

20030513

厚生労働科学研究研究費補助金

効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対するL-アルギニン
およびジ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

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 古賀靖敏

平成16(2004)年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対する L-アルギニンおよびジ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に関する研究 ----- 1

古賀靖敏

(資料)ミトコンドリア病に関する全国疫学調査用紙

L-アルギニンの臨床治験プロトコール

ミトコンドリア病に関する新聞記事

啓蒙活動:平成 15 年度市民公開講座ポスター

II. 分担研究報告

1. 3243 近傍の点変異と臨床病型 ----- 43
後藤雄一
2. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes(MELAS)に対するジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)療法、L-アルギニン療法における治療効果の検討 ----- 46
二瓶健次
3. MELAS 筋細胞における細胞死過程とその抑制系の検討 ----- 54
山形崇倫
4. (1)Leigh 脳症 (8993T→G 変異) 患児に対する creatine 療法の経験
(2) 細胞内 Ca^{2+} imaging、細胞内 pH を指標とした培養細胞における薬物の影響に関する検討 ----- 57
杉江秀夫
5. ビタミン B1 反応性ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の診断と治療法開発に関する研究 ----- 60
内藤悦雄
6. (1)近赤外分光法によるミトコンドリアミオパチー患者の筋血流、酸素摂取率の検討
(2) ミトコンドリア rRNA 遺伝子異常を伴う急速進行性全身性ジストニアの一例 ----- 63
萩野谷和裕

7.	(1)ENMC mitochondrial disease rating scale による Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) の重症度評価 (2)Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) における髄液 14-3-3 蛋白 田辺雄三	----- 71
8.	小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対する治療法開発のための基礎および臨床研究 中野和俊	----- 80
9.	高乳酸血症と脳卒中様症状を伴うミトコンドリア脳筋症の臨床的研究 松岡太郎	----- 86
10.	ミトコンド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ー細胞内活性酸素発現変化及び遺伝子発現変化ー 馬嶋秀行	----- 88
11.	小児の血管内皮機能に関する研究 石井正浩	----- 94
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 97
IV.	研究成果の刊行物・別刷	----- 99

総括研究報告

小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対するL-アルギニンおよびジクロロ酢酸療法の
効果判断と分子病態を踏まえた新しい治療に関する研究

主任研究者 古賀靖敏 久留米大学医学部小児科助教授

研究要旨

ミトコンドリア病は、エネルギー産生障害を来し、種々の症状を呈するヒトで最も多い遺伝病である。本研究は、ミトコンドリア病の新しい治療法の研究開発が主たる目的であるが、それに付随するミトコンドリア病の診断基準、重症度分類、治療指針も策定する。①ミトコンドリア病の脳卒中を来す病型(MELAS)でL-アルギニン(Koga Y. et al. *Neurology* 58:827-828, 2002)が、ミトコンドリア病の病状進展防止に効果があることを見出した(自験例24症例)。この臨床的な治療効果をさらに確認するために、今年度は急性期発作があるMELAS症例11例に使用し、従来の治療方法に比較してより有効な評価が得られた。②この有効性を評価するための2重盲検ランダム化試験を行うためには、国内のみでは十分なMELAS症例が無いために国際的な治験研究の必要性が生じた。この可能性を探るために、アメリカ、イギリス、イタリア、ロシアのミトコンドリア病研究拠点を訪問し、国際的治験研究を開始する事で合意した。具体的な方策は平成16年7月のEuromitで行われる。③重症度分類策定に関し、海外で提唱されたMDRSは、国際基準に成り得る普遍性を持つが、乳幼児の評価が困難であること、腎障害の評価項目に欠けている点が問題と思われ日本に適する基準を検討中である。④ビタミンB1反応性ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の診断と治療法開発に関する研究では、高濃度TPP存在下でもPDHC活性が正常化しない重症群と正常化する軽症群の2群に分けられた。男児14例中8例は感染時に脱力発作や筋力低下がみられ、6例はLeigh脳症を呈した。女児6例中2例はWest症候群を伴っていた。⑤核がなくてミトコンドリア活性を持った“ミトコンドリア細胞が分離された(Nakano K, et al *Mitochondrion* 3:21-27: 2003)。今後このミトコンドリア細胞を用いて、薬剤がミトコンドリア機能に与える影響を評価するシステム構築が期待される。⑥新しく開発したヒドロキシラジカル検出試薬を用い、細胞内活性酸素の分布を調べた。その結果、細胞内発生活性酸素のうち、その大部分は、ミトコンドリアから発生していることを検証し、また、その活性酸素発生量は、電子伝達系の阻害剤で増大する事を見出した。⑦ミトコンドリア病の診断解析システムの整備に関し、日本でも少なくとも2カ所以上でミトコンドリア脳筋症の解析が可能となった。⑧老化機構とミトコンドリア機能の関係を老化モデル動物で直接解明するために、Klotho KOマウスにおけるミトコンドリア機能を解析した。この研究は、老化とミトコンドリア機能の関係を直接証明できるものと考え、解析を進めている。⑨ミトコンドリア病における血管内皮機能の評価をさらに多くの患者で解析し、いづれの病型においても内皮機能の低下を認めた。

分担研究者	
後藤 雄一	国立精神・神経センター神経研究所部長
二瓶 健次	国立成育医療センター神経内科医長
山形 崇倫	自治医科大学小児科学講師
杉江 秀夫	浜松市発達医療総合センター所長
内藤 悦雄	徳島大学医学部発生発達医学講座小児医学分野助教授
萩野谷和裕	東北大学大学院小児病態学分野助教授
田辺 雄三	千葉県こども病院第一内科部長
中野 和俊	東京女子医科大学小児科講師
松岡 太郎	市立豊中病院小児科主任医長
馬嶋 秀行	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科腫瘍学講座顎顔面放射線学研究分野・宇宙環境医学講座教授
石井 正浩	久留米大学医学部小児科講師

A.研究目的

ミトコンドリア病は、ミトコンドリアエネルギー産生の異常により発症する遺伝病であり、現在ではヒトの遺伝性疾患としては最も頻度の高いものと考えられている。そのほとんどは小児期に発症するため、本症は小児科医が日常診療の中で遭遇する病気である。その遺伝的および生化学的異常は、これまでの多くの研究により明らかにされてきている。しかしながら、本症が小児の難病であるにもかかわらず、我が国を含め世界における本症の診断基準は未だ確立されたものは無く、また効果的な治療方針も決められてはいない。このような状況の中で、本症の効果的診断法を確立し、有効な治療指針を決定する事は、現行の医療制度の中では、社会的医療援助が受けられていない病気に苦しむ患者に光明を与え、後遺障害を予防出来、ひいては日本国の医療費削減に寄与できるものであり、一日も早いミトコンドリア病の治療環境の整備が必要である。申請者は、脳卒中を来すミトコンドリア病(MELAS)の急性期にL-アルギニンを投与し、速やかに脳卒中症状が改善することを報告した (Koga Y. et al.

Neurology 58:827-828, 2002)。この治療法は、脳卒中を来すミトコンドリア病の急性期治療に特効的効果があり、Orphan 薬として承認申請予定であり、申請のための基礎データを集積している (2004年3月)。本研究では、新しい治療法の研究開発を目的に、その診断基準および重症度分類、治療指針を作成し、小児慢性特定疾患対象疾病としての治療環境を整備出来るように現在研究を進めている。この研究は、病気で苦しむ多くの患者の医療環境の整備に直接つながり、患者およびその家族の福祉の向上に寄与できるものである。

B.研究方法

1. 日本におけるミトコンドリア病疫学調査 (最終報告)

患者数の把握、病型、診断方法、現在の治療法に関しアンケート調査 (添付資料) を行った。日本における入院 200 床以上の 2236 カ所の病院の小児科、内科、神経内科部長もしくは院長宛にアンケート調査を実施した。

2. 国内での MELAS 急性発作期の L-アルギニン使用症例の解析

ミトコンドリア病に対する薬物治療に関して、申請者らは、脳卒中を来す病型で L-アルギニン (Koga Y. et al. Neurology 58:827-828, 2002) が、ミトコンドリア病の病状進展防止に効果があることを見出した (自験例 24 症例)。平成 15 年度に MELAS 急性期発作がある MELAS11 例の 14 回の脳卒中エピソードに L-アルギニンが使用された。この臨床的な治療効果をさらに確認するために、これら症例を臨床的に詳細に解析し、従来の治療方法に比較してその有効性を評価した。

3. 治験対象患者プロフィールの確定と、インフォームドコンセント、およびレジストリー作成。

レジストリーを行う患者は、欠損遺伝子の同定、電子伝達系酵素活性のレベル、臓器内変異遺伝子の分布などが確定していることが、その後の治療の効果判定を行う上で重要である。

4. ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) 急性期発作

におけるL-アルギニン療法の Orphan drug 国際治験。

有効性を評価するための2重盲検ランダム化試験を行うには、国内のみでは十分な MELAS 症例が無い。十分な治験症例数を確保するには、国際的な共同治験研究の必要性が生じた。この可能性を探るために、アメリカ、イギリス、イタリア、ロシアのミトコンドリア病研究拠点を訪問し国際的な共同治験研究について話し合った。

5. ミトコンドリア病 (MELAS) の我が国における重症度分類

ミトコンドリア病患者の社会的救済を行うためにも、重症度分類が必要である。日本に即したものが必要であり、本研究でも策定作業に入っている。

6. ミトコンドリア脳筋症の分子基盤解明への研究

ミトコンドリア脳筋症の分子基盤解明に向けて種々のアプローチを継続して行った。

7. ミトコンドリア病診断ネットワークの構築。(倫理面への配慮)

研究に先立ち、患者には研究の目的および、主旨を十分に説明し、同意が得られた場合のみ、研究に使用する。疫学調査に関しては、指針に準拠して行う。また、多施設共同研究の場合は、基本内容を一致させた上で研究参加施設の倫理委員会の承認を得る。遺伝子解析研究に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。

C. 研究結果

1. 日本におけるミトコンドリア病疫学調査 (最終報告)

入院 200 床以上の 2236 カ所の病院にアンケート調査を実施し、1051 件 (47%) の回収率を得た {小児科 756 件 (51.3%)、神経内科 295 件 (38.7%)}。日本では、741 症例のミトコンドリア脳筋症患者が存在し、その 430 例は小児科で残り 311 例は神経内科でフォローされている事が判

明した。小児期発症のミトコンドリア脳筋症では、Leigh 脳症が 31.1%と最も多く、ついで MELAS が 29.9%となっている。一方、成人期に多い KSS は、7.4%と小児期では少なく、MELAS および Leigh 脳症の 2 病型が小児期では重要であることが判明した。Leigh 脳症は成人期にはみられず、小児期に死亡すると考えられる。我々の研究班では、MELAS および Leigh 脳症の 2 病型に関し、診断基準策定、重症度分類および治療指針を作成する予定である (図 1、図 2)。

日本におけるミトコンドリア病 (741 症例)

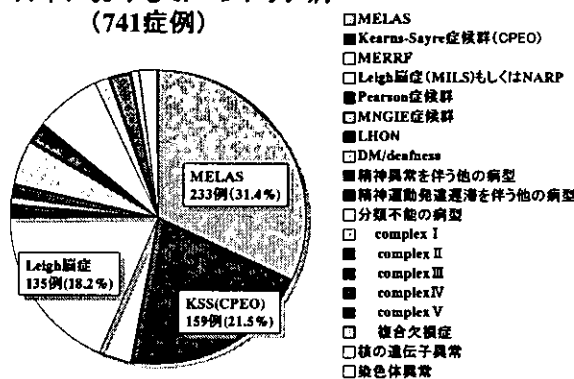
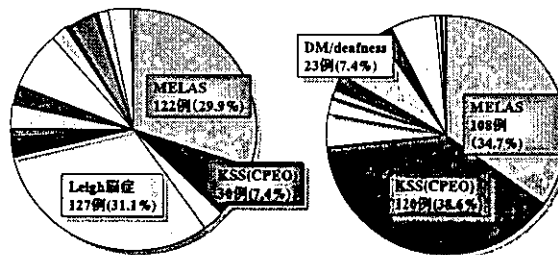


図 1

日本におけるミトコンドリア病

小児科 430 症例 神経内科 311 症例



Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine

図 2

2. 国内での MELAS 急性発作期の L-アルギニン使用症例の解析

脳卒中を来す病型で L-アルギニン (Koga Y. et al. Neurology 58:827-828, 2002) が、ミトコンドリア病の病状進展防止に効果があることを見出した。この臨床的な治療効果をさらに確認するために、臨床的な MELAS 11 例に L-アルギニンが使用

された 14 回のエピソードを臨床的に解析し、従来の治療方法に比較してその有効性、副作用を評価した。今回解析できた L-アルギニン使用経験例を表 1 に示す。全 11 症例中、症例 5、6、11 は、臨床的には MELAS だが変異はまだ確定されておらず、また、筋病理学的所見も無いことから今回は評価からはずした方が良くと考えられる。また、症例 10 は、遺伝学的には確かに A3243G を持つが、年齢が 3 歳 6 ヶ月と小さく、精神運動発達遅滞と心筋症を合併し、いまままで、典型的な脳卒中発作を来していないことから臨床的には Leigh 脳症に近いと考えられこれも除外した。残る 7 症例 10 回の脳卒中エピソードに関し解析すると、10 回のエピソード中、L-アルギニンの効果が著効ないし効果ありと判断されるケースは、9 回 (90%) であり、何ら副作用は報告されていない。一方、効果無しと判断されたエピソードを持つ症例 (症例 3) は、発症後 11 時間の投与であり、同じ症例の次のエピソードでは、発症後 35 分の投与で効果ありの判断を下されている。つまり、L-アルギニンは、発症後出来るだけ早期に (5-12 時間以内) 使用することが望ましいと考えられる。しかし、症例によっては、発症後一日後でも効果を認めた症例もあり、治療開始時期の限界については、今後の症例の蓄積が必要である。

今回特記すべき知見は、症例 1 のエピソードである。症例は 16 歳の女性であり、A3243G の典型的な変異を持ち、臨床的、筋病理学的、遺伝学的に確定した MELAS である。5 回の脳卒中発作に関し、5 回目に L-アルギニン使用されている。1, 2 回目のエピソードは、けいれん、頭痛、軽度の視野異常であり、抗痙攣剤と頭痛薬で 3 日間で消失しており軽度のエピソードと言える。しかし、4 回目は、頭痛、眼症状 (閃輝暗点、左同名半盲)、部分けいれん、失語など左後頭葉から側頭葉の広範な病変があったが、ステロイド、グリセオール、ラジカットを使用し発症から 8 日で閃輝暗点症以外は消失した。5 回目のエピソードは、

複雑部分発作の二次性全般化 (意識混濁を伴い右手から右半身、または全身へ波及) と考えられるけいれん重積である。けいれんに対しては、セルシンは無効、ドルミカムは部分的に有効であったが、発症後 5 時間で投与した L-アルギニン治療後 1 時間でけいれんは消失、意識は清明となった。臨床経過は、4 回目が 16 日の入院に対して、5 回目は 4 日間の入院であった。臨床的に 4 回目と 5 回目のエピソードは、重症度としては同じと考えられる。特記すべき点は、4 回目と 5 回目での MRS 解析結果である。4 回目では、左後頭葉に著明な乳酸のピーク増加と NAA の低下が認められる。これに対し、5 回目の L-アルギニン投与後は、乳酸のピークも認められず NAA のピークも存在する (図 3)。

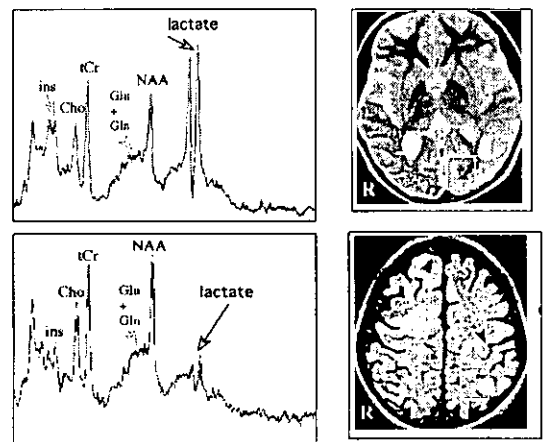


図 3

これは、L-アルギニンの治療的効果を MRS でとらえた初めての症例である。L-アルギニンの血管拡張効果が虚血部位に早期に作用し脳組織の代謝異常を改善した可能性が示唆される。この症例報告は、Kubota M. et al. Brain & Development in press 2004 に掲載予定である。今後より多くの治験症例を重ねることで、L-アルギニン療法の有効性と限界について評価する事が大切である。

3. 治験対象患者プロフィールの確定と、インフォームドコンセント、およびレジストリー作成。大規模治験に備えて以下の治験プロトコールを

作成している（添付資料）。また、患者レジストリーに関し、一次アンケートで患者数を多くフォローアップしている全国のミトコンドリア病拠点病院に関し、治験プロトコルや院内 IRB 用の書類などを送付し、治験への承諾を得ている。リストしている拠点病院を表 2 に示す。

4. ミトコンドリア脳筋症（MELAS）急性期発作における L-アルギニン療法の Orphan drug 国際治験。

2 重盲検ランダム化試験を行うための十分な治験症例数を確保するために、平成 16 年 3 月 4 日より 10 日間ミトコンドリア病研究拠点を訪問した。アメリカはニューヨークのコロンビア大学医学部神経内科教室（Prof. S DiMauro）、イギリスのニューカッスル大学医学部神経内科教室（Prof. DM Turnbull）、イタリアの国立遺伝研究所神経部門（Prof. DiDonato, Dr. Uziel）、モスクワ国立遺伝研究所医学遺伝部門（Dr. Zakharova）を訪問し、MELAS 脳卒中急性発作における L-アルギニン療法について国際共同研究を行うことが決定された。この詳細に関しては、平成 16 年 7 月に開催される Euromit で討議される。

5. ミトコンドリア病（MELAS）の我が国における重症度分類

ミトコンドリア病患者の社会的救済を行うためにも、重症度分類が必要である。日本に即したものが必要であり、本研究でも策定作業に入っている。2003 年に European Neuromuscular Centre (ENMC) で提唱された mitochondrial disease rating scale (MDRS) が発表された（Chinnery PF and Bindoff LA. Neuromuscular Dis 2003;13:757-764）。この重症度分類を参考に、日本に適した重症度分類を作成するためのワーキンググループを作成し検討しており、平成 16 年 3 月までに重症度指針として報告予定である。これに先駆けて、ENMC mitochondrial disease rating scale (MDRS) を用いて後方視的に、MELAS 症例の経時的重症度評価を行った（田辺雄三）。その結果、MDRS は国際基準に成り得る普遍性を持つが、乳幼児の評価が困

難であること（言語発達の獲得されていない時期の評価が出来ない）、MELAS の合併症である腎障害などの評価項目に欠けている点が問題と思われた。この点につき、今年度も引き続き検討する予定である。

6. ミトコンドリア脳筋症の分子基盤解明への研究

① 3243 近傍の点変異と臨床病型

ミトコンドリア病では最も多い点変異である 3243 変異の両隣の 3242 変異と 3244 変異を有する患者を見いだした。そのうち、3242 変異は臨床表現型は、典型的な 3243 変異 MELAS ときわめて類似したが、3244 変異例はその病因性を確認できなかった。同じ転移 RNA 内の点変異でありながら MELAS と MELAS 以外の臨床病型を呈することから、これらを比較することが MELAS の病態を形成する要因を解明することにつながると考えられた（後藤雄一）。

② MELAS 筋細胞における細胞死過程とその抑制系の検討

MELAS 筋芽細胞を用いて、ミトコンドリア遺伝子異常を持つ筋芽細胞がエネルギー供給不足により細胞死を起こすことを確認し、その細胞死の過程を検討した。更に、その細胞死に対して MELAS 治療薬であるジクロロ酢酸ナトリウム (DCA)、チトクローム C を添加することによる変化を検討した。エネルギー不足により誘導される細胞死は cytochrome C の放出に引き続く、caspase-9, -3 の活性化による経路と、近年、注目されている小胞体ストレス細胞死に関与する caspase-4 が活性化される経路が確認された。この細胞死は DCA 添加により用量依存的に抑制され、DCA によりエネルギー枯渇が改善され、細胞死への誘導が減るものと考えられた。一方、チトクローム C 添加ではこの細胞死には変化がなく、チトクローム C の臨床的な効果は別の経路による作用と思われた。ミトコンドリア異常症では疾患モデルが難しく、また、case-control による薬剤の効果の検討が難しく、この筋芽細胞を用いた実験系で

は条件の変更が容易であり、薬剤の効果などの比較検討には有用な実験系と思われた(田辺雄三)。

③細胞内 Ca^{2+} imaging、細胞内 pH を指標とした培養細胞における薬物の影響に関する検討

薬物の生体での臨床効果を検討するため in vitro での細胞障害の検査法について一方法を紹介した。細胞障害の指標として細胞内 Ca^{2+} 濃度、および細胞内 pH の 2 種類を指標として考えた。これにより、病的細胞における薬物の影響を in vitro で検討することが可能であり、薬物の薬理作用と臨床応用の関連について基礎データが提供できると思われる(杉江秀夫)。

④Leigh 脳症(8993T→G 変異) 患児に対する creatine 療法の経験

ジクロル酢酸(DCA)の投与により臨床症状が増悪した Leigh 脳症の 1 女児例に creatine monohydrate を投与し臨床効果について検討した。髄液中乳酸・ピルビン酸値はクレアチン補充療法開始後低下を認めたが、L/P 比の変化はなかった。また呼吸症状の改善が得られ脳画像上も進行が緩徐化した。クレアチン補充療法は、本児のような重篤な状態な乳児でも特に副作用を認めず安全に投与可能であった(二瓶健次)。

⑤ビタミン B1 反応性ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の診断と治療法開発に関する研究
小児期発症のミトコンドリア脳筋症の原因の一つであるピルビン酸脱水素酵素複合体(PDHC)異常症は種々の臨床症状を呈する。乳幼児期に発症する Leigh 脳症から筋症状のみでほぼ正常の発達がみられるものまで非常に多彩である。この PDHC 異常症の中にはビタミン B1 大量投与により血中・髄液中乳酸値の低下および臨床症状の改善が認められるビタミン B1 反応性 PDHC 異常症がある。当科において診断し得た 60 例の PDHC 異常症の中で、20 例がこのビタミン B1 反応性 PDHC 異常症と診断できた。酵素診断には活性型ビタミン B1 であるチアミンピロリン酸(TPP)の低濃度(1×10^{-4} mM、正常人の血中濃度)および高濃度(0.4 mM)存在下での

PDHC 活性を測定した。PDHC 活性の低濃度 TPP 存在下での低下および高濃度 TPP 存在下での有意な増加により、ビタミン B1 反応性 PDHC 異常症と診断した。これら 20 例のビタミン B1 反応性 PDHC 異常症は 2 群に分けることができた。高濃度 TPP 存在下でも PDHC 活性が正常化しないグループ 1 は 8 例(男 7 例、女 1 例)、正常化するグループ 2 は 12 例(男 7 例、女 5 例)であった。グループ 2 は比較的軽症例が多く、このうち 4 例はビタミン B1 投与後、症状は消失し、ほぼ正常に発達している。男児 14 例中 8 例は感染時に脱力発作や筋力低下がみられ、6 例は Leigh 脳症を呈した。女児 6 例中 2 例は West 症候群を伴っていた(内藤悦雄)。

⑥MELAS における髄液 14-3-3 蛋白

髄液中の 14-3-3 タンパクが脳破壊の指標となることが報告され、今回我々は小児の MELAS 患者の髄液中の 14-3-3 タンパクを Western blotting 法によって検索した。その結果、脳卒中発作を起こしてしばらく経過した時が最も陽性度が高く、広範な脳障害を反映していると考えられた(田辺雄三)。

⑦近赤外分光法によるミトコンドリアミオパチー患者の筋血流、酸素摂取率の検討

近赤外分光を用いて前腕骨格筋内の血流量と酸素摂取量を非侵襲的に測定し、ミトコンドリア病において異常が検出できるかを検討した。正常対照として 10 歳から 35 歳のボランティア 10 名、6 歳から 26 歳のミトコンドリア病患者 7 名、6 歳から 13 歳の DMD 7 名について同意を得た上で検討した。安静時の前腕筋血流量・筋酸素摂取量は正常対照および DMD 患者に比して有意な差はなかった。軽度運動負荷時の前腕筋血流量はミトコンドリア病患者において有意に上昇していた ($p < 0.05$)。筋酸素摂取量は正常対照と有意な差がなかった。今後、さらに多くの患者について検討する予定である(萩野谷和裕)。

⑧核がなくてミトコンドリア活性を持った“ミトコンドリア細胞

HeLa 細胞由来の mitochondria-less (ρ^0) 細胞と血小板の融合によりできた cybrid 細胞から、核がなくミトコンドリア活性を持った“ミトコンドリア細胞”を作り出し、持続培養に成功した (Nakano K, et al Mitochondrion 3:21-27: 2003)。

本年度の研究において、ミトコンドリアの働きを理解する基礎的研究として、ミトコンドリア細胞の細胞生物学的解析を行い、ミトコンドリア細胞は原核細胞の性質を持つことがわかった。今後このミトコンドリア細胞を用いて、薬剤がミトコンドリア機能に与える影響を評価するシステムを構築してゆきたい。また、ミトコンドリア脳筋症のうち小児に多い MELAS と Leigh 症候群の臨床症状と病態の把握を試み、それぞれの臨床経過の特徴をまとめた。MELAS は経過とともに発作出現頻度が減少し、急速または緩徐の進行型があり、死因に心筋症、呼吸障害の合併が認められるなどの特徴が認められた。また、Leigh 症候群は臨床と頭部 MRI の経過から亜型分類が可能であると考えられた。これらの特徴を踏まえて今後の薬物治療の評価に生かしてゆきたい。MELAS 患者の脳卒中様症状に対する L-アルギニン治療の試みの検討を進め有効性を認めたが、対象症例が少数であったため今後さらに症例を増やして検討が必要と思われた (中野和俊)。

⑨ミトコンド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

小児期発症のミトコンドリア脳筋症ではミトコンドリア DNA 突然変異がその原因であることが知られている。ミトコンドリア DNA 突然変異を有する細胞では、ミトコンドリア DNA が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。しかし、細胞中に発生する活性酸素のうち、ミトコンドリアから発生酸素がどのくらいの割合なのかは明らかではない。本研究では、新しく開発したヒドロキシラジカル検出試薬を用い、

共焦点レーザー顕微鏡にて生細胞を観察し、細胞中の活性酸素発生を検出して、細胞内活性酸素の分布を調べた。その結果、細胞内発生活性酸素のうち、その大部分は、ミトコンドリアから発生していることを検証し、また、その活性酸素発生量は、電子伝達系の阻害剤で増大する事を見出した。さらに、ミトコンドリア DNA 障害細胞でも発生する活性酸素の増大を認めた。これらは、小児期発症のミトコンドリア脳筋症の発症機序の一つが、ミトコンドリアから発生する活性酸素発生である可能性を示唆した (馬嶋 秀行)。

⑩ミトコンドリア病の診断解析システムの整備
ミトコンドリア病の疑いがある場合、迅速に診断できるシステム整備が必要であり、生化学、組織化学、および遺伝子検索を備えたセンターを開設した (図 4)。

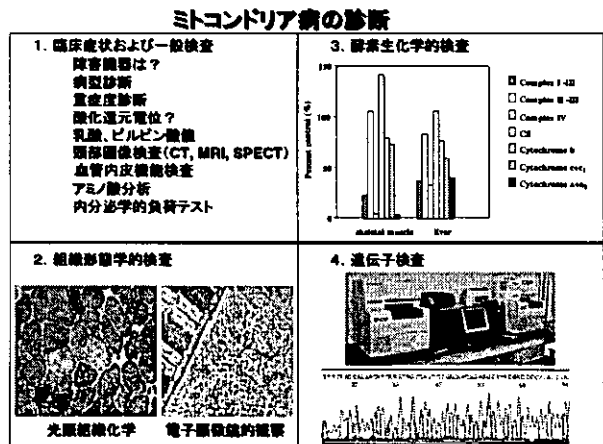


図 4

a) 生化学検査：ミトコンドリアの酸素消費、電子伝達系酵素活性、b) 筋生検検体の組織化学的、電子顕微鏡的検索、c) 培養細胞での分子基盤解明の解析システム、d) ミトコンドリア DNA の 16.5Kb の全周塩基配列が 2 日で解析可能なシステムを確立した。このことから、日本でも少なくとも 2 カ所以上でミトコンドリア脳筋症の解析が可能となった。

⑪ミトコンドリア tRNA^{Leu}(UUR) 遺伝子の A3243G 変異を持つ MELAS14 例のミトコンドリア DNA 全周解析

ミトコンドリア遺伝子の変異速度が核 DNA に比較して 10 倍速いことからミトコンドリア DNA の全周塩基解析を行い tRNA^{Leu}(UUR) 遺伝子の A3243G のヘテロプラスミー以外に臨床症状の重症度に相関する変異を検索した。臨床的に MELAS を疑われている患者の末梢血、もしくは生検筋より DNA を分離使用する。この分離 DNA を鋳型とし 16,569bp 塩基対の大きさがあるミトコンドリア DNA 全周を、LA・TaqDNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社) を用いたロング PCR 法で 7 つの断片 (図 5) に分割し増幅させる。

7 Fragments PCR

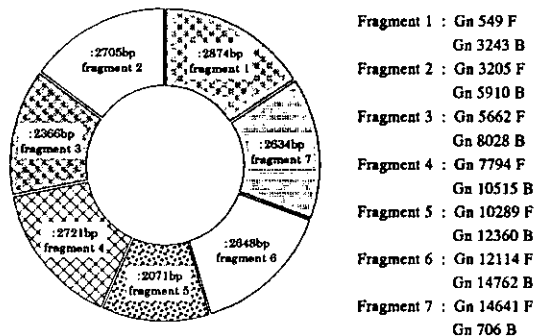


図 5

Sequencing Primers for mtDNA

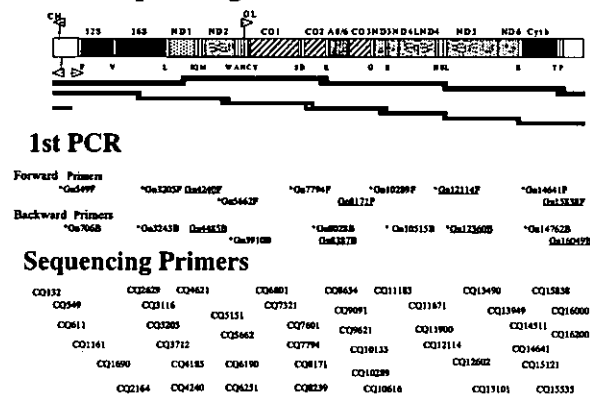


図 6

PCR 後は電気泳動による確認を行い、そこで得られた 7 つの PCR 産物を鋳型にしてシーケンス反応を行う。シーケンス反応では、さらに各 PCR フラグメントから細かく分け、最終的には 43 個の短いフラグメントでミトコンドリア

DNA 全周を網羅しシーケンス反応を行う。図 6 に各フラグメントと対応するプライマーの配置図を示している。なお、PCR フラグメントは 100bp づつ、シーケンスフラグメントは 50bp づつオーバーラップするように配置している。また PCR 用プライマー (Gn) はゲル濾過精製、シーケンス用プライマー (CQ) は逆相 HPLC カラムによる分離精製を施し、ミトコンドリア DNA を特異的に増幅し、さらにプライマー 3' 末端に含まれる 8 塩基にわたるリピートフラグメントは含まないようにデザインになっている。シーケンス反応は簡便化をはかるために、シーケンサー CEQ8000 (ベックマンコールター社) とは別売りされている DTCS キットをそのプロトコール通りに使用している。シーケンス反応後はエタノール沈殿を経て、シーケンサー CEQ8000 により、15 時間から 16 時間かけてミトコンドリア全塩基配列を解析する。この後に MacMolly 解析ソフトにより解析しチャート比較、アライメントをすることで、すでに報告された変異やポリモルフィズムに加え、新たに未報告の変異やポリモルフィズムを得る事ができる。さらに、この解析データ、シーケンス波形を照らし合わせ、アミノ酸置換が生じているか否かをミトコンドリア遺伝子コードから推定する。特に重症な患者では、他の部位に正常では出現頻度が少ない多型が多く存在した。

⑫ Leber 遺伝性視神経萎縮症 14 例のミトコンドリア DNA 全周解析

Leber 遺伝性視神経萎縮症のロシア人患者 12 名、日本人患者 1 名のミトコンドリア DNA の全周塩基解析を行い両者の変異の分布および頻度に関して比較検討した。患者では、プライマー変異以外にセカンダリー変異も見つかったが、両者のいづれもない症例で、ミトコンドリア脳筋症の他の病型で報告されている他の変異がヘテロで見つかり、Leber 遺伝性視神経萎縮症とミトコンドリア脳筋症のオーバーラップが推

測された。

⑬電撃型の経過をたどった MELAS 症例の剖検解析

脳卒中発症後一週間の経過で死亡した 12 歳の MELAS 患者で、時間経過を追って頭部画像解析を行い、剖検所見を含めて臨床的、生化学的、組織形態的、遺伝学的に詳細に解析を行った。

【症例】

11 歳男児

主訴：発作性嘔吐、全身性痙攣

現症：出生時異常なし。幼少時運動発達にとくに異常を指摘されなかった。小学校に入学してから、徐々に算数や体育の授業などで遅れが目立つようになり、たびたび頭痛、嘔吐発作がみられるようになった。2003 年 8 月はじめごろより頭痛・嘔吐発作、全身倦怠感、食欲低下を認め 8/12 近医にて点滴後、帰宅するも改善せず 8/13 同院入院。入院後 8 月 16 日全身間代性痙攣が出現し、意識混濁、全身筋力低下、失調歩行が出現し MRI にて左後頭葉から左側頭葉にかけて梗塞様所見を認め精査・加療目的で 8 月 17 日当院転院となった。

【身体所見】

身長 140cm (-1SD) 体重 35kg(-1SD)

血圧 114/58mmHg, 脈拍 96/分 整、体温 37.3℃

神経学的所見：意識レベルは JCS で 1、運動系では全身の筋力低下（握力 左 6 kg 右 10 kg）、構語障害、失調性歩行、協調運動低下。腱反射異常、病的反射はなし

【家族歴】

母親に糖尿病と片頭痛の既往があり、母方の兄弟に糖尿病罹患者が多くみられる。

【入院時検査】

WBC 11100/ μ l RBC 427 万/ μ l Plt 27.6 万/ μ l
Na 132mEq/l K 4.5mEq/l Cl 97mEq/l GOT
259IU/l GPT 66IU/l
LDH 893IU/l T.B 0.8mg/dl TP 7.4g/dl Alb
5.2g/dl

BUN 15.3 mg/dl Cr 0.24mg/dl CRP 0.16

CK 3515 IU/l 乳酸 9.57 mol/l (0.47~1.91) ビ
ルビン酸 0.34 mol/l (0.03~0.1)

L/P 比 ; 28.14

心電図異常 なし、脳波 全般性に徐波化

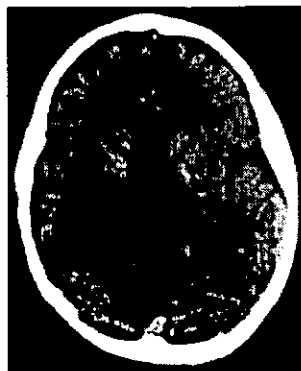


図 7 頭部 CT

基底核部に軽度の石灰化と、大脳皮質の萎縮を認める。

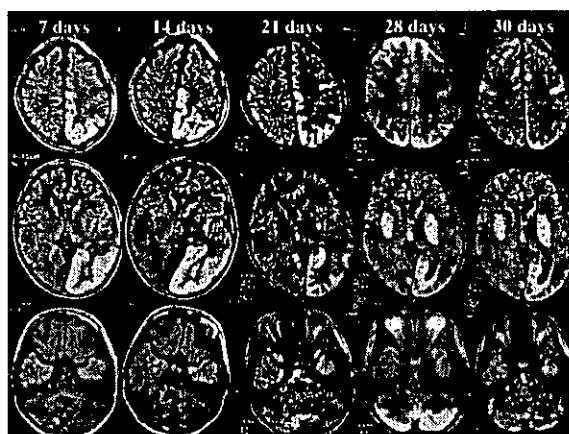


図 8 頭部 FLAIR MRI 画像変化

後頭～頭頂・側頭葉・小脳虫部にかけて左側優位に異常高信号域を認める。徐々に両側の前頭、頭頂葉、後頭葉内側の皮質、中心溝周囲の皮質および両側小脳半球へと病巣が広がるとともに、左の側脳室三角部は開大している。両側レンズ核の高信号域は 17 病日ころから、以後拡大している。

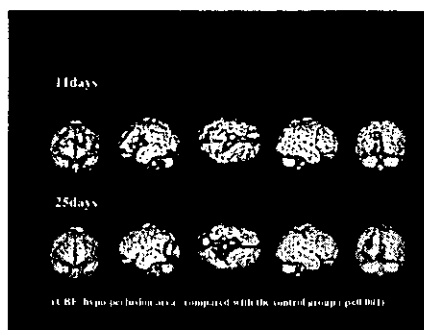


図 9 SPM-SPECT

脳血流量が低下した部分を標準 control 群に比べ有意差のみられる箇所を示す。後頭部と左の側頭、頭頂部に有意に血流低下を認める。

【入院後経過】

入院当初は、意識レベルは比較的保たれており（JCS 1）脳梗塞後の降圧剤投与、代謝性アシドーシス是正のためにアルカリ療法、利尿剤、抗けいれん剤等の加療を行った。血管内皮機能の低下を確認し、VitC および VitE、7α U 投与開始した。

第13病日ごろから、嚥下障害と同時に徐傾眠傾向であった。第15病日、再度けいれん発作を起こし、痛み刺激にかろうじて反応する程度に意識レベルが低下した。以後MRI上で梗塞巣の拡大を認め、ステロイドパルス療法等行うも効果なく、低Na血症、アシドーシス、急性腎不全と進行し永眠された。死後、本例に対して剖検を行なった。

剖検所見】

剖検所見では、おもに、左心室の心筋肥大、腔水症、胸水。両肺うっ血・水腫（左：365g 右：485g）、脳重量増加（1660g）、脳溝の浅底化脳表血管の増生、腫脹さらに、両腎腫大（左：205g、右：200g）また、胃・大腸びらん変化を認めた。

【遺伝子検索】

分子遺伝学的検索オートシーケンサーによるミトコンドリアDNA全周解析と組織特異性検索を行った。図11にミトコンドリアDNAの全周解析結果をまとめ、中段はすでに報告のある多型遺伝子を、下段では今回新しく検索された可能性のある多型遺伝子を示した。病因遺伝子は、tRNAロイシンUUR上に位置するA3243Gが同定された。図7に本患者におけるミトコンドリアDNA A3243G変異の、組織別ヘテロプラスミー率の検討を示す。各臓器ごとにその変異率は30%から80%台とrangeが広く、障害臓器と変異率の高さとの相関性は、明らかでない。

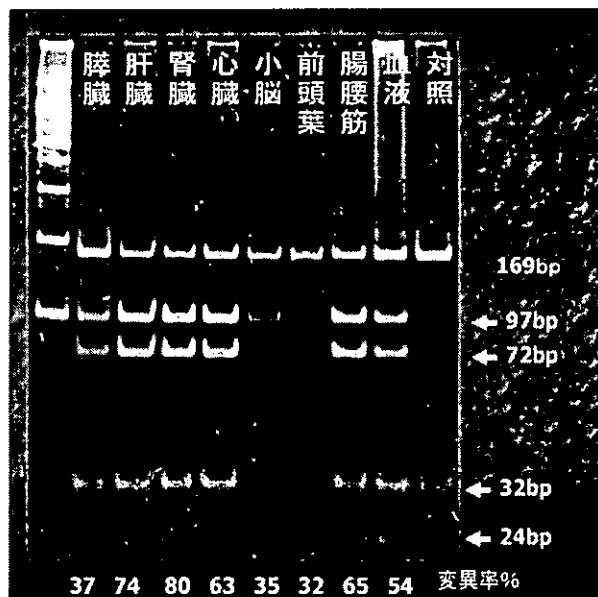


図 10

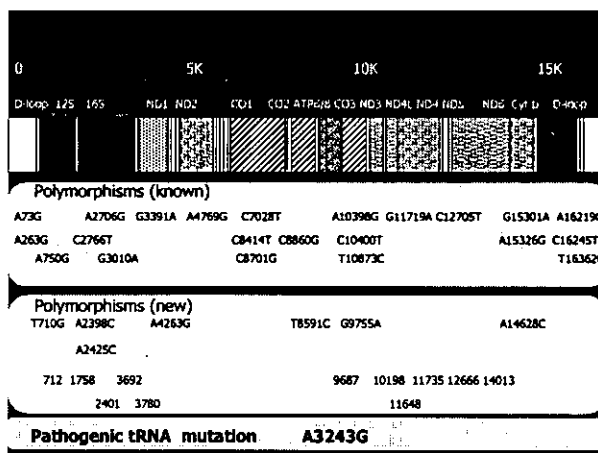


図 11

【本症例に関する考察】

ミトコンドリア病のサブタイプで最も多い MELAS は日本で230ほど存在するが、その自然歴はいまだわかっていない。本例は MELAS の初回発作から電撃的に経過し、死の転帰をむかえた症例である。本症例のような MELAS 患者に対して、発症からの経時的画像変化を試みた。SPM: statistical parametric mapping 法は、ロンドンの Friston KJ らによって開発されたソフトウェアであり、SPECT等の脳賦活検査で得られた control 群に対し統計学的に有意に変化した領域を画像解析する手法である。今回の本患者の経時的な SPM-SPECT 所見では、急性期での局所的な脳血流量の低下を確認し得た。この結果は成人

MELAS 例で報告されるものと異なる結果であるが、これに関しては各々画像を得た臨床時期の違いによるものとする。あるいは、成人と小児間で血管内皮機能不全による血管機能異常に対する反応に差があるのかもしれない。剖検では生前の臨床所見からは確認し得なかった肥大型心筋症の所見を得ており、現疾患の死線期に感染が加わり死に至った症例であると考えられた。

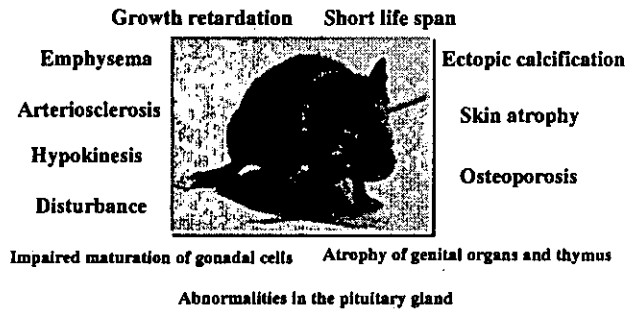
MELAS の死因は、さまざまであるが多くの、脳梗塞様病変に心筋症や腎症を合併しており、末期に肺炎等の感染症が加わって死に至る症例が報告されている。MELAS の増悪因子として、主要臓器の直接的な機能障害が致死的になると考えられる。さらに、今回のように臨床的に高い重症度を示した症例を、分子遺伝学的に解明する目的でミトコンドリア DNA 全周シーケンス解析、各臓器別点変異率の解析をおこなった。ミトコンドリア遺伝子上で A3243G 変異を示していたが、現時点では重症な MELAS 患者である本例に、その遺伝学的背景を裏づけするような根拠となる結果がまだ得られていない。現在は家系検索などもすすめているが、MELAS の病態の解析に、今回新しく検索された多型遺伝子との関連や核遺伝子異常との関連性を引き続き検討していく予定である。

⑭ Klotho KO マウスにおけるミトコンドリア機能異常の解析

Klotho 遺伝子欠損マウスは、単一遺伝子欠損老化モデルとして偶然発見されたモデルマウスであるが、その老化機構に関するエネルギー産生系の解析は未だ成されていない。本研究の目的は、このマウスにおける老化症状【図 12】の進行状態とエネルギー産生機構の関心に焦点を絞り、老化機構の分子基盤を解明する。それにより、神経症状進展を予防する新しい治療法開発に、大きく寄与出来ると考えられる。

Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling aging

Aging phenotypes in Klotho kl/kl mice



Kuro-o M, et al, Nature 390, 45-51 (1997)

図 12

今回報告した挿入突然変異マウスは、世界で初めて得られた単一遺伝子の変異により、著明な早期老化を示すマウスであり、加齢とともに発症する多くの疾患の成立を解明するために重要な疾患モデルと考えられている。今後この老化モデルマウスを用いて、Klotho 遺伝子異常がミトコンドリアエネルギー代謝に及ぼす影響や老化による Klotho 遺伝子群の発現調節メカニズムの検討をすすめていく予定である。この研究は、老化とミトコンドリア機能の関係を直接証明できるものと考え、解析を進めている。⑮ミトコンドリア脳筋症における血管内皮機能の評価

ミトコンドリア脳筋症(MELAS)患者に対して、超音波診断装置を用いて血管内皮機能の検討を行った。目的 MELAS 患者における血管内皮機能を検討することである。対象は、筋生検にて MELAS と診断された 14 例(男性 9 例 女性 5 例)、年齢中央値 12.5 歳(8-45 歳)である。対照は年齢と性別を一致させた健常者 13 例とした。血管内皮依存性血管拡張を検査するために flow mediated vasodilatation (FMD) を計測した。超音波装置として Philips 社製 SONOS 5500G 及び GE 社製 VIVID 7 を使い、超音波探触子は 10 MHz のものを使用した。上腕を 200mmHg の圧で 4 分 30 秒駆血、その前後における肘動脈の血管径拡張の変化を計測しその拡張率(%FMD)

を求めた。血管内皮非依存性血管拡張を検討するために、ニトログリセリン 0.6mg 舌下投与し、血管径拡張の拡張率 (dilatation of Nitroglycerine: NTG-D) を求めた。MELAS 患者における %FMD は対照に比較して著明に低下していた

($3.5 \pm 0.9\%$ vs. $14.4 \pm 0.5\%$ $p < 0.05$)。ニトログリセリン舌下投与における MELAS 患者と対照に比較では差は認めなかった ($17.7 \pm 2.1\%$ vs. $22.1 \pm 1.8\%$)。MELAS 患者では正常群に対して有意に血管内皮機能の低下を認めた。血管内皮機能低下はミトコンドリアのエネルギー産生系酵素の異常による血管内皮からの一酸化窒素

(NO) の放出障害であることが示唆された。今後、ビタミン C は MELAS 患児や川崎病既往児の治療戦略において重要なものになりうる可能性が示唆された。

7. ミトコンドリア病診断ネットワークの構築。ミトコンドリア脳筋症に対する新規治療薬開発を効率良く行うために、診断と治療が一体となったミトコンドリア病診断ネットワークを構築した。これは、インターネットを介して、患者のレジストリーから診断解析データ、治療成績を一括してデータベース化するもので、新しい治験開発に大きく寄与できるものである (図 13)。

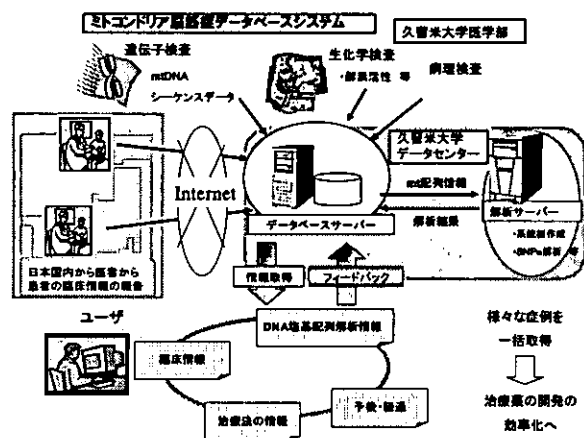


図 13

D. 考察

1) ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) 急性期発作における L-アルギニン療法の Orphan drug 国内

申請と国際治験

MELAS の急性期の治療薬として有効な L-アルギニンを Orphan drug としての国内申請に向けて、全力を挙げている。また、日本の古賀靖敏医師をプロジェクトリーダーとして、日本、米国、イギリス、イタリア、ロシアの 5 カ国で Orphan drug 申請を前提とした国際共同治験研究として発展している。平成 16 年度は、この計画を押し進める。

2) ミトコンドリア病の診断基準・診断方法の国際的標準化

ミトコンドリア病の診断基準・診断方法は、世界的に各々の国で認定されたものはなく、この点、世界的に標準化した診断・治療法を策定するために、日本、米国、ヨーロッパを中心に、国際的に統一した診断基準・検索方法を決定するためのカンファレンスを計画している。

3) ミトコンドリア脳筋症の分子基盤をふまえた治療方法の開発に関しては、今後も継続して続けていく予定である。

4) ミトコンドリア脳筋症の成人特定疾患への医療支援事業

小児期発症した MELAS は、成人期に達しており、成人特定疾患への医療支援事業が必要である。

6) 市民公開講座、医師への啓蒙活動

病気の診断、社会援助を得るためにも本症の啓蒙活動が必要であり、今後啓蒙活動を広く行っていく。(添付)

E. 結論

日本における本症の診断基準、治療指針を策定し、ミトコンドリア脳筋症の治療薬開発の為、まず本邦における患者数を把握する意味で、Nation-wide の疫学調査を行った。今後、小児期発症の MELAS、Leigh 脳症に関して診断基準、重症度分類、治療指針を策定する予定である。ミトコンドリア病の効果的診断システムを確立するために、日本で 2 カ所のミトコンドリア病研究センターを設定した。また、臨床的、病理

学的、生化学的、遺伝子検索のすべてが行えるシステムを構築し、データベース化し、それらを統合したデータベースセンターをインターネットで開設する予定である。また、診断システムの国際的標準化も国際的に進んでいる。新薬開発として、今まで治療法の無かった MELAS 急性期発作に対する L-アルギニン療法を開発し、小規模治験ネットワークを構築、Orphan drug としての申請準備が整った。この治療法は、国際特許を取得しており（古賀靖敏、特許# 2002-299575）、主任研究者をプロジェクトリーダーとして国際共同治験研究へと発展している。ミトコンドリア脳筋症の中で、Leigh 脳症に対する DCA（ジクロロ酢酸ナトリウム）療法の治験は米国での大規模治験の結果、効果無しという結論が出ている。現在、米国では MELAS に対する DCA 治験が進行している。日本での DCA 治験研究に関しては、現在検討中である。今後、MELAS、Leigh 脳症の 2 病型における日本での診断基準、重症度分類、治療指針に関し、研究を進めていく予定である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Koga A, Koga Y, Akita Y, et al. Mitochondrial RNA processing intermediates showed dominant negative effects in mitochondrial myopathies. *Neuromuscular Dis* 13:259-62, 2003
 - 2) Koga Y. MELAS and L-arginine therapy. *Brain & Development* 2004 in press.
 - 3) 古賀靖敏, 古賀敦子. 小児期発症ミトコンドリア脳筋症に対する新しい治療法. *小児科* 44(9):1361-1375, 2003
 - 4) 古賀靖敏. 片頭痛とミトコンドリア病. *日本医事新報社* 4153: 19-25, 2003
 - 5) 西岡淳子, 古賀靖敏. 小児の悪性高熱症、悪性症候群、横紋筋融解症の臨床像と病態および治療. *小児科* 44(13): 2109-2117, 2003
 - 6) 古賀敦子, 古賀靖敏. 神経症状を有するミトコンドリア遺伝子異常. *小児科* 45(1):51-61, 2004
- ### 2. 学会発表
- 1) Koga Y, Koga A, Akita Y, et al. Mitochondrial RNA processing intermediates showed dominant negative effects in mitochondrial myopathies. International Congress of Neuromuscular Disorders. Vancouver, Canada. July 6, 2002.
 - 2) Koga Y, Koga A, Akita Y, Ueki I, Fukiyama R, Matsuishi T. L-arginine ameliorates the cerebral hemodynamics in the acute episodes of MELAS. 127th American Neurological Association Annual meeting, New York, NY. USA. October 15. 2002.
 - 3) Koga Y, Akita Y, Ueki I, Koga A, Matsuishi T. MELAS and L-arginine Therapy. The American society of human genetics 53rd Annual Meeting, Los Angeles, USA. November 4- 8. 2003.
 - 4) 古賀靖敏: ミトコンドリア DNA とその機能、第 43 回日本歯科放射線学会総会、ワークショップ 8 「細胞放射線感受性変化におけるミトコンドリアの役割」、平成 14 年 10 月 18 日、長崎
 - 5) 伊藤晋一、植木勲、西岡淳子、秋田幸大、古賀敦子、古賀靖敏、松石豊次郎: MELAS の自然歴. 第 424 回日本小児科学会、福岡地方会例会. 平成 15 年 4 月 12 日、福岡
 - 6) 古賀靖敏: 片頭痛とミトコンドリア病. 第 106 回日本小児科学会ワークショップ、common disease にみる重要な疾患、重大な疾患. 平成 15 年 4 月 25-27 日、福岡
 - 7) 古賀靖敏: MELAS における L-アルギニン療法. 第 45 回日本小児神経学会イブニングトーク. 平成 15 年 5 月 22-24 日、福岡
 - 8) 植木勲、秋田幸大、終山了、古賀靖敏、松石豊次郎: ミトコンドリア tRNA 遺伝子異常の

- 遺伝子検索システム. 第 45 回日本小児神経学会. 平成 15 年 5 月 22-24 日, 福岡
- 9) 久木原博子、藤丸千尋、岩崎瑞枝、古賀靖敏: MELAS 患者の症状に対応した生活支援のあり方を探る—思春期発症の事例を通して—. 第 16 回日本看護福祉学会. 平成 15 年 7 月 12 日, 玉名
- 10) 久木原博子、藤丸千尋、岩崎瑞枝、古賀靖敏: MELAS 患者の自然歴における各病期 (重症度) に応じた看護の問題点—発症から 10 年の経過—. 第 29 回日本看護研究会学術集会. 平成 15 年 7 月 24-25 日, 大阪
- 11) 藤丸千尋、久木原博子、岩崎瑞枝、古賀靖敏. 視覚・聴覚障害及び知的退行をきたした MELAS 末期患者の生活実態—患者および家族の心理的・身体的サポートシステムの整備に向けて—. 第 29 回日本看護研究会学術集会. 平成 15 年 7 月 25 日, 大阪
- 12) 古賀靖敏: MELAS における L-アルギニン療法. 第 20 回小児神経筋疾患懇話会、教育講演. 平成 15 年 8 月 9 日, 東京
- 13) 古賀靖敏: MELAS と L-アルギニン療法 —血管内皮機能不全に対する治療—. 第 13 回神奈川脳卒中フォーラム学術集会、特別講演. 平成 15 年 9 月 26 日, 横浜
- 14) Koga Y, Akita Y, Ueki I, Fukiyama R, Matsuishi T. Novel Therapeutic Trial of L-arginine on Acute Phase of Stroke in MELAS. 第 76 回日本生化学会大会シンポジウム、ミトコンドリアの多様性と機能障害. 平成 15 年 10 月 15-18 日, 横浜
- 15) 古賀靖敏、秋田幸大、松石豊次郎: ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) の L-アルギニン療法. 第 46 回日本先天代謝異常学会. 平成 15 年 11 月 20-22 日, 松江
- 16) 平田孝治、秋田幸大、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏. マウス脳神経終末アミノ酸の動態. 第 3 回日本ミトコンドリア研究会年会. 平成 15 年 12 月 18-20 日, 福岡
- 17) 石田香織、西岡淳子、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏. ミトコンドリア DNA 全周シーケンスシステムの構築. 第 3 回日本ミトコンドリア研究会年会. 平成 15 年 12 月 18-20 日, 福岡
- 18) 秋田幸大、柗山了、平田孝治、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、富田祐子、古賀靖敏. 頭痛を伴う意識消失発作と糖尿病を呈するミトコンドリア機能異常症と考えられた症例. 第 3 回日本ミトコンドリア研究会年会. 平成 15 年 12 月 18-20 日, 福岡
- 19) 西岡淳子、石田香織、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏. 発症後電撃的な経過をとった MELAS の一症例: ミトコンドリア全周シーケンス解析法をふまえて. 第 3 回日本ミトコンドリア研究会年会. 平成 15 年 12 月 18-20 日, 福岡

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「ミトコンドリア機能異常に起因する疾患における臨床症状発現の予防・治療的組成物」出願番号: 特許 2002-299575 として特許を取得した。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成15年度国内における MELAS 脳卒中に対する L-アルギニン使用経験 (表1)

番号	年齢	性別	発症年齢	臨床診断	遺伝子診断	重症度	投与量	経過	効果判定	パラメーター
1.	16歳	女性	5歳	MELAS	A3243G	中	15g	良好	効果あり	MRSでの乳酸の低下 発症後5時間で開始
			エピソード⑤							
2.	13歳	女性	10歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	改善	効果あり?	乳酸の低下あり 発症後2日後に投与開始 5日間連続使用
			エピソード②							
3.	19歳	女性	5歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	良好	効果なし	発症後11時間で投与
			エピソード①							
			エピソード②				0.5g/kg	良好	効果あり	発症後35分で投与
4.	10歳	女性	10歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	良好	効果あり	発症後30分に投与
			エピソード③							
5.	12歳	女性	10歳	MELAS	検査中	中	0.5g/kg	良好	不明	発症後一日で治療開始
			エピソード②							
6.	13歳	男性	12歳	MELAS	不明	中	0.5g/kg	改善	不明	発症後36時間で治療開始
			エピソード②							
7.	14歳	男性	11歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	良好	著効	発症後60分に投与
			エピソード②							
			エピソード③				0.5g/kg	良好	著効	発症後60分に投与
8.	12歳	女性	6歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	良好	著効	乳酸の低下あり 発症後一日で治療開始
			エピソード①							
			エピソード②				0.5g/kg	良好	効果あり	乳酸の低下あり 発症後12時間で治療開始
9.	15歳	男性	12歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	良好	著効	乳酸の低下あり 発症後12時間で治療開始
			エピソード②							
10.	3歳6m	女性	1歳	Leigh脳症?	A3243G	重症	0.5g/kg	不明	不明	発症後治療開始は不明
			心筋症合併	今まで脳卒中のエピソード無し						
11.	11歳	女性	7歳	MELAS	不明	中	0.5g/kg	良好	著効	症状の早期消失 発症後7時間で治療開始

大規模治験協力施設（表2）

小児科施設	症例	神経内科施設	症例
久留米大学医学部附属病院	22	北里大学病院	9
東京女子医科大学附属病院	9	北海道大学医学部附属病院	8
千葉県こども病院	7	藤田保健衛生大学病院	6
東北大学医学部附属病院	5	株式会社日立製作所日立総合病院	6
徳島大学医学部附属病院	5	筑波大学附属病院	4
名古屋大学医学部附属病院	5	自治医科大学附属病院	4
自治医科大学附属病院	4	横浜市立大学医学部附属病院	4
府立母子保健総合医療センター	4	川崎医科大学附属病院	3
旭川医科大学医学部附属病院	3	埼玉医科大学附属病院	3
名古屋市立大学病院	3	市立泉佐野病院	3
国立療養所三重病院	2	国立療養所宮城病院	2
大阪大学医学部附属病院	2	九州大学医学部附属病院	2
滋賀医科大学医学部附属病院	2	山口大学医学部附属病院	2
広島大学医学部附属病院	2	岩手医科大学附属病院	2
市立豊中病院	2	産業医科大学病院	2
国立高知病院	1	京都府立医科大学附属病院	2
国立福山病院	1	山形県立河北病院	2
国立療養所南京都病院	1	都立駒込病院	2
国立療養所宮崎東病院	1	奈良県立医科大学附属病院	2
秋田大学医学部附属病院	1	福島県立医科大学医学部附属病院	2