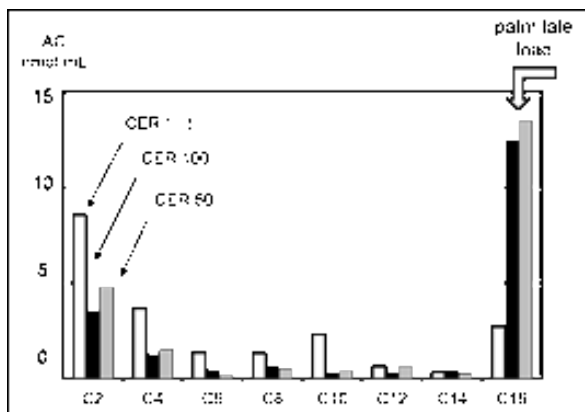


図5. セレウリドの 酸化への影響

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  $\beta$ -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



## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 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
Min Yao, Min Cai, Dengfu Yao, Xi Xu, Rongrong Yang, Yuting Li, Yuanyuan Zhang, Hiroshi Kido, Dengbing Yao.	Abbreviated half-lives and impaired fuel utilization in carnitine palmitoyltransferase II variant fibroblasts.	PLoS ONE	10(3)	e0119936	2015
Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Hiroshi Kido.	Oral administration of lactobacillus pentosus strain S-PT84 enhances anti-influenza virus specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice.	J Vaccine Immuno	2(1)	5	2015
Mineyoshi Hiyoshi, Irene L. Indalao, Mihiro Yana, Kazuhiko Yamane, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido.	Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 $\beta$ -mediated $\beta$ -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability.	Arch Virol	160	225-234	2015
Hai-Yan Pan, Hua-Mei Sun, Lu-Jing Xue, Min Pan, Yi-Ping Wang, Hiroshi Kido, Jian-Hua Zhu.	Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection.	Am J Physiol Circ Physiol	307	H922-H932	2014

Yamane K, Indalao IL, Yamamoto Y, Hanawa M, <u>Kido H.</u>	Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for multiorgan failure in severe influenza.	PLoS ONE	9(5)	e98032	2014
Chida J, <u>Kido H</u>	Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells.	<i>Methods Mol Biol,</i>	1098 (1)	21-32	2014
Shinahara W, <u>Takahashi E,</u> Sawabuchi T, Arai M, Hirotsu N, <u>Kido H.</u>	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.	<i>PLoS ONE</i>	8(7)	e70060	2013
Shoji M, <u>Takahashi E,</u> Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, Echigo N, <u>Kido H,</u> Nakamura S, Mashino T, Okutani T, Kuzuhara T.	Anti-Influenza Activity of C60 Fullerene Derivatives.	<i>PLoS ONE</i>	8(6)	e66337	2013
Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Matushita M, <u>Kido H.</u>	Blood Lactate/ATP Ratio, as an Alarm Index and Real-Time Biomarker in Critical Illness.	<i>PLoS ONE</i>	8(4)	e60561	2013



Kimoto T, Mizuno D, Takei T, Kunimi T, Ono S, Sakai S, <u>Kido H.</u>	Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10 -Induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 reseponses.	<i>Influenza and Other Resp. Viruses</i>	7(6)	1218-1226	2013
Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, Konoha K, Fujii K, Chida J, Mizuno D, Fijihashi K, <u>Kido H.</u>	Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity trough induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus.	<i>J. Virol.</i>	86(20)	10924-10934	2012
Cissé Y, Inoue I, <u>Kido H.</u>	Oseltamivir reduces hippocampal abnormal EEG activities after influenza A virus infection in isoflurane-anesthetized rats.	<i>J. Exp. Pharmacol.</i>	4	69-76	2012
Kubota M, Chida J, Hoshino H, Kashii H, Ozawa H, Koide A, Hoshino A, Koyama A, Mizuno Y, Yamaguchi M, Yao D, Yao M, <u>Kido H.</u>	Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children.	<i>Brain Dev</i>	34(1)	20-27	2012
Fujimoto C, Takeda N, Matsunaga A, Sawada A, Tanaka T, Kimoto T, Shinahara W, Sawabuchi T, Yamaguchi M, Hayama M, Yanagawa H, Yano M, <u>Kido H.</u>	Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adults.	<i>Influenza Other Respi Viruses</i>	6(6)	396-403	2012

木戸博	インフルエンザ感染症の予防と治療に関する新展開	インフルエンザ	16(2)	5-6	2014
木戸博	インフルエンザ脳症とCPT-II熱不安定性遺伝子多型	クリニシアン	61(634)	13-16	2014
木戸博	インフルエンザ感染症の重症化メカニズム	<i>J Otolaryngo Head Neck Surgery</i>	30(11)	1540-1544	2014
木戸博	インフルエンザ感染の重症化機序、肺炎・脳症の最新知見と治療法の提案	都耳鼻会報	143	41-46	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	日本臨床内科医学会誌	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、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

Kakoki K, Kamiyama H, Izumida M, Yashima Y, Hayashi H, Yamamoto N, Matsuyama T, Igawa T, Sakai H, Kubo Y.	Androgen-independent proliferation of LNCaP prostate cancer cells infected by xenotropic murine leukemia virus-related virus.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	447	216-222	2014
Shigematsu S, Hayashi H, Yasui K, Matsuyama T.	SAM domain-containing N-terminal region of SAMHD1 plays a crucial role in its stabilization and restriction of HIV-1 infection.	<i>Acta Med Nagasaki</i>	58	103-111	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>	48	448-456	2014
Chua KJ, Kubo Y, Ma Y, Yasui K, Matsuyama T, and Hayashi H.	A short variant BTBD2 as a novel negative regulator of IRF-associated signalling.	<i>Int J Integrative 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 Retroviruses</i>	29	279-288	2013

Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N.	Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases.	<i>Adv Virol</i>	2012	ID 640894(1-14)	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	1636-1644	2012
Haga N, Kubota M, Miwa Z.	Hereditary sensory and autonomic neuropathy types IV and V in Japan.	<i>Pediatrics International</i>	4	In press	2015
Hoshino H, Kubota M.	Canavan disease: Clinical features and recent advances in research.	<i>Pediatrics International</i>	56	477-483	2014
Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Takahashi K.	Changes in Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Human Herpesvirus-6-Associated Acute Encephalopathy/Febrile Seizures.	<i>Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume</i>		ID 564091, <a href="http://dx.doi.org/10.1155/2014/564091">http://dx.doi.org/10.1155/2014/564091</a>	2014
Y Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihar a Y, Hirose S, Shiomi M, Kawaguchi H, Kubota M et al.	Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline.	<i>Brain Dev</i>		In press	2014
Shimada S, Shimajima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, Kubota M et al.	Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications.	<i>Brain Dev</i>		In press	2014

Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita T, Saitsu H, Matsumoto M.	Novel compound heterozygous PIGT mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3	<i>Neurogenetics</i>		doi: 10.1007/s10048-014-0408-y	2014
Ohba C, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, Terashima H, Kubota M, Kawawaki H, Matsufuji M, Kojima Y, Tateno A, Goldberg-Stern H, Straussberg R, Marom D, Leshinsky-Silver E, Nakashima M, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H.	Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations.	<i>Epilepsia</i>		doi: 10.1111/epi.12668. [Epub ahead of print]	2014
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.	<i>Brain Dev</i>	36	489-495	2014

Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, <u>Kubota M</u> et al.	De Novo Mutations in <i>GNAO1</i> , Encoding a Gao Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy.	<i>The American Journal of Human Genetics.</i>	93	1–10	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 J-i, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, <u>Kubota M</u> , Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K-i, Matsumoto N, Niikawa N.	MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome.	<i>Am J Med Genet</i>	Part A 161A	2234– 2243	2014

Kato M, Yamagata T, <u>Kubota M</u> , Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saito H.	Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation.	<i>Epilepsia.</i>		doi: 10.1111/e pi.12200.	2013
Shinohara, M, Saitoh, M, Nishizawa, D, Ikeda, K, Hirose, S, Takanashi, JI, Takita J, Kikuchi K, <u>Kubota M</u> et al.	ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus.	<i>Neurology</i>	80	1571– 1576	2013
Haga N, <u>Kubota M</u> , Miwa Z.	Epidemiology of hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV and V in Japan.	<i>Am J Med Genet Part A</i>	161A	871–874	2013

Hachiya Y, Hayashi M, Negishi T, Atsumi S, <u>Kubota M</u> , Nishihara T.	A Case of Osteogenesis Imperfecta Type II Caused by a Novel <i>COL1A2</i> Gene Mutation: Endoscopic Third Ventriculostomy to Prevent Hydrocephalus.	<i>Neuropediatrics</i>	43(04)	225-228	2012
Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, <u>Kubota M</u> , Amemiya K, Takanashi JL, Hwang SK, Hirose S, Mizuguchi M.	Mutations of the SCN1A gene in acute encephalopathy.	<i>Epilepsia</i>	53	558-564	2012
Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, <u>Kubota M</u> , Saito Y, Takanashi JI, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M	Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes.	<i>Brain Dev</i>	34	337-343	2012
Hayashi M, Saito-Miwa N, Tanuma N, <u>Kubota M</u> .	Brain vascular change in Cockayne syndrome.	<i>Neuropathology</i>	32	113-117	2012
Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi JI, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, <u>Kubota M</u> .	Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS)	<i>Brain Dev.</i>	34	124-127	2012



Kubota M, Chida J, Hoshino H, Kashii H, Ozawa H, Koide A, Hoshino A, Koyama A, Mizuno Y, Yamaguchi M, Yao D, Yao M, Kido H.	Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children.	<i>Brain Dev</i>	34	20-27	2012
Chida J, Ono R, Yamane K, Hiyoshi M, Nishimura M, Onodera M, Nakataki E, Matsushita M, Kido H.	Blood Lactate/ATP Ratio, as an Alarm Index and Real-Time Biomarker in Critical Illness.	<i>PLoS ONE</i>	8(4)	e60561	2013
Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto YI	ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome.	<i>Human Mut</i>		In press	2015
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.	<i>J Thorac Dis</i>	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.	<i>J Thorac Dis</i>	5	145-148	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.	喀血を主訴とし, びまん性肺胞出血との鑑別を要した気管支管支骨軟骨形成症の1例.	気管支学	36	73-77	2014
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	肺膿瘍・膿胸7例における歯周病細菌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,	<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.	<i>Therapeutic Research</i>	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
Nishimura H, Okusa Y.	A verification of an overestimation of “deaths associated with influenza pandemic of 1918-1919, Japan” claimed in a demographic study.	<i>JJID</i>		In press	2015
Katsushima Y, Katsushima F, Suzuki Y, Seto J, Mizuta K, Nishimura H, Matsuzaki Y.	Characteristics of mycoplasma pneumoniae infection identified by culture in a pediatric clinic.	<i>Pediatr Int</i>	57	doi: 10.1111/ped.12513	2014

M Yamaya, LK Nadine, C Ota, H Kubo, T Makiguchi, R Nagatomi, <u>H</u> Nishimura	Magnitude of influenza virus replication and cell damage is associated with interleukin-6 production in primary cultures of human tracheal epithelium.	<i>Resp Physiol Neurol.</i>	202	16-23	2014
E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, <u>H</u> Nishimura.	Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing.	<i>PLOS ONE</i>	9(8)	e103560	2014
Yamaya M, <u>Nishimura H</u> , Nadine LK, Ota C, Kubo H Nagatomi R.	Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	<i>Arch Pharm Res.</i>	37	520-529	2014
Yamaya M, <u>Nishimura H</u> , Nadine L, Kubo H, Nagatomi R.	Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	<i>Resp Invest.</i>	52	251-260	2014
M Yamaya, L Nadine, H Kubo, K Saito, R Saito, <u>H</u> <u>Nishimura</u>	Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells.	<i>J Med Virol</i>		DOI: 10.1002/j mv. 23974	2014
Takashita E, Ejima M, Miura M, Ohnishi A, <u>Nishimura H</u> , 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.	<i>Euro Surveill.</i>	19	pii=20666	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.	<i>PLoS ONE</i>	8(11)	e80244	2013
Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Nadine L, Kubo H, Nagatomi R	Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	<i>Physiol Rep</i>	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.	<i>Microbiol. Immunol</i>	57	400-405	2013
S Yamayoshi, S Iizuka, T Yamashita, H Minagawa, K Mizuta, M Okamoto, H Nishimura, K Sanjoh, N Katsushima, Ts Itagaki, Y Nagai, K Fujii, S Koike	Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71.	<i>J. Virol.</i>	86	5686-5696	2012
A Takeyama, K Hashimoto, M Sato, S Kanno, K Takano, M Ito, M Katayose, H Nishimura, Y Kawasaki, M Hosoya	Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections.	<i>J. Med. Virol.</i>	84	1135-1142	2012

Yamaya M, <u>Nishimura H</u> , Hatachi Y, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, Mizuta K, Kubo H, Nagatomi	Levofloxacin inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells.	<i>Antimicrob Agents Chemother</i>	56	4052-4061	2012
Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, Yamada S, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Ohkouchi S, Tamada T, <u>Nishimura H</u> , Ishizaka A, Maruyama I, Okada Y, Takashi K, Nukiwa T	Gradual increase of high mobility group protein b1 in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis.	<i>Pulm Med</i>	91	64-86	2012
M Yamaya, <u>H Nishimura, Y</u> Hatachi, H Yasuda, X Deng, T Sasaki, H Kubo and R Nagatomi	Inhibitory effects of Tiotropium on rhinovirus infection in human airway epithelial cells.	<i>European Respiratory J</i>	40	122-132	2012
K Shirato, M Kawase, O Watanabe, C Hirokawa, S Matsuyama, <u>H Nishimura</u> and F Taguchi	Differences in neutralizing antigenicity between laboratory and clinical isolates of HCoV-229E isolated in Japan in 2004-2008 depend on the S1 region sequence of the spike protein.	<i>J. Gen. Virol.</i>	39	1908-1917	2012

T Kooriyama, M Okamoto, T Yoshida, T Nishida, T Tsubota, A Saito, M Tomonaga, T Matsuzawa, H Akari, <u>H Nishimura</u> , T Miyabe-Nishikawa	Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees.	Primates		DOI 10.1007/s10329-012-0320-8	2012
Asada M, Yoshida M, Hatachi Y, Sasaki T, Yasuda H, Deng X, <u>Nishimura H</u> , Kubo H, Nagatomi R, Yamaya M	l-carbocysteine inhibits respiratory syncytial virus infection in human tracheal epithelial cells.	Respir Physiol Neurobiol.	180	112-118	2012
小山田厚子、三木祐、鈴木克之、佐々木悟、深瀬真由美、伊藤洋子、大宮卓、他ICTメンバー、 <u>西村秀一</u>	地域流行前の一病棟内でのインフルエンザ集団発生と対応	医療		In press	2015
大宮卓、佐々木純一、 <u>西村秀一</u>	免疫クロマト法を原理とする種々のアデノウイルス迅速抗原検出キットの、ウイルス検出感度の比較	医学検査		In press	2015
菊地祐樹、鈴木優子、伊藤洋子、 <u>西村秀一</u>	噴霧式インフルエンザ生ワクチンの力価についての検討	仙台医療センター医学雑誌	4	39-41	2014
菱川容子、橋本真帆、 <u>倉橋宏和</u> 、 <u>別府玲子</u> 、 <u>大谷可菜子</u> 、 <u>西村秀一</u>	重症心身障害児（者）施設におけるヒトメタニューモウイルスの集団感染と重症例の発生	日本重症心身障害学会誌	39	379-383	2014

山口育男、青山知枝、山本優、木下恵子、伊藤由美、西村秀一	イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キット BD ベリターシステム 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	86	723-733	2012
西村秀一	殺菌性能を有する空中浮遊物質の放出を謳う各種電気製品の、寒天平板培地上の細菌に対する殺菌能の本体についての解析	感染症学会誌	86	723-733	2012
西村秀一	殺菌能力を謳う各種空気洗浄電気製品の、塗布乾燥状態の細菌に対する効果の有無の検証	日本環境感染学会誌	27	342-345	2012
Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, 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 $\beta$ -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy.	<i>Am J Med Gen</i>	A 164(5) 7	1180-1187	2014
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.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	448(2)	175-181	2014

Shioya A, Takuma H, <u>Yamaguchi S</u> , 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.	<i>J Neuro Sci</i>	346(1 -2)	350-352	2014
Vatanavichar n N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoonto rn N, Jirapinyoe P, Sathienkijkan chai A, <u>Yamaguchi S</u> , Wasant P	Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response.	<i>Brain Dev</i>		In press	2015
Sakai C, <u>Yamaguchi S</u> , Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto YI	ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome.	<i>Hum Mut</i>		In press	2015
Kobayashi T, Minami S, Mitani A, Tanizaki Y, Booka M, Okutani T, <u>Yamaguchi S</u> , Ino K	Acute fatty liver of pregnancy associated with fetal mitochondrial trifunctional protein deficiency.	<i>J Obstet Gynaecol Res</i>		In press	2015
Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, <u>Yamaguchi S</u>	Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1.	<i>Anal Bioanal Chem</i>	405(4)	1345-135 1	2013



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
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 $\beta$ -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy.	Am J Med Gene	A 164(5 )	1180-118 7	2014
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、ピオチン欠乏症	小児科臨床	67(5)	787-794	2014
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
山口清次	ミトコンドリア脂肪酸 酸 化異常症	日本臨床	29	627-631	2014
山口清次	有機酸・脂肪酸代謝異常症	日本臨床	31	205-211	2014
Yamaguchi S, Purevusren 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

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