

表 卒中発作時に出現したけいれんの発作型

全身性けいれん	3例	5エピソード
部分けいれん	7	22
片側上肢	3	4
眼瞼	1	2 (2エピソードともに群発)
両側上肢 多源性	2	4
半身	2	5 (1エピソードは重積)
2次性全般化	2	7 (1例3エピソードは2次性全般化群発)
-----		
部分性持続性けいれん EPC	2	6
片側上肢・下肢	1	1
片側上肢	1	2
半身	1	2
片側下肢	1	1

た、けいれんが認められた7例27エピソードの内、けいれんに先行して4例7エピソードに頭痛を、3例6エピソードに嘔吐を、2例5エピソードに視覚症状を認めた。一方、頭痛・嘔吐発作を認めた7例23エピソードにおいて、先行症状として、見えない、チカチカするという視覚症状を1例に、意識障害を2例に、頭痛発作4日間持続後に視覚症状を1例に認めた。これらのことから頭痛・嘔吐発作は卒中様発作の軽症型と推測される。

卒中様発作に関連したけいれんの発作型を表に示す。全8例中わずか3例5エピソードのみに全身性けいれんを認めた。これらは発作時脳波を記録しえなかったため、2次性全般化である可能性を否定できない。同一症例でも、発作ごとに臨床症状は多彩であった。経時的にけいれん発作型・出現部位が変化し、3例では多源性、1例では交代性けいれん、2例では群発、2例でEPCが出現した。EPCの出現時期は卒中様発作の出現初期ではなく、卒中様発作を繰り返して、MELASの病状が進行した時期であった。症例5では、てんかん性全身性けいれんと笑い発作を併発した。

卒中様発作時脳波は、非けいれん時に2例2エピソードにおいて記録可能であり、片側後頭頭～後頭葉において徐波を認めた。けいれん時においては2例4エピソード（うち1例2エピソードはEPC）で記録可能であり、片側後頭葉が好発部位であり、後側頭～後頭葉起源の発作波が運動野に波及するとけいれん発作を惹起しうることを示していた。嘔吐・頭痛発作、脳卒中様発作ともに、徐波バースト、棘波バースト、高振幅徐波バーストが主体で、後側頭～後頭葉起源が好発であり共通していた。さらに、高振幅徐波に多棘波が重畳していた。記録しえたEPC1例1エピソードにおいて、片側頭頂に鋭波が認められ、同時記録した筋電図の筋放電と時間的に一致していなかった。

卒中様発作時の脳波に関して、堀ら<sup>14)</sup>は、片側の後頭葉に起始する棘波、不規則多棘徐波が全般化を、Funakawaら<sup>15)</sup>は周期性片側てんかん性放電 (periodic lateralized epileptiform discharges), Fujimotoら<sup>16)</sup>は頭頂後側頭葉～後頭葉に多棘波を伴った高振幅徐波を報告しており、後頭葉優位に大脳半球皮質の過興奮が示唆される。

#### IV. 卒中様発作の推定発現機序 (図8)

脳梗塞様発作を起こす機序として、ミトコンドリア機能低下・エネルギー代謝障害、血管内皮細胞に異常なミトコンドリアが集積し、毛細

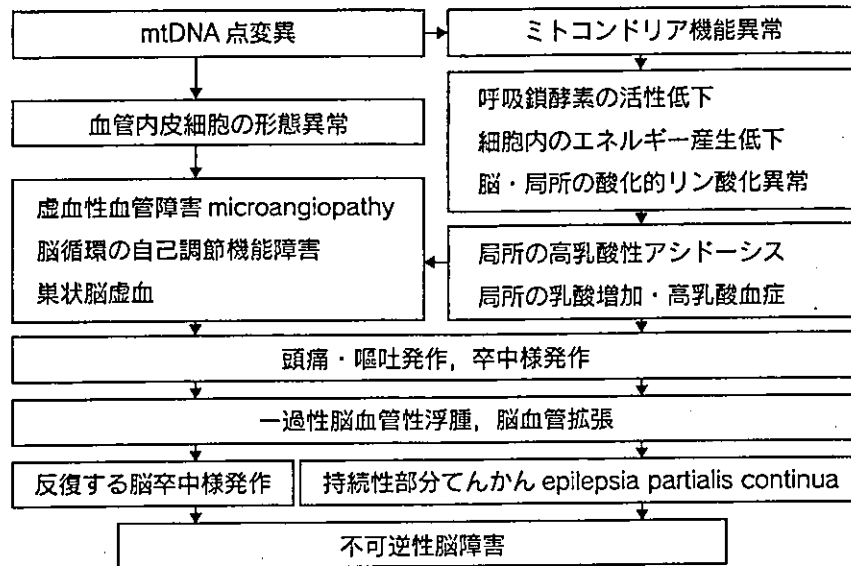


図8 卒中様発作の推定発現機序

血管内腔の狭小化から虚血性血管障害 (mitochondrial microangiopathy)<sup>17)</sup>をきたしていると考えられている。血管自体の障害に起因する増悪により、脳虚血が惹起されると考えられている。SPECTでは責任病巣に一致して、血流の低集積が認められる<sup>18)</sup>。細小動脈は、脳血流の自己調節能を担っている。虚血性変化に加え、充血やうっ血、血管壁の透過性亢進による循環障害が起こり、局所のエネルギー代謝異常が惹起されると考えられる。脳症状が発作性に反復し、後頭葉が好発部位である理由は不明である。

病理学的には、大脳皮質や小脳に新旧種々の軟化巣や層状壊死が多発し、グリオーシスと毛細血管の新生、拡張がみられる。軟化巣分布は血管支配と一致しない。そのなかによく保たれた神経細胞が残存している<sup>17)</sup>。皮質の萎縮と嚢胞形成と壊死を伴った層状壊死を認め、壊死巣は大脳の後頭葉に顕著であり<sup>17)19)</sup>、灰白質では、視床<sup>19)</sup>、基底核<sup>20)</sup>が侵される。

プロトンMRS所見を検討したBarkovichらは、病巣に一致して局所性に乳酸値が上昇していること、MRI-T2画像で萎縮像を示した慢性期の病側被殻において、乳酸値は上昇せず、MRI-T2画像上、正常と考えられた対側被殻に

おいて乳酸値が上昇していたと報告<sup>21)</sup>した。卒中様発作に先行して、脳内に局所性乳酸アシドーシスが生じている可能性がある。

MRI拡散強調画像にて、卒中様発作急性期には、一般的な脳梗塞とは異なり、可逆的・限局性血管性浮腫を認め、これが病態にかかわっているという報告がある<sup>22)</sup>。

#### おわりに

MELASにおける卒中様発作症状は、けいれんに先行または随伴して頭痛、嘔吐、視覚症状を、けいれん後に一過性片麻痺を伴うことがある。けいれんの多くが後頭葉起源の部分発作である。卒中様発作を反復し、不可逆性、進行性脳症を惹起する。

#### 文 献

- 1) Moraes C et al : The mitochondrial tRNA Leu (UUR) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) ; Genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. Am J Hum Genet 50 : 934-949, 1992
- 2) Pavlakis SG et al : Mitochondrial myo-

- pathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes; A distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* **16** : 481-488, 1984
- 3) Goto Y et al : A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **348** : 651-653, 1990
  - 4) Goto Y et al : A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta* **1097** : 238-240, 1991
  - 5) Ballinger SW et al : Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet* **1** : 11-15, 1992
  - 6) van den Ouweland JMW et al : Mutation in Mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* **1** : 368-371, 1992
  - 7) Reardon W et al : Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* **340** : 1376-1379, 1992
  - 8) 中野和俊ほか : ミトコンドリア脳筋症の治療—1999年. *東京女子医科大学雑誌* **70** : E 10-15, 2000
  - 9) Komura K et al : Effectiveness of creatine monohydrate in mitochondrial encephalomyopathies. *Pediatr Neurol* (in press)
  - 10) 大津真優ほか : 脳卒中様発作に対し midazolam が奏功した MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) の 2 例. *脳と発達* **35** : 71-74, 2003
  - 11) Koga Y et al : Effect of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS. *Neurology* **58** : 827-828, 2002
  - 12) Kuriyama M et al : Mitochondrial encephalomyopathy with lactate-pyruvate elevation and brain infarctions. *Neurology* **34** : 72-77, 1984
  - 13) Matsuzaki M et al : Hypothalamic growth hormone deficiency and supplementary GH therapy in two patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes. *Neuropediatrics* **33** : 271-273, 2002
  - 14) 堀 有行, 廣瀬源二郎 : Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS) の脳波異常について. *臨床脳波* **31** : 717-724, 1989
  - 15) Funakawa I, Yasuda T, Terao A : Periodic lateralized epileptiform discharges in mitochondrial encephalomyopathy. *Electroenceph Clin Neurophysiol* **103** : 370-375, 1997
  - 16) Fujimoto S et al : Serial electroencephalographic findings in patients with MELAS. *Pediatr Neurol* **20** : 43-48, 1999
  - 17) Ohama E et al : Mitochondrial Angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy. *Acta Neuropathol* **74** : 226-233, 1987
  - 18) Suzuki T et al : Mitochondrial encephalomyopathy (MELAS) with mental disorder CT, MRI and SPECT findings. *Neuroradiology* **32** : 74-76, 1990
  - 19) Valanne L et al : Lamina cortical necrosis in MELAS syndrome; MR and neuropathological observations. *Neuropediatrics* **27** : 154-160, 1996
  - 20) Fujii T et al : CT, MRI, and autopsy findings in brain of a patient with MELAS. *Pediatr Neurol* **6** : 253-256, 1990
  - 21) Barkovich AJ et al : Mitochondrial disorders : Analysis of their clinical and imaging characteristics. *AJNR* **14** : 1119-1137, 1993
  - 22) Yoneda M et al : Vasogenic edema on MELAS; A serial study with diffusion-weighted MR imaging. *Neurology* **53** : 2182-2184, 1999

## ミトコンドリア脳筋症 (MELAS, Leigh症候群) を成因とする 小児難治性てんかんの診断, 治療に関する研究

Diagnosis and treatment of intractable epilepsy caused  
by mitochondrial encephalomyopathies: MELAS and Leigh syndrome

中野和俊, 中山智博, 佐々木香織, 松崎美保子,  
田良島美佳子, 大津真優, 小国弘量, 大澤真木子

要旨: ミトコンドリア脳筋症における難治性痙攣の機序を解明するため, MELAS8例, Leigh症候群10例の計18例について痙攣の特徴を後方視的に検討した。このうちMELAS1例, Leigh症候群2例で, 血小板ミトコンドリアDNA (mtDNA) 変異率の経時的变化を検討した。MELAS痙攣の多くは脳卒中様発作に起因し, てんかん発作と異なると考えられた。EPC (epilepsia partialis continua) は, 頭痛や嘔吐がなくEPCが卒中様発作の反復後に出現する点で他のMELAS痙攣と異なると考えられた。頭部MRIの検討からLeigh症候群の亜型分類を試み, West症候群は大脳障害群に, ミオクロニー発作は小脳脳幹障害群で認め, 亜型とてんかん発作型の相関を見出した。神経症状の変動にはmtDNA変異の増減が関与すると考えられた。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2003;15:49-56

Key Words : MELAS, Leigh syndrome, stroke-like episodes, epilepsy partialis continua,  
West syndrome

### はじめに

ミトコンドリア脳筋症は細胞内小器官であるミトコンドリアの機能障害により全身の種々の臓器が障害される疾患で, エネルギー消費が高い中枢神経系は最も侵されやすく進行性で難治の経過をたどる。日本における小児科, 神経内科領域でのミトコンドリア脳筋症の疫学調査<sup>1)</sup>では, 全体ではMELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) が32%,

Kearns-Sayre症候群 (KSS) が20.8%, Leigh症候群18.5%であった。しかし, 小児科領域と神経内科領域ではその分布が異なり, 小児科領域においては, Leigh症候群が31.1%, MELASが29.9%であったのに対し, 神経内科領域ではKSSが38.6%, MELASが34.7%であった。小児科領域ではMELASとLeigh症候群の発症頻度が高いといえる。

MELASは脳卒中様症状と高乳酸血症を主体とする。初発年齢は5-15歳に多く, 脳卒中

東京女子医科大学 小児科

[〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1 東京女子医科大学 小児科 Tel: 81-3-3353-8111 Fax: 81-3-5269-7338  
E-mail: knakano@ped.twmu.ac.jp]

Kazutoshi NAKANO MD, Tomohiro NAKAYAMA MD, Kaori SASAKI MD, Mihoko MATSUZAKI MD,  
Mikako TARASHIMA MD, Mayu OHTSU MD, Hirokazu OGUNI MD, Makiko OSAWA MD  
Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University 8-1, Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo,  
Japan, 162-8666.

発作性エピソード	症例数(%) (重複を含む)	回数(%)	発症から症状(エピソード) までの期間(月)	
頭痛・嘔吐(+)痙攣(-)	7(32)	23(41)	2-27	12±9
頭痛・嘔吐(+)痙攣(+)	7(32)	16(29)	0-70	16±18
頭痛・嘔吐(-/? )痙攣(+)	6(27)	11(20)	11-94	18±20
頭痛・嘔吐(-) epilepsy partialis continua (EPC)	2(9)	6(11)	25,74	
延べ合計	22症例(100%)	56回(100%)		

Tab. 1 発作性エピソードの頭痛・嘔吐と痙の検討

様症状時には頭痛，嘔吐発作とともにしばしば痙攣を合併しててんかんと鑑別が問題になる。遺伝形式は母系遺伝を示し，ミトコンドリアDNA (mtDNA) はロイシン (UUR) 転移RNA内の点変異が報告されている。変異型の比率の高い細胞では呼吸鎖酵素の合成能の低下による細胞障害が生じること，形態異常を有するRRF (Ragged red fibers) やSSV (strongly SDH-reactive blood vessels) では変異型が集族していることなどが判明している。本症に対する治療法は確立しておらず，急性期の痙攣の成因によってその治療法が異なってくる可能性がある。本研究においてMELASの痙攣の特徴を検討し，狭義のてんかんとの違いを明らかにすることとした。

Leigh症候群<sup>3)</sup>は脳幹，大脳基底核，視床の壊死性病変に起因する摂食障害，呼吸障害，精神運動発達遅滞，退行，筋緊張低下を主徴とし，しばしば難治性の痙攣を合併する。発症年齢は乳幼児が多い。本症の病因は，①主にX-linked PDHC E1 $\alpha$ -subunitの遺伝子変異によるピルビン酸脱水素酵素異常 (PDHC: pyruvate dehydrogenase complex)。②電子伝達系酵素異常：複合体IまたはIVの活性低下 (mtDNA変異，核DNA変異を呈す場合もある) ③mtDNA変異は8993，9176が主で，3243，8344変異の報告もある。これらは母系遺伝を呈する。④核DNA変異：9q34のSURF-1遺伝子変異がcytochrome c oxidase (CCO) 欠損例で報告されている)。また，酵素異常も含めて原因が特定できない症例がなお45%から60%ある。しかし，これらの遺伝

子変異や酵素異常がどのように臨床症状を規定しているかは不明である。今回，我々はLeigh症候群を亜型分類し，てんかん発作の特徴を亜型分類から検討したので報告する。

## 対象

対象は1980年から当科で経過観察してきたミトコンドリア脳筋症18例で，内訳はMELASと診断した8例 (男2例)，Leigh症候群と診断した10例 (男2例) である。MELASは，初発3歳から15歳2ヵ月，最終受診時年齢6歳11ヵ月から29歳，死亡が2例であった。MtDNAのA3243G点変異が明らかになった例は3例であった。Leigh症候群は，発症年齢は日齢0から8歳 (平均2歳2ヵ月)，最終受診年齢は1歳7ヵ月から17歳4ヵ月，死亡が2例であった。

## 方法

MELAS例における痙攣の特徴について，発作症状，発作時脳波，治療による脳の変化を後方視的に分析した。Leigh症候群におけるてんかん発作の特徴について，臨床経過と頭部MRIの検討から亜型分類を試み，各群における痙攣，臨床症状の特徴を後方視的に分析した。mtDNAの変化を検討するために，A3243G変異を示すMELASの1例とT8993G変異を示すLeigh症候群2名に対し，約半年間隔で採血後遠心にて単離した血小板を液体窒素で保存。この保存血小板をtemplateとし，nested PCR法を用い症例ごとにPCR-RFLPを行った。

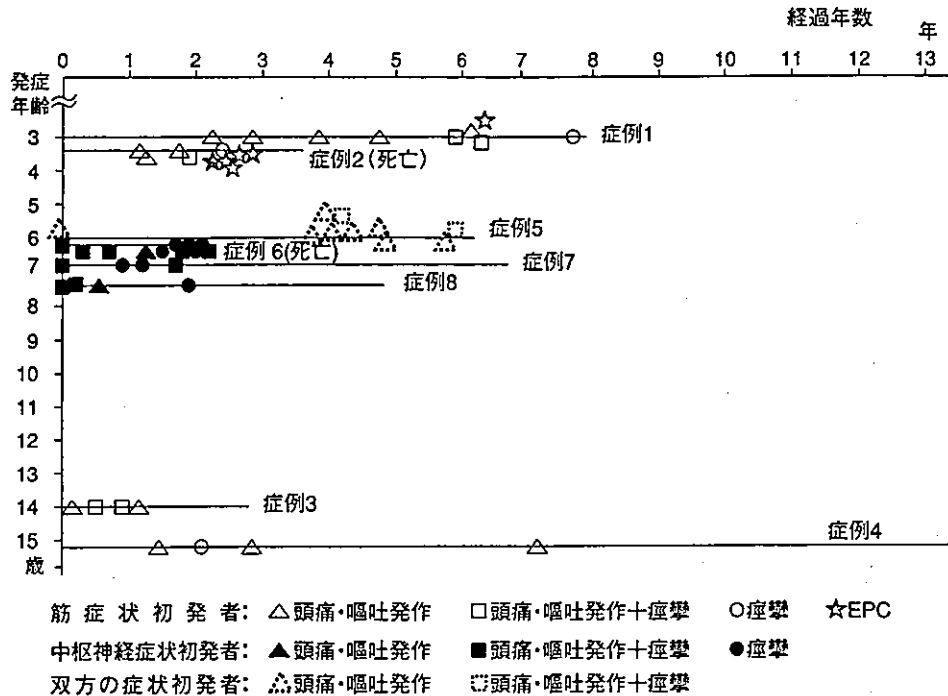


Fig. 1 発作性エピソードの臨床経過

## 結 果

### 1. MELASの痙攣—てんかん発作との鑑別

MELASの痙攣発作型を延べ症例数で検討すると、全般性が25%、部分性が58%、部分性持続性(EPC)が17%であり、延べ回数で見るとは全般性が15%、部分性が67%、EPCが18%であった。MELASの痙攣発作の主体は部分痙攣が主体をなしていた。発作性エピソードにおける頭痛・嘔吐発作、痙攣発作の頻度を延べ回数で検討すると(Tab.1)、頭痛・嘔吐(+ )痙攣(-)発作群が41%、頭痛・嘔吐(+ )痙攣(+ )発作群が29%、頭痛・嘔吐(-/? )痙攣(-)発作群が20%、頭痛・嘔吐(-)EPC(+ )群が11%であり、頭痛・嘔吐発作を合併しているものが70%を占めた。ミトコンドリア脳筋症の発症から発作性エピソード発現までの期間を見ると、頭痛・嘔吐(+ )痙攣(-)発作群、頭痛・嘔吐(+ )痙攣(+ )発作群は0または2ヵ月から発現しているのに対して、頭痛・嘔吐発作(-)EPC(+ )群は25または27ヵ月に発現し、頭痛・嘔吐(-/? )痙攣(+ )発作群はその中間の11ヵ月から発現していた。発作性エピソード

を症例ごとに検討すると(Fig.1)、同一症例において頭痛・嘔吐(+ )痙攣(-)発作、頭痛・嘔吐(+ )痙攣(+ )発作、または頭痛・嘔吐(-/? )痙攣(+ )発作が混在した。EPCが2例に認められたがいずれも卒中様発作の出現初期ではなく、卒中様発作を反復して症状が進行した時期であった。

卒中様発作時の脳波および頭部MRIの検討では、症例1の9歳1ヵ月、頭痛嘔吐発作時にT5-O1に徐波バースト(徐波が発作性に持続)を認め、1ヵ月後の全身痙攣発作の痙攣消失時の脳波ではT6-O2-P4に徐波バーストが認められた(Fig.2)。頭部MRIは、9歳1ヵ月時は左後頭葉にT2強調像で増強される新しい病巣ができており、1ヵ月後には左後頭葉の病巣は消退し、新たに右後頭葉にT2強調像で増強される新しい病巣が出現していた(Fig.3)。これらのMRIの変化は卒中様発作時の徐波バーストの出現部位と一致していた。症例3の15歳2ヵ月、頭痛嘔吐発作から右半盲を呈した時の脳波では、左後頭葉優位に不規則多棘徐波複合様になり、一部は高振幅徐波に棘波が重畳していた(Fig.4)。EPC時の脳波は左Cz-C4領域に鋭波バーストを認

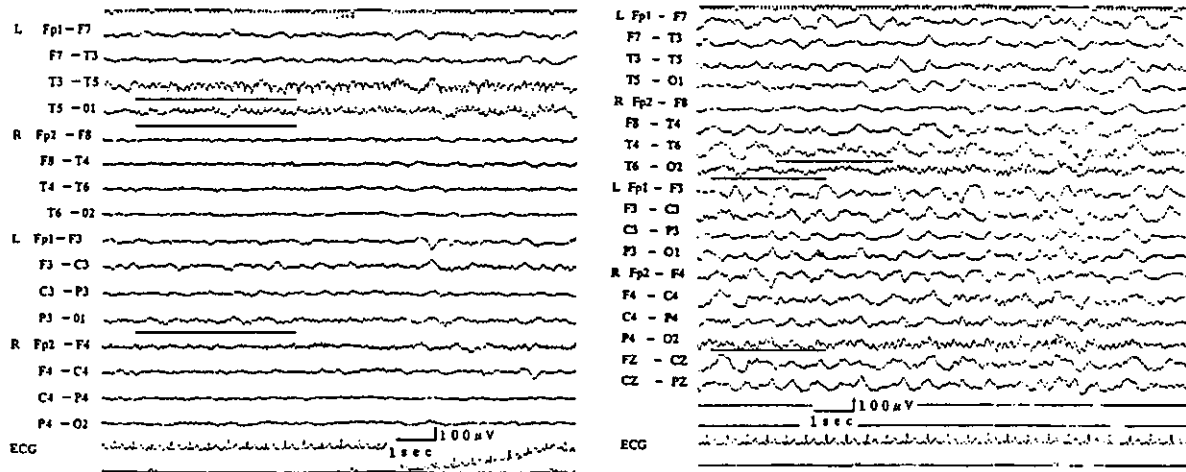


Fig. 2 MELAS症例1. EEG

左(9:1)頭痛・嘔吐発作(意識障害を伴う) 右(9:2)全身痙攣発作時の痙攣消失時記録

各々, 左pT-O, 右pT-O-Pに6-7Hz徐波バーストが認められた。1カ月の経過で, 発作巣が変化した。脳画像部位と一致した。

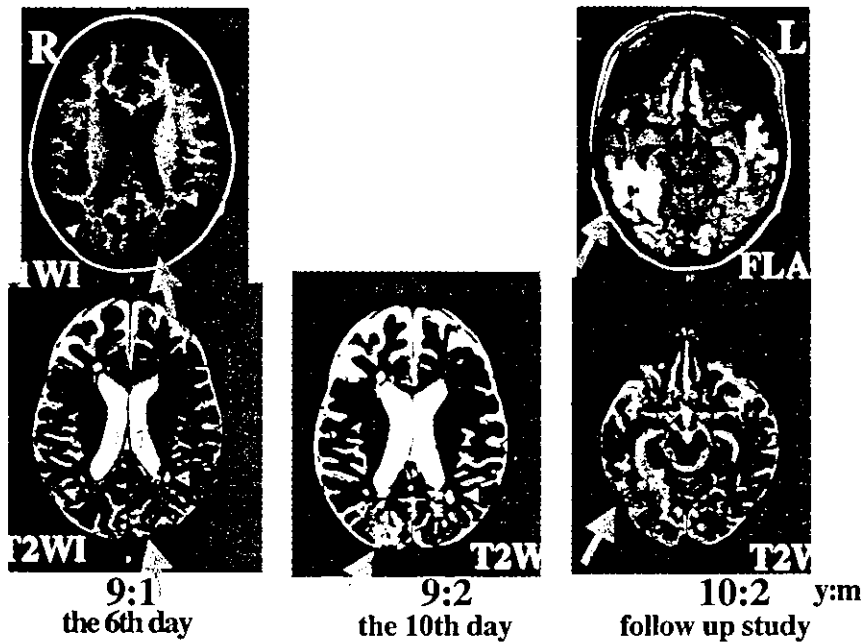


Fig. 3 MELAS のMRI : 症例1 (A3243G)

めたが, 筋放電と鋭波は同期しなかった。

痙攣を伴った卒中様症状にdiazepam, phenytoinなど種々の抗痙攣剤を試みたが無効または効果は一時的であり, 頭痛発作は消失しなかった。MELASの2症例(症例1, 5)の卒中様症状出現時に, midazolamを0.3 mg/kg静注, その後0.2 mg/kg/hrで持続投与したところ静注数十秒で頭痛は消失し脳波も突発性異常波が消失し基礎波が出現した<sup>4)</sup>。

## 2. Leigh症候群におけるてんかんの特徴—亜型分類と発作との関係

Leigh症候群は, 頭部MRIと臨床経過から, ①基底核型, ②大脳皮質基底核型, ③大脳皮質基底核脳幹型, ④基底核小脳型, ⑤基底核(-)小脳脳幹型に分類されると考えられた。①基底核型は臨床症状が出現する以前から基底核病変が出現し, 主な障害部位が基底核に限局したままであった。病因遺伝子は不明で

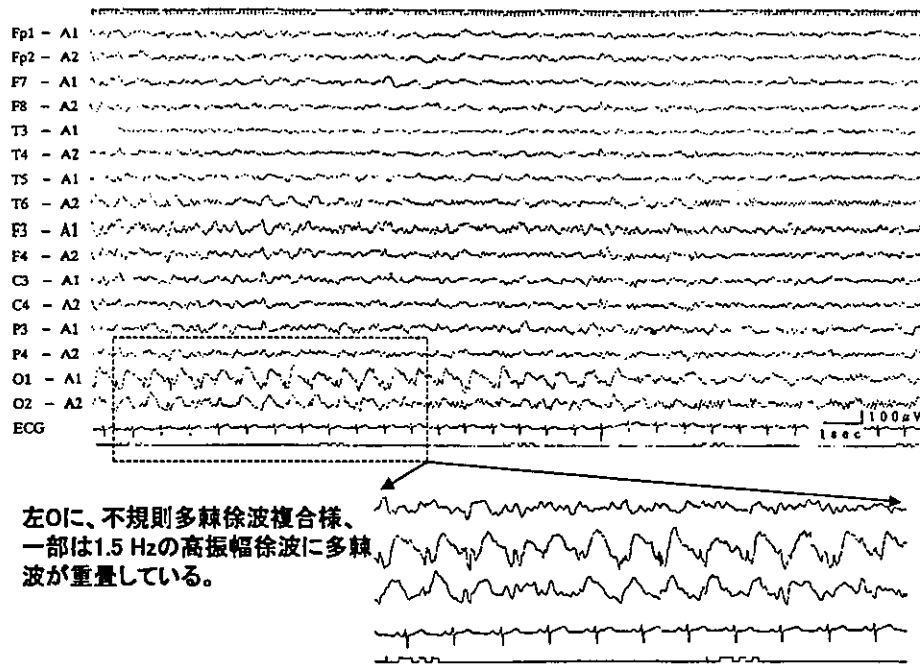


Fig. 4 MELAS 症例3 (15:2)  
頭痛・嘔吐発作眼の奥のチカチカ、頭痛→右半盲

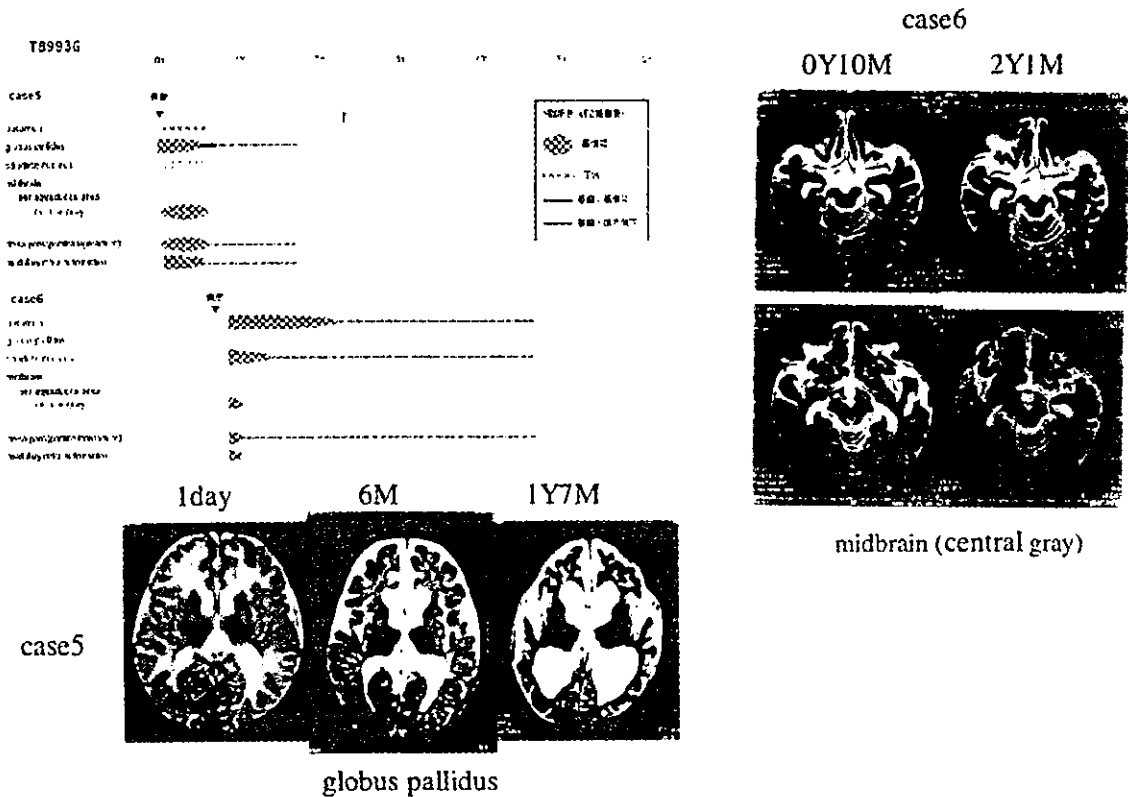


Fig. 5 大脳皮質基底核脳幹型 T8993G経過

COX部分欠損が認められた。②大脳皮質基底核型はEpileptic spasmで発症し、MRI上は初期には基底核病変を認めなかったが後に出現している。病因遺伝子は不明である。③大

脳皮質基底核脳幹型は大脳から脳幹まで広範囲の萎縮を呈する重症型で、病因遺伝子はT8993G変異が認められた。Leigh症候群症例6のMRIの経過を図に呈示する (Fig.5)。生下



亜型分類	症例数	発作発現率%	発作型
基底核型	3	0	
大脳皮質基底核型	1	100	Atypical West
大脳皮質基底核脳幹型	2	100	West
基底核小脳型	3	0	
基底核(-)小脳脳幹型	2	100	Myoclonic szs
合計	10	50	

Tab. 2 てんかん発作と亜型分類

時より淡蒼球に病変を認め月齢が進むとともに大脳皮質、白質の萎縮が進行しているのが認められる。10ヵ月時には中脳、延髄にも病変が認められている。④基底核小脳脳幹型はMRI上、小脳の萎縮、基底核病変を主体とし、症状は軽症だが感染を契機に増悪しやすい。病因遺伝子はT8993C, T9176C変異が認められた。⑤基底核(-)小脳脳幹型はMRI上基底核に病変が認められず、小脳、中脳、延髄の病変を主体とした。病因遺伝子はA8344G変異が認められた。

てんかん発作をこの亜型分類(案)で検討すると(Tab.2), ②大脳皮質基底核型でAtypical Westを1例(100%)で認め、③大脳皮質基底核脳幹型でWestを2例(100%)で認めた。⑤基底核(-)小脳脳幹型でミオクロニー発作を2例(100%)で認めた。しかし、①基底核型と④基底核小脳型はてんかん発作を認めなかった。合計ではLeigh症候群患者のうち50%にてんかん発作を認め、West症候群を30%, ミオクロニー発作を20%に認めた。

### 3. 長期の神経症状の変化とmtDNA変異率

T8993G変異をもつLeigh症候群の2例とA3243G変異を持つMELASの1例において、痙攣を含む長期の神経症状の変化とmtDNA変異率の変化を検討した。Leigh症候群、症例1の変異率は89.1%(8ヵ月), 89.1%(1歳), 89.0%(1歳4ヵ月), 89.2%(1歳9ヵ月)とほとんど変化せずに1歳9ヵ月過ぎに永眠している。症例2の変異率は84.9%(10ヵ月), 86.9%(1歳), 79.4%(1歳3ヵ月)と1歳で変異率が最

高になっているが、患児は1歳過ぎから徐々に発達が認められている。MELAS例においても臨床症状の緩解時には変異率が低下し、増悪とともに変異率が上昇する傾向が認められた。

## 考 案

本研究からMELASの痙攣の特徴に、①部分発作が主体、②嘔吐、視覚異常を伴う激しい頭痛発作が痙攣発作に先行、痙攣後も頭痛発作は数日から2週間遷延するなど、頭痛発作が痙攣発作に密接に関連、③頭痛発作と痙攣発作にみられる発作時脳波はいずれも徐波が主体をなしそれに棘波が重畳するパターン、④発作時の脳波異常の局在と頭部MRIの病変部位が一致する点などがある。これらからMELASの痙攣は脳卒中様発作に起因するものであり、神経細胞がてんかん原性を獲得して慢性的にてんかん性放電を発するてんかん発作とは異なると考えられた。一方、部分性持続性けいれん(EPC)は頭痛・嘔吐発作を伴わない点、EPCが卒中様発作をしばらく反復してから発現しているなど、MELASの他の痙攣と区別するべきかと思われた<sup>5)</sup>。

これまでの痙攣出現時脳波の検討では、周期性異常放電(PLEDs), 不規則性高振幅徐波、てんかん性異常波を呈した例が報告されている<sup>6,9)</sup>が、Fujimotoの報告<sup>9)</sup>は、O, P-O, C-P, pT-Oに多棘波を伴った高振幅δ波を認め、本報告と一致した。

痙攣発作の治療ではdiazepam, phenytoin

は有効でなくmidazolamが有効であった。MidazolamはGABA作動性ニューロンに作用するベンゾジアゼピン系薬剤であり、大脳皮質の興奮性を抑制し抗痙攣作用を有するが、血管拡張作用も報告されている<sup>10)</sup>。Koga<sup>11)</sup>により血管拡張作用を有するL-アルギニンの静注が卒中様発作の改善に有効であったと報告されている。MELASの痙攣発作の病態には血管障害が深く関わっていると推測される。

本研究で、Leigh症候群患者のうち50%にてんかん発作を認めた。そのうちWest症候群を30%、ミオクロニー発作を20%に認めた。Leigh症候群とてんかんと関連はWest症候群を含めて古くから指摘されている<sup>12, 13)</sup>。しかし、Leigh症候群の臨床経過は多彩であり、てんかん発作の特徴は十分に捉えられていない。今回、我々はLeigh症候群の亜型分類(案)<sup>14)</sup>を試み、その視点からてんかん発作を検討した。West症候群が大脳皮質基底核型と大脳皮質基底核脳幹型で認められ、いずれも大脳障害が著明群であった。ミオクロニー発作は基底核(-)小脳脳幹型で認めた。しかし、大脳の大きな障害を伴わない基底核型、基底核小脳型ではてんかん発作は認められなかった。このことから、Leigh症候群におけるてんかん発作型は、亜型と相関があることが明らかになった。DiMauro<sup>15)</sup>は幾つかのATPase遺伝子の変異が母系遺伝のLeigh症候群と乳児てんかんの合併に関連するが、早期発症のてんかんの多くは呼吸鎖のサブユニットを支配する核遺伝子欠損が関係すると指摘している。今後、遺伝子を中心とした成因と亜型分類との関係を明らかにしてゆくことでLeigh症候群におけるてんかんの病態がさらに明らかになると思われる。

血小板は骨髄で巨核細胞から分離し、核を持たず、1,2個のミトコンドリアを有する。血小板の寿命は数日間と短いことから血小板ミトコンドリアは、ミトコンドリア脳筋症の症状の変化を反映していると考えた。我々は血小板mtDNA変異率の増減を検討し、臨床症状の緩解、増悪とともに変異率が低下、上昇の傾向を見出した<sup>16)</sup>。症状の増悪は細胞機

能の低下を意味するが、このとき活性酸素が増加しmtDNAの変異率を増大させ、さらに増大したmtDNA変異により症状が悪化するというvicious circleが関与していると思われる。ミトコンドリア機能をさらに検討するため我々は血小板ミトコンドリアとミトコンドリアを保持しない細胞(Rho<sup>0</sup>)の融合細胞から核を有せずミトコンドリア機能をもった“ミトコンドリア細胞”の培養に成功した<sup>17)</sup>。今後、この細胞を用いてさらに検討してゆく予定である。

#### 参 考 文 献

- 1) 古賀靖敏. 小児期発症のミトコンドリア脳筋症にたいする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. 平成14年度 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 2003; 1-9
- 2) 中野和俊, 王 崇メイ, 武藤順子, 田良島美佳子, 白井紀久, 中山智博ら. ミトコンドリア脳筋症の治療-1999年-. 東京女子医科大学雑誌 2000; 70, Extra: E10-E15
- 3) 中野和俊, 斎藤加代子. Leigh症候群. 小児科診療 2001; 64, 110
- 4) 大津真優, 中野和俊, 前田由美, 武藤順子, 鶴見映子, 矢崎枝里子ら. 脳卒中様発作に対しmidazolamが奏効したMELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) の2例. 能と発達 2003; 35, 71-74
- 5) 松崎美保子, 中野和俊, 大澤真木子. MELASにおける脳卒中様発作と臨床. 小児科 2003; 44, 377-386
- 6) 逸見祥司, 舟川 格, 安田 雄, 寺尾 章. 脳卒中様発作の急性期にPLEDsを呈したMELASの1例. 脳と筋電図 1999; 27, 65-68
- 7) Funakawa I, Yasuda A, Terao A. Periodic lateralized epileptiform discharges in mitochondrial encephalomyopathy. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1997; 103, 370-375
- 8) Tulinius SH, Hagne I. EEG findings in children and adolescents with mitochondrial encephalomyopathies: a study of 25 cases. Brain Dev 1991; 13, 167-173

- 9) Fujimoto S, Mizuno S, Shibata H et al. Serial electroencephalographic findings in patients with MELAS. *Pediatr Neurol* 1999; 20, 43-48
- 10) Hayashi Y, Minamino N, Kanagawa K, Kuro M, Matsuo H. Effects of thiopental, ketamine, etomidate, propofol and midazolam on the production of adrenomedulline and endothelin-1 in vascular smooth muscle cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1999; 103, 325-331
- 11) Koga Y, Ishibashi M, Ueki I, Yatsuga S, Fukiyama R, Akita Y et al. Effects of L-arginine on acute phase of stroke in three patients with MELAS. *Neurology* 2002; 58, 827-828
- 12) Kamoshita S, Mizutani I, Fukuyama Y. Leigh's subacute necrotizing encephalomyelopathy in a child with infantile spasms and hypsarrhythmia. *Dev Med Child Neurol* 1970; 12, 430-5
- 13) Matsuishi T, Yoshino M, Tokunaga O, Katafuchi Y, Yamashita F. Subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh syndrome): Report of a case with Lennox-Gastaut syndrome. *Brain Dev* 1985; 7, 500-4
- 14) 田良島美佳子, 中野和俊, 佐々木香織, 中山智博, 松崎美保子, 矢崎枝里子ら. Leigh症候群の経過-頭部MRI画像を中心に-. *脳と発達* 2003; 35, S312
- 15) DiMauro S, Andreu AL, De Vivo DC. Mitochondrial disorders. *Journal of Child Neurology* 2002; 17, 3S35-47
- 16) 中山智博, 中野和俊, 田良島美佳子, 佐々木香織, 斎藤加代子, 大澤真木子ら. ミトコンドリアDNA点変異率の経時的検討. 第1回日本ミトコンドリア研究会年会要旨集 2001: 14
- 17) Nakano K, Ohsawa I, Yamagata K, Nakayama T, Sasaki K, Tarashima M, Saito K, Osawa M, Ohta S. Continuous Culture of Novel Mitochondrial Cells Lacking Nuclei. *Mitochondrion* 2003; 3, 21-27

## Summary

### Diagnosis and treatment of intractable epilepsy caused by mitochondrial encephalomyopathies: MELAS and Leigh syndrome

Kazutoshi NAKANO MD, Tomohiro NAKAYAMA MD, Kaori SASAKI MD, Mihoko MATSUZAKI MD, Mikako TARASHIMA MD, Mayu OHTSU MD, Hirokazu OGUNI MD, Makiko OSAWA MD

To elucidate the mechanisms underlying intractable convulsions with mitochondrial encephalomyopathy, we studied 8 cases with MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) and 10 cases with Leigh syndrome. We also evaluated serial changes in the mutation rate of platelet mitochondrial DNA (mtDNA) by the PCR-RFLP method in one MELAS case and two Leigh syndrome cases. As most convulsions in MELAS are attributable to stroke-like attacks, differentiation from epileptic seizures is necessary. EPC (epilepsia partialis continua) can be distinguished from convulsions associated with MELAS, based on not being accompanied by headache or vomiting and because EPC occur after repeated stroke-like episodes. We found definite differences among epileptic seizure types according to the Leigh syndrome sub-group, which we first attempted to classify using serial brain MRI studies. West syndrome was recognized in groups with prominent cerebral lesions. Myoclonic seizures were recognized in the group with prominent cerebellar and brain stem lesions. Fluctuation of neurological symptoms, including convulsions, was related to changes in the mtDNA mutation rate.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found.2003;15:49-56

＝ 症 例 報 告 ＝

乳児期発症筋型極長鎖アシル CoA 脱水素酵素  
欠損症の 1 例

伊藤 康<sup>1</sup> 中野 和俊<sup>1</sup> 宍倉 啓子<sup>1</sup> 鈴木 暘子<sup>1</sup> 飯田 典久<sup>2</sup>  
佐々木伸孝<sup>2</sup> 木村 正彦<sup>3</sup> 長谷川有紀<sup>3</sup> 山口 清次<sup>3</sup> 大澤真木子<sup>1</sup>

**要旨** 我々は乳児期に発症し、幼児早期に診断しえた筋型（成人型）極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症の女児例を経験したので報告する。症例は発熱および頸部筋緊張持続に伴い頸部有痛性筋硬直と高 CK 血症を反復し、2 歳 3 カ月時に精査入院となった。非発作時は軽度の筋緊張低下を認めたが、他に神経学的異常を認めなかった。頸部筋緊張持続による症状の発現、飢餓負荷でのジカルボン酸尿出現などから脂肪酸代謝異常を疑った。血液濾紙遊離脂肪酸分析とアシルカルニチン分析および培養皮膚線維芽細胞のアシル CoA 脱水素酵素活性測定を行い、VLCAD 欠損症と確定診断した。VLCAD 欠損症は、従来、重症、軽症小児型、成人型の 3 病型に分類されてきたが、本症例と文献的考察から全身型、筋型とする分類を提案した。

**見出し語** 筋型極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）欠損症、乳児期発症、発熱、高 CK 血症、有痛性筋硬直

はじめに

ミトコンドリア β 酸化系は酸素が豊富な条件下で脂肪酸を酸化しエネルギーを供給する主経路である。β 酸化異常症では、感染症・発熱、運動、飢餓によりエネルギー需要が増した時に、エネルギー供給不全状態となり、脳、骨格筋、心筋、肝、腎障害などが生じ、低血糖、時には急性脳症、Reye 症候群、乳幼児突然死症候群（SIDS）様の臨床像を呈することが知られている<sup>1)2)</sup>。

極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase: VLCAD）は、パルミトイル

CoA（炭素数：C16）に最大活性を持ち、β 酸化の最初のステップであるアシル CoA からエノイル CoA への酸化を触媒し<sup>3)</sup>、遺伝子座は 17p11.2-p11.13105 に位置する<sup>4)</sup>。VLCAD 欠損症は常染色体劣性遺伝であり、本邦では本症例を含め 10 例が同定されているのみで（私信）、周知された疾患とは言えない<sup>5)</sup>。従来、VLCAD 欠損症は、発症時期、症状により重症小児型、軽症小児型、成人型の 3 病型に分類されてきた<sup>6)</sup>。

今回我々は乳児期発症の筋型（従来の成人型）VLCAD 欠損症を経験した。今後本疾患を早期に診断、治療する上で、本症例の臨床像は非常に重要と思われる。さらに VLCAD 欠損症の病型分類についての文献的再考を行った。

I 症 例

**症 例** 2 歳 3 カ月、女児。  
**主 訴** 反復性の頸部有痛性筋硬直と高 CK 血症。  
**家族歴** 両親はいとこ婚で両祖父が兄弟である。両親は健康。妹（当時 0 歳 5 カ月）も 2 歳時に発熱

<sup>1</sup> 東京女子医科大学医学部小児科  
<sup>2</sup> 厚生連尾道総合病院小児科  
<sup>3</sup> 島根医科大学小児科  
連絡先 〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1  
東京女子医科大学小児科（中野和俊）  
E-mail: knakano@ped.twmu.ac.jp  
(受付日: 2002. 10. 21, 受理日: 2003. 4. 8)

時の高CK血症に気付かれ、その後反復した。流産歴はない。母方祖母の妹が2歳時に亡くなっているが詳細は不明。その他に神経筋疾患はない。

既往歴 妊娠経過は異常なく、胎動は強かった。在胎41週5日、3,100g、49.2cm、自然分娩にて出生。仮死は認めず、哺乳および啼泣力微弱はなかった。あやし笑い2カ月、定頸3～4カ月、寝返り5～6カ月、独坐7カ月、四つ這い7～8カ月、伝い歩き9カ月、始歩、始語11カ月、二語文2歳前と発達は正常であった。扁桃炎による発熱を繰り返した。

現病歴 生後8カ月時、頭部を下垂したままの四つ這いと後頭部の硬直に気付かれたが、20分位で軽快した。9カ月時、40℃台の高熱が持続し、第3病日近医に入院。AST 866 IU/l、ALT 157 IU/l、CK 19,000 IU/lと異常高値を認めたため、翌日尾道総合病院へ転院。筋力低下は認めず、輸液のみの経過観察で第11病日にはCK 122 IU/lまで改善した。1歳0カ月時、頭部を前屈したまま痛みを訴えたが、症状はすぐ消失した。1歳1カ月時、発熱2日目に足元の本を取り出していた際、頭部を前屈したまま後頭部が硬直していた。臥床により軽快したが、当日は同様の現象が繰り返された。その後筋症状は認められなかったが、第3病日CK 6,162 IU/lと高値であったため入院。頸部MRIおよび筋CTでは異常を認めなかった。その後半年間感冒には罹患したが、高熱、筋症状は出現せず、検査も行われなかった。1歳7カ月時、高熱2日目にCK 1,219 IU/l、乳酸30 mg/dl、ピルビン酸2.29 mg/dlであった。1歳10カ月時、再び高熱3日目にCKは89 IU/lであったが、その後頭部前屈位、後頭部硬直状態となり、手足の疼痛も訴えた。第4病日に定頸不安定となり、頸部痛訴えるため再診。CK 37,790 IU/l、CRP 12.6 mg/dlのため入院。第5病日CK 40,680 IU/l、乳酸11.7 mg/dl、ピルビン酸1.01 mg/dl。髄液乳酸10.9 mg/dl、ピルビン酸1.07 mg/dl。頭部MRI、脳波は異常なし。なかなか歩こうとせず、定頸不安定の持続期間も長かった。2歳1カ月時、高熱に伴い高CK血症出現し、第4病日に入院。顔を下に向けアイスクリームを食べていると頭部を前屈させたまま頭部硬直状態となり、頸部痛を訴えた。硬直状態は1分間持続し、臥位にすると軽快した。定頸不安定は5日間続いたが、頸部以外には筋症状を認めなかった。

これまでの高CK血症時には低血糖の既往はない。2歳3カ月時、精査目的に当科紹介入院となった。

入院時現症 体重11.8kg、身長85.4cm、頭囲47.5cmと年齢相当であった。顔貌は丸顔、上眼瞼下垂様、上向きの鼻孔、テント状上口唇であった。頭頸部、胸腹部は異常なし。深部腱反射は正常。Babinski反射陰性。手首window徴候、scarf徴候、反張膝など軽度の筋緊張低下を認めたが、筋力低下はなかった。その他の神経学的異常所見も認めなかった。

入院時検査所見 血液検査は早朝空腹時に行われた。血液一般、生化学異常なし。CK 66 IU/lを含め、その他の筋原性酵素も安静、平熱時には正常範囲内であった。血糖、NH<sub>3</sub>、尿酸、乳酸、ピルビン酸、総ケトン等の代謝産物、電解質異常なし。内分泌系、血液ガス分析異常なし。非発作時の血清カルニチンは、遊離カルニチン28.5 μmoles/l (-1.0 SD)、総カルニチン33.9 μmoles/l (-1.2 SD)、アシル/遊離比0.19 (+0.1 SD)であり、遊離カルニチンがやや低下していた。胸部X線、筋CT、腹部エコー、心電図、脳波、運動神経伝導速度は異常なし。津守稲毛式精神発達検査では発達年齢3歳4カ月(発達指数148)であったが、運動、操作・探索面では1歳9カ月相当であった。

飢餓負荷試験 絶食19時間後の血糖値は73 mg/dlであったが、患児のストレスが強く、またケトシス(尿ケトン3+)を認めたため検査を終了。CK、NH<sub>3</sub>、乳酸値の上昇は認めず、血漿アミノ酸分析も異常なし。絶食18時間後の尿中アミノ酸・有機酸分析では、軽度の乳酸増加、ケトン体およびジカルボン酸[C6 (+8 SD), 8, 10 (+15 SD)]の軽度排泄増加を認めた。

筋生検所見 左大腿直筋にて開放筋生検を行った。

(1) 組織化学所見: HE染色では中心核を軽度認めたが、大小不同、壊死再生、結合織・脂肪浸潤、炎症性細胞浸潤はなかった。PAS染色、オイルレッドO染色ではグリコーゲン、脂肪滴の蓄積を認めなかった。Acid phosphatase染色、phosphorylase染色も異常なかった。ATPase染色では選択的筋線維萎縮はなく、タイプ2c線維の軽度増加を認めた。Gomoriトリクローム染色ではミトコンドリアが軽度増加していたが、ragged-red fiberはなかった。NADH-TR染色でも筋鞘膜下に軽度活性増強を認め、

ミトコンドリアの増加が示唆された。CCO 活性は正常であった。

(2) 電子顕微鏡所見 (図1): 筋原線維の微細構造は概ね良く保たれ、脂肪滴、グリコーゲンの増加は



図1 電子顕微鏡所見

- a) 筋原線維間のミトコンドリアクリステの残存 (⇔) と思われる構造と、ミエロイド小体 (→) を示す。また ▶ のように薄い膜が認められ、一部は二層構造と思われたが、破壊されたミトコンドリア由来であると確定することは困難であった。この膜の内部にも少量のグリコーゲン顆粒が存在した。周辺のミトコンドリア (⇨) は正常である。(× 31,500)
- b) 筋鞘膜下のミエロイド小体 (→) を示す。この部分にはミトコンドリアクリステを示唆する所見は見られないが、a) と同様に周囲に膜構造 (▶) が認められる。(× 42,000)

なかった。しかし一部の筋原線維間あるいは筋鞘膜下に電子密度の高い膜様構造物(ミエロイド小体)を認め、近接した部分にミトコンドリアクリステと思われるひだ様構造物が見られた。この部分においてミトコンドリアが破壊され正常な構造を失ったことが示唆された。

血液濾紙遊離脂肪酸分析(表1) 2歳9カ月(軽度下肢痛を認めた発熱第2病日)、および3歳3カ月(非発作時)に行われ、C14:1(5-tetradecenoate)の増加を認めた。

血液濾紙アシルカルニチン分析 低アセチルカルニチン、C14:1のアシルカルニチンの増加を認めた。

アシル-CoA脱水素酵素活性測定(表2) 3歳3カ月時、培養皮膚線維芽細胞を用いて、酵素活性が測定された。オクタノイル CoA (C8)を基質とした脱水素酵素活性は正常であったが、パルミトイル CoA (C16)に対する酵素活性は低下していた。C16/C8比も対照に比べ低下しており、VLCAD欠損症のパターンを示した。

表1 血液濾紙採血による遊離脂肪酸分析(島根医科大学小児科)

	C8	C10	C10:1	C14:1
症例(2歳9カ月)	12.6	7.3	nd	12.0
症例(3歳3カ月)	7.3	7.1	0	5.2
コントロール	2.3-8.7	2.8-7.1	nd	nd

uM/L blood spot

C8; octanoate, C10; decanoate, C10:1; 4-decenoate, C14:1; 5-tetradecenoate

II 考 察

本症例は発熱や頸部の持続的な筋緊張(長時間の運動負荷?)による症状の発現、血清カルニチンの軽度低下、絶食時のジカルボン酸尿症、電顕所見のミトコンドリア障害の可能性、家族歴より常染色体劣性遺伝の脂肪酸代謝異常症を鑑別にあげた。血液濾紙遊離脂肪酸分析、アシルカルニチン分析より VLCAD 欠損症を疑い、培養皮膚線維芽細胞を用いたアシル CoA 脱水素酵素活性測定により VLCAD 欠損症と確定診断した。

ミトコンドリアβ酸化の最初のステップであるアシル CoA からエノイル CoA への酸化を触媒するアシル CoA 脱水素酵素には炭素鎖長により基質特異性の異なる4種類の酵素(極長鎖, 長鎖, 中鎖および短鎖)があり、作用範囲は部分的に重複している。パルミトイル CoA (C16)に最大活性をもち、炭素数14~22に特異性をもつ極長鎖アシル CoA 脱水素酵素(VLCAD)が1992年発見され、長鎖脂肪酸

表2 培養皮膚線維芽細胞のアシル-CoA脱水素酵素活性測定(島根医科大学小児科)

基質 (アシル-CoA)	CS	C4	C8	C16	C16/C8
コントロール1	94.5	2.36	4.63	2.41	0.52
コントロール2	71.2	1.68	4.08	2.41	0.59
症例	76.5	2.21	5.13	1.49	0.29

nmol/min/mg protein

CS; citrate synthetase, C4; butyryl-CoA, C8; octanoyl-CoA, C16; palmitoyl-CoA

表3 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症の病型分類と臨床症候<sup>6)</sup>

Andresen の分類	重症小児型	軽症小児型	成人型
発症時期	早期新生児~乳児期	乳児~幼児期	思春期以降
臨床症候	高い死亡率 若年死の家族歴 肝障害 心筋障害(多い) 代謝代償不全  骨格筋障害 筋緊張低下	低い死亡率  肝障害 心筋障害(まれ) 代謝代償不全 低ケトン性低血糖 骨格筋障害 筋緊張低下 横紋筋融解(まれ)	心筋障害(まれ)   低血糖発作(なし) 骨格筋障害 筋緊張低下(まれ) 横紋筋融解 筋痛
分類	全身型?		筋型

表4 筋型極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症の臨床症候<sup>6)11)~18)</sup>

・小児期以降発症（多くは思春期以降）
・運動、飢餓、感染（発熱）、情動ストレスにより誘発
・限局した筋障害分布
・筋痛、有痛性筋硬直、筋力低下、高CK血症、ミオグロビン尿症、筋緊張低下、疲労、全身倦怠
・低血糖発作ない、飢餓負荷にて血糖低下はないが、ケトン体は低形成
・筋病理組織所見；軽度の非特異的形態変化～無変化
光顕像：筋線維（ほとんどがタイプI線維）細胞質内脂肪滴
電顕像：サルコメア構造の異常を伴わない、細胞質内中性脂肪蓄積
正常なミトコンドリアの筋鞘膜下蓄積（極一部）

（炭素数14～20）の $\beta$ 酸化にはむしろ VLCAD が重要と考えられた<sup>3)</sup>。翌1993年には本酵素の欠損症が3つのグループから報告された<sup>8)~10)</sup>。Andresen (1999年)らの報告では50例以上が<sup>6)</sup>、本邦でも本症例を含め10例が同定されている（私信）<sup>3)</sup>。遺伝形式は常染色体劣性遺伝とされ、臨床的には発症年齢、重症度より、従来重症小児型、軽症小児型、成人型の3病型に分類されてきた（表3）<sup>6)</sup>。

成人型は筋障害を主徴とし、その発症年齢は学童期<sup>11)~13)</sup>や幼児早期（診断は思春期）<sup>14)</sup>も含まれ、必ずしも成人に限らない。これらの点から成人型は、筋型とする方がより適当と思われる。筋型 VLCAD 欠損症の臨床症候を表4に示した<sup>6)11)~18)</sup>。本症例の如く、骨格筋障害を主徴とする筋型 VLCAD 欠損症で乳児期発症および幼児早期診断の報告例は検索の範囲ではないが、今後の筋型 VLCAD 欠損症の症例蓄積により増えてくるとと思われる。筋型 VLCAD 欠損症における筋障害の分布は限局性であるが<sup>6)</sup>、本症例では頸部で症状を反復した。硬直による前屈位ではなく、頸部痛による背屈制限と考えた。その理由は不明であるが、四つ這い姿勢や頭の重さなど乳幼児期の特性に関連している可能性がある。また本症例のように非～低ケトン性低血糖症や非ケトン性ジカルボン酸尿症の臨床像を必ずしも呈しないことにも留意すべきである。

乳幼児期における小児型 VLCAD 欠損症の報告例では、生後2日に心肺停止を経験し、その後 Reye 様症候を反復したが、心筋障害もなく、幼児期以降は食事療法にて経過の良い症例<sup>19)</sup>や、歯科治療を受け突然死した幼児期発症例<sup>20)</sup>もあり、重症小児型、

軽症小児型は厳密には区別をつけ難い。重症小児型と軽症小児型はどちらもいわゆる全身型と分類するのが妥当と思われた。全身型は初発症状の軽重にかかわらず Reye 様症候群や乳児突然死症候群（SIDS）に注意を要する危険度の高い病型と言えよう。

VLCAD 患者からの培養細胞を用いた研究では、C16の長鎖脂肪酸を基質とした時、重症型ではC14、C16、軽症型ではより短いC12のアシルカルニチンが主に蓄積していたことが報告されている<sup>21)</sup>。全身型における症状の軽重は、蓄積するアシル CoA の炭素鎖長の差異、あるいは作用範囲が重複している長鎖アシル CoA 脱水素酵素（LCAD）活性の個人差と関連している可能性が考えられる。

筋型と全身型 VLCAD 欠損症の臨床症候からの独立性に関して、文献検索した筋型 VLCAD<sup>6)11)~18)</sup>においては、その後の経過観察で全身型に移行したという記載はなかった。また、家族歴で全身型 VLCAD 欠損症を示唆する報告はなかった。以上より、臨床症候からは他の $\beta$ 酸化異常症と同様、筋型と全身型は区別可能と考えた。本症例においても妹が発熱時に高CK血症（最大37,080 IU/l）を反復し、同疾患と考えられるが（有痛性筋硬直は認めず）、低血糖、心筋・肝機能障害などの全身型症状は見られていない。しかし、本症例も含めて経過観察の中で筋型から全身型への移行がないことを確認しなくてはならない。

Andresen は VLCAD 欠損症での遺伝子変異のスペクトルは多様であると述べている<sup>6)</sup>。重症小児型は酵素が生成されない変異（ヌルアレル）を、軽症小児型・成人型は酵素活性が残存する変異を持つとし、遺伝型-表現型の関係は明白であるとした。確かに重症型はヌルアレル対を持つ割合が高いが成人型には見られないことから、ヌルアレル対の有無は重症（全身型）と成人型（筋型）の区分を可能にすると思われる。しかし、軽症型にもヌルアレル対は認められることから、ヌルアレル対からは全身型を明確に重症型と軽症型に区分できない。むしろヌルアレル対の存在は全身型と筋型を区分する遺伝型を示唆する。一方、Pons らの報告した軽症小児型と筋型で、アレル対の変異のパターンが同一の症例もあり<sup>19)</sup>、VLCAD 欠損症における遺伝型-表現型の相互関係はさらに解明を進める必要がある。その際、VLCAD 遺伝子の発現に組織特異性の観点からの検討も必要



と思われる。

なお、本論文の要旨は第44回日本小児神経学会総会(平成14年6月27日、仙台)で報告した。

血液濾紙アシルカルニチン分析を施行していただいた京都府立医科大学小児科寺田直人先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 杉山成司, 和田義郎. 脂肪酸代謝異常. 杉田秀夫, 小澤鏑二郎, 埜中征哉, 編. 新筋肉病学. 東京: 南江堂, 1995:700-17.
- 2) 伊賀三佐子, 木村正彦, 山口清次. 乳幼児の突然死と先天代謝異常症. 小児科 1999;40:1743-51.
- 3) Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S, Hashimoto T. Novel fatty acid  $\beta$ -oxidation in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 1992;267:1027-33.
- 4) Andresen BS, Bross P, Vianey-Saban C, et al. Cloning and characterization of human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase cDNA, chromosomal assignment of the gene and identification in four patients of nine different mutations within the VLCAD gene. *Hum Mol Genet* 1996;5:461-72.
- 5) 山口清次. ミトコンドリアアシル-CoA 脱水素酵素欠損症(極長鎖, 長鎖, 中鎖, 短鎖). 先天異常症候群辞典(上巻). 別冊日本臨牀. 領域別症候群シリーズ No.33. 大阪: 日本臨牀社, 2001:144-7.
- 6) Andresen BS, Olpin S, Poorthuis BJ, et al. Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Am J Hum Genet* 1999;64:479-94.
- 7) Hashimoto T. Peroxisomal and mitochondrial enzymes. In: Coates PM, Tanaka K, eds. *New developments in fatty acid oxidation*. New York: Wiley-Liss, 1992:19-32.
- 8) Bertrand C, Largilliere C, Zobot MT, Mathieu M, Vianey-Saban C. Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid oxidation in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1993;1180:327-9.
- 9) Aoyama T, Uchida Y, Kelley RI, et al. A novel disease with deficiency of mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:1369-72.
- 10) Yamaguchi S, Indo Y, Coates PM, Hashimoto T, Tanaka K. Identification of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in three patients previously diagnosed with long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 1993;34:111-3.
- 11) Fukao T, Watanabe H, Orii K, et al. Myopathic form of very-long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: evidence for temperature-sensitive mild mutations in both mutant alleles in a Japanese girl. *Pediatr Res* 2001;49:227-31.
- 12) Minetti C, Garavaglia B, Bado M, et al. Very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in a child with recurrent myoglobinuria. *Neuromuscul Disord* 1998;8:3-6.
- 13) Straussberg R, Harel L, Varsano I, Elpeleg ON, Shamir R, Amir J. Recurrent myoglobinuria as a presenting manifestation of very long chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatrics* 1997;9:894-6.
- 14) Merinero B, Pascual Pascual SI, Perez-Cerda C, et al. Adolescent myopathic presentation in two sisters with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1999;22:802-10.
- 15) Pons R, Cavadini P, Baratta S, et al. Clinical and molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatr Neurol* 2000;22:98-105.
- 16) Scholte HR, Van Coster RNA, de Jonge PC, et al. Myopathy in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical and biochemical differences with the fatal cardiac phenotype. *Neuromuscul Disord* 1999;9:313-9.
- 17) Smelt AH, Poorthuis BJ, Onkenhout W, et al. Very long chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency with adult onset. *Ann Neurol* 1998;43:540-4.
- 18) Ogilvie I, Pourfarzam M, Jackson S, Stockdale C, Bartlett K, Turnbull DM. Very long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency presenting with exercise-induced myoglobinuria. *Neurology* 1994;44:467-73.
- 19) Merinero B, Perez-Cerda C, Garcia MJ, et al. Mitochondrial very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency with a mild clinical course. *J Inherit Metab Dis* 1996;19:173-6.
- 20) Roe CR, Wiltse HE, Sweetman L, Alvarado LL. Death caused by perioperative fasting and sedation in a child with unrecognized very long chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* 2000;136:397-9.
- 21) Vianey-Saban C, Divry P, Brivet M, et al. Mitochondrial very-long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta* 1998;269:43-62.

## A Two-Year-Old Infant with a Myopathic Form of Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency

Yasushi Ito, MD, Kazutoshi Nakano, MD, Keiko Shishikura, MD, Haruko Suzuki, MD,  
Nori-hisa Iida, MD, Nobutaka Sasaki, MD, Masahiko Kimura, Yuki Hasegawa, MD,  
Seiji Yamaguchi, MD and Makiko Osawa, MD

*Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, Tokyo (YI, KN, KS, HS, MO);*

*Department of Pediatrics, Hiroshima-ken Kouseiren Onomichi General Hospital, Hiroshima (NI, NS);*

*Department of Pediatrics, Shimane Medical University, Izumo, Shimane (MK, YH, SY)*

A two-year-three-month old girl was hospitalized for detailed examination following repeated hyper-creatine kinasemia and cervical muscle cramps induced by pyrexia and persistent hypertonicity of the cervical muscles. Physical examination showed mild hypotonia but no muscle weakness. Induction of symptoms by continuous cervical muscular exercise and the appearance of dicarboxylic aciduria during the fasting test indicated a disorder of fatty acid oxidation. Free fatty acid and acyl carnitine analyses using dried blood spots, and acyl-CoA dehydrogenase activity assays using cultured skin fibroblasts established a diagnosis of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency. Currently VLCAD deficiency has been divided into three phenotypes; a severe childhood form, a milder childhood form, and an adult form. However, we suggest that the severe and milder childhood forms would be better described as a systemic form, and the adult form and our infant case as a myopathic form. An early onset of the myopathic form within the first year of life, as well as its diagnosis in early infancy, has never been described in the literature.

*No To Hattatsu 2003;35:491-7*

### ＝ 訂 正 ＝

本誌 2003;35:406-10 に掲載されました岩崎俊之、三浦寿男、砂押 渉、細田のぞみ、武井研二、片山文彦。「Clobazam の投与により笑い発作が誘発された難治てんかんの 1 例」中の図の一部に校正ミスがありました。訂正箇所をここに記し、お詫びいたします。

図 1 頭部 MRI (TIWI TR/TE = 600/12)

- (誤) 側脳室体部断面 (a) では、前頭葉と側頭葉がわずかに残存する。  
橋延髄移行部 (b) では、脳幹部は保たれている。
- (正) 橋延髄移行部 (a) では、脳幹部は保たれている。  
側脳室体部断面 (b) では、前頭葉と側頭葉がわずかに残存する。

岩崎俊之

## Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species\*<sup>§</sup>

Received for publication, September 10, 2002, and in revised form, October 28, 2002  
Published, JBC Papers in Press, November 4, 2002, DOI 10.1074/jbc.M209264200

Ken-ichi Setsukinai<sup>‡</sup>, Yasuteru Urano<sup>‡</sup>, Katsuko Kakinuma<sup>§</sup>, Hideyuki J. Majima<sup>¶</sup>,  
and Tetsuo Nagano<sup>‡</sup>||

From the <sup>‡</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan, the <sup>§</sup>Biophotonics Research Project/MMBS, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Misaki, Miura, Kanagawa 238-0225, Japan, and the <sup>¶</sup>Kagoshima University Dental School, Sakuragaoka, Kagoshima, Kagoshima 890-8544, Japan

We designed and synthesized 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (HPF) and 2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (APF) as novel fluorescence probes to detect selectively highly reactive oxygen species (hROS) such as hydroxyl radical (<sup>•</sup>OH) and reactive intermediates of peroxidase. Although HPF and APF themselves scarcely fluoresced, APF selectively and dose-dependently afforded a strongly fluorescent compound, fluorescein, upon reaction with hROS and hypochlorite (<sup>-</sup>OCl), but not other reactive oxygen species (ROS). HPF similarly afforded fluorescein upon reaction with hROS only. Therefore, not only can hROS be differentiated from hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitric oxide (NO), and superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) by using HPF or APF alone, but <sup>-</sup>OCl can also be specifically detected by using HPF and APF together. Furthermore, we applied HPF and APF to living cells and found that HPF and APF were resistant to light-induced autoxidation, unlike 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, and for the first time we could visualize <sup>-</sup>OCl generated in stimulated neutrophils. HPF and APF should be useful as tools to study the roles of hROS and <sup>-</sup>OCl in many biological and chemical applications.

Reactive oxygen species (ROS)<sup>1</sup> play key roles in many pathogenic processes, including carcinogenesis (1), inflammation (2), ischemia-reperfusion injury (3), and signal transduction (4–7). Several methods, including electron spin resonance (8) and chemiluminescence (9), have been developed to detect ROS, but fluorescence detection is superior in terms of high

sensitivity and experimental convenience. Experimental studies on Ca<sup>2+</sup>-dependent signal transduction in cells were greatly facilitated by the development of fluorescent indicators for cytosolic Ca<sup>2+</sup> (10, 11). Several fluorescence probes to detect ROS, such as 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and dihydrorhodamine 123, have also been developed. However, as Hempel and co-workers (12) pointed out, DCFH and dihydrorhodamine 123 can react with various ROS and oxidizing species (superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitric oxide (NO), ferrous ion, and others), and in addition, DCFH is easily autoxidized, resulting in a spontaneous increase in fluorescence upon exposure to light. Therefore, it is not appropriate to think of these probes as detecting a specific oxidizing species in cells, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or NO, but rather they should be considered as detecting a broad range of oxidizing reactions that may be increased during intracellular oxidative stress (12).

There are many species of ROS, as mentioned above, but they tend to be considered collectively as "oxidative stress" when their effects in living cells are discussed. However, we believe that each species of ROS is likely to have a specific role in living cells. There is some evidence for this view. For example, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human and mice (13), p38 mitogen-activated protein kinase mediates caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) but not by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (14), and hydroxyl radical (<sup>•</sup>OH) plays an important role as a second messenger in T cell activation (15). In addition, each species of ROS has a characteristic chemical reactivity; for example, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> reacts with anthracenes to yield endoperoxides in the Diels-Alder mode (16), whereas <sup>•</sup>OH can react directly with aromatic rings to yield hydroxylated products (17), and NO reacts with guanine to yield the deaminated compound (18). However, because of the problems, *i.e.* lack of selectivity among species and autoxidation (12, 19–20), the roles of an individual species of ROS in living cells remain uncertain. Therefore, we believe that it is very important to be able to detect each species of ROS selectively. If novel fluorescence probes that overcome the above problems were available, they would contribute greatly to the elucidation of the roles of individual ROS in living cells, because we would be able to "see" the generation of specific ROS with high resolution in time and space.

It is known that <sup>•</sup>OH participates in various biological processes. For example, HeLa, MW451, and HL-60 cells are induced to undergo apoptosis by <sup>•</sup>OH (21). <sup>•</sup>OH can damage DNA bases (1) and mediates redox alteration of cell-membrane Ca<sup>2+</sup> channels (22). However, because of the lack of effective direct detection methods for <sup>•</sup>OH, its participation in these events has been established only indirectly by using inhibitors such as dithioethanol, glutathione, and desferrioxamine (1, 15, 21, 22).

\* This work was supported by Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan Research Grants 11794026, 12470475, 12557217 (to T. N.), 10771238 and 12771349 (to Y. U.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>§</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains text and additional references.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-3-5841-4850; Fax: 81-3-5841-4855; E-mail: [tlong@mol.f.u-tokyo.ac.jp](mailto:tlong@mol.f.u-tokyo.ac.jp).

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ROS, reactive oxygen species; DCFH, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein; HPF, 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid; APF, 2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid; HRP, horseradish peroxidase; PMA, 4 $\beta$ -phorbol-12-myristate-13-acetate; DCFH-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Amplex Red, 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine; HPPA, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid; MPO, myeloperoxidase; DMF, *N,N*-dimethylformamide; HLE, human hepatocellular carcinoma cell line; CCD, charge coupled device; hROS, highly reactive oxygen species; ROO<sup>•</sup>, alkylperoxyl radical; NO, nitric oxide; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide radical.

Therefore, we wished to develop novel fluorescence probes for highly reactive oxygen species (hROS). Here, we use the term hROS to indicate reactive oxygen species with strong oxidizing power sufficient to directly hydroxylate aromatic rings (for example,  $\cdot\text{OH}$  or reactive intermediates of peroxidase).

We report herein the development of novel fluorescence probes for ROS, 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (HPF) and 2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (APF), which can specifically detect certain species of ROS in terms of an increase of fluorescence and exhibit complete resistance to autoxidation both *in vitro* and *in vivo*. We also describe the visualization of hypochlorite ( $\text{OCl}^-$ ) in stimulated neutrophils.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—4-Fluoronitrobenzene, 4-iodophenol, isobutene, 2,2,2-trifluoroethanol, and trifluoromethanesulfonic acid were purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Uranine (sodium fluorescein), cuprous chloride, 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride, horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7), polyvinylpyrrolidone, and 4 $\beta$ -phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) were purchased from Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd. (Osaka, Japan). Fluorescein was purchased from Aldrich. DCFH-DA and 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red) were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid (HPPA) was purchased from Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). Myeloperoxidase (MPO, EC 1.11.1.7) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Pyridine, dichloromethane, dimethyl sulfoxide ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), and methanol were used after distillation. Other materials were of the best grade available and used without further purification.

**Instruments**— $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-LA300 instrument at 300 MHz. Mass spectra were determined with a JEOL JMS-SX102A mass spectrometer. Fluorescence spectroscopic studies were performed on a Hitachi F4500.

**Fluorometric Analysis**—The slit width was 2.5 nm for both excitation and emission. The photomultiplier voltage was 950 V. HPF, APF, and DCFH-DA were dissolved in DMF to obtain 10 mM stock solutions. We obtained DCFH by hydrolyzing DCFH-DA with 0.01 M aqueous NaOH for 30 min at 37 °C in the dark (12).

**Cell Lines**—A human hepatocellular carcinoma cell line (HLE) was purchased from the Health Science Research Resources Bank of Japan Health Sciences Foundation (Osaka, Japan). PCR3.1-Uni plasmid (Invitrogen) containing a sense human manganese-superoxide dismutase cDNA insert was a kind gift of Dr. Makoto Akashi (National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan). The HLE cell line was transfected using the GenePORTER transfection procedure (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) according to the previous report by Motoori and co-workers (23). Manganese-superoxide dismutase-transfected HLE cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS) and 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Genetecin at 37 °C in humidified air containing 5%  $\text{CO}_2$ . Genetecin was removed at least 24 h before the experiments were performed.

**Light-induced Autoxidation**—Manganese-superoxide dismutase-transfected HLE cells were seeded 1 day before dye loading onto a glass-bottomed dish. The cells were then rinsed with modified Hanks' balanced salt solution containing 10.0 mM HEPES, 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 2.7 mM glucose adjusted to pH 7.3  $\pm$  0.05. Then, the cells were loaded with HPF or DCFH-DA (10  $\mu\text{M}$ ) by incubation for 30 min at 37 °C in the dark. Fluorescence images were acquired using a CSU-10 confocal laser scanning unit (Yokogawa Electric Co., Tokyo, Japan) coupled to an IX90 inverted microscope with an UPlanAPO  $\times$ 20 objective lens (Olympus Optical Co.) and a C5810-01 color chilled 3CCD camera (Hamamatsu Photonics K. K.). The excitation wavelength was 488 nm, and the emission was filtered using a 515-nm barrier filter. After loading the dyes, the fluorescence images were acquired. After that, the cells were laser-irradiated at 488 nm for 10 s, and then the fluorescence images were acquired again. The laser power, the exposure time of the 3CCD camera (for acquiring the fluorescence images), and the gain of the amplifier were held at 500  $\mu\text{W}$ , 1 s, and 18 decibels, respectively, to allow quantitative comparisons of the relative fluorescence intensity of the cells between groups.

**Preparation of Porcine Neutrophils**—Neutrophils were obtained from 1.8 liters of porcine blood basically according to the method of Wakeyama and co-workers (24) with some modifications (25). Erythrocytes in the buffy coat collected from blood were hemolyzed with a large volume of ice-cold 0.2% NaCl solution for 30 s, and then the preparation

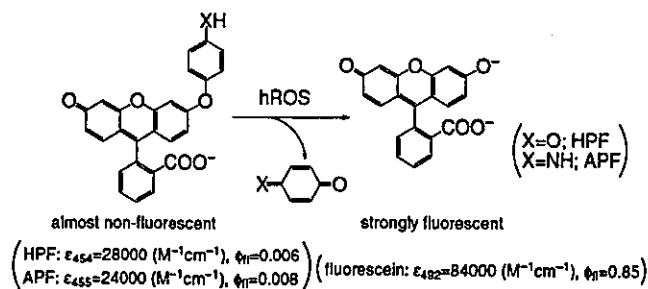


FIG. 1. Scheme of O-dearylation reaction of HPF and APF with hROS.  $\epsilon$  is the molar absorptivity, and  $\phi_f$  is the relative quantum efficiency of fluorescence.

was promptly mixed with an equal volume of ice-cold 1.6% NaCl solution to restore the isotonic condition. Neutrophils were separated from platelets and mononuclear cells by the Conray-Ficoll method described previously (26). The neutrophils were suspended in Krebs-Ringer phosphate buffer (114 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 2.4 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4) and kept on ice until use.

**Bioimaging of Neutrophils**—Separated porcine neutrophils were seeded onto a glass-bottomed dish. Then, the cells were loaded with HPF or APF (10  $\mu\text{M}$ ) by incubation for 30 min at room temperature. Dye-loaded neutrophils were stimulated with PMA (2 ng/ml; 0.1% DMF was contained as a cosolvent). Fluorescence images were acquired twice in each experiment (before and 10 min after the stimulation with PMA) using an LSM510 confocal laser scanning unit (Carl Zeiss Co., Ltd.) coupled to an Axiocvert 100M inverted microscope with a Plan-Neofluar  $\times$ 100/1.3 objective lens (Carl Zeiss Co., Ltd.). The excitation wavelength was 488 nm, and the emission was filtered using a 505–550 nm barrier filter.

#### RESULTS

**Design and Synthesis of HPF and APF**—We reported previously that aryloxyphenols are O-dearylated in the *ipso*-substitution manner by hROS such as  $\cdot\text{OH}$ , reactive intermediates of peroxidase, and cytochrome P450, but not by other ROS ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ , and so on) (27, 28). In addition, our recent investigation of the absorption and fluorescence properties of fluorescein derivatives showed that the fluorescence of fluorescein could be quenched by protection of the phenolic hydroxy group at the 6'-position of fluorescein with an electron-rich aromatic ring.<sup>2</sup> Therefore, we designed and synthesized two novel fluorescence probes for hROS, HPF and APF, by making use of this fact. We expected that almost nonfluorescent HPF and APF would be O-dearylated upon reaction with hROS to yield strongly fluorescent fluorescein. The putative reaction scheme is shown in Fig. 1. The dynamic range of fluorescence augmentation should be wide, because both molar absorptivity and quantum efficiency values are greatly increased upon O-dearylation, so these compounds should operate as sensitive and selective fluorescence probes for hROS. HPF and APF were obtained in only 3 steps and 2 steps, respectively (see Supplemental Materials).

**Reactivity of HPF and APF with  $\cdot\text{OH}$** —First, we investigated the reactivity of HPF and APF for chemically generated hROS. We tried to detect  $\cdot\text{OH}$ , one of the hROS, formed in the Fenton reaction, using HPF and APF (Fig. 2A).  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added to buffer solutions of HPF and APF and then ferrous perchlorate was added. The fluorescence intensity did not increase upon the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone, but increased substantially upon the addition of ferrous perchlorate in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The results clearly showed that both HPF and APF could detect  $\cdot\text{OH}$  selectively. In addition, the fluorescence increase caused by the reaction with  $\cdot\text{OH}$  was suppressed in buffer solutions of HPF and APF containing  $\text{Me}_2\text{SO}$  (a quencher of  $\cdot\text{OH}$ ), and we confirmed the production of fluorescein in the reaction mixture with  $\cdot\text{OH}$  by reverse-phase high-performance liquid chromatog-

<sup>2</sup> K. Setsukinai, Y. Urano, and T. Nagano, manuscript in preparation.