

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791176

研究課題名（和文）セレウス菌感染によるライ様症候群の臨床像および病態に関する研究

研究課題名（英文）A study of Reye-like syndrome associated with emetic toxin of bacillus cereus

研究代表者

小林 弘典 (HIRONORI KOBAYASHI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：70397868

研究成果の概要（和文）：本研究ではタンデムマスによるアシルカルニチン分析を用いてセレウス菌感染症患者の脂肪酸代謝についての評価を行い、培養皮膚線維芽細胞を用いた *in vitro* の検討においてはセレウリドと脂肪酸代謝に及ぼす影響を検討した。

患者血液を用いた検討においては、長鎖アシルカルニチンの軽度上昇を認めたものの、特異的な脂肪酸代謝障害を示唆する所見は得られなかった。

in vitro における検討ではセレウリドによりグルタル酸尿症 2 型に類似した脂肪酸代謝障害のプロファイルを呈し、濃度依存性に脂肪酸代謝が障害することを明らかにした。セレウリドはミトコンドリア内膜を破壊するといわれており、今回の広範なスペクトラムの脂肪酸代謝障害所見と矛盾しなかった。一方、患者から得られた血液検体の所見は必ずしも広範な脂肪酸代謝障害を示唆するものではなかった。今後はセレウリドの血中濃度や組織特異的濃度についての検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to investigate the effect on the fatty acid metabolism of the patients with *Bacillus cereus* infection by an acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry, and to investigate effect of cereulide, emetic toxin from *B. cereus*, on fatty acid metabolism using *in vitro* acylcarnitine probe (IVP) assay of cultured fibroblasts.

The acylcarnitine-profile of two patients with *B. cereus* infection revealed to be non-specific elevation of long-chain acylcarnitines. The result of IVP assay revealed that cereulide could inhibit fatty acid metabolism profiles fatty acid metabolism, resulting the similar acylcarnitine-profile to glutaric aciduria type 2. In addition, cereulide impaired fatty acid oxidation in concentration-dependent, the profile of acylcarnitines of IVP assay suggested toxic effect of cereulide on fatty acid oxidation was actualized from concentration of 50-100 ng/ml.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：脂肪酸代謝障害、ミトコンドリア、セレウス菌、セレウリド、タンデムマス、アシルカルニチン

1. 研究開始当初の背景

セレウス菌は食中毒の原因菌として知られている。セレウス菌感染症では、嘔吐毒素であるセレウリドによってその臨床像が形成されるが、セレウス菌感染症にともなうライ様症候群の報告がなされている。ライ様症候群はミトコンドリア脂肪酸β酸化異常症（脂肪酸代謝異常症）などでよく見られる臨床像である。セレウリドはミトコンドリアにも作用する事が知られているが、脂肪酸代謝障害に関する詳細な検討はなされていない。近年、脂肪酸代謝障害、脂肪酸代謝異常症の診断に対して、タンデムマスによるアシルカルニチン分析が普及してきており、少量の血液試料から広範な脂肪酸代謝スクリーニングが可能となった。申請者らは2003年からタンデムマスを導入し、脂肪酸代謝異常症等の研究を行ってきた。また、申請者の属する教室では脂肪酸代謝異常症の研究を通じて蓄積された培養皮膚線維芽細胞や血液試料があり、今回検討を行った脂肪酸代謝異常症への検討が行い易い状況であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、1) ライ様症候群をきたしたセレウス菌罹患患者のアシルカルニチン分析を行い、脂肪酸代謝セレウス菌感染症患者の臨床像を詳細に検討する事に加え、2) セレウリドのミトコンドリア脂肪酸代謝への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) アシルカルニチン分析によるセレウス菌感染症患者の集積

臨床症状から脂肪酸代謝異常症やライ様症候群などが疑われた患者の血中アシルカルニチン分析を行った。アシルカルニチン分析にはろ紙血もしくは血清を検体として用いた。分析はブチル誘導体化法を用いた。セレウス菌感染症については細菌学的な検索もしくは血清のセレウリド上昇が認められた症例を確定例とした。

(2) 線維芽細胞を用いたセレウリドの脂肪酸代謝への影響の検討

現在保有している脂肪酸代謝異常患者および健常コントロールの線維芽細胞を用いて、これまでに確立している *in vitro* probe assay を改良した研究を行った。すなわち、細胞が脂肪酸を要求する条件下においてコントロールの細胞にセレウリドを加え、一定時間細胞培養を行ったのち、培養液（細胞外液に近似する）のアシルカルニチンを測定する。脂肪酸代謝障害があれば、酵素の障害部位に応じた培養液中の特異的なアシルカルニチンの増加が確認できるのでこれらのプロフィールを比較検討した。また、これらの

結果をセレウリドを添加せずに行った脂肪酸代謝患者から得られた細胞のプロフィールと比較し、病態を解析した。

4. 研究成果

1. セレウス菌感染症に伴う脂肪酸代謝障害を来した症例の集積

タンデムマスを用いて、アシルカルニチン分析による代謝スクリーニングを行った。平成23年度はろ紙血1,322検体、血清449検体、平成24年度はろ紙血909検体、血清221検体を分析した。胃腸炎症状を伴いライ様症候群を来した症例の中から2症例について広汎な脂肪酸代謝障害を認めたが、それらの症例でのセレウス菌感染は証明されなかった。

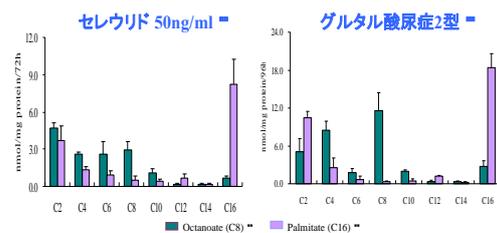
これまでに見出したセレウス菌感染症確定例2症例についてのアシルカルニチンプロフィールの詳細な検討を行った。そのうち1症例は遊離カルニチン、長鎖アシルカルニチン等の広汎な上昇を認めた。グルタル酸尿症2型に類似するプロフィールであったが、検体の溶血所見が強く非特異的上昇である可能性が疑われた。残りの1例については、C14:1等の軽度上昇がみられるものの、脂肪酸代謝障害を示唆する程度の上昇ではなく、非特異的上昇の範囲と考えた。

以上の結果から、アシルカルニチン分析ではセレウス菌感染症患者の脂肪酸代謝障害の様子を観察することが困難である可能性が示された。

2. 培養皮膚線維芽細胞を用いたセレウリドの脂肪酸代謝への影響の検討

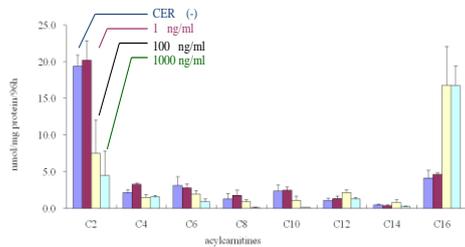
前述の培養皮膚線維芽細胞を用いた *in vitro* probe assay を応用してセレウス菌 (*Bacillus cereus*) から分泌される毒素であるセレウリドが脂肪酸代謝異常症に及ぼす影響を検討した。セレウリド濃度を50 ng/ml として検討を行った際のアシルカルニチンプロフィールは我々が所有するグルタル酸尿症2型の症例と類似し、中鎖から長鎖アシルカルニチンが広汎に上昇していた(図1)。

図1 グルタル酸尿症2型とセレウリド添加時のアシルカルニチンプロフィールの比較



また、セレウリドは低濃度(1 ng/ml)では正常コントロールとの差を認めず、100 ng/ml、1000 ng/ml と濃度依存性に脂肪酸代謝能を阻害する事が明らかになった。これらの事から少なくとも一定量までは脂肪酸代謝に与える影響は少ないが、ある濃度に至ると脂肪酸代謝を著しく阻害する事が示唆された(図 2)。

図 2 セレウリド濃度による脂肪酸代謝能の変化



セレウリドはミトコンドリア内膜を物理的に障害するといわれており、今回の広範なスペクトラムの脂肪酸代謝障害所見と矛盾しなかった。一方、患者から得られた血液検体の所見は必ずしも広範な脂肪酸代謝障害を示唆するものではなかった。今後はセレウリドの血中濃度や組織特異的濃度についての検討が必要である。

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 4 件)

- 1) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furui M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Taketani T, Fukao T, Fukuda S. Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: Evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012 Sep;107:87-91. (査読あり)
- 2) Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Fukao T, Yamaguchi S. Clinical and molecular aspects of Japanese children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012 Sep;107:237-240. (査読あり)
- 3) 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*. 2011 April;102(4):399-406. (査読あり)

- 4) Yagi M, Lee T, Awano H, Tsuji M, Tajima G, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takeshima Y, Matsuo M. A patient with mitochondrial trifunctional protein deficiency due to the mutations in the HADHB gene showed recurrent myalgia since early childhood and was diagnosed in adolescence. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011 Dec;104(4): 556-559. (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) 小林弘典, 和田泰格, 鈴木絵理, 山田健治, 高橋知男, プレブスレン ジャミヤン, 長谷川有紀, 長谷川行洋, 山口清次. 新生児発症型グルタル酸尿症 2 型男児例に対する Bezafibrate 治療の経験. 第 54 回日本先天代謝異常学会 2012. 11. 15-17, (岐阜市)じゅうろくプラザ
- 2) 小林弘典, 高橋知男, 山田健治, 長谷川有紀, 山口清次. ピボキシル基を含む抗菌薬によりカルニチン欠乏症をきたした 24 例の臨床像. 第 64 回中国四国小児科学会 2012. 11. 10-11, (香川)香川大学
- 3) 山田健治, 小林弘典, Jamiyan Purevsuren, 高橋知男, 長谷川有紀, 山口清次. 新生児発症型グルタル酸尿症 2 型に対するベザフィブラートの有効性の検討: In vitro probe acylcarnitine assay の結果との関連性: 第 37 回日本医用マススペクトル学会年会 2012. 10. 25-26, (名古屋)愛知県産業労働センター
- 4) Kobayashi H, Mushimoto Y, Hasegawa Y, Yamada K, Purevsuren J, Takahashi T, Minohata T, Iida J, Yamaguchi S. Acylcarnitine analysis by ESI-MS/MS with smaller amount of sample and rapid analytical time. 19th International Mass Spectrometry Conference 2012. 9. 15-21, Kyoto International Conference Center, Japan
- 5) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S. Application of in-vitro probe acylcarnitine assay using tandem mass spectrometry for the evaluation of mitochondrial fatty acid oxidation. 19th International Mass Spectrometry Conference 2012. 9. 15-21, Kyoto International Conference Center, Japan
- 6) 山口清次, Purevsuren J, 小林弘典, 長谷川有紀. セレウス菌食中毒による急性

脳症はミトコンドリアβ酸化障害を介して起こる．第54回日本小児神経学会2012.5.17-19, (札幌)ロイトン札幌

7) Kobayashi H, Yamada K, Prevsuren J, Mushimoto Y, Takahashi T, Hasegawa Y, Ito M, Yamaguchi S. Beneficial effect of bezafibrate on boy with the late-onset glururic aciduria type 2. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. 2012.4.1-6, Seoul, Korea

8) 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 Matabolism August 30-September 2, 2011, Geneva, Switzerland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 弘典 (KOBAYASHI HIRONORI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：70397868

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし