

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659498

研究課題名(和文) 培養細胞とタンデムマスとを用いた小児感染毒素等による酸化障害評価法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to evaluate the fatty acid oxidation impairment by infection using cultured cells and tandem mass spectrometry, in children

研究代表者

山口 清次 (Seiji, Yamaguchi)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：60144044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性脳症の機序として、細菌毒素、使用される薬剤、高温環境などによる脂肪酸酸化障害の関与の可能性を検討した。方法は、培養細胞とタンデムマスを用いるin vitro probe (IVP) assayによる酸化能評価法を応用した。

その結果、食中毒菌であるセレウス菌の毒素セレウリド、高温環境(41℃)あるいは解熱剤のアスピリンとジクロフェナクは脂肪酸酸化を障害する可能性が示された。解熱剤の中でもアセトアミノフェンは安全なことが推測された。小児の感染時に一部の細菌毒素、解熱剤、あるいは高熱環境は急性脳症発症のリスクがある。これらの研究成果はより安全な小児診療に役立つ。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of acute encephalopathy in young children is often unknown in many cases. Onset of acute encephalopathy is not infrequently similar to that of congenital fatty acid oxidation (FAO) disorders. Influence of bacterial toxins, antipyretic drugs, or heat stress by hyperpyrexia on FAO was determined by in vitro probe (IVP) assay using cultured fibroblasts, and tandem mass spectrometry, changing the circumstance of cell culture.

The results were as follows: (i) cereulide, a toxin of *Bacillus cereus*, which occasionally causes acute encephalopathy in infants, disturbed FAO; (ii) heat stress possibly causes exacerbation of FAO in long-chain FAO disorders; (iii) antipyretics, salicylate (metabolites of Aspirin), and Diclofenac disturbed FAO in normal control cells, while acetaminophen did not. These findings may be consistent with clinical observation. The above findings will be of help for prevention of acute encephalopathy in children with infectious disease and/or hyperpyrexia.

研究分野：小児科学、先天代謝異常

キーワード：脂肪酸酸化 セレウリド タンデムマス法 in vitro probe assay 急性脳症 解熱剤 heat stress

1. 研究開始当初の背景

小児では感染等を契機に急性脳症を起こす症例に遭遇することは少なくない。例えば、インフルエンザ脳症や食中毒などともなう急性脳症などである。この機序の病態は十分に解明されていない。一方、先天性脂肪酸β酸化異常症は、安定している時は無症状にみえても感染などを機に急性脳症様の症状で発症することが多く、この点で類似点がある。感染時の何らかの毒素等がβ酸化を阻害する結果として、急性脳症が引き起こされるという仮説を立てた。この仮説が正しければ、急性脳症発症の予防策や治療法の確立に有用である。

2. 研究の目的

培養皮膚線維芽細胞を用いて、細菌毒素、感染時のサイトカイン、あるいは高熱等の環境による負荷をかけて、β酸化系への影響を *in vitro* で調べる。そしてβ酸化障害という代謝異常の面から急性脳症の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

培養細胞とタンデムマス法を組み合わせ、β酸化能を評価する方法 (*in vitro* probe assay、以下 IVP assay) を応用し、培養液に感染毒素、サイトカイン類、あるいは高温などといった環境への負荷をかけて、β酸化能への影響を調べた。

(1) *In vitro* probe (IVP) assay

ヒト皮膚線維芽細胞を用いた。遊離脂肪酸フリー、ブドウ糖低濃度、カルニチン過剰に調整した特殊な培養液に、パルミチン酸を添加して、96時間培養した。培養液の上清を取りタンデムマス法によってアシルカルニチンを測定した。

(2) 細菌毒素の負荷

食中毒を引き起こすセレウス菌の毒素セレウリド(名古屋大学細菌学より供与)、ペロ毒素、およびカンピロバクター毒素(以上2つは麻布大学より供与)を培養液に添加して、IVP assayを行った。

(3) 培養温度環境を高温と低温下で評価

正常細胞と長鎖脂肪酸代謝異常症(CPT2欠損症、TFP欠損症、およびグルタル酸血症2型:GA2)患者由来の細胞を用いて、37の他に41(高温)と33(低温)でIVP assayを行った。

(4) 解熱剤の影響

感染時に解熱剤を使用されることが多い。代表的な解熱剤であるアスピリン、ジクロフェナク、およびアセトアミノフェンを培養液

に添加してIVP assayを行った。

(5) ベザフィブラートによるβ酸化改善効果
β酸化障害のレスキュー効果を評価するために、ベザフィブラート(BEZ)をβ酸化異常症患者の細胞(VLCAD欠損症、TFP欠損症、CPT2欠損症、およびGA2)の培養液に添加してIVP assayによってβ酸化障害のレスキューについて検討した。

4. 研究成果

(1) 細菌毒素の負荷

セレウス菌の毒素セレウリド:正常細胞に負荷したところ、C16アシルカルニチンの蓄積が観察された。このことから、セレウリドは長鎖脂肪酸の代謝障害を引き起こすことが推察された。急性β酸化障害を介して急性脳症に発展する可能性が高いと結論づけられた。

ペロ毒素、カンピロバクター毒素:病原大腸菌由来のペロ毒素存在下では、細胞が急激に減少してβ酸化能の評価は困難であった。ペロ毒素は溶血毒であり、β酸化障害を介するというよりも細胞毒のために脳症様症状に至ることが推測された。カンピロバクター毒素の場合細胞が生育できる濃度の範囲内では、特にβ酸化障害の所見は観察されなかった。

以上より、セレウリドのような一部の毒素はβ酸化障害を介して急性脳症を引き起こし、別の細菌毒素による脳症の場合、β酸化障害を介さない機序で急性脳症に至るものと思われる。

(2) 高温と低温環境下で評価

37の他に41(高温)と33(低温)の環境で調べたところ、正常細胞では明らかな変化は見られなかった。しかし、脂肪酸代謝異常症(CPT2欠損症、TFP欠損症、およびGA2)患者由来の細胞では、高温下において長鎖脂肪酸のβ酸化障害が増悪することが観察された。一方、低温下では、脂肪酸代謝異常症の異常所見が緩和した。

以上より、体質的に長鎖脂肪酸のβ酸化系の脆弱な体質の場合、発熱時に症状を増悪させる可能性がある。一方低温下では異常が緩和される可能性が高い。

(3) 解熱剤の影響

代表的な解熱剤として、アスピリン、ジクロフェナク、およびアセトアミノフェンを調べた。その結果、アスピリンとジクロフェナクでは、β酸化が抑制される所見が得られた。一方、アセトアミノフェンではβ酸化への影響は見られなかった。

アスピリンやジクロフェナクは疫学調査の結果、急性脳症のリスクがあるため、原則として小児への投与控えるようリコメンドされている。一方アセトアミノフェンに関し

ては安全な解熱剤とされている。今回の研究はこれを支持する結果であり、解熱剤の一部がβ酸化障害を介して急性脳症、ライ症候群様症状へ発展するリスクがあることを示す。

(4) ベザフィブラートのβ酸化改善効果

β酸化異常症の患者細胞を用いて、高脂血症薬ベザフィブラート (BEZ) によるβ酸化障害のレスキュー効果を評価した。その結果、テストしたβ酸化異常症患者の細胞 (VLCAD 欠損症、TFP 欠損症、CPT2 欠損症、およびGA2) すべてにおいて、増加していたアシルカルニチンが正常化する傾向を観察した。

すなわち、BEZ はβ酸化異常を改善させる効果が期待される。しかし高温下で BEZ を添加して細胞を培養すると急速に細胞が死滅する所見が観察された。高温下みられるβ酸化障害を BEZ が改善させるとは言えないことも留意すべきである。

結論として以下のことが導かれた。食中毒菌の一部 (セレウス菌など) によるβ酸化の障害を介して急性脳症が起こる可能性がある。体質的にβ酸化系の脆弱な個体では発熱時の高温下でβ酸化障害がさらに顕在化し、その結果として急性脳症に発展する可能性が考えられる。解熱剤のうちアスピリンとジクロフェナクはβ酸化を阻害する可能性があり、これらの使用は急性脳症、ライ症候群の発症に関連する可能性がある。一方疫学的に安全と考えられているアセトアミノフェンではβ酸化を阻害する所見は得られなかった。臨床的観察を支持する所見であった。小児に対して使用する解熱剤の種類に注意を払う必要がある。BEZ はβ酸化障害を改善させる薬剤として期待されるが、発熱時における症状増悪に対する安全性についてはさらに検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

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* 41(5): 799-802, 2015 (査読有)

DOI: 10.1111/jog.12609

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 (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.084

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* 36(2): 232-239, 2015 (査読有)

DOI: 10.1002/humu.22730

Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyoe P, Sathienkijanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain and Development* 37, in press (査読有)

DOI: 10.1016/j.braindev.2014.10.005
Yamaguchi S, Purevsuren 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(査読有)

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=dc9massc/2013/002303/004&name=0270-0276e&UserID=202.250.215.249>

Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Anal Bioanal Chem* 405(4): 1345-1351, 2013 (査読有)

DOI: 10.1007/s00216-012-6532-3

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 (査読有)

DOI: 10.1542/peds.2012-0030

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* 107: 87-91, 2012 (査読有)

DOI:10.1016/j.yimgme.2012.07.004
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* 107: 237-240, 2012 (査読有)
DOI:10.1016/j.yimgme.2012.06.010

[学会発表](計 39 件)

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. 江陽グランドホテル, 仙台, 2014.11.13-11.15

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. Congress Innsbruck, Innsbruck, Austria, 2014.9.2-9.5

Yamaguchi S: Screening, diagnosis, and treatment of organic and fatty acid disorders. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) Educational lecture. Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort, Chiba, Japan, 2013.11.27-11.29

Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. InterContinental RIYADH, Riyadh, Saudi Arabia, 2013.9.14-9.18

Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS>S) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta Marriott Marquis, Atlanta, USA, 2013.5.5-5.10

Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013.

PGIMER & Dr. RML Hospital, New Delhi, India, 2013.4.4-4.8

高橋知男, 山田健治, プレブスレンジャミヤン, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: アスピリンと酸化機能の関連性の検討: in vitro probe assay による評価. 第 54 回日本先天代謝異常学会. じゅうろくプラザ, 岐阜, 2012.11.15-11.17

Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamada K, Takahashi T, Ichiyama T, Yamaguchi S: Effect of proinflammatory cytokines on mitochondrial fatty acid oxidation in development of acute encephalopathy. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2012. ICC, Birmingham, UK, 2012.9.4-9.7

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酸化障害を介して起こる. 第 54 回日本小児神経学会. ロイトン札幌, 札幌, 2012.5.17-5.19

Yamaguchi S: Current topics in diagnosis and treatment of mitochondrial fatty acid oxidation disorders. 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 Symposium. Lotte Hotel Seoul, Seoul, Korea, 2012.4.1-4.6

[図書](計 4 件)

山口清次: ミトコンドリア脂肪酸β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

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

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

山口清次編: タンデムマス・スクリーニングガイドブック, 診断と治療社, 東京都, 2013(全 151 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