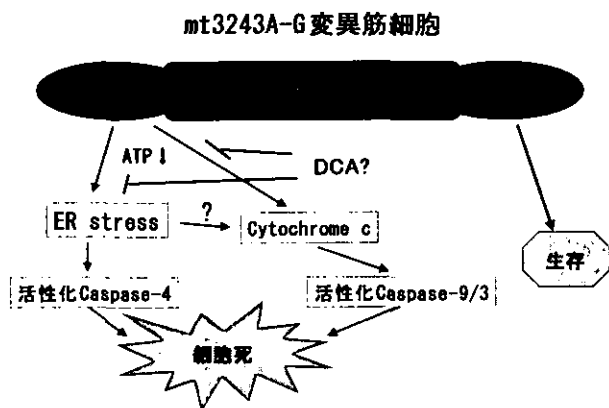


していることが確認された。ERストレスによりcaspase-12のみならず、cytochrome cの放出も誘発されるという報告もあり、今回確認されたこの2つの経路がERストレスによって誘導されたものか、別々の刺激により誘導されたものかは今後の検討が必要と思われた。また、DCAはこの細胞死を用量依存性に完全にではないが抑制した。これは、DCAによるPDHの活性化によるATP産生能が改善したためと予想されるが、さらに細胞死ストレスの条件を変え検討するとともにその抑制薬剤の検討をすることでmt異常症治療法の有効な治療戦略、新規治療薬の開発につながる可能性もあると思われた。



E. 結論

MELAS 筋芽細胞を使い、ATP 産生が極度に低下にする状態では cytochrome c 放出による caspase9/3 系に加え、ER ストレス (hcaspase-4 の活性化) の経路が活性化され

ている可能性が示唆された。Cytochrome c 放出系も ATP 産生低下による ER ストレス過程によるものである可能性もあり、ER ストレスの制御も治療的戦略になりうると考えられ今後の検討が必要と思われた。DCA はこの細胞死を用量に依存して完全にではないが、抑制した。更に、MELAS 治療薬、caspase 阻害薬による抑制系の検討が必要と思われた。また、この実験系はミトコンドリア異常症の病態の検討には任意に条件が変更でき、良い系と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
準備中
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

- (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

分担研究者 杉江秀夫 浜松市発達医療総合センター所長

研究協力者 平野浩一、宮本健、古橋協、福田冬季子、伊藤政孝、鈴木輝彦
浜松市発達医療総合センター小児神経科、浜松医科大学小児科

研究要旨

- (1) ジクロロ酢酸 (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反応を認めず安全に投与可能であった
- (2) 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。

A. 研究目的

ミトコンドリア異常症は多臓器に及ぶ臨床症状を来し、進行性で予後の不良なものもある。昨年度 Leigh 脳症の女児でジクロロ酢酸(DCA)の投与により、症状が増悪した例を報告した。今回その症例に対して creatine monohydrate を投与し、その臨床効果について検討した。また生体に投与する薬剤の効果を *in vitro* で検討する方法のひとつとして、ARGUS-50 を用いた細胞内 Ca^{2+} imaging、細胞内 pH を測定する方法について紹介する。

B. 研究方法

(1) 症例は日齢 172 日の女児で、姉が Leigh 脳症で 11 ヶ月時に死亡している。血中乳酸 27.6mg/dl、ピルビン酸 1.36mg/dl(日齢 3)、髄液中乳酸 43.7mg/dl、ピルビン 2.54mg/dl(日齢 32)。体重増加不良、低緊張を認め精査目的のため入院。ミトコンドリア DNA (mtDNA) 8993T→G 変異を認めた。クレアチン療法の効果の可能性などにつき説明のうえ保護者から同意を得た後、creatine monohydrate を Hangenfeldt らの方法を一部改

変した東京女子医大の中野の投与方法(東京女子医科大誌;2000)にそって0.2mg/Kg/day 分2にて2週間経口投与し、その後0.08~0.12mg/Kg/day 分3にて維持をした。

(2) 細胞内Ca²⁺濃度の変化はFura-2を用いた。Fura-2における340nmと380nm励起における蛍光強度の比(RF340/F380):Ca-II(浜松ホトニクス)によりCa濃度をコンピュータで算出した。同様にBCECFを用いて細胞内pHの変化を450nmと490nm励起における蛍光強度の比(RF450/F490)を用いて算出した。データ解析には(Argus-50:浜松ホトニクス)を用いた。

C.研究結果

(1) 本例はDCA療法を日齢70で開始したところ突然呼吸障害、全身チアノーゼ出現、著明なアシドーシスを認めた。乳酸・ピルビン酸値は、血中・髄液中とも低下していたがDCAは一旦中止した。DCA濃度は投与7時間後血中82.5μg/ml、10時間後血中70.8μg/ml(150以下)、20時間後髄中44.2μg/mlと有効濃度域であった。再投与でも時に再び呼吸症状の増悪を来し、DCAは日齢101に中止した。その後日齢172にcreatine monohydrateを投与開始した。投与後の臨床的経過の特徴としては:(1)SPO₂低下頻度の減少、(2)感染症状(発熱、CRP上昇)を反復したにも関わらず、挿管、人工呼吸管理が必要な状態は減少、(3)心臓超音波検査でのEFなど心機能には有意な変化は認めず、(4)髄液中乳酸・ピルビン酸、血中乳酸・ピルビン酸は次第に低下、L/P比は変化なし、(5)画像所見の変化はそれまでの進行性変化(脳萎縮・レンズ核のう胞性変化)が緩徐化、(6)クレアチン投与と関連した問題になる副反応はなし、であった。

(2) 昨年度L6細胞に3-NPAを添加することにより作成したミトコンドリア呼吸鎖異常の細胞では、次第に細胞内Ca²⁺の濃度が上昇し最終的には細胞死となった。一方ATPを培地に混合し前処置する事で3-NPAを添加しても細胞内Ca²⁺濃度の上昇は抑制できた。この観察を元に今後培養細胞に対する外的ストレスとしてchemical hypoxia, thermal stress, toxic agentsを使用、また薬物投与の候補としてDCA, creatine monohydrateを用いる。細胞障害の評価としては細胞内Ca²⁺濃度に加え、乳酸による細胞内アシドーシスの指標として、細胞内pHの変化、ミトコンドリア酵素群の活性、ATP contentなどを検索する。

D.考察

DCAはミトコンドリア異常症に伴う高乳酸血症に対する対症療法薬として使用されている。本例のようにmtDNA異常によるLeigh脳症においてはmtDNAの変異率が90%以上と高率である事や、特に8993T→G変異は8993T→C変異と比べても進行の早い重症群と考えられているため、DCA投与による乳酸・ピルビン酸代謝への急激な影響が症状増悪の一因となる可能性が推定され、投与には慎重を要すると考えられる。creatine monohydrateをミトコンドリアエネルギー供給への付加的な作用を期待して使用してみた。Creatine monohydrateは糖原病、ミトコンドリア病などに試されているが、その機序としてはクレアチン/クレアチンリン酸(PCr)の貯蔵がクレアチン補充療法により高まり、ミトコンドリアおよび細胞のクレアチンキナーゼとATP/ADPを介しての細胞へのATP供給が高まる効果が期待されている。本例では乳酸値の低下および感染による臨床症状の悪化の軽減などが見られ、また重篤な副作

用を認めなかったことから、試みる価値のある薬物療法と考えられた。

臨床効果を期待する薬剤についてその薬効の機序について検討することは重要である。今回提案した細胞障害の指標として、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化、細胞内 pH の変化を検索することで、様々な薬剤において細胞レベルでの影響を見ることができ有用であると考えられる。さらに病的細胞と正常細胞を今後比較してゆく予定である。

E. 結論

DCA 投与で臨床症状が悪化した Leigh 脳症の女児例について creatine monohydrate を投与した。一定の効果があつたが、特に副作用は認めなかった。creatine monohydrate は試みる価値のある薬剤と考えられる。細胞内 Ca^{2+} 、pH-imaging により病的細胞での薬物の影響を検索し臨床的な薬物療法に対する基礎的な指標のひとつとして利用ができる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nambu M, Kawabe K, Fukuda T, Okuno TB, Ohta S, Nonaka I, Sugie H, Nishino I. A neonatal form of glycogen storage disease type IV. *Neurology*. 2003; 61(3): 392-4.

- 2) Ito Y, Saito K, Shishikura K, Suzuki H, Yazaki E, Hayashi K, Fukuda T, Ito M, Sugie H, Osawa M. A 1-year-old infant with McArdle disease associated with hyper-creatine kinase-emia during febrile episodes. *Brain Dev*. 2003 Sep; 25(6): 438-41

2. 学会発表

- 1) Sugie H. Muscle Glycogen Storage Diseases: Overview and diagnostic approach. Scientific and Clinical Symposia. Advances in Glycogen Storage diseases. 3rd Annual Scientific Meeting Asian & Oceanian Myology Center. January 9, 2004. Singapore
- 2) 杉江秀夫。筋型糖原病の治療法開発。第 45 回日本小児神経学会学術集会シンポジウム「ミオパチー治療の新たな展開」平成 15 年 5 月 23 日 福岡
- 3) 杉江秀夫。筋型糖原病の病態に応じた治療法の開発。第 46 回日本先天代謝異常学会シンポジウム「先天代謝異常の新しい治療戦略」平成 15 年 11 月 22 日 松江

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

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

分担研究者 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

研究要旨

小児期発症のミトコンドリア脳筋症の病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。

A.研究目的

当科において診断し得た 60 例の PDHC 異常症の中でビタミン 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たビタミン B1 反応性 PDHC 異常症 20 例の酵素診断と臨床像を報告する。

B.研究方法

全国の医療施設から当科に先天性高乳酸血症患者の酵素診断を依頼され、ビタミン

B1 反応性 PDHC 異常症と診断できた 20 例を対象とした。

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。

(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、趣旨を十分に説明し、同意が得られた場合のみ、研究に使用する。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

ビタミンB1反応性PDHC異常症20例は2群に分けられた。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脳症であった。女児6例中2例はWest症候群を伴っていた。

ビタミンB1投与量は症例ごとに異なっていたが、100mg/日～200mg/日が多かった。E1 α 遺伝子解析により判明した変異は全て点変異であり、エクソン3の変異が6例、エクソン8の変異が3例、エクソン7の変異が2例、エクソン4の変異が1例、エクソン11の変異が1例みられた。

D. 考察

ビタミンB1反応性PDHC異常症の病因はTPPに対する親和性が著名に低下したPDHCを有しているためかもしくは低濃度TPPではPDHCの不安定化が生じるためと考えられる。特徴的な症状は感染時の脱力発作や筋力低下などであった。感染時にはビタミンB1の消耗と摂取不足により、ビタミンB1が欠乏し、PDHC活性が低下するためと考えられた。

E. 結論

早期からのビタミンB1大量投与により臨床

症状の改善が得られる本症の診断には、低濃度TPP存在下でのPDHC活性の測定が重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kitamura S, Yokota I, Hosoda H, Kotani Y, Matsuda J, Naito E, Ito M, Kangawa K, Kuroda Y. Ghrelin concentration in cord and neonatal blood: relation to fetal growth and energy balance. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5473-5477, 2003.

2. 学会発表

- 1) Naito E, Ito M, Yokota I, Saijo T, Ogawa Y, Shinahara K, Yamamoto S, Kuroda Y. Biochemical and molecular analysis of 12 patients with thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase deficiency. IXth International Congress on Inborn Errors of Metabolism (September 2-6, 2003).
- 2) 内藤悦雄、伊藤道徳、横田一郎、黒田泰弘：ピルビン酸脱水素酵素 α サブユニット(E1 α)遺伝子異常症の再発危険率についての検討。第45回日本小児神経学会総会(平成15年5月22～24日、福岡)
- 3) 内藤悦雄、小谷裕美子、松田純子、横田一郎、黒田泰弘、重松陽介、木村正彦、山口清次、但馬剛、佐倉信夫：タンデム質量分析計による新生児マススクリーニングで発見されたグルタル酸血症I型の2女児例。第46回日本先天代謝異常学会(平成15年11月20～22日、島根)
- 4) 内藤悦雄、杉本真弓、岡田隆文、小谷裕美子、松田純子、横田一郎、黒田泰弘、重松陽介、木村正彦、山口清次、但馬剛、佐倉信夫：タンデム質量分析計による新生児マススクリーニングで発見されたグルタル酸血症I型の2女児例。第55回中

- | | |
|---|-------------------------------|
| 国四国小児科学会（平成 15 年 11 月 29～30 日、徳島） | 1.特許取得
なし |
| 5) <u>内藤悦雄</u> 、小谷裕美子、松田純子、横田一郎、黒田泰弘、高橋昭良、矢野雅彦、大橋十也。GM ₂ ガングリオシドーシス (Tay-Sachs 病)の 1 男児例。第 121 回日本小児科学会徳島地方会（平成 15 年 12 月 13 日、徳島） | 2.実用新案登録
なし
3.その他
なし |

H.知的財産権の出願・登録状況

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

- (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

分担研究者 萩野谷和裕 東北大学大学院小児病態学分野助教授

研究協力者 (1) 吳 艶玲¹、孫 桂蓮¹、石飛真美子¹、福与なおみ¹、宮林重明²、大村清³
¹ 東北大学小児科、² 国立仙台病院小児科、³ 国立療養所西多賀病院小児科
(2) 石飛真美子¹、坂本 修¹、大浦敏博¹、沢石由記夫²、矢野珠巨²、後藤雄一³
¹ 東北大学小児科、² 秋田大学小児科、
³ 国立精神神経センター神経研究所疾病研究第二部

研究要旨

- (1) 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。
- (2) [症例] 5 歳男児。2002 年 1 月 (4 歳)、急性扁桃腺炎罹患。2 月中旬よりイライラする、手をモゾモゾする、体に力が入らない、などの症状あり。3 月 MRI で基底核病変を認め、5 月の脳血流 SPECT で同部位の血流低下を認めた。舞蹈病として抗生剤投与を行ったが不随意運動は増悪。7 月よりジストニアとなり、oculogyric crisis、歩行困難が出現した。各種治療薬に抵抗し、筋緊張亢進・ジストニアは現在もなお進行中である。頭部 MRI 被殻 T2 軽度高信号、淡蒼球 T1 軽度高信号。左基底核で測定した MRS では NAA 低下あり。大脳萎縮が徐々に進行。脳血流 SPECT 基底核領域で血流低下。眼底異常なし。血算生化学異常なし。血液・髄液中乳酸・ピルビン酸正常。血中アミノ酸分析・尿中有機酸分析 (GC/MS) 異常ピークなし。血清セルロプラスミン正常。血清ビオチン正常、ビオチニダーゼ活性正常。AADC 活性正常。髄液・尿ビオプテリン正常、血清ビオプテリンやや低下、DHPR 活性正常。歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、Machado-Joseph 病、Huntington 病遺伝子トリプレットリピート陰性、HPRT 遺伝子変異なし、パントテン酸キナーゼ遺伝子変異なし。カテコラミン値異常 (血漿アドレナリン高値 (280 pg/ml)、血漿ノルアドレナリン高値 (1060 pg/ml)、血漿ドーパミン (20 pg/ml)、血漿 L-dopa 高値 (4.7 ng/ml)、髄液 HVA 低値 (107 nmol/l)、5-HIAA 正常下限 (75.8 nmol/l))。whole mitochondrial DNA sequencing で未知の変異あり (t1819c (正常人 200 人での出現頻度 0%))。[考察] 本児において認められた t1819c 変異が病因となりうるかは細胞生物学的検討とともに、さらなる症例の蓄積が必要である。

(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

A. 研究目的

ミトコンドリアミオパチーにおける生化学的マーカーは血中乳酸・ピルビン酸の上昇であり、好氣的運動時の著明な変化が本症の診断時に臨床的に用いられることが成人では多いが、幼小児や歩行が困難な患者では運動負荷はできない。

近赤外分光法 (NIRS) は非侵襲的に骨格筋の血流および酸素摂取率をモニターすることが可能な方法であり、近年各種の臨床応用が検討されている。我々は、本法によりミトコンドリアミオパチー患者と正常対照が区別できるかの検討をしている。さらに本症に対する何らかの治療的試みの評価の手段として NIRS が利用できないかを今後の検討の目的としている。

今年度は対象をさらに多くのミトコンドリア病患者に広げ、また、Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)患者も疾患対照として検討した。

B. 対象および方法

対象: 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DMD7名について同意を得た上で検討した。

方法: 1) 安静臥床後に非利き手(左)の上腕に血圧測定用のマンシエットと巻き、前腕の浅指屈筋筋腹に近赤外分光光度計 (NIRO300, 浜松ホトニクス) の入光部と受光部を4cmの間隔で長軸方向に貼り付ける。Pathlength factor は4.0を採用。0.1秒毎に筋組織中の酸素化ヘモグロビン(HbO₂)、還元ヘモグロビン(RHb)、総ヘモグロビンの濃度変化をモニターする。

2) モニター開始後、静脈駆血(50mmHg)を20秒間行う。その後圧を緩め5分後もう1

回繰り返す。5分の休息後、動脈駆血(200mmHg)を40秒間行う。これを5分後に再度施行する。

3) 次に、握力計にて最大握力の10%の力で握力計を握ってもらい、1分後にそのままを保ちながら静脈駆血を20秒間施行する。これを5分の休息後もう1回繰り返す。次に、握力計にて最大握力の10%の力で握力計を握ってもらい、1分後にそのままを保ちながら動脈駆血を40秒間行う。これを5分の休息後もう1回繰り返す。

4) 前腕筋血流量および前腕酸素摂取率は van Beekvelt らの方法により算出した^{1, 2, 3}。

a) 前腕筋血流量: 静脈駆血時の HbO₂ と RHb の濃度変化率($\mu\text{M}/\text{sec.}$)を計測し、その結果を $\text{ml} / \text{min.} / 100 \text{ ml tissue}$ に換算する。今回は Hb を 13.5g/dl、Hb の分子量は 64000 として計算した。

b) 前腕酸素摂取率: 動脈駆血時の HbO₂ の減少率($\mu\text{M} / \text{sec.}$)を計測し、その結果を $\mu\text{moleO}_2 / \text{min.} / 100 \text{ g tissue}$ に換算する。筋の比重は 1.04 とし、ヘモグロビンと酸素のモル比は 1 : 4 として計算した。

C. 研究結果 (Figures 1 & 2)

1) 安静時の前腕筋血流量は正常対照、DMD 患者に比して有意な差はなかった。安静時の前腕筋酸素摂取量も正常対照およびDMD患者に比して有意な差はなかった。DMD 患者では酸素摂取量の低下傾向が見られたが有意な差は見られなかった。

2) 軽度運動負荷時の計測については知的障害児、および幼少の患者は指示に従えないため検討からはずした。このためミトコンドリア病患者の検討は4例のみとなった。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。DMD患者では正常に比して低下傾向が見られたが統計学的有意差はなかった。また1例のDMDについてプレドニン内服前後で検討したが、服用後には安静時の酸素摂取量が服用前の6倍に上昇していた。

D. 考察

今後、多くの患者について検討する予定で

ある。また、計測の安定性を得る上では幼児や知的障害の強い患者以外の対象を検討すべきと思われる。計測の正確さを期す上では、皮下脂肪の厚さが計測結果に影響を与えるとの報告があり、現在超音波エコーにて皮下脂肪の計測を検討に加えている。今後皮下脂肪の厚さで補正した結果にて検討をする予定である。

Figure 1

安静時の左前腕筋血流量・酸素摂取量の比較

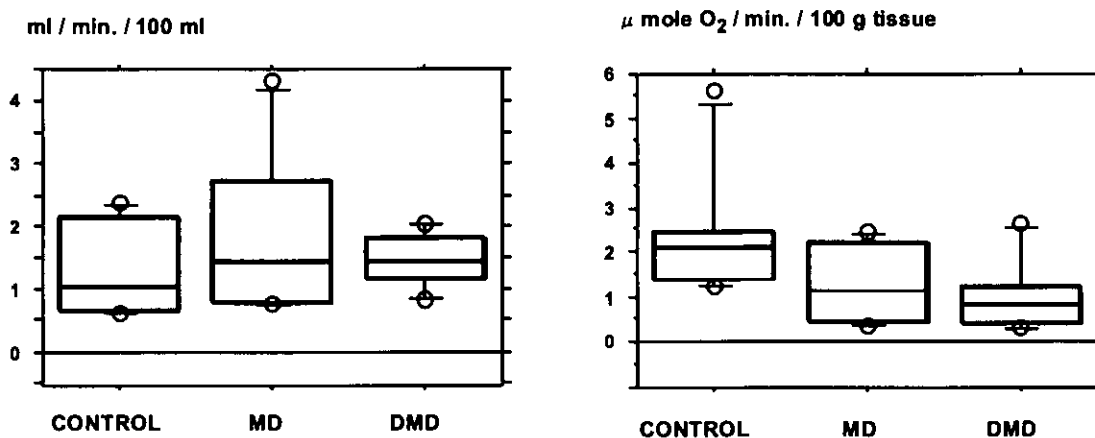
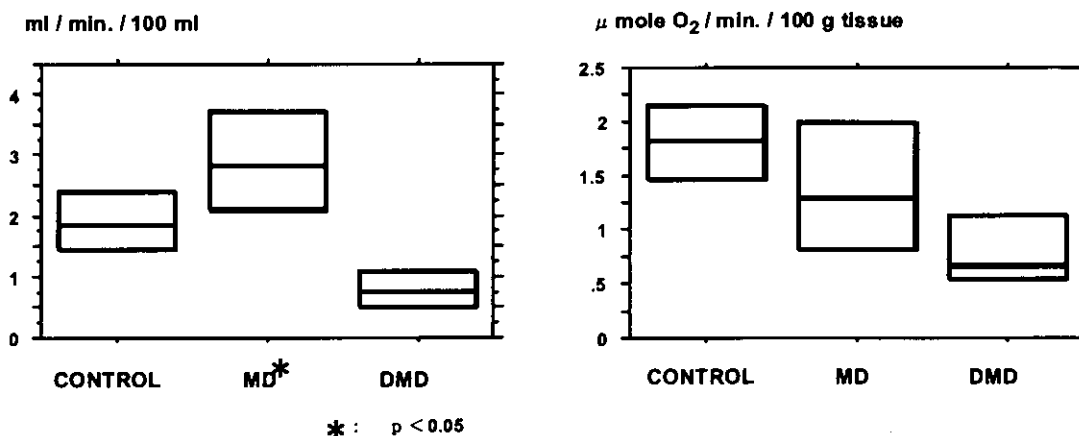


Figure 2

運動負荷時の左前腕筋血流量・酸素摂取量の比較



E. References

- 1) Van Beekvelt, M. C. Colier, W. N. Wevers, R. A. Van Engelen, B. G. Quantitative measurement of oxygen consumption and forearm blood flow in patients with mitochondrial myopathies. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 1999; 471: 313-9.
- 2) van Beekvelt, M. C. Borghuis, M. S. van Engelen, B. G. Wevers, R. A. Colier, W. N. Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. *Clinical Science* 2001; 101: 21-8.
- 3) De Blasi, R. A. Ferrari, M. Natali, A. Conti, G. Mega, A. Gasparetto, A. Noninvasive measurement of forearm blood flow and

oxygen consumption by near-infrared spectroscopy. *Journal of Applied Physiology* 1994 ; 76 : 1388-93.

F.健康危険情報

特になし

G.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

(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

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系の異常により発症する遺伝病であり、その障害部位の分布により臨床症状は多彩である。今回我々は、幼児期に発症し急速進行性のジストニアを呈した症例において、ミトコンドリア全周シーケンスを行い、t1819c変異を見出した。t1819c変異による疾患はこれまでに報告がなく、多型としての報告も認められない。t1819c変異がジストニアの病因となりうるかは細胞生物学的検討とともに、症例の蓄積が必要であるためここで報告する。

B. 症例

症例は5歳男児。家族歴に特記事項はなく、姉、兄、妹の四人兄弟。在胎41週、3666gで出生し、生直後発熱のため5日間抗生剤投与を受けた。生後3ヶ月より気管支炎、中耳炎を反復し、加療を要した。発達歴はあやし

笑い3ヶ月、単語12ヶ月、顎定3ヶ月、座位6ヶ月、寝返り6ヶ月、ハイハイ9ヶ月、立位9ヶ月、独歩12ヶ月と特に異常を認めなかった。

2002年1月(3歳4ヶ月)のとき、急性扁桃腺炎のため39℃台の発熱を3日間認めた。同年2月中旬よりイライラする、手をモゾモゾする、体に力が入らない、などの症状が出現した。3月の頭部MRIで基底核病変、5月の脳血流SPECTで同部位の血流低下を認めた。舞踏病として抗生剤投与を行ったが、徐々に症状が進行し、7月ごろよりジストニアとなり歩行不能となった。ジストニアは進行性で、筋緊張亢進のため舌や頬粘膜の咬傷が耐えない。

これまでプレドニゾロン、γグロブリン、ピオチン(100mg/日)、ビタミンB6(300mg/日)、バルプロ酸、カルバマゼピン、ハロペリドール、プロモクリプチン、レボドパは無効であった。トリヘキシフェニジルは副作用

(尿閉)のため増量できなかった。

検査結果を図1、図2、表1、表2に示す。

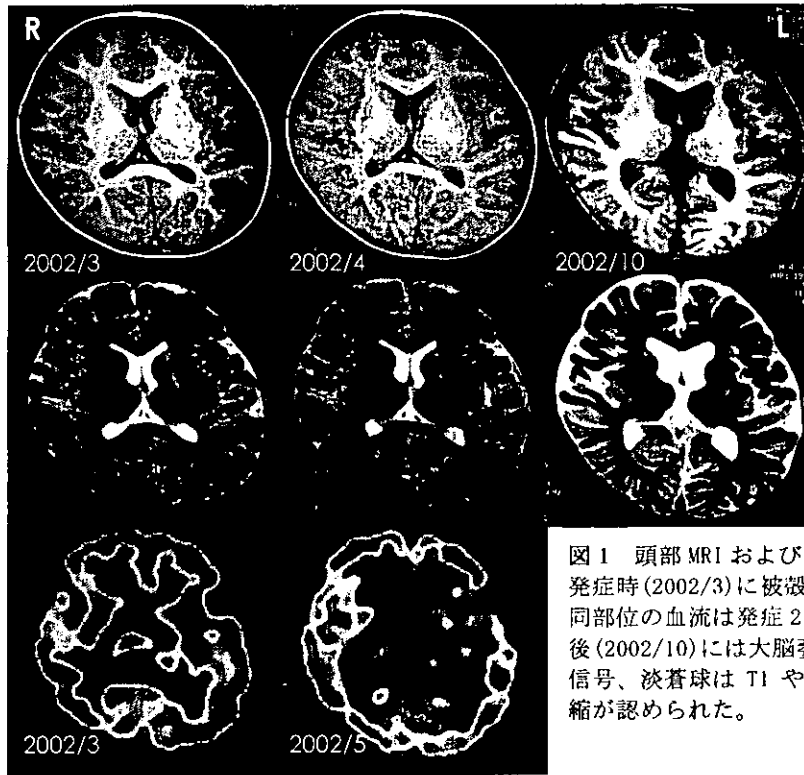


図1 頭部MRIおよびHMPAO-SPECT経時変化
発症時(2002/3)に被殻内側部にT2高信号域を認めた。
同部位の血流は発症2ヶ月後には低下した。発症7ヵ月
後(2002/10)には大脳萎縮が進行し、被殻は全体にT2高
信号、淡蒼球はT1やや高信号を呈し、基底核全体の萎
縮が認められた。

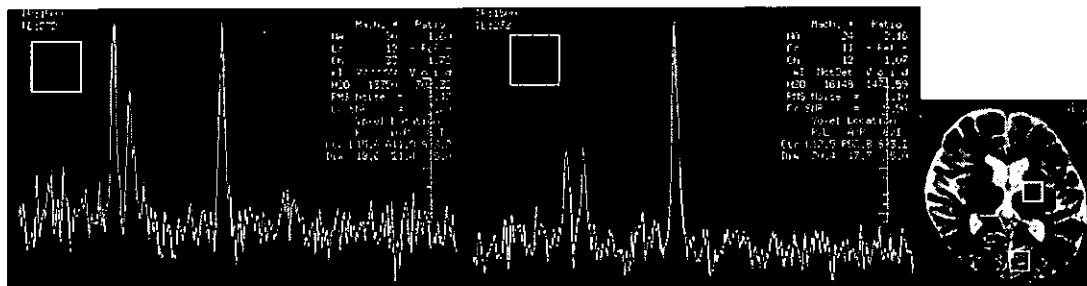


図2 発症7ヵ月後(2002/10)のMRスペクトロスコピー
後頭葉(黄色)に比べ、基底核(白色)でNAA/Cr値の低下が認められた。

表1 各種検査

項目	結果	否定された疾患名
血算・生化学・血清	異常なし	
血清乳酸/ビルビン酸	5.8/0.71 mg/dl	
髄液乳酸/ビルビン酸	9.6/0.91 mg/dl	
血中アミノ酸分析	特異的ピークなし	アミノ酸代謝異常症
尿中有機酸分析	特異的ピークなし	有機酸代謝異常症
血清セルロプラスミン	正常	Wilson 病
血清ビオチン	正常	ビオチンダーゼ欠損症
ビオチンダーゼ活性	正常範囲	
髄液・尿ビオプテリン	正常範囲	ビオプテリン代謝異常症
血清ビオプテリン	やや低下	
ジヒドロプテリジン還元酵素活性	正常	
aromatic L-aminoacid decarboxylase (AADC) 活性	正常	AADC 欠損症
カテコラミン		カテコラミン産生系の異常
血漿アドレナリン	280 pg/ml (<100)	
血漿ノルアドレナリン	1060 pg/ml (100-450)	
血漿ドパミン	20 pg/ml (<20)	
血漿 L-DOPA	4.7 ng/ml (1.2-2.2)	
髄液 HVA	107 nmol/l (212-989)	
髄液 5-HIAA	75.8 nmol/l (74~370)	
歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA), Machado-Joseph 病, Huntington 病遺伝子	トリプレットリピート陰性	DRPLA, Machado-Joseph 病, Huntington 病
hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 遺伝子	exon, cDNA 変異なし	Lesch-Nyhan 症候群
pantothenate kinase 2 遺伝子	変異なし	Hallervorden-Spatz 症候群

表2 全周ミトコンドリア DNA シーケンス

領域	変異	アミノ酸置換	正常人での頻度 (%)
D-loop	a73g		98
	a263g		83
	Ins-311c		85
	t489c		62
12SrRNA	a750g		99
	a1438g		92
16SrRNA	t1819c		0
	a2706g		99
	g3010a		31.5
ND2	a4769g	syn	99
	c4883t	syn	35
	c5178a	L-M	29
CO I	c7028t	syn	99
ATP8	c8414t	L-F	31
ATP6	a8701g	T-A	45
	a8860g	T-A	100
CO III	t9540c	syn	52
ND3	a10398g	T-A	70
	c10400t	syn	63
ND4	t10873c	syn	63
	c11215t	syn	2
	a11561g	syn	0
	G11719a	syn	100
ND5	c12705t	syn	73
ND6	c14668t	syn	34
cyt b	c14766t	I-T	100
	t14783c	syn	65
	g15043a	syn	63
	a15326g	T-A	99
	a15874g	syn	2
D-loop	c16223t		75
	t16362c		43

C. 考察

幼児期発症で、急速に進行性する全身性ジストニアの一例を報告した。各種検査結果より、カテコラミンの利用障害があると推察され、これに加えミトコンドリア DNA の未知の t1819c 変異を検出した。t1819c 変異はこれまでに多型としての報告も認められず、t1819c 変異がジストニアの病因となりうるかを検討することが必要である。

今後細胞生物学的検討とともに、症例の蓄積が期待される。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhao Y, Haginoya K, Sun G, Dai H, Onuma A, Iinuma K Platelet-derived growth factor and its receptors are related to disease progression in human muscular dystrophy, J Pathology, 2003; 201:149-159.
- 2) Munakata M, Haginoya K, Soga T, Yokoyama H, Kato R, Nagasaka T, Murata T, Higano S, Takahashi Si, Iinuma K. The metabolic properties of band heterotopia differ from those of other cortical dysplasias: a proton magnetic resonance spectrophotometry analysys. Epilepsia, 2003 ; 44 : 336-371.

2. 学会発表

- 1) 萩野谷和裕、NIRS による小児てんかんの発作時脳血流変化 2003 第 37 回日本てんかん学会 シンポジウム I
- 2) 萩野谷和裕、孫桂蓮、飯沼一字、筋ジストロフィーにおける connective tissue growth factor の役割について 2003 第 45 回日本小児神経学会総会
- 3) 石飛真美子、福与なおみ、廣瀬三恵子、北村太郎、富樫紀子、奈良智恵子、宗形光敏、横山浩之、萩野谷和裕、飯沼一字、免疫抑制剤により白質脳症をきたした小児 3 例、2003 第 45 回日本小児神経学会総会
- 4) 福与なおみ、萩野谷和裕、富樫薫、横山浩之、高柳勝、田中総一郎、戸田達史、飯沼一字、精神発達遅滞を認めない福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD) の 1 例 2003 第 45 回日本小児神経学会総会
- 5) 横山浩之、廣瀬三恵子、奈良知恵子、宗形光敏、萩野谷和裕、飯沼一字、ADHD 新規診断患児における CDI の検討 2003 第 45 回日本小児神経学会総会

- | | |
|--|-------------------------------|
| 6) 萩野谷和裕、代 紅梅、飯沼一字、筋ジ
ストロフィーにおける活性化線維芽細
胞の役割について 2003 第106回日
本小児科学会学術集会 | 2.実用新案登録
なし
3.その他
なし |
|--|-------------------------------|

F.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

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

- (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

分担研究者 田辺雄三 千葉県こども病院第一内科部長
研究協力者 藤井克則 千葉大学大学院医学研究院小児病態学
小林和彦 千葉県こども病院神経科

研究要旨

- (1) 治療法評価のためには重症度評価が必要であるが、MELAS に関する重症度評価は確立していない。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。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、MELAS の合併症である腎障害の評価項目に欠けている点が問題と思われた。
- (2) 髄液中の 14-3-3 タンパクが脳破壊の指標となりうることが報告され、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。

- (1) ENMC mitochondrial disease rating scale による Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) の重症度評価

A.研究目的

ミトコンドリア脳筋症に対する根本的な治療法はいまだ確立していないが、近年、卒中様発作に対する L-アルギニン療法、MELAS に対するジクロロ酢酸長期使用が報告されている。今後これらの治療法の有効性評価が必要と思われる。しかし治療法の評価に必要な MELAS の自然歴は不明であり、重症度評価が確立していない。そこで European Neuromuscular Centre (ENMC) で提唱された mitochondrial disease rating scale (MDRS)

に注目し、MELAS の重症度評価として適応可能か検討する目的で、我々の MELAS 症例を後方視的に MDRS で重症度評価を行い、その有用性を検討した。

B.研究方法

<対象>
対象は 1988 年から 2002 年までに千葉県こども病院神経科を受診し、MELAS と診断された 10 名中、後方視的に MDRS による重症度評価が可能な 5 名を対象にした。全例

mtDNA3243 変異を持つ男児であった。発症年齢4歳8ヶ月-10歳3ヶ月、観察期間9-18年間であった。

<方法>

MDRS は、2003年3月にオランダで行われた EMNC のワークショップで提唱された MELAS に限らないミトコンドリア病を対象とした重症度スケールであり、The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)、The International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS)、The medical Research Council scale for muscle power、The medical Research Council scale for hearing impairment といったいくつかの国際的評価スケールを基に構成されている。検査所見より日常生活動作・QOL を重視し、実際に患者の生活レベルを左右する項目で評価スケールが設定されている。項目毎に障害進行と共に0、1、2、3、4とポイントが加わり、日常生活動作8項目32点 運動系5項目21点 感覚器2項目8点 内分泌1項目3点 心機能1項目4点 認知2項目8点 計76点で評価する。

C.研究結果 図1参照

発症から5年を前期、5-10年を後期とした場合、全5例の前期5年間の平均スコア上昇は11.4、後期5年間の平均スコア上昇は、24.2であった。

症例1は4歳時に心筋症にて発症した男児。4-9歳の5年間で3回の卒中様発作(以下SLE)でスコア13上昇、10-15歳の5年間で1回のSLEしか認めなかったがスコアは36上昇した。スコアの上昇には、SLEより心不全の増悪が関与した。

症例2は、発達遅滞で発症した男児。初回SLE16歳時19、20歳時24だが、4回目のEPCを伴うSLEを認めた22歳時スコアは46に上昇した。スコアの上昇には、病前期のSLE

より、病後期のEPCを伴うSLEが大きく関与した。

症例3は、5歳時に心筋症にて発症した男児。一回のSLEを認めるのみである。5歳の発症時スコアは11、13歳時の初回SLE直前のスコアは53であり、初回SLE以前にスコアは高値を示した。心不全の進行はないが、痴呆の進行がスコアを上昇させた。

症例4は、発達遅滞、SLEにて発症した男児。10-12歳の2年間で8回のSLEを認めたが、スコアは7上昇したのみであった。しかし17-19歳の2年間では2回のSLEにもかかわらず、スコアは16上昇した。

症例5は発達遅滞で発症した男児。発症時5歳スコア19、23歳時スコア51でこの間に3回のSLEを認めたが経過中に急激なスコア上昇はなく、なだらかな上昇を認めた。痴呆の進行と共にスコアは上昇した。

D.考察

MDRSにてMELAS症例の後方視的重症度評価を行った。経時的变化をみると、前期5年間と比較して、後期5年間のスコア上昇は著しかった。このことは、同じ治療的介入を評価する際に時期により、その評価の基準が変わることを意味する。

SLEは、MELASの中樞神経症状として重要であり、Lアルギニン療法はSLEを治療対象としている。またジクロロ酢酸治療の有効性評価にもSLEの頻度が用いられている。しかしSLEがMELASの重症化にどの様に影響を及ぼすかを検討した報告はない。今回、MDRSを用いてMELAS症例の経過を評価することにより、SLEがMDRSスコア上昇にどの様に関与しているかを検討した。症例1は4回のSLEを認めたが、心不全の増悪がスコアの上昇に最も関与した。症例2は、前期のSLEより後期のEPCを伴うSLEがスコアの上昇に大きく関与した。症例3は、1回

の SLE しか認めていないが、初回 SLE 以前にスコアは高値を示した。心不全の進行はないが、痴呆の進行がスコアを上昇させた。症例 4 は 18 回の SLE を認めている。10-12 歳の 2 年間で 8 回の SLE を認めたが、スコアは 7 上昇したのみであった。しかし 17-19 歳の 2 年間では 2 回の SLE にもかかわらず、スコアは 16 上昇した。スコア上昇には SLE の頻度より病期の影響が大きいのと思われる。症例 5 は 3 回の SLE を認めた。SLE を契機にスコアが上昇したことはなく、なだらかな上昇を認め、痴呆の進行と共にスコアは上昇した。今回の検討で SLE が必ずしも症状の重症化に関与しない症例も存在することが判明した。MELAS の治療を考えるうえで、SLE を予防・治療するだけでは重症化を防ぐことが出来ないと思われた。

今後 MDRS での MELAS 症例の評価の妥当性を検討する必要がある。116th ENMC International Workshop でも議論されているが、乳幼児のミトコンドリア脳筋症は、臨床経過が違うため成人のミトコンドリア病と異なった評価法が必要とされる。MDRS の Section 1: 日常生活動作項目の Handwriting、Hygiene は乳幼児では評価が困難である。今回の検討では、症例 1 の 4 歳 8 ヶ月時での評価が最少であったが、4 歳 8 ヶ月児の正常書字と比較して書字の評価は困難であり、上肢巧緻性と高次機能を総合的に検討してスコア化した。MDRS では、小学校就学前年齢の重症度評価は困難であり、適応年齢の下限を定める必要がある。

MDRS はミトコンドリア病全般の重症度

評価のために検討された。MDRS では MELAS の合併症であり QOL を左右する腎障害の評価項目がない。MELAS の重症度評価として使用する場合には腎障害の項目を追加する必要がある。また SLE は Paroxysmal event (migraine, seizures) という下位項目に含まれるため、SLE 急性期の評価は出来ない。SLE 急性期に対する治療評価には用いることが出来ない。

MDRS は、年齢を考慮する必要や腎障害が評価できないといった欠点はあるが、国際的な重症度評価として普及していく可能性がある。MELAS に特化した重症度評価の修正版を新たに作成するか、多少の不便はあるが国際性を重視し現 MDRS を用いて MELAS 治療法を評価するかは今後検討する必要がある。

E. 結論

MDRS は国際基準に成り得る普遍性を持つ。問題点として、乳幼児の評価が困難であること、MELAS の合併症である腎障害の評価項目に欠けている点がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(2) Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) における髄液 14-3-3 蛋白

A. 研究目的

ミトコンドリア病は、エネルギー産生器管であるミトコンドリアの機能不全によって生じる疾患群である。エネルギー産生不全の結果、人体組織で様々な障害が生じるが中でも筋肉、脳組織の障害は日常生活を営む上で著しい妨げとなり、临床上大きな問題となっている。

細胞の恒常性は多くのタンパク質が協調して維持されている。中でも細胞の生と死は厳密にコントロールされ、外界からの刺激に対して敏感に即応することが求められる。例えば炎症性サイトカインは疾患によって惹起される生体反応の一つであるが、細胞外から細胞内の核にシグナルを伝達することでその薬理効果を発揮する。この細胞外から核に至るまでの経路は主に MAPK カスケードという経路が利用され、リン酸化を介して非常に迅速にシグナル伝達が行われることが知られている。

この経路は様々なタンパク分子によって制御される。リン酸化を修飾する因子として tyrosine kinase, serine-threonine kinase, phosphatase, scaffold protein, adaptor protein, G protein, 14-3-3 protein などがあり、これらが複雑に連携を保ちながら細胞の恒常性を維持することになる。

この中でも 14-3-3 protein は高度に保存された 2 量体形成タンパクであり細胞の恒常性を保つ上で重要な働きをしている。例えば細胞周期調節、アポトーシスシグナル制御、細胞内 trafficking、癌発生、細胞の成長・分化に深く関与しており、その機能不全はいくつかの疾患を引き起こすことが報告されている。このタンパクはリン酸化されたセリン・スレオニン分子に結合するが、現在まで

に 200 以上のその binding partners が存在することが知られている。その生理的有用性と相まって人体組織細胞に広く含まれており、中でも脳神経細胞ではタンパク質重量の約 1% を占めている。

Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) は異常プリオンタンパクによって発症する神経変性疾患である。脳局所性に異常プリオンタンパクが増加するため、従来診断は脳病理が確定的であるため生前診断が困難とされてきた。しかし CJD 患者の髄液を解析することによりその中で増加しているタンパクの存在が見出され、様々な同定作業の結果それが 14-3-3 タンパクであることが判明した。

これらのことより髄液中の 14-3-3 タンパクが脳破壊の指標となりうることが報告され、現在本タンパクの同定作業が成人神経内科領域で行われている。MELAS についても検出されていることがすでに報告されている。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ので報告する。

B. 研究方法

<症例> 13 歳男児

5 歳時心筋炎を疑われ千葉県こども病院入院、血液検査にて高乳酸血症が判明した。筋力低下症状も呈していたため筋生検施行、ragged red fiber が認められ、またミトコンドリア DNA 変異 (A3243G) もあり、ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) と診断された。入院時難聴も認めていた。

その後、外来にて内服治療を行い経過観察をしていた。13 歳時、歩行が困難となったため再度千葉県こども病院入院。頭部 MRI 上、著明な脳萎縮と大脳基底核の石灰化を認

めた。この入院時に髄液検査を施行している（1回目）。

平成15年1月卒中様症状あり、再度千葉県こども病院入院。MELASの卒中発作と思われた。この時髄液検査施行（2回目）した。平成15年2月MRIにて側頭葉および後頭葉に散在性の病変を認め、再度髄液検査を施行した（3回目）。その後症状落ち着いたものの、重度四肢麻痺を残し、寝たきりの状態となった。平成15年4月フォローアップで髄液検査を再度施行している（4回目）。

<方法>

今回検査した髄液は上記エピソードの4回分である。髄液は遠心分離して細胞成分を除去した後、SDS-PAGE用のsample loading bufferを加えて95°Cで5分間加熱し、-80度で保存した。SDS-PAGEは12.5%ゲルを使用し、nitrocellulose membraneにタンパクを転写した後、anti-rabbit 14-3-3 antibody (Santa Cruz Biotechnology)を反応させ、ECLキット (Amersham Bioscience)にて14-3-3 bandを検出した。また陽性であったため、anti-rabbit specific-14-3-3 antibody (Santa Cruz Biotechnology)にてisoformを決定した。

C.研究結果

第1回目で軽度陽性、第3回目で強度陽性となった。第3回目の髄液を検索した結果、 β 、 ζ の二つのisoformが陽性であった。図2に示したように、臨床経過で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（3回目）、歩行不能時の髄液では軽度陽性（1回目）であった。またMRIも撮影されているが、1回目3回目の画像上、より広範に障害された方がよりバンド密度が濃くなる傾向が認められた（図3）。

D.考察

今回我々の検討では、急性期の脳卒中発作で

強度の陽性、慢性期の症状進行時に軽度陽性の結果が得られた。脳細胞中に14-3-3 proteinが豊富に含まれることから、MRI画像所見とあわせて、より広範な部位の脳障害がバンドの濃度変化として現れたと考えられる。

14-3-3 isoforms解析は様々な疾患ですでに報告がなされているが、今回のMELAS症例では二つのisoforms β 、 ζ のみ同定された。これらが脳障害部位を反映しているのか、MELASの脳病理を反映しているのか、また実験手技に基づいているのかを判断するためには、今後の更なる症例の集積が必要と思われる。

E.結論

MELASにおける髄液14-3-3 proteinは卒中様発作により生じた広範な脳障害を反映している可能性がある。

F.健康危険情報

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

H.研究発表

1.論文発表

- 1) 宮本茂樹、染谷知宏、田辺雄三、佐藤浩一、佐々木望、長谷川行洋、浦上達彦、藤塚聡、川村智、伊藤卓夫、松浦信夫：1型糖尿病における低血糖に伴う一過性局在性神経症状 小児科臨床 56:1079-1082, 2003