

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591503

研究課題名(和文) プロテオミクスによるウイルス関連脳症の病態特異的バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Research of pathology-specific biomarkers for virus-related encephalopathy

研究代表者

鳥巢 浩幸 (TORISU, HIROYUKI)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：10398076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：小児のウイルス関連脳症は非特異的な急性中枢神経症状で発症するため、検査所見で急性脳症を診断し、重症度を評価することは臨床的に重要である。我々は急性脳症患者と熱性けいれん重積を含めた非脳症患者より採取された髄液検体を用いて、液体クロマトグラフ質量分析を実施し、6個の分画を選出した。各分画での急性脳症群の信号値は対照群よりも有意に高く、多変量解析でも分画の信号値のみで対照群と判別可能であることが示された。また、分画3の信号値は最も検出力が高く、入院時検査値よりも検出力高いことが示された。ただし、分画の信号値と病型や病原体などの臨床的特徴の関連は明らかでなく、病態特異性は示されなかった。

研究成果の概要(英文)：The virus-related encephalopathy in childhood is mostly developed with non-specific CNS symptoms. Therefore it is clinically important to diagnose acute encephalopathy and to evaluate disease severity by laboratory findings. We carried out liquid chromatograph mass spectrometry using a cerebrospinal fluid specimen of patients with acute encephalopathy and controls. As a result, six specific fragments were detected. The signal level of the patients with acute encephalopathy was significantly higher than those of controls. The difference was clearer in the multivariate analysis. In addition, a detection power was the highest in a signal level of fragment 3, as a result of ROC analysis. But the association between signal level and clinical features such as a type or the pathogen was not clear.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：急性脳症

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 小児のウイルス関連脳症の病態の多様性

小児のウイルス関連脳症は、けいれん、意識障害、異常行動などの中枢神経症状で発症し、高率に神経学的後遺症を残す症候群である。近年のMRI画像を中心とした脳症研究は、この症候群に複数の病型が存在することを明らかにした

### 2) 小児の急性脳症の治療の問題点

小児のウイルス関連脳症は、けいれんや意識障害などの非特異的な急性中枢神経症状で発症することから、臨床的な検査所見によって熱性けいれんや熱せん妄を鑑別し、発症早期に急性脳症の重症度の評価することは臨床的に重要な課題である。

また、小児の急性脳症の治療は、病態の多様性にかかわらず、ステロイドパルス療法を中心とした、経験に基づいた治療がなされ、治療効果判定が病態の区別なく行われていることが多い。このため、急性脳症に対する各種治療の効果は明確でないことが多い。小児の急性脳症の治療成績を上げるためには、病態を評価し、病態に応じて治療を計画し、実施する必要がある。

### 3) 小児の急性脳症のバイオマーカー

我々は、2008年よりウイルス関連脳症の早期診断に関し、多施設共同研究を行い、50名のウイルス感染に伴う急性脳症患者を集積し、高サイトカイン血症を特徴とする急性壊死性脳症や出血性ショック脳症で病初期の尿中 $\alpha$ -2-microglobulin (BMG)のCr補正值が異常高値を示すことを報告し、このバイオマーカーがウイルス関連脳症の神経学的予後に関連することを報告した。しかし、この指標は、けいれん重積型脳症ではほとんど上昇しない例もあり、病態に応じたバイオマーカーを考える必要がある。

### 4) 小児のウイルス関連脳症の網羅的プロテオミクス解析

高速液体クロマトグラフと質量分析法を

用いたプロテオミクス解析は、微量のサンプルで蛋白発現プロファイルを網羅的に解析することが可能である。このため、各種疾患で未知のバイオマーカーの探索に応用され、未知の病態を解明することが期待される。

## 2. 研究の目的

ウイルス関連脳症患者の髄液を用いて網羅的プロテオミクス解析を行い、病態特異的なバイオマーカーを見出す。

## 3. 研究の方法

1) 九州大学病院に入院したウイルス関連脳症患者から臨床データを収集し、髄液検体を採取する。対象群は熱性けいれん、熱せん妄で同病院に入院した患者とする

2) 髄液検体を高速クロマトグラフと質量分析計を用いた測定法を整え、ウイルス関連脳症特異的マススペクトルを検出する。

3) 得られた特異的マススペクトルのMS/MS、MS/MS/MSスペクトルよりバイオインフォマティクスを用いて物質(新規バイオマーカー候補)を同定する。

## 4. 研究成果

### 1) ウイルス関連脳症患者と対照群(熱性けいれん・熱せん妄)の集積と臨床データのデータベース化と予備解析

<患者群と対照群>

急性脳症患者 23例

(男14女9、発症年齢中央値21か月)

熱性けいれん・熱せん妄患者 26例

(男15女11、発症年齢中央値20か月)

<臨床データ解析>

) 初回検査値の単変量解析 ; ( ) は  $p$  値

急性脳症群 < 熱性けいれん・熱せん妄群

血清総蛋白 (0.008)、アルブミン (0.001)、

血小板数 (0.016)

急性脳症群 > 熱性けいれん・熱せん妄群

尿酸 (0.001)、AST (0.008)、CRP (0.022)、

FDP (0.033)、D-dimer (0.007)

髄液検査での検討では有意な差を示す項目はなかった。

#### ) 初回検査値の多変量解析

血清アルブミン値、尿酸値、ALT 値、WBC、CRP 値が判別因子として選択された。有意差を認められた項目から、全身性の炎症の程度に加え、血管内皮障害による血管透過性亢進や血栓産生、さらに臓器障害が、脳症群の特徴であることが示唆された。

#### ) 集団の特徴

有意項目の散布図では熱性けいれん群が比較的単一の集団を呈するのに対して、急性脳症群のばらつきが大きいことから、急性脳症群はよりヘテロな集団であることが示唆されるため、バイオマーカーの検討を行う上で、急性脳症群を既存の臨床データに基づいて分類しておくことが必要であると考えられた。

## 2) 髄液検体の高速クロマトグラフと質量分析計を用いた解析

### <対象>

急性脳症患者 15 例(男 8 女 7)と、熱性けいれん重積例を含めた対称患者 16 例(男 8 女 8)より採取された髄液検体を用いて、液体クロマトグラフ質量分析を実施した。なお、髄液所見(細胞数、蛋白、糖)において、両群に有意な差はない。

### <方法>

#### ) 高速液体クロマトグラフィー

Agilent 1200 Series(Agilent Technologies)

サンプル：髄液 10 $\mu$ l (未処理検体)

カラム：CAPCELL PAK C18 MG III (5 $\mu$ m)

(Shiseido Co.) Size: 2.0mm i.d. x 50mm

移動相 A:水(0.1%ギ酸) B:アセトニトリル(0.1%ギ酸)

Gradient B20%(0-3min) B20-100%(3-12min)

B100%(12-20min)

#### ) 質量分析

Esquire 6000 (Bruker Daltonics)

ESI-IT イオンモード

Positive m/z = 100-3000

### <脳症特異的スペクトル抽出>

各急性脳症検体でそれぞれ 10-15 個の major fragment を決定。

各検体の major fragments のうち、3 検体以上の急性脳症検体で認められた fragment を選別。

選ばれた fragments のうち、全対照群での最大値の 2 倍以上の intensity を示す検体が 3 個以上ある fragment を抽出。

### <スペクトル結果>

最終的に 6 個の fragments を抽出することができた。

F1 (m/z=1156.2 RT=8.2 min)は、急性脳症群 7 例(47%)で、F2 (1239.2 RT=8.4 min)は 3 例、F3 (1300.0 RT=8.4)は 5 例、F4 (1330.0 RT=8.3 min)は 4 例、F5 (1343.9 RT=8.1)は 5 例、F6 (1421.4 RT=8.3)は 3 例で、対照群と比較して明らかな高値を示した。

\*RT; retention time

## 3) データ解析

### ) 脳症群と対照群で信号強度の比較

F1-F6 の全 fragment で、統計学的有意差をもって脳症群の信号強度が高かった ( $p=0.001-0.008$ )。

これは、入院時検査値による両群の単変量解析結果よりも低い  $p$  値を示した。また、検察と fragment 信号値を用いたロジスティック解析でも fragment 信号値のみで 2 群は判別可能であった。

### ) 各 fragment の ROC 解析・相関解析

F1-F6 の ROC 解析では、F3 (1300.0 RT=8.4) が感度 0.8 特異度 0.8 で検出力が最も高かった。F3 は各 fragment と相関を認め、特に F5 との相関が高かった (相関係数 0.76)。

さらに全 fragment と入院時検査値で検出力を比較検討したところ、入院時の検査値よりも F3 の AUC が高かった。

### ) Fragment と病態・病原体別の脳症の検討

Fragment3 の信号値と各症例の月例、病型、

病原体との関連を検討したが、関連性は認められなかった。また、他のフラグメントでも関連性が認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Lee S, Sanefuji M, Watanabe K, Uematsu A, Torisu H, Baba H, Kira R, Takada Y, Ishizaki Y, Toyoshima M, Aragaki F, Hara T: Clinical and MRI characteristics of acute encephalopathy in congenital adrenal hyperplasia. *J Neurol Sci* 306:91-93, 2011.
2. Sanefuji M, Takada Y, Kimura N, Torisu H, Kira R, Ishizaki Y, Hara T: Strategy in short-term memory for pictures in childhood: a near-infrared spectroscopy study. *Neuroimage* 54:2394-2400, 2011.
3. Iwayama M, Kira R, Kinukawa N, Sakai Y, Torisu H, Sanefuji M, Ishizaki Y, Nose Y, Matsumoto T, Hara T: Parental age and child growth and development: child health check-up data. *Pediatr Int* 53:709-714, 2011.
4. Torisu H, Iwaki A, Takeshita K, Hiwatashi A, Sanefuji M, Fukumaki Y, Hara T. Clinical and genetic characterization of a 2-year-old boy with complete PLP1 deletion. *Brain Dev* 34: 852-6, 2012.
5. Sanefuji M, Torisu H, Kira R, Yamashita H, Ejima K, Shigeto H, et al. A case of childhood stiff-person syndrome with striatal lesions: A possible entity distinct from the classical adult form. *Brain Dev* 35; 575-8. 2013.
6. Narazaki R, Makimura M, Sanefuji M, Fukamachi S, Akiyoshi H, So H, Yamamura K, Doisaki S, Kojima S, Ihara K, Hara T, Ohga S. Bilateral stenosis of carotid siphon in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Brain Dev* 35:690-3, 2013
7. Sakai Y, Ohkubo K, Matsushita Y, Akamine S, Ishizaki Y, Torisu H, Ihara K, Sanefuji M, Kim MS, Lee KU, Shaw CA, Lim J, Nakabeppu Y, Hara T. Neuroendocrine phenotypes in a boy with 5q14 deletion syndrome implicate the regulatory roles of myocyte-specific enhancer factor 2C in the postnatal

hypothalamus. *Eur J Med Genet* 56; 475-83, 2013.

8. Torisu H, Yoshikawa Y, Yamaguchi-Takada Y, Yano T, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sawaishi Y, Hara T. Alexander disease with mild dorsal brainstem atrophy and infantile spasms. *Brain Dev* 35; 441-4, 2013.
9. Uike K, Matsushita Y, Sakai Y, Togao O, Nagao M, Ishizaki Y, Nagata H, Yamamura K, Torisu H, Hara T. Systemic vascular phenotypes of Loeys-Dietz syndrome in a child carrying a de novo R381P mutation in TGFBR2: a case report. *BMC Research Notes* 6; 456, 2013.
10. Torisu H, Watanabe K, Shimojima K, Sugawara K, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sakai Y, Yamashita H, Yamamoto T, Hara T. Girl with a *PRRT2* mutation and infantile focal epilepsy with bilateral spikes. *Brain Dev* 36:342-345, 2014.
11. 鳥巢浩幸:  
【全面改訂版 必携!けいれん、意識障害 その時どうする】けいれん・意識障害を起こす疾患の治療管理のポイント 多発性硬化症.  
小児内科 43 巻: 538-540, 2011.
12. 鳥巢浩幸:  
特集 クローズアップ 脳炎・脳症・髄膜炎: 多発性硬化症  
小児内科 45 巻; 402-406, 2013.
13. 李守永:  
特集 クローズアップ 脳炎・脳症・髄膜炎: 先天性副腎皮質過形成に伴う脳症  
小児内科 45:390-393, 2013
14. 礒部菜摘、石崎義人、原寿郎:  
特集 クローズアップ 脳炎・脳症・髄膜炎: 脳炎脳症と自己免疫  
小児内科 45:179-182, 2013

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 鳥巢浩幸:  
神経免疫、脱髄性疾患、感染、予防接種副反応: 脱髄性疾患と予防接種副反応 - 予防接種後 ADEM - 第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分
2. 鳥巢浩幸:  
小児多発性硬化症の病態と臨床像 第 8 回小児重症筋無力症研究会 2013.6.1 大分
3. 鳥巢浩幸、渡辺恭子、下島圭子、島田姿野、實藤雅文、石崎義人、酒井康成、

- 山本俊至、奥村彰久、原寿郎：  
PRRT2 変異を有する ICCA 症候群家系に認めた、幼児期発症部分てんかんの一女児例。  
第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分。
4. 磯部菜摘、鳥巢浩幸、實藤雅文、李守永、石崎義人、酒井康成、原寿郎：  
日本脳炎経過中の MRI, SPECT, 脳波所見；10 歳男児例  
第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分。
  5. 李守永、鳥巢浩幸、石崎義人、實藤雅文、酒井康成、原寿郎：  
熱性けいれん重積とけいれん重積型脳症の鑑別における急性期脳波周波数解析。  
第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分。
  6. 李守永、鳥巢浩幸、石崎義人、實藤雅文、酒井康成、原寿郎：  
けいれん重積後より持続脳波モニタリングを行ったけいれん重積型脳症患者の脳波周波数解析。  
第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分。
  7. 石崎義人、鳥巢浩幸、酒井康成、李守永、實藤雅文、原寿郎：  
亜急性硬化性全脳炎と麻疹ワクチン応答の個人差に関連する遺伝子多型についての検討。  
第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分。
  8. 鳥尾倫子、鳥巢浩幸、酒井康成、磯部菜摘、石崎義人、實藤雅文、原寿郎：  
特徴的顔貌、成長障害、精神運動発達遅滞、高カルシウム血症を呈した遠位関節拘縮症の女児例。  
第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分。
  9. 鳥巢浩幸、楠田剛、李守永、賀来典之、磯部菜摘、石崎義人、酒井康成、原寿郎：  
質量分析を用いた小児ウイルス関連脳症のバイオマーカーの検索。  
第 18 回日本神経感染症学会 2013.10.11-12. 宮崎。
  10. 鶴池 清、松下 悠紀、酒井 康成、園田有里、石崎 義人、実藤 雅文、永田 弾、山村 健一郎、鳥巢 浩幸、原 寿郎：  
脳血管周囲腔の拡張を認めた Loews-Dietz 症候群の男児例。  
第 116 回日本小児科学会学術集会 2013.4.19-21 広島。
  11. 鳥巢浩幸、李守永、山口結、石崎義人、實藤雅文、酒井康成、原寿郎：  
急性中枢神経症状を呈する発熱小児における急性脳症の判別  
第 54 回日本小児神経学会総会 2012.5.17-19 札幌。
  12. 鳥巢浩幸、李 守永、賀来典之、實藤雅文、石崎義人、酒井康成、馬場晴久、原 寿郎：  
有熱時けいれん・意識障害を呈する小児における急性脳症の判別に関する検討  
第 17 回日本神経感染症学会総会 2012.10.19-20 京都
  13. 鳥巢浩幸、金城唯宗、石崎義人、實藤雅文、酒井康成、村海信哉、萩原綱一、板倉朋子、酒田あゆみ、原寿郎：  
West 症候群を発症した MCAP/MPPH 症候群の乳児例  
第 46 回日本てんかん学会 2012.10.11-12 東京。
  14. 吉良龍太郎：  
小児免疫性中枢神経疾患の臨床 最近の進歩；小児多発性硬化症。  
第 53 回日本小児神経学会総会 2011.5.26-28 横浜。
  15. 鳥巢浩幸：  
小児免疫性中枢神経疾患の臨床 最近の進歩；小児急性散在性脳脊髄炎の臨床像。  
第 53 回日本小児神経学会総会 2011.5.26-28 横浜。
  16. 長友雄作、實藤雅文、李 守永、福本有里、村田憲治、保科隆之、鳥巢浩幸、石崎義人、原 寿郎：  
急性脳症様症状を呈した、乳児ボツリヌス症の 1 例。  
第 114 回日本小児科学会学術集会 2011.8.12-14 東京。
  17. 鳥巢浩幸、楠原浩一、權藤健二郎、林北見、平林伸一、島川修一、岩松浩子、前垣義弘、安元佐和、日高靖文、奥村彰久、高梨潤一、廣瀬伸一、原 寿郎：  
小児急性脳症における早期尿中 2 ミクログロブリン補正值の検討（第 2 報）。  
第 53 回日本小児神経学会総会 2011.5.26-28 横浜。
  18. 實藤雅文、李守永、鳥巢浩幸、石崎義人、吉川陽子、山口 結、原 寿郎：  
急性脳炎・脳症を疑われた乳児ボツリヌス症の 1 例。  
第 53 回日本小児神経学会総会

- 2011.5.26-28 横浜.
19. 石崎義人、岡本伸彦、鳥巢浩幸、實藤雅文、吉川陽子、山口 結、原 寿郎：  
新規 ATP6V0A2 遺伝子変異を認め、多彩な臨床症状を認めた常染色体劣性型皮膚弛緩症 2 型の 1 例。  
第 53 回日本小児神経学会総会  
2011.5.26-28 横浜.
  20. 李守永、鳥巢浩幸、實藤雅文、石崎義人、吉川陽子、山口 結、原 寿郎：  
発症早期の頭部 MRI で大脳皮質下白質の拡散能低下を呈する急性脳症の検討.第 53 回日本小児神経学会総会  
2011.5.26-28 横浜.
  21. 吉川陽子、鳥巢浩幸、實藤雅文、石崎義人、李 守永、山口 結、矢野珠巨、沢石由記夫、原 寿郎：  
発症早期に診断された、新規 GFAP 遺伝子異常を伴う乳児型 Alexander 病の 1 男児例。  
第 53 回日本小児神経学会総会  
2011.5.26-28 横浜.
  22. 鳥尾倫子、實藤雅文：  
Febrile myoclonus の一例。  
第 53 回日本小児神経学会総会  
2011.5.26-28 横浜.
  23. 鳥巢浩幸、吉川陽子、實藤雅文、石崎義人、李 守永、山口 結、矢野珠巨、沢石由記夫、原 寿郎：  
West 症候群を発症した乳児型 Alexander 病の 1 例。  
第 45 回日本てんかん学会  
2011.10.6-7 新潟.
  24. 實藤雅文、高田 結、鳥巢浩幸、吉良龍太郎、石崎義人、原 寿郎：  
NIRS における、ヘモグロビン濃度変化量の比率を用いた解析法の有用性。  
日本ヒト脳機能マッピング学会  
2011.9.1-2 京都.
  25. 李 守永、實藤雅文、渡邊健二、上松あゆ美、豊島光雄、秦 大資、新垣文雄、鳥巢浩幸、石崎義人、山口 結、原 寿郎：  
急性脳症を発症した先天性副腎皮質過形成患者 3 例の臨床像、MRI 所見の検討  
第 16 回日本神経感染症学会総会  
2011.11.4-5 東京
  26. 園田有里、長友雄作、實藤雅文、李 守永、村田憲治、保科隆之、石崎義人、原 寿郎：  
急性脳症・脳幹脳炎を疑われた乳児ボツリヌス症の 1 例  
第 16 回日本神経感染症学会

2011.11.4-5. 東京

〔図書〕(計 4 件)

1. 原 寿郎、鳥巢浩幸：  
免疫性神経疾患ハンドブック 急性散在性脳脊髄炎  
南江堂、108-120, 2013.
2. 鳥巢浩幸、原 寿郎：  
小児多発性硬化症 p85-91  
<アクチュアル脳・神経疾患の臨床>  
最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎  
中山書店、2012
3. 吉良龍太郎：  
急性散在性脳脊髄炎 P98-101  
小児科臨床ピクシス 急性脳炎・急性脳症、2011 中山書店
4. 吉良龍太郎：  
急性散在性脳脊髄炎  
今日の小児治療指針 第 15 版、2012  
医学書院

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
鳥巢浩幸 10398076

(2) 研究分担者  
吉良龍太郎 70304805  
實藤雅文 50467940  
石崎義人 20572944  
李守永 10529796  
酒井康成 10380396  
楠田剛 90710533  
磯部菜摘 50645992

(3) 連携研究者  
なし