

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659195

研究課題名（和文） タンデムマスと培養細胞を用いる小児薬剤の安全性検証法の開発

研究課題名（英文） Development of evaluation method of drug safety for children using cultured cells and tandem mass spectrometry

研究代表者

山口 清次 (YAMAGUCHI SEIJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：60144044

研究成果の概要（和文）：

成人には無害でも小児に対して健康被害を起こす薬剤が知られている。そこで、培養細胞とタンデムマス質量分析計を用いる *in vitro* probe acylcarnitine (IVP) assay という方法を応用して、小児に対する薬物等の脂肪酸  $\beta$  酸化に対する毒性を評価するシステムを確立した。アスピリン、バルプロ酸などは、脂肪酸代謝の脆弱な細胞で  $\beta$  酸化障害が増強された。ベザフィブレートは  $\beta$  酸化異常症の代謝を改善した。

研究成果の概要（英文）：

There are some drugs which may occasionally toxic for children, despite non-toxic for adults. We use a method, *in vitro* probe acylcarnitine (IVP) assay, using cultured fibroblasts and tandem mass spectrometry (MS/MS) to evaluate fatty acid oxidation (FAO) capacity and toxicity of drugs. Cells from various FAO disorders (medium- to long-chain disorders) were used, and the following results were obtained: Aspirin (antipyretic), and valproic acid (anti-epileptic drug) potentially caused some inhibition of FAO in cells from impaired FAO patients. Bezafibrate (hypolipidemic drug) significantly improved FAO in cells from FAO disorders. Bezafibrate can be a new treatment option for FAO disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

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：脂肪酸代謝異常、インフルエンザ脳症、薬剤安全性、 $\beta$  酸化能、ベザフィブレート

## 1. 研究開始当初の背景

一部の薬剤（解熱剤、抗がん剤、抗けいれん剤など）、あるいは細菌毒素などで、成人では問題にならない量でも小児では健康被害をきたすことがある。バルプロ酸による肝機能障害や、解熱剤（アスピリン、ジクロフェナク酸など）によるライ症候群などが知られている。先天代謝異常である脂肪酸代謝異常の発症形態と類似性がある。

我々は、先天性脂肪酸β酸化異常症の代謝障害を評価する方法として用いる、培養細胞とタンデムマスを使った *in vitro* probe (IVP) assay を応用している。特定の薬剤の、β酸化系に及ぼす影響の有無を調べて、小児への薬剤等の安全性を評価する試みを行った。

## 2. 研究の目的

IVP assay の実験系を用いて、いくつかの薬剤や毒素や生体因子の脂肪酸β酸化への影響を評価して、小児の薬剤等による健康被害の病態、機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

正常と脂肪酸代謝異常症の皮膚線維芽細胞を、ブドウ糖フリー、脂肪酸フリー、カルニチン過剰にした特殊な培養液で培養する。これにパルミチン酸を添加してβ酸化を進行させる。一定時間後（72～96時間）に培養液のアシルカルニチン（AC）をタンデムマス分析して、ACプロファイルからβ酸化能、β酸化障害部位を特定する。

## 4. 研究成果

- (1) 培養条件の検討：上記の培養液に加える薬剤等の添加量を検討した。バルプロ酸、アスピリンともに0.5～1.0 mMの濃度であれば、37℃でも41℃でも、培養時間48～96時間で細胞は生存できることを確認した。
- (2) アスピリンの影響：長鎖脂肪酸代謝の脆弱な細胞（VLCAD欠損症）では、長鎖脂肪酸の代謝がより強く障害されることがわかった。
- (3) バルプロ酸の影響：37℃ではβ酸化への明らかな障害はみられなかったが、高温下（41℃）において、中鎖脂肪酸代謝の脆弱な細胞（MCAD欠損症）では、中鎖脂肪酸代謝障害が増強され、長鎖脂肪酸の脆弱な細胞（VLCAD欠損症）では、長鎖脂肪酸代謝がより強く障害される傾向がみられた。
- (4) ベザフィブレート（高脂血症治療薬）の

β酸化への影響：β酸化異常症（MCAD欠損症、VLCAD欠損症、TFP欠損症、グルタル酸血症2型GA2）の細胞をもちいてIVP assayによって薬理効果を調べた。検査した全例で、ベザフィブレートがβ酸化障害を改善することがわかった。

- (5) サイトカインの影響：インフルエンザなどで増加するサイトカイン、IL-1、IL-6、IFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ を添加してβ酸化能をみたところ、IL-1とTNF- $\alpha$ が長鎖脂肪酸代謝に抑制的に働くことがわかった。
- (6) 今回、有意な影響の証明されなかった薬剤等でも、カルニチン濃度など培養条件を変えたり、細胞内のACプロファイルを評価することによってより正確な病態評価が可能になる可能性がある。

## 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8件）

- (1) 山口清次, 長谷川有紀, 虫本雄一, 小林弘典, プレブスレン・ジャミヤン: GC/MS有機酸分析で発見される小児の後天性ビタミン欠乏症: ビタミンB1欠乏症とビオチン欠乏症. ビタミン 86(1): 32-36, 2012(1月)、査読無
- (2) Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R.: Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy: The importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening. Molecular Genetics and Metabolism 102(4): 399-406, 2011 (April)、査読有  
DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.12.004
- (3) 虫本雄一, 山口清次: 新生児突然死とその予防. 産婦人科治療 102(4): 317-321, 2011(4月)、査読無
- (4) Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S: Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1. Molecular Genetics and Metabolism 102(3): 343-348, 2011 (March)、査読有  
DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.11.159
- (5) Kawana S, Nakagawa K, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot

on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique. Journal of Chromatography B 878: 3113-3118, 2010 (November)、査読有  
DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.09.015

- (6) Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S: In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type2. Journal of Chromatography B 878: 1673-1676, 2010 (Jun)、査読有  
DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.03.029
- (7) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Heat stress deteriorates mitochondrial  $\beta$ -oxidation of long-chain fatty acids in cultured fibroblasts with fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders. Journal of Chromatography B 878(20): 1669-1672, 2010 (Jun)、査読有  
DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.01.046
- (8) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial  $\beta$ -oxidation: Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. Brain & Development 32: 362-370, 2010 (May)、査読有  
DOI: 10.1016/j.braindev.2009.06.001

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 山口清次: 質量分析を応用したミトコンドリア代謝障害の解析. 第117回日本解剖学会総会・学術集会 シンポジウム. 山梨大学甲府キャンパス(甲府市), 2012年3月26日
- (2) 小林弘典, 山田健治, プレブスレン ジャミヤン, 虫本雄一, 高橋知男, 長谷川有紀, 伊藤道徳, 山口清次: ベザフィブラートが有効であった遅発型グルタル酸尿症 2 型の男児例. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. ホテルニューオータニ幕張 (千葉市), 2011 年 11 月 26 日
- (3) 山田健治, 小林弘典, 虫本雄一, プレブスレン ジャミヤン, 長谷川有紀, 山口清次: グルタル酸尿症 2 型に対するベ

ザフィブラートの効果 : in vitro probe assay による評価. 第 53 回日本先天性代謝異常学会. 千葉, ホテルニューオータニ幕張 (千葉市), 2011 年 11 月 25 日

- (4) Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Okamoto A, Ohta M, Yamaguchi S: Emetic toxin of bacillus cereus that associates with reye-like syndrome severely inhibits mitochondrial fatty acid oxidation. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. International Conference Center (Geneva, Switzerland), 2011/8/31
- (5) 山口清次: ベザフィブラートのミトコンドリア  $\beta$  酸化異常症に対する治療-in vitro probe assay による評価-. 第 53 回日本小児神経学会総会. パシフィコ横浜 (横浜市), 2011 年 5 月 27 日
- (6) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukao T, Fukuda S: A hypolipidemic drug, bezafibrate, can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research. Colorado Convention Center (Denver, USA), 2011 /4/30
- (7) Purevsuren J, 長谷川有紀, 山口清次: Acute encephalopathy due to emetic toxin of bacillus cereus and mitochondrial fatty acid oxidation disturbance. 第 42 回日本小児感染症学会. 仙台国際センター (仙台市), 2010 年 11 月 27 日
- (8) 山口清次: 質量分析を用いたメタボロミクス解析による先天代謝異常の診断、病態評価. 第 2 回臨床メタボロミクス研究会 講演. 神戸大学医学部 (神戸市), 2010 年 11 月 30 日
- (9) Yamaguchi S: Organic acidemia and its treatment in JAPAN. 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening, Symposium. Discovery Kartika Plaza, Kuta Bali, Indonesia, 2010/10/5
- (10) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial fatty acid oxidation (FAO) in FAO disorders: evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. Society for the study of inborn errors of

metabolism. The Istanbul Convention and Exhibition Center, Istanbul, Turkey, 2010/8/31

- (11) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李紅, プレブスレンジャミヤン, 山口清次: 末梢リンパ球とタンデム質量分析を用いた簡便な脂肪酸代謝異常症の酵素活性評価. 第 113 回日本小児科学会. 盛岡市民文化ホール (盛岡市), 2010 年 4 月 23 日
- (12) 内田由里, 長谷川有紀, 虫本雄一, 高橋知男, 小林弘典, 山口清次: インフルエンザ脳症と代謝異常症の関連について. 第 85 回山陰小児科学会. 松江テルサ (松江市), 2010 年 4 月 4 日

[図書] (計 1 件)

- 1) 山口清次編: 有機酸代謝異常ガイドブック GC/MS データの読みかた・活かしかた, 診断と治療社, 東京, 2011 (6 月, 全 195 頁)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 清次 (YAMAGUCHI SEIJI)  
島根大学・医学部・教授  
研究者番号: 60144044

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

長谷川 有紀 (HASEGAWA YUKI)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号: 00362921

小林 弘典 (KOBAYASHI HIRONORI)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号: 70397868

虫本 雄一 (MUSHIMOTO YUICHI)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号: 90467712

PUREVUSUREN Jamiyan  
(PUREVSUREN JAMIYAN)  
島根大学・医学部・外国人特別研究員