

表 4 低ナトリウム血症出現時の主要症状

患者	1	2	3	4
脳卒中様発作	3	12	6	1
心不全の増悪	1*	0	2	0
急性腎不全	0	0	0	1
重篤な麻痺性イレウス*	0	0	0	1
特記すべき症状なし	1	7	4	1

*心不全の増悪に脳卒中様発作か合併

*高圧酸素療法、外科治療を要した

表5 低ナトリウム血症時の内分泌学的検査結果 (患者 1, 2, 3)

患者	1	2	3
年齢 (yr mo)	11 5	16 8	20 1
血清ナトリウム (mmol/L)	114	124	124
尿中ナトリウム (mmol/L)	209	142	156
尿中ナトリウム排泄率 (%)	2 9	2 0	2 2
血漿浸透圧 (mmol/kg)	229	250	249
尿浸透圧 (mmol/kg)	526	582	593
血清クレアチニン [μ mol/L (10-40)]	10 6	22 8	30 5
血清尿素窒素 [μ mol/L of urea (3 0-6 5)]	2 5	3 6	4 2
血清尿酸 [μ mol/L (120-420)]	369	309	202
血清コルチゾール [nmol/L (110-520)]	589	331	193
血清遊離サイロキシン [pmol/L (10-36)]	15 4	19 3	14 1
血清抗利尿ホルモン (pg/ml)	14 1	0 9	0 8
血清レニン活性 [ng/L \cdot s (0 1-0 8)]	0 14	0 14	0 22
血清アルトステロン [pmol/L (83-666)]	110	94	55

()内は正常範囲

当科におけるミトコントリア脳筋症におけるクレアチン治療の現状

分担研究者 中野 和俊 東京女子医科大学小児科講師

研究協力者 古村聖美、武藤順子、田良島美佳子、佐々木香織、
中山智博、大澤真木子 東京女子医科大学小児科

研究要旨 クレアチンの補充療法が種々の疾患で注目されているか、ミトコントリア脳筋症に対するクレアチン補充の効果はまた報告が少ない。クレアチンをミトコントリア脳筋症に投与し、①その効果を臨床経過および脳波の変化の検討、また、②クレアチンの体内動態を検討した。クレアチンの補充は、細胞内のクレアチン/クレアチンリン酸の貯蔵を増加させ ATP の供給を高める可能性があると考えられる。クレアチン補充はミトコントリア脳筋症に有効性が認められた。

A 研究目的

ミトコントリア脳筋症はミトコントリアまたは核する疾患である。これまでにミトコントリア脳筋症に対しビタミン B1、B2、C などの各種ビタミン、Coenzyme Q10、Cytochrome c などの電子伝達系の基質、シクロ酢酸ナトリウムなどが投与されてきたが根本的治療は未確立である¹⁾²⁾。近年、クレアチンの補充療法が種々の疾患で注目されているか、ミトコントリア脳筋症に対するクレアチン補充の効果はまた報告が少ない。我々はクレアチンをミトコントリア脳筋症に投与し、①その効果を臨床経過および脳波の変化の検討、また、②クレアチンの体内動態を検討したので報告する。

B 研究方法

【対象】

① その効果を臨床経過および脳波の変化の検討

対象は Leigh 症候群 1 例、MELAS (Mitochondrial encephalopathy, myopathy and stroke-like episodes) 2 例。Leigh 症候群は 1 歳 6 ヵ月発症で、ミトコントリア DNA np A8344G

DNA 変異によりミトコントリア機能が障害を受けて進行性退行性に症状が進行

変異を呈する 2 歳 5 ヵ月の女児。MELAS 例は 3 歳、9 歳発症でミトコントリア DNA np A3243G 変異を呈する 2 歳 5 ヵ月の女児。9 歳、および 11 歳の女児。

② クレアチンの体内動態の検討

対象は、ミトコントリア脳筋症の 5 例で、内訳は Leigh 症候群 1 例 9 ヵ月発症が、ミトコントリア DNA np T8993G 変異を呈する 11 ヵ月男児、MELAS 1 例 9 歳発症でミトコントリア DNA np A3243G 変異を呈する 10 歳女児、MERRF (Myoclonus epilepsy with ragged red fibers) 1 例 9 歳発症でミトコントリア DNA np A8344G 変異を呈する 11 歳女児、分類不能 2 例 12 歳、38 歳発症で cytochrome c oxidase 部分欠損を示す 25 歳、51 歳の親子例。

【方法】

クレアチンは、内服で最初 2 週間は 0.2g/kg/日、分 2 回、その後、維持量の 0.08～0.2g/kg/日、分 2～3 回を投与した。

① その効果を臨床経過および脳波の変化の検討

MELAS の2例において覚醒時の脳波周波数分析、 $(\delta + \theta)/(\alpha + \beta)$ の解析を行い脳波上の改善を検討した。

② クレアチンの体内動態の検討

開始前と2週間後、さらに3ヵ月あるいは6ヵ月後に血中と髄液中クレアチン、乳酸、ピルヒン酸を測定と好氣的運動負荷試験を施行した。開始後1~2週でクレアチン血中動態を測定した。MELASとMERRFの2例でMRSも内服前後で施行しました。

なお、クレアチン投与は、倫理委員会の承認後、患者家族のインフォームトコンセントを得た上で行った。

(倫理面への配慮)

C 研究結果

① その効果を臨床経過および脳波の変化の検討

クレアチン投与により、Leigh 症候群例では粗大運動、微細運動の改善、呼吸機能改善に伴い、夜間酸素飽和度の改善をみた。3歳発症のMELAS例では、発症時はチトクロームCが筋力の改善に有効であったが6歳時から出現した卒中様発作には無効であった。この発作に対し、シクロ酢酸ナトリウムが一時有効であったが、7歳時再び卒中様発作が頻回になりクレアチン投与し卒中様発作は著しく減少しADLが改善した。9歳発症のMELAS例でもクレアチン投与により頭痛発作の改善をみた。

脳波周波数分析ではMELASの2例でクレアチンによる脳波上の改善が認められた。

② クレアチンの体内動態の検討

クレアチン投与時の血中動態は、1例以外は1~2時間後にピークを示し、半減期は3~4時間であった。クレアチン投与時の脳内移行の検討では、投与2週間後の髄液中、クレアチンの上昇を認め、投与2ヵ月

時のMRSで脳実質のクレアチンの増加を認めた。これらの結果から、クレアチンの脳内への移行が確認された。クレアチンの長期投与で、3ヵ月、6ヵ月で血液、脳脊髄液、脳実質のクレアチン濃度がピーク時に比べて低下の傾向を認めた。

クレアチン投与により臨床的には5例中4例で効果を認めたが、1例でミオクロヌスの増悪があった。クレアチン投与により血液、脳脊髄液の乳酸、ピルヒン酸は変化が認められず、好氣的運動負荷試験でも変化は認められなかった。

D 考察

クレアチン補充療法はこれまで心不全、腎障害、スポーツにおける筋力増強、guanidinoacetate methyltransferase 欠損症などに投与されてきている。ミトコントリア脳筋症へのクレアチン療法はこれまで Hagenfeldt ら、Borhert ら、Tranopolsky らの報告がある。細胞内ではミトコントリアのクレアチンキナーゼによりクレアチンは高エネルギーのクレアチンリン酸に変換され、細胞内で細胞質のクレアチンキナーゼによりクレアチンリン酸がクレアチンに変換され、その際ADPはATPに変換されるクレアチン shuttle が存在する。クレアチンの補充は、細胞内のクレアチン/クレアチンリン酸の貯蔵を増加させATPの供給を高める可能性があると考えられる。

E 結論

今回の検討でクレアチン補充はミトコントリア脳筋症に有効性が認められた。今後、ミトコントリア脳筋症に対する治療法の1つとして、注意深く臨床を観察して試みる価値があると思われる。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) 中野和俊、他 東京女子医科大学
雑誌 70 , E10-15、2000
- 2) 大津真優、中野和俊、他 脳と発
達 35 , 71-74、2003

2 学会発表

- 1) 中野和俊、中山智博、佐々木香織、田
良島美佳子、齋藤加代、大澤真木子、大澤
郁郎、太田成男。核を持たずにミトコント
リア活性を示す“ミトコントリア細胞”の
培養成功。2002年 第44回日本小児神経
学会 仙台
- 2) 中野和俊、大澤郁郎、山縣久美、中山
智博、佐々木香織、田良島美佳子、立川恵
美子、道津裕季、齋藤加代子、大澤真木子、
太田成男。核を持たずにミトコントリア活
性を示す“ミトコントリア細胞”の培養成
功。2002年 第2回日本ミトコントリア研
究会 東京
- 3) 松崎美保子、中野和俊、佐々木香織、
中山智博、多良島美佳子、立川恵美子、大
澤真木子。MELASにおける脳卒中様発作
の臨床的特徴、脳画像の経時的変化。2002
年 第2回日本ミトコントリア研究会 東
京

H 知的財産権の出願・登録状況（予定も 含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
分担研究報告書

小児期発症のミトコントリア脳筋症に対する L-アルギニンおよびシクロロ酢酸療法の効果判定と分子病態を踏まえた新しい治療法開発に関する臨床研究

高乳酸血症と脳卒中様症状を伴うミトコントリア脳筋症の臨床的研究

分担研究者 松岡 太郎 市立豊中病院 小児科医長

研究要旨 高乳酸血症と脳卒中様症状を伴うミトコントリア脳筋症 (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes、以下 MELAS) は、繰り返す脳卒中様症状 (stroke-like episode、以下 SE) が特徴的であり、SE を伴わない他のミトコントリア脳筋症とは一線を画している。この SE が MELAS の病態解明の手掛かりになると期待され、MRI や SPECT など複数の頭部画像検査を組み合わせた経時的な研究もされているが、不明な点が多い。一方、MELAS は突然の SE の発症のため救急医療の対象となりやすい疾患である。「繰り返すてんかん発作」ではなく MELAS と早期診断すると共に、SE 発症時の的確な判断と初期治療が重要であると考えられる。今回、2 例の MELAS で合計 15 回の SE を経験したので、その臨床経過と検査所見につき報告する。

A 研究目的

MELAS の SE の臨床的特徴を明らかにする。

B 研究方法

共に女兒の MELAS 2 例を対象とした。症例 1、症例 2 の現在の年齢は、それぞれ 19 歳と 8 歳である。症例 1 の家族歴に特記事項はなく、本人の既往歴・発達歴に拡張型心筋症と軽度の知能低下を認めた。症例 2 の姉は低身長のため成長ホルモン療法中で、本人の既往歴・発達歴に低身長と精神運動発達遅滞を認めた。症例 1、症例 2 の当科初診時年齢はそれぞれ 14 歳、3 歳で、診断確定時年齢はそれぞれ 14 歳（初回の SE 後）、4 歳（2 回目の SE 後）である。2 例共に、血液を用いた PCR 法による検索で、ミトコントリア DNA 塩基番号 3244 のアデニン (A) からグアニン (G) への点変異を認めた（遺伝子解析をしていただきました国立精神・神経センター神経研究所の後藤雄一先生に深

謝いたします）。経過観察期間は共に 4 年 9 ヶ月である。経過観察中、SE の間欠期に使用した薬剤は、症例 1 においてはフェニトイン、コエンザイム Q10、チトクローム製剤、コハク酸、ビタミン類、シクロロ酢酸、インシュリンで、症例 2 においてはフェニトイン、コエンザイム Q10、フェノハルヒタール、ハルプロ酸、チトクローム製剤であった。

SE とは次の 3 項目を満たすものと定義した。

- ① 痙攣や意識障害などの急性の中樞神経症状が出現した。
- ② ①に関連して、頭部 CT や頭部 MRI で新しい局所病変の出現が確認できた。
- ③ 入院にて加療や経過観察できた。

2 例の MELAS の合計 15 回の SE につき、診療録を後方視的にチェックし、中樞神経症状の種類、血液ガス所見、頭部画像検査所見、予後などにつき検討した。

C 研究結果

- ① 2例で合計15回のSE中、痙攣は10回で認められた。このうち片側性は6回で、全て意識障害を認めなかった。
- ② 神経症状出現後4時間以内に測定した血液ガス12回中、代謝性アシトシスを認めたのは2回のみであった。
- ③ 神経症状出現後12時間以内に施行した頭部CT11回中、新しい局所病変を認めたのは1回のみであった。
- ④ 10回のSEでは、8時間以内に主な神経症状は消失した。
- ⑤ 4回のSEで痙攣重積となった。このうち3回では、止痙後、運動機能の低下や知的退行が明らかであった。
- ⑥ ④の10回と⑤の4回を発症時に鑑別することは困難であった。

D 考察

その病態から容易に予想できることではあるが、MELASの痙攣はその半数以上が単純部分発作であった。ただ、二次性全般化もまれてはなく、また、薬剤抵抗性のものが比較的多かった(薬剤抵抗性の痙攣でも、時間の経過とともに“自然に”止痙することが多かった)。教科書的な記載では、MELASのSEの診断には血液ガスの測定や頭部画像検査が有用であるとされているが、今回の検討では、これらの発症直後の所見はMELASのSEの診断に必ずしも有用ではなかった。合計15回のSE中4回で痙攣重積となり、このうち3回で、SEからの回復後運動面あるいは知的な面で明らかかな退行を認めた。ただ、これらの“後遺症を残す”SEと、その他のSEとを発症直後に鑑別することは困難であった。MELASのSEでは、血液ガスの経時的なチェックを含めた嚴重な経過観察が必要と考えられた。

E 結論

- ① MELASの2例で合計15回のSEを経験した。

- ② 神経症状出現後4時間以内の血液ガスや12時間以内の頭部CTは、SEの診断に必ずしも有用ではない。

MELASのSEは短時間で回復するものも多いが、痙攣重積に至ることもあり、その鑑別は発症直後には不可能である。血液ガスの経時的なチェックを含めた嚴重な経過観察が必要である。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

なし

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)

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

小児期発症のミトコントリア脳筋症に関する研究

(1) ミトコントリア異常を持つ培養細胞における動態変化に関する検討
—細胞内活性酸素発現変化及び遺伝子発現変化—

分担研究者 馬嶋秀行 鹿児島大学歯学部歯科放射線学講座教授
研究協力者 富田和男、大童寛子、岩下洋一朗

研究要旨

小児期発症のミトコントリア脳筋症ではミトコントリア DNA 突然変異がその原因であることが知られている。本研究ではその研究モデルとしてミトコントリア DNA 欠損細胞である $\rho 0$ 細胞を用い、細胞内遺伝子の発現変化並びに細胞内活性酸素発現量の変化を調べた。 $\rho 0$ 細胞では、ミトコントリア DNA 転写因子の有意な低下が明らかとなった。また、 $\rho 0$ 細胞では、細胞内活性酸素の有為な増大が認められた。これより、ミトコントリア DNA が先に述べたように電子伝達系の一部の構成蛋白質をコードしているため、不完全な電子伝達系から発生するスーパーオキシド量を増大している可能性があることが示された。

A 研究目的

小児期発症のミトコントリア脳筋症ではミトコントリア DNA 突然変異がその原因であることが知られている。

本研究ではミトコントリア脳筋症の基盤研究モデルとして、ミトコントリア DNA 欠損細胞 ($\rho 0$ 細胞) を用い、その細胞における核遺伝子の変化、並びに細胞内発生活性酸素の量について検討を行った。

B 研究方法

本研究ではヒト骨肉腫由来細胞 (143B) 並びに同細胞のミトコントリア欠損細胞 ($\rho 0$ 細胞) 並びに $\rho 0$ 細胞に正常ミトコントリアを移入したさいふり細胞 (87wt) を用いた。143B 細胞、 $\rho 0$ 並びに 87wt 細胞の倍加時間は各々 15.3 ± 1.1 、 21.5 ± 1.7 、 16.1 ± 2.6 時間と $\rho 0$ 細胞の増殖が最も遅かった。

遺伝子の活性は DNA アレイ法を用いた。DNA アレイ法を用いて遺伝子発現変化を検討することにより、ミトコントリア DNA 非存在下の細胞における動態をより理解し、さらにミトコントリアの機能についての考察を試みた。143B 及び $\rho 0$ 細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法 (Perkin Elmer 社 Human microarray I) により両細胞間での遺伝子発現の変化を調べた。遺伝子活性変化は、さらに RT 定量 PCR 法により 143B と $\rho 0$ 細胞の mRNA 発現量の比較を行い検証を行った。

細胞内活性酸素発現量の測定は、蛍光試薬 (DMAX) を用い、生細胞を用い活性酸素の検出を行った (Motoori and Majima

et al, Cancer Res, 2001)。具体的には、143B 及び $\rho 0$ 細胞、並びに 87wt 細胞を用い、活性酸素検出試薬 (DMAX) をロートし、レーザー共焦点にて蛍光を観察し比較を行った。

C 研究結果

143B 細胞、及び $\rho 0$ 細胞を用いた DNA アレイ実験結果を表 1 a に示す。143B 細胞及び $\rho 0$ 細胞で遺伝子発現の変化 ($\rho 0/143B$) を調べると、調べた 2400 遺伝子のうち $\rho 0$ 細胞で発現が 5 倍以上上昇している遺伝子は 360 個存在した。それに対し、発現が 1/5 以下に下がっている遺伝子は 79 個であった。また、87wt 細胞及び $\rho 0$ 細胞で遺伝子発現の変化 ($\rho 0/87wt$) を調べると (表 1 b)、調べた 2400 遺伝子のうち $\rho 0$ 細胞で発現が 5 倍以上上昇している遺伝子は 924 個存在した。それに対し、発現が 1/5 以下に下がっている遺伝子は 26 個にとどまった。

また、各遺伝子をカテコライズし、変化遺伝子群をみると、 $\rho 0/143B$ 並びに $\rho 0/87wt$ 共、分子シャペロン遺伝子群の発現が高まっていることが分かった (過半数が 5 倍以上) (表 1)。すなわち、 $\rho 0/143B$ では 10/22、 $\rho 0/87wt$ では 12/22 であった。また、ミトコントリア関連遺伝子群の中では、ミトコントリア転写因子及びミトコントリアリボゾームマルタンパク質サブユニット遺伝子の発現が下がり、ミトコントリア熱ショックタンパク質の発現はすべて上昇していた。これらのことより $\rho 0$ 細胞においては、ミトコントリア関連遺伝子の

Cat. No	> 5	Percent	Prosite Category
mitoch	3 / 29	10.3	Mitochondria related genes
1	3 / 20	15.0	Cytokines and growth factors
2	49 / 270	18.1	DNA or RNA associated proteins
3	54 / 353	15.3	Domains
4	5 / 39	12.8	Electron transport proteins
5	1 / 14	7.1	Hormones and active peptides
6	18 / 159	11.3	Hydrolases
7	4 / 18	22.2	Inhibitors
8	2 / 24	8.3	Isomerases
9	9 / 43	20.9	Ligases
10	1 / 25	4.0	Lyases
11	3 / 55	5.5	Other transport proteins
12	31 / 137	22.6	Others
13	7 / 72	9.7	Oxidoreductases
14	48 / 339	14.2	Post-translational modifications
15	12 / 22	54.5	Protein secretion and chaperones
16	6 / 63	9.5	Receptors
17	17 / 95	17.9	Structural proteins
18	28 / 164	17.1	Transferases
Total	360 / 2400	15.0	

Cat. No	< 0.2	Percent	Prosite Category
mitoch	2 / 29	6.9	Mitochondria related genes
1	0 / 20	0.0	Cytokines and growth factors
2	7 / 270	2.6	DNA or RNA associated proteins
3	10 / 353	2.8	Domains
4	0 / 39	0.0	Electron transport proteins
5	1 / 14	7.1	Hormones and active peptides
6	5 / 159	3.1	Hydrolases
7	0 / 18	0.0	Inhibitors
8	1 / 24	4.2	Isomerases
9	1 / 43	2.3	Ligases
10	0 / 25	0.0	Lyases
11	1 / 55	1.8	Other transport proteins
12	2 / 137	1.5	Others
13	4 / 72	5.6	Oxidoreductases
14	14 / 339	4.1	Post-translational modifications
15	0 / 22	0.0	Protein secretion and chaperones
16	6 / 63	9.5	Receptors
17	1 / 95	1.1	Structural proteins
18	5 / 164	3.0	Transferases
Total	79 / 2400	3.3	

表1a DNA アレイ結果 ($\rho 0/143B$)

Cat. No	> 5	Percent	Prosite Category
mitoch	12 / 29	41.4	Mitochondria related genes
1	5 / 20	25.0	Cytokines and growth factors
2	123 / 270	45.6	DNA or RNA associated proteins
3	131 / 353	37.1	Domains
4	12 / 39	30.8	Electron transport proteins
5	4 / 14	28.6	Hormones and active peptides
6	63 / 159	39.6	Hydrolases
7	7 / 18	38.9	Inhibitors
8	12 / 24	50.0	Isomerases
9	19 / 43	44.2	Ligases
10	9 / 25	36.0	Lyases
11	20 / 55	36.4	Other transport proteins
12	58 / 137	42.3	Others
13	27 / 72	37.5	Oxidoreductases
14	122 / 339	36.0	Post-translational modifications
15	10 / 22	45.5	Protein secretion and chaperones
16	18 / 63	28.6	Receptors
17	30 / 95	31.6	Structural proteins
18	56 / 164	34.1	Transferases
Total	924 / 2400	38.5	

Cat. No	< 0.2	Percent	Prosite Category
mitoch	1 / 29	3.4	Mitochondria related genes
1	0 / 20	0.0	Cytokines and growth factors
2	1 / 270	0.4	DNA or RNA associated proteins
3	4 / 353	1.1	Domains
4	0 / 39	0.0	Electron transport proteins
5	1 / 14	7.1	Hormones and active peptides
6	1 / 159	0.6	Hydrolases
7	0 / 18	0.0	Inhibitors
8	0 / 24	0.0	Isomerases
9	2 / 43	4.7	Ligases
10	0 / 25	0.0	Lyases
11	1 / 55	1.8	Other transport proteins
12	1 / 137	0.7	Others
13	1 / 72	1.4	Oxidoreductases
14	2 / 339	0.6	Post-translational modifications
15	0 / 22	0.0	Protein secretion and chaperones
16	2 / 63	3.2	Receptors
17	1 / 95	1.1	Structural proteins
18	1 / 164	0.6	Transferases
Total	26 / 2400	1.1	

表1b DNA アレイ結果 ($\rho 0/87wt$)

Gene Name	$\rho 0/143B$ Results	Function
mtK	±	ミトコンドリア外膜に存在し ATP+クレアチン(ADP)+オキサククレアチンの反応を行う酵素 エネルギー代謝で重要な役割を果たす Haas R C et al (1989) J Biol Chem 264 2890 2897
mtTF	(0.38±0.25)	Mitochondrial transcription factor 1 ミトコンドリア内で働く転写因子 ミトコンドリア DNA の転写調節に関与 Parisi M A et al (1991) Science 252 965 969
mtHSP70	±	ミトコンドリア熱ショックタンパク質 HSP 60と同様分子シャペロンとして働く 抗癌剤投与により発現が up regulate される Kim SH et al (1999) Cancer Res 59 4012 7
mtMP	±	Mitochondrial matrix protein P1 heat shock protein 60 ミトコンドリアマトリクスにあるタンパク質 ミトコンドリアにタンパク質を import し 正しい二次構造をとらせるのに働いている
mtSCFH	±	ミトコンドリアβ酸化に関与する酵素 ミトコンドリアマトリクスに存在する
mtS12	±	ミトコンドリア 28S リボソームタンパク質のヌクレオチド 363 368 Johnson et al (1998) Genomics 52 363 368
BIP	±	ほぞけた ER タンパク質と相互作用するシャペロン Haas et al (1994) Experimenta 50 29 18 23
Chaperonin 10	±	ミトコンドリアにおいて HSP60 の空所にポリペプチド基質を入れ ふたをする Monzini et al Biochim Biophys Acta (1994)1218 478 80
TID	±	ミトコンドリアに存在し mtHSP70 と結合して作用している アポト-シグナル伝達に関与する Siken et al PNAS (1999) #499 8504

表2 RT 定量 PCR 結果

発現のみならず、核遺伝子の変化、特に分子シャペロン遺伝子の発現が変化すること

とが分かった。

さらにシャペロン遺伝子群並びにミトコンドリア関連遺伝子群に注目し、RT 定量 PCR 検討を行った。結果では、ミトコンドリア DNA 転写因子 (mtTF) のみが有意に低下していることが分かった (表 2)。

143B 及び $\rho 0$ 細胞、並びに $\rho 0$ 細胞に正常ミトコンドリアを移入したハイブリント、87wt 細胞を用い、活性酸素検出試薬 (DMAX) をロートし、レーザー共焦点にて蛍光を観察し比較をおこなった結果を図 1 に示す。 $\rho 0$ 細胞における細胞内活性酸素発現量の有意な増大が認められた。

D 考察

ミトコンドリア内膜には電子伝達系が存在し酸素下で ATP 合成が行なわれている。この電子伝達系は Complex I から V および ATP synthase、ANP translocator から構成され、全体でおよそ 100 の蛋白質からできている。一方、ミトコンドリアには DNA (mtDNA) が存在し、16,569bp の大きさの環状構造をとっている。mtDNA では核 DNA とコトンのシークエンスが異なることが知られている。この mtDNA は 13 の蛋白質をコートしているか、実は、この蛋白質は、前述の電子伝達系の蛋白質のうちの 13

FLUORESCENT INTENSITY (DMAX)

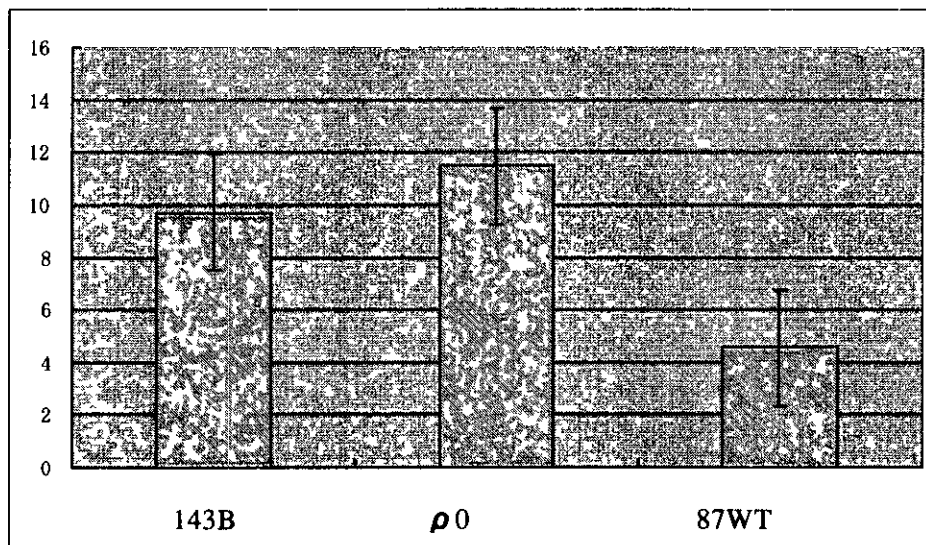


図1 細胞内活性酸素発生量

の蛋白質をコートしている。

ミトコントリア電子伝達系は電子の酸化還元をくり返し、その間に水素イオンを膜間間隙に移し、再び水素イオンをマトリックスに移行させ、そのエネルギーによりATPをADPに変換し、その産生されたATPを膜間間隙に移行している。この複雑な“ハイオマンン”は細胞中の最も大きなエネルギー製造器官となっているが、一方完璧なマンンではなく、電子の“もれ”を生じることか知られている。このもれはComplex IとIIIから最も生ずる。通常、正常な状態でも2? 3%の電子のもれか生し、これからスーパーオキサイトが発生すると考えられている。則ち、このもれ電子は酸素により捕獲され、酸素はスーパーオキサイトとなる。成人で1日およそ250gの酸素を消費するが、この2? 3%の電子のもれにより細胞では最大のスーパーオキサイトの発生源となっている。さらに、ミトコントリア脳筋症の様にミトコントリアDNAに突然変異をきたすと、結果として電子伝達系の構造異常を引き起こし、結果としてATP合成不全ばかりで無く、電子のもれを多く生じ、活性酸素の過剰発現による酸化ストレスをひきおこすことか考えられる。

一方、細胞の致死にはネクローシスとアポトーシスの2つの形態があることが知られている。最近の見解では、アポトーシスにミトコントリアが重要な役割を果たしていることが唱えられ、これらは総称してミトコントリア関連死 (mitochondria mediated cell death) と呼ばれている。ミトコントリア関連死では、ミトコントリアの膜電位の減少あるいは変化、細胞内カルシウムの上昇、通常ミトコントリアに存在するチトクロームcの放出が報告され、我々はさらに、ミトコントリアに局在し、スーパーオキサイトを除去する酵素であるマンガンスーパーオキサイトディスムターゼ (MnSOD) 過剰発現細胞でアポトーシスカ抑制されることを明らかにしている (Majima et al JBC, 1998, Motoori and Majima et al Cancer Res, 2001)。また、老化、および、アルツハイマー、パーキンソン、ALS等、多くの神経疾患でやはり電子伝達系の障害がみついている。このほか、ミトコントリアには、アポトーシスの前駆体であるチトクロームcをはじめ、apoptosis-inducing factor (AIF)、また、caspase前駆体が存在し自らの細胞の致死に機能している。すなわち、これらの結果は、酸化ストレスとミトコントリア障害

の関連が浮きぼりにされてきていることを示唆している。

本研究では、ミトコントリア脳筋症の基盤研究モデルとして、ミトコントリア DNA 欠損細胞 ($\rho 0$ 細胞) を用い、その細胞における核遺伝子の変化、並びに細胞内発生活性酸素の量について検討を行った。本研究の結果より、DNA アレイ法を用いた遺伝子発現のスクリーニングではミトコントリア DNA の欠損により核由来遺伝子発現量の変化が明らかになった。さらにシャペロン蛋白質群並びにミトコントリア関連蛋白質群における定量 PCR 法による mRNA 発現量における 143B と $\rho 0$ 細胞の違いはミトコントリア DNA 転写因子のみ $\rho 0$ 細胞で有意に低下していることが明らかとなったか、他の遺伝子活性に大きな変化を認めなかった。ミトコントリア DNA 転写因子 (mtTF) の低下は、 $\rho 0$ 細胞ではミトコントリア DNA が欠損しているため、必要がなくなったためであると推察される。他のシャペロン並びにミトコントリア関連遺伝子については RT 定量 PCR による明らかな差異が認められなかったかこれはミトコントリアからミトコントリア DNA が欠損してもミトコントリア自体は存在し、その蛋白質等のターンオーバーが行われ、機能を保持していることが推察される。さらにミトコントリア脳筋症のようなミトコントリア DNA 突然変異による遺伝子変化かどう起こるかは興味深く今後の課題であろう。

143B 細胞及び $\rho 0$ 細胞の細胞内活性酸素発現量の比較では、 $\rho 0$ 細胞で有意な活性酸素増大が認められた (図 1)。これはミトコントリア DNA は、先に述べたように電子伝達系の一部の構成蛋白質をコートしているため、不完全な電子伝達系から発生するスーパーオキシド量を増大している可能性があることが示された。やはり、ミトコントリア脳筋症のようなミトコントリア DNA 突然変異細胞でも同様に、不完全な電子伝達系から発生するスーパーオキシド量の増大の可能性を示唆しよう。

ミトコントリア DNA 欠損細胞は、神経疾患、老化の究極のモデルとなりうる。ミトコントリア DNA 欠損細胞の生理学的意義の研究も行なわれてきている。これらの研究により、これらの疾患の生理学的意義が明らかにされよう。

E 結論

143B 細胞及び $\rho 0$ 細胞で遺伝子発現の変

化を調べると、調べた 2400 遺伝子のうち $\rho 0$ 細胞で発現が 5 倍以上上昇している遺伝子は 360 個存在した。それに対し、発現が 1/5 以下に下がっている遺伝子は 79 個であった。また、87wt 細胞及び $\rho 0$ 細胞で遺伝子発現の変化を調べると、調べた 2400 遺伝子のうち $\rho 0$ 細胞で発現が 5 倍以上上昇している遺伝子は 924 個存在した。それに対し、発現が 1/5 以下に下がっている遺伝子は 26 個にとどまった。次に 143B 細胞及び $\rho 0$ 細胞における RT 定量 PCR 法によるシャペロン蛋白質群並びにミトコントリア関連遺伝子の遺伝子発現量について調べたところミトコントリア DNA 転写に関連する遺伝子 (mtTF) のみの明らかな発現量低下が明らかとなった。

143B 細胞及び $\rho 0$ 細胞の細胞内活性酸素発現量の比較では、 $\rho 0$ 細胞で有意な活性酸素増大が認められた。これより、ミトコントリア DNA が先に述べたように電子伝達系の一部の構成蛋白質をコートしているため、不完全な電子伝達系から発生するスーパーオキシド量を増大している可能性があることが示された。

F 研究発表

1 論文発表

【原著】

英文

1 Yen H-C, Nien C-Y, Majima HJ, Lee C-P, Chen S-Y, Wei J-S Increase of Lipid Peroxidation by Cisplatin in WI38 but not in SV40-transformed WI38 cells J Biochem Mol Toxicol 2003 17(1) 1-8

2 Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species J Biol Chem 2003 31, 278(5) 3170-5

3 Koike S, Ando K, Oohira C, Fukawa T, Lee R, Takai N, Monobe M, Furusawa Y, Aoki M, Yamada S, Shimizu W, Nojima K, Majima H Relative biological effectiveness of 290 MeV/u carbon ions for the growth delay of a radioresistant murine fibrosarcoma J Radiat Res (Tokyo) 2002 43(3) 247-55

4 Majima HJ, Nakanishi-Ueda T, Ozawa T 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) staining by anti-HNE antibody Methods Mol Biol 2002, 196 31-4

2 学会発表

【国内】

1) 馬嶋秀行 細胞放射線感受性におけるミトコンドリアの役割、ワークシヨノプコーディネータ、座長、2002年第43回日本歯科放射線学会総会、長崎

2) 柿沼志津子、中田有希子、久保歩、甘崎探都子、野島久美恵、物部真奈美、馬嶋秀行、佐渡敏彦、西村まゆみ、島田義也 重粒子線によって誘発されたマウス胸腺リンパ腫の特徴、2002年第45回日本放射線影響学会、仙台

3) 馬嶋秀行、本告成淳、富田和男、大童寛子、小澤俊彦、長野哲雄 Mn SODを過剰発現させた肝細胞癌培養細胞の放射線によるNO及び酸化ストレス発現、2002年第2回日本NO学会学術集会、東京

4) 富田和男、平井太、柿沼志津子、大童寛子、小澤俊彦、長野哲雄、馬嶋秀行 ヒト膀胱癌細胞における酸化的ストレス起因アポトーシスの抑制におけるMn SODの細胞内局在部位の重要性、2002年第24回日本フリーラシカル学会、大阪

5) 富田和男、柿沼志津子、岩下洋一朗、大童寛子、小澤俊彦、馬嶋秀行 DNAマイクロアレイ法を用いたp0細胞における遺伝子発現変化、2002年第2回日本ミトコンドリア研究会、東京

【国外】

1 Yen H-C, Hsu Y-T, Chang H-M, Majuma HJ, Lee C-P, Chen S-Y Bleomycin induces more Oxidative Stress in WI38 than in Transformed WI38 cells, 9th Annual Meeting of the Oxygen Society, San Antonio, TX, USA, Nov, 2002

2 Tomita K, Iwashita Y, Indo H, Hayata I, Ozawa T, Majuma H Effect of Low Dose

X-ray Irradiation on Human Neuronal Progenitor Cell, 9th Annual Meeting of the Oxygen Society, San Antonio, TX, USA, Nov 2002

3 Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majuma H, Nagano T Development of Novel Reliable Fluorescence Probes to Detect Reactive Oxygen Species which can distinguish Specific Species 9th Annual Meeting of the Oxygen Society, San Antonio, TX, USA, Nov, 2002

4 Majuma HJ, Hirai F, Tomita K, Motoori S, Indo H, Kato H, Yen H-C, Ozawa T, Nagano T Cell Death by Reoxygenation is prevented by Mitochondrial Manganese Superoxide in a Human Pancreatic Cancer Cell Line, KP4 11th Meeting of the Society for Free Radical Research International, Paris, France, July, 2002

5 Majuma HJ, Motoori S, Kakinuma S, Yamaguchi C, Kato H, Tsujii H, Nagano T and Ozawa T Overexpression of MnSOD decreases Radio-sensitivity in a Human Hepatocarcinoma Cell Line The Forth Japan-France Workshop on Radiobiology, Isotopic Imaging, CEA, Fontenay aux Roses, France, June, 2002

6 Majuma HJ, Kato T, Yen H-C, Yamaguchi Y, Tomita K, Kawano K, Indo H Induction of Radio-resistance by a Long-term Preculture with Low-dose Chemotherapeutic Agents in Seven Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines The 4th Asian Congress of Oral and Maxillo-Facial Radiology, Kaohsiung, Taiwan, June, 2002

小児の血管内皮機能に関する研究

分担研究者 石井 正浩 久留米大学小児科 講師

研究要旨 高周波超音波探触子を用いて小児の血管内皮機能を非観血的に検討した。川崎病児 11 例、チアノーゼ性心疾患患児 9 例、MELAS 患児 2 例、脳梗塞既往児 2 例および胸痛などを主訴に外来を受診した正常小児 8 例に対して血管内皮機能依存性の血管拡張能である Flow mediated dilatation (FMD) と血管内皮非依存性のニトロールによる反応性を検討した。川崎病児、MELAS 患児、脳梗塞既往児、チアノーゼ性心疾患患児において血管内皮機能の低下を証明することかできた。また、その治療薬としてヒタミン C およびアルギニンの有効性が示唆された。

A 研究目的

最近、血管分子生物学の進歩により動脈硬化病変の診断が向上してきている。我々は以前川崎病遠隔期の患児に対して冠動脈内に薬物を注入しその反応により、局所的の Nox の産生が低下していることを証明し報告した。しかし、本法を行うには心臓カテーテル検査を行うことか必要であるため観血的検査法であった。近年、高周波の超音波探触子が開発され、非観血的に血管の情報か得られるようになった。血流増加による Nox の局所放出能を調べる Flow mediated dilatation (FMD) 法が開発され成人領域の動脈硬化の早期診断に有効である。しかし、小児での報告はない。本研究では、川崎病児、MELAS 患児、脳梗塞既往児、チアノーゼ性心疾患患児および年齢を一致させた正常児の血管内皮機能を検討した。

B 研究方法

【対象】

川崎病児 11 例、チアノーゼ性心疾患患児 9 例、MELAS 患児 2 例、脳梗塞既往児 2 例および胸痛などを主訴に外来を受診した正常小児 8 例とした。

【方法】

肘動脈を超音波探触子にて描出した血管系を測定し、その後、上腕を 4 分間駆血し解放後の血管径測定する。その増加分%FMD か血管内皮依存性の血管拡張である。その後、ニトロール (ISDN) を舌下させ血管内皮非依存性の血管拡張能を測定した。その後、ヒタミン C およびアルギニンによる治療効果を検討した。

(倫理面への配慮)

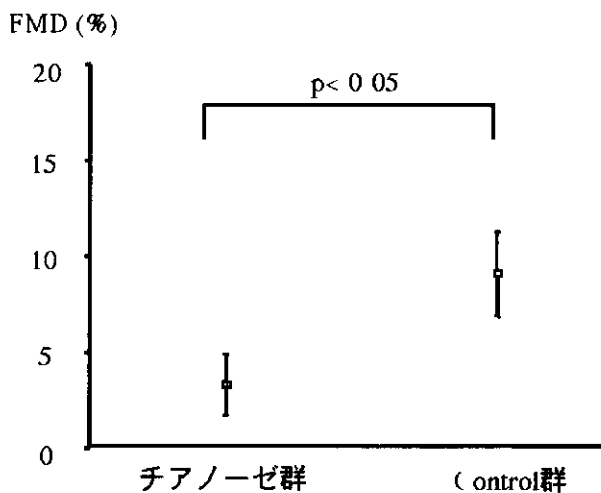
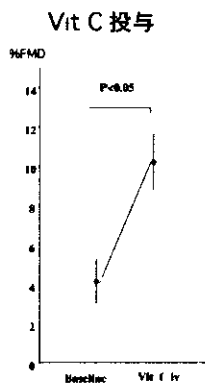
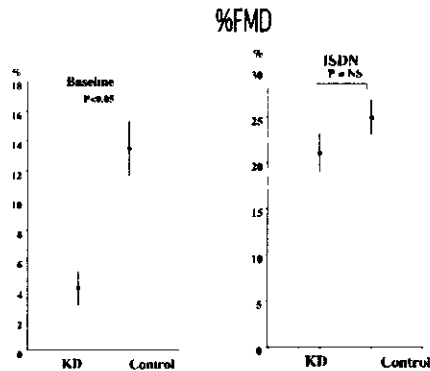
患児およびその家族に説明し、承諾を得た上で行った。

C 研究結果

1 血管内皮機能

川崎病児では%FMD は正常児と比して有意の低下しており、ニトロールによる反応は正常

児と差がなかった。以上のことより血管内皮機能の低下が示唆された。これらの川崎病児にヒタミンCを2000mg 静脈内投与することで血管内皮機能が改善した。



チアノーゼ型心疾患患児も同様に血管内皮機能低下を認めた。ヒタミンCを2000mg 静脈内

投与することで血管内皮機能が改善した。同様に MELAS 患児、脳梗塞既往児においても血管内皮機能の低下を認めた。

D 考察

川崎病児、MELAS 患児、脳梗塞既往児、チアノーゼ性心疾患患児において血管内皮機能の低下を証明することができた。また、その治療薬としてヒタミンCおよびアルギニンの有効性が示唆された。

E 結論

川崎病児、MELAS 患児、脳梗塞既往児、チアノーゼ性心疾患患児において血管内皮機能の低下していた。

F 健康危機情報

川崎病児、MELAS 患児、脳梗塞既往児、チアノーゼ性心疾患患児は、動脈硬化のリスクが高いと考えられる。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Ishii M, Himeno W, Sawa M, Iemura M, Furuji J, Muta H, Sugahara Y, Egami K, Akagi T, Ishibashi M, Kato H Assessment of the ability of myocardial contrast echocardiography with harmonic power Doppler imaging to identify perfusion abnormalities in patients with Kawasaki disease at rest and during dipyridamole stress *Pediatr Cardiol*, 2002,23 192-199
- 2 Muta H, Ishii M, Maeno Y, Akagi T, Kato H Quantitative evaluation of the

- changes in plasma concentration of cardiac natriuretic before and after transcatheter closure of atrial septal defect Acta Paediatr, 2002,91 649-652
- 3 Ishii M, Ueno T, Ikeda H, Iemura M, Sugimura T, Furuji J, Sugahara Y, Muta H, Akagi T, Nomura Y, Homma T, Yokoi H, Nobuyoshi M, Matsuishi T, Kato H Sequential follow-up results of catheter intervention for coronary artery lesions after lesions after Kawasaki disease quantitative coronary artery angiography and intravascular ultrasound imaging study Circulation, 2002,105 3004-3010
- 4 Muta H, Ishii M, Matsuishi T Coronary artery aneurysms after Kawasaki disease in a patient with single coronary artery Pediatr Cardiol, 2002,23 568-569
- 5 Furuji J, Ishii M, Ikeda H, Muta H, Egami K, Sugahara Y, Himeno W, Akagi T, Kato H, Matsuishi T Soluble forms of the selectin family in children with Kawasaki disease prediction for coronary artery lesions Acta Paediatr 2002,91 1183-8
- 6 牟田広実、石井正浩、廣瀬彰子、古井潤、菅原洋子、姫野和家子、赤木禎治、加藤裕久 川崎病ガンマグロブリン療法における製剤間での治療効果の比較 日児誌 2002,106,742-746
- 7 牟田広実、石井正浩、古井潤、江上公康、姫野和家子、菅原洋子、赤木禎治、加藤裕久 大動脈弁病変を伴う心室中隔欠損症の長期予後 日小循誌 2002,18 617-621
- 8 石井正浩 川崎病児はいつまで経過観察が必要か？冠状動脈血管機能および構造からのアプローチ Progress in Medicine 2002,22 100-104
- 2 学会発表
- 1) 古井潤、石井正浩、棚成嘉文、藤堂景茂 松石豊次郎 青年期チアノーゼ性心疾患患児における血管内皮機能の検討 第13回日本心エコー学会学術集会 鹿児島 4月
- 2) 古井潤、牟田広実、石井正浩、赤木禎治、松石豊次郎、中村好一、柳川洋 全国調査で報告された治療が遅れた症例に関する検討 第22回日本川崎病研究会, 2002 9 (北九州)
- 3) 阪上尊彦、牟田広実、石井正浩、赤木禎治、松石豊次郎 川崎病年長例の臨床像と予後 第16回全国調査成績による検討 第22回日本川崎病研究会, 2002 9 (北九州)
- 4) 牟田広実、石井正浩、赤木禎治、松石豊次郎、中村好一、柳川洋 川崎病患児におけるNa値の検討 第16回全国調査より 第22回日本川崎病研究会, 2002 9 (北九州)
- 5) 牟田広実、石井正浩、赤木禎治、松石豊次郎、中村好一、柳川洋 川崎病全国調査で報告された治療が遅れた症例に関する検討 第104回日本小児科学会学術集会, 2003 4 (福岡)
- 6) Himeno W, Ishii M, Sugahara Y, Kato H Quantitative evaluation on severity of left ventricular myocardial abnormalities in Kawasaki disease the tissue characterization study 51st Annual

Scientific Session, American College of
Cardiology 2002 Atlanta

7) Furu J, Ishii M, Kato H An ultrasound
tissue characterization study in coronary
artery wall in patients with atypical
Kawasaki disease 51st Annual Scientific
Session, American College of Cardiology 2002
Atlanta

8) Ishii M, Ueno T, Ikeda H, Iemura M, Muta
H, Kato H, Matsuishi T Sequential follow-up
results of catheter intervention for
coronary artery lesions after Kawasaki
disease 75th Scientific Sessions, American
Heart Association, Chicago, 2002

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
杉江 秀夫	16 先天異常・遺伝疾患「脆弱 X 症候群」	白木和夫、前川喜平監修	新小児科学 (第2版)	医学書院	東京	2002	218-220
杉江 秀夫	33 神経疾患 B 神経・筋疾患「代謝性ミオパチー」	白木和夫、前川喜平監修	新小児科学 (第2版)	医学書院	東京	2002	1516-1522
杉江 秀夫	6 先天代謝異常「カルニチン代謝異常」	大関武彦、古川漸、横田俊一郎	「今日の小児治療指針」13版	医学書院	東京	2003	
杉江 秀夫	19 神経・筋疾患「重症筋無力症」	大関武彦、古川漸、横田俊一郎	「今日の小児治療指針」13版	医学書院	東京	2003	
田辺 雄三	33 神経疾患 B 神経・筋疾患「筋強直症候群」	白木和夫、前川喜平監修	新小児科学 (第2版)	医学書院	東京	2002	1503-1509

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
古賀 靖敏	Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS	Neurology	58	827-828	2002
古賀 靖敏	Mitochondrial RNA processing intermediates showed dominant negative effects in mitochondrial myopathies	Neuromuscular Dis	13	259-262	2003
古賀 靖敏	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病（狭義）の欠損複合体別分類と臨床、複合体 I	日本臨床	60 suppl 4	478-481	2002

古賀 靖敏	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病（狭義）の欠損 複合体別分類と臨床、複合体Ⅱ	日本臨床	60 suppl 4	482-485	2002
古賀 靖敏	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病（狭義）の欠損 複合体別分類と臨床、複合体Ⅲ	日本臨床	60 suppl 4	486-489	2002
後藤 雄一	Apoptosis is suspended in muscle of mitochondrial encephalomyopathies	Acta Neuropathol	103	531-540	2002
後藤 雄一	A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions	Ann Neurol	51	645-648	2002
後藤 雄一	Atypical muscle pathology and a survey of cis-mutations in deaf patients harboring a 1555 A-to-G point mutation in the mitochondrial ribosomal RNA gene	Neuromusc Disord	12	506-512	2002
後藤 雄一	Leber's hereditary opticneuropathy with intracranial arteriovenous malformation a case report	Acta Neurol Belg	102	82-86	2002
後藤 雄一	Atypical MELAS associated with mitochondrial tRNA(Lys) gene A8296G mutation	Pediatr Neurol	27	397-400	2002
後藤 雄一	Age related expression of Werner's syndrome protein in selected tissues and coexpression of transcription factors	J Clin Pathol	55	195-199	2002
後藤 雄一	A point mutation of mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh syndrome	Neuromusc Disord	12	53-55	2002
後藤 雄一	A Novel mtDNA C11777A Mutation in Leigh Syndrome	Mitochondrion	2	293-304	2003
後藤 雄一	A double mutation (G11778A and G12192A) in mitochondrial DNA associated with Leber's hereditary optic neuropathy and cardiomyopathy	J Hum Genet	48	47-50	2003

桃井 真里子	The human secretin gene fine structure in 11p15.5 and sequence variation in patients with autism	Genomics	80(2)	185-194	2002
桃井 真里子	Association of autism in two patients with hereditary multiple exostoses caused by novel deletion mutations of EXT1	J Hum Genet	47(5)	262-265	2002
桃井 真里子	Co-existence of nemaline and cytoplasmic bodies in muscle of an infant with nemaline myopathy	Neuropathology	22(4)	294-298	2002
桃井 真里子	Autonomic function in Kawasaki disease with myocardial infarction usefulness of monitoring heart rate variability	Pediatrics International	45(4)	accepted	2003
桃井 真里子	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病(狭義)診断学 ミトコンドリア病を疑わせる臨床症状 検査成績 臨床症状概論	日本臨床	60 suppl 4	229-232	2002
桃井 真里子	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病(狭義)診断学 ミトコンドリア病を疑わせる臨床症状・検査成績 血液, 尿, 髄液生化学検査	日本臨床	60 suppl 4	233-235	2002
桃井 真里子	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病(狭義)診断学 ミトコンドリア病を疑わせる臨床症状・検査成績 画像診断	日本臨床	60 suppl 4	236-239	2002
桃井 真里子	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病(狭義) 診断学 ミトコンドリア病を疑わせる臨床症状 検査成績 その他(脳波など)	日本臨床	60 suppl 4	240-242	2002
桃井 真里子	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病(狭義) 各論的事項 NARP	日本臨床	60 suppl 4	298-301	2002
桃井 真里子	【ミトコンドリアとミトコンドリア病】 ミトコンドリア病(狭義) 各論的事項 純粋型ミトコンドリア病	日本臨床	60 suppl 4	302-305	2002
二瓶 健次	亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の臨床	医療	56	73-79	2002
二瓶 健次	亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) に対する薬物療法の有用性	小児科	44	234-241	2003