

201128274A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

ミトコンドリア脳筋症に合併する高乳酸血症に対する  
ピルビン酸ナトリウム の治療法開発に関する研究

—試薬からの希少疾病治療薬開発の試み—

平成23年度 総括研究年度終了報告書

研究代表者 古賀 靖敏  
平成 24 (2012) 年 3 月

## 目次

I. 総括研究年度終了報告	1
ミトコンドリア脳筋症に合併する高乳酸血症に対する ピルビン酸ナトリウム治療法の開発に関する研究 —試薬からの希少疾病治療薬開発の試み—	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
III. 研究成果の刊行物・別刷	33

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業）  
総合研究報告書 概要版

ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム治療法の開発に関する  
研究

—試薬からの希少疾病治療薬開発の試み—

研究代表者 古賀 靖敏 久留米大学医学部小児科教授

研究要旨：高乳酸血症は、種々の難治性神経・代謝疾患で観察される重要な病態であるが、この治療薬は今だ世界に存在せず、その病態を踏まえた新しい治療薬の開発が熱望されている。ピルビン酸ナトリウム (PA) 治療 (Mitochondrion 2007;7:399- 403) は、ミトコンドリア脳筋症の細胞モデルで細胞死を防ぐ効果があり、臨床研究でもジクロロ酢酸に勝る乳酸の軽減効果と臨床的有効性がある事を報告した。現在は、工業用試薬であるが、この一年の班研究が橋渡し研究として平成 24 年度の重点研究分野ステップ 1 に採択されれば、医薬品として上市するのに必要な非臨床試験および第 1、第 2 相試験を完了でき、将来の医師主導試験 (第 3 相試験) へ向けたインフラ整備を完結することが可能になる。研究 1 年目は、パートナー企業獲得のための交渉、今までの PA 研究論文の洗い出し、非臨床試験のデータセットの必須項目の確認、第 2 相試験計画を踏まえた第 1 相試験の試験計画 (案)、プライマリーエンドポイントの検討、エントリー患者のリクルートを行い戦略薬事相談の面談を経て、重点研究へむけての申請書類作成を行った。効果的治療法が開発されなければ、細胞死が惹起され、患者では後遺障害、QOL の悪化、リハビリや社会復帰のための医療費増大などが起こる。この治療薬の開発は、患者の QOL を改善するのみでなく、患者の社会参加、医療費抑制、社会における経済効果の浮揚に大きく貢献できると考えられる。本研究の特筆すべき特徴は、試薬から出発し医薬品としての希少疾病に対する新規治療法開発を目的とした点にある。申請者は、MELAS に対するアルギニン試験 (医師主導試験) の実績があり、患者リクルートも完了しており、独創的かつ効果的・効率的な研究の実施が可能である。今回、パートナー製薬企業が決定し、PMDA の戦略薬事前相談を 10 月 6 日に終了し、平成 23 年度内に本相談を行う予定で進めている。平成 24 年度は、本研究を発展させ、難治疾患研究事業の重点研究に申請しており、採択されれば研究期間内で製剤特許を新たに申請する予定であり、日本から世界に発信できるミトコンドリア病に対する PA の新規医薬品開発が可能となる。

研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

村山 圭：千葉県立こども病院、医長  
森 雅人：自治医科大学、講師  
石崎 義人：九州大学、講師  
斎藤 伸治：名古屋市立大学、教授  
大竹 明：埼玉医科大学、教授  
藤井 克則：千葉大学、講師  
藤井 達哉：滋賀県立小児保健医療センター、

センター長

但馬 剛：広島大学、講師  
田中 雅嗣：地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター、部長  
佐伯 武頼：熊本大学、特任教授  
山口 清次：島根大学、教授  
新田 淳美：富山大学、教授  
角間 辰之：久留米大学バイオ統計センター、センター長

## A. 研究目的

高乳酸血症の病態を踏まえた治療薬は今だ世界に存在しない。ミトコンドリア病では、高乳酸血症の程度が高度であるほど臨床的に重症で死亡率も高くなる事が示され

(Neurology2011;77:1965- 1971)、高乳酸血症を治療することがミトコンドリア病の重症度を軽減できると考えられるようになった。しかし、従来ジクロロ酢酸 (DCA) が高乳酸血症に使用されていたが、その肝・腎・神経毒性が明らかになり、DCAにかわる薬剤の開発が急務となった。我々は、ミトコンドリア病での臨床研究から、PA が高乳酸血症を軽減するのみでなく、臨床的にもその重症度を軽くするという知見を得た。このような世界情勢の中で、本研究は、先天性高乳酸血症の病態を踏まえた新しい治療薬の開発を目的としており、試薬からの医薬品開発研究、日本から世界に発信できる独創的な開発研究である。

## B. 研究方法

(1) 当該研究計画に関して現在までに行った研究等高乳酸血症に対するPA治療

(Mitochondrion 2007;7:399- 403) は、ミトコンドリア病の細胞モデルでも細胞死を防ぐ効果がある事が最近のメタボローム解析で証明された (JBC 投稿中)。また、臨床研究では、DCAに勝る高乳酸の軽減効果と臨床的有効性が示された (BBA 2010 ;1800 (3): 313-5、Brain & Dev 2011 in press、BBA 2011 in press)。平成23年4月発足のミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究(後藤班)と連携し、MELASに対するアルギニンの医師主導試験の経験を踏まえ、本研究で重点研究分野のステップ1への申請に向けて、以下の資料を作成した。

### (2) 治験薬概要書(案)

非臨床試験データとして有用な情報を収集するために、PA研究に関する論文をPubMedで網羅的に検索し、科学的論理的な論文を洗い出しまとめた。また、PAの概念実証としての根拠、および現在までのあらゆる臨床研究データを集大成し、治験薬概要書(案)として作成した。

### (3) 治験へ向けたエンドポイントの探索

現在までのミトコンドリア脳筋症研究およびPAの臨床研究から今回の治験に最も感度および特異度の高いバイオマーカーをエンドポイントとして挙げた。

### (4) 第1、2相試験計画(案)

将来の医師主導治験での第3相試験を実施する事を念頭に、第2相試験および第1相試験を計画した。これは、次回の戦略薬事相談に伴い詳細な指導を経て、プロトコルを確定する事になる。

### (5) 治験実施組織の構築

日本におけるミトコンドリア臨床研究拠点を中心に13か所の治験協力施設(候補)を抽出し、平成24年からの治験研究分担研究者として日本における治験システムを構築した。

### (6) 治験薬GMP製造した製剤の確保・製造工程記録一式

PAの製剤は、試験薬GMPにより製造され、CMOへの製造技術移転が完了するまでに原薬および最終製剤の暫定規格、規格設定のための試験方法の確立並びに安定性試験を行う事とする。現在、第1相および第2相試験のための必須項目(原体の予備安定性試験、加速、過酷試験)に関し、東レ・ファインケミカル(株)、ノーベルファーマ社と共同し進めている。

## C. 研究結果

研究体制図を資料1に示す(資料1:研究体制)。

### 1) 治験薬概要書(案)(資料2:治験薬概要書案)

平成23年8月1日に採択を受けて、10月6日にPMDAの薬事戦略前相談を行った。その指導により、国内外のピルビン酸ナトリウムに関する研究論文を網羅的に検索し、約250編から非臨床試験データセットの構築に有用な情報を中心に治験薬概要書の基本になる資料を作成した。PAは生体内物質であり、従来の臨床研究ではその毒性に関しての論文はみつからない。この点、ヒトに使用するための必須の非臨床試験データとして、通常ラット単回、イヌ単回試験、薬物濃度測定法の確立、およびラットおよびイヌに対する一か月反復投与試験、安全性薬理試

験などが含まれる。第1相試験移行のために必須の非臨床試験の項目については、薬事戦略相談の指導に従って、医薬品申請業務に精通した専門業者に依頼する必要がある。開発対象となる適応症については、遺伝性疾患であるミトコンドリア病に合併する高乳酸血症とした。この疾患はUnmet Medical Needs医薬品であり、かつ希少疾病である。

## 2) 第1、2相試験計画案

### ①第1相試験計画案

安全性及び忍容性の推測および薬物動態を確認するために、健康な成人ボランティア（通常は男性）10名に対してPAを投与し、その安全性（人体に副作用は無いかな）を中心に、薬物動態を確認する。単回投与試験では、PAを体重あたり低用量0.5g/kg/回もしくは高用量1.0g/kg/回を250mlの水とともに単回経口投与する。その後、PAの血漿中濃度を前、15分、30分、45分、60分、120分後に測定する。この際、嘔吐、下痢などの臨床症状も確認する。連続投与試験では、低用量0.5g/kg/day TIDもしくは高用量1.0g/kg/day TIDで一週間投与する。その後、PAの血漿中濃度を測定し同時に、嘔吐、下痢などの臨床症状も確認する。この案は、薬事戦略相談の指導を受けて改変する。

### ②第2相試験計画案（資料3：第2相試験ダイアグラム）

試験デザインは、二重盲検クロスオーバーとし、18名の患者を対象に6名ずつ以下の3群に分ける。A群は、プラセボ→低用量（0.5g/kg/day TID）、B群は、低用量（0.5g/kg/day TID）→高用量（1.0g/kg/day TID）、C群は、高用量（1.0g/kg/day TID）→プラセボとする。試験期間は、各群それぞれ1ヶ月間で、計2ヶ月間投与とする。試験計画の詳細を「資料5：第2相試験ダイアグラム」に記す。（資料5：第2相試験ダイアグラム）。試験のエントリークライテリアは、遺伝子異常が判明し、血漿中乳酸が2mM/L以上の高乳酸血症を示すMELASおよびLeigh脳症患者であり、明らかな肝・腎・心不全や糖尿病の無い患者で、PAの経口投与が可能となる患者とする。プライマリーエンドポイントは、MRSによる側脳室の乳酸値とし、セカン

ダリーエンドポイントでは、血漿中の乳酸、ピルビン酸、L/P比、グリセルアルデヒド3リン酸、FGF-21とする。第2相試験計画案を策定後、日本医薬品医療機器総合機構（PMDA）での試験前相談を実施し、指導に沿ったプロトコル改定を行う。

### 3) 治験実施組織の構築

日本を代表するミトコンドリア病臨床研究拠点をまとめ、平成24年の厚生労働科学研究班（案）として構築した（資料4：班員分布図）。

（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、不利益・危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）を十分に説明し、同意が得られた場合のみ研究を実施する。本研究は、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）に準拠して行う。また、本研究の計画調書は、すべての協力研究施設の倫理審査会に提出し、承認を得る予定である。多施設共同研究の倫理審査会資料は、基本内容を一致させた上でそれぞれの研究参加施設の倫理委員会の承認を得る。この原案は、すでに国立精神神経医療センター、埼玉医科大学病院、久留米大学病院にてすでに承認されているが、それを基本とし、さらに修正し、新GCP準拠したものとする。また、第2相試験研究に関しては、「医薬品の臨床試験の実施の基準に対する省令」、新GCPに準拠し、患者の利益を最大限配慮しつつ、副作用に充分留意しながら、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）に基づき、ヘルシンキ宣言や、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意に関して、十分な配慮のもとに行う。また、ピルビン酸ナトリウムの非臨床試験を行うに当たっては、動物を用いた短期、長期試験その他において、国が定めた「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び申請者が所属する久留米大学で定めた倫理規定等を遵守し、動物愛護上の配慮に充分留意した上で行う事とする。

### D. 考察

平成23年8月1日の難治疾患研究事業の

採択から、実質5 か月間の研究を通して、我々が得られた結論は、PA の高乳酸血症に対する臨床的効果は、過去の臨床研究および我々の基礎的臨床的研究により充分科学的妥当性があり、今後、難治疾患研究事業の重点研究ステップ1 に申請可能と考えられた。

#### E. 結論

今回の研究成果から、PA の試薬からの医薬品開発を目指して、平成24年度の難治疾患研究事業の重点領域研究ステップ1 に申請している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yasutoshi Koga, Nataliya Povalko, Koujyu Katayama, Noriko Kakimoto, Toyojiro Matsuishi, Etsuo Naito, Masashi Tanaka. . Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation in PDH E1 · gene. *Brain & Dev* 2012 34;87-91
- 2) Yasutoshi Koga, Nataliya Povalko, Junko Nishioka, Koujyu Katayama, Noriko Kakimoto, and Toyojiro Matsuishi. Molecular Pathology of MELAS and L-Arginine Effects. *Biochem Biophys Acta General* 2012;1820:608-614
- 3) Shuichi Yatsuga, Nataliya Povalko, Koujyu Katayama, Junko Nishioka, Noriko, Kakimoto, Toyojiro Matsuishi, Yasutoshi Koga. MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan *Biochem Biophys Acta General* 2012;1820:619-624
- 4) Yasutoshi Koga. Biochemistry of Mitochondria, Life and Intervention 2010. *Biochem Biophys Acta General* 2012 1820:551-552
- 5) Saito K, Kimura N, Oda N, Shimomura H, Kumada T, Miyajima T, Murayama K, Tanaka M, Fujii T. Pyruvate therapy for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(5):632-6.
- 6) Masamichi Ikawa, Kenichiro Arakawa, Tadanori Hamano, Miwako Nagata,

Yasunari Nakamoto, Masaru Kuriyama, Yasutoshi Koga, Makoto Yoneda. Evaluation of systemic redox states in patients carrying MELAS A3243G mutation in mitochondrial DNA. *European Neurology* (in press)

##### 2. 学会発表

- 1) Koga Y: Beneficial effects of Pyruvate Therapy on Mitochondrial Myopathy. *MITOCHONDRIAL MEDICINE 2011: CHICAGO.* 2011.6.14-18 (USA, Chicago).
- 2) Koga Y: mitochondrial morphology, Cardiolipin. 5th SFRR-Asia 8th ASMRM 11th J-mit. 2011. 8. 31-9. 4 (Kagoshima).
- 3) 古賀靖敏: MELAS コホート研究に診られる成長障害の実態と GH に対する反応性. 第45回日本小児内分泌学会学術集会. 2011.10.6-8. 大宮ソニックシティ (埼玉).
- 4) Koga Y: Satellite Meeting. Treatment of Mitochondrial Disease - now and in the future Conference 2011, New York, NY. 2011.10.24 (USA, New York)
- 5) Povalko N: Satellite Meeting. Treatment of Mitochondrial Disease - now and in the future Conference 2011, New York, NY. 2011.10.24 (USA, New York)
- 6) 古賀靖敏: ミトコンドリア病治療の最前線. PDHE1 $\alpha$  欠損による Leigh 脳症に対するピルビン酸ナトリウムの臨床評価. 第53回日本先天代謝異常学会総会、第10回アジア先天代謝異常症シンポジウム. 2011.11.24-26. ホテルニューオターニ幕張 (千葉)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



## 資料 2

# 治験薬概要書（案）

ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に  
対するピルビン酸ナトリウム治療法の開発  
研究

久留米大学医学部小児科

古賀靖敏

版番号：第 1 版 2011 年 12 月 18 日



## 1. 序文

高乳酸血症は、種々の難治性神経・代謝疾患で観察される重要な病態である。この病態治療薬は今だ世界に存在せず、その病態を踏まえた新しい治療薬の開発が世界的に熱望されている。遺伝的異常により本病態を合併する代表的疾患として、ミトコンドリア病がある。ミトコンドリア病は、ミトコンドリアのエネルギー産生系酵素の遺伝的異常により引き起こされる難治性進行性疾患であり、平成 14 年の厚生労働科学研究班研究(古賀班)による全国調査で、740 名の存在が確認された<sup>1)</sup>。臨床症状により種々の病型が報告されているが、本症に共通する基本病態として、遺伝的な電子伝達系酵素の低下により、患者細胞では好気性解糖系が障害された結果、高乳酸血症が存在する。その程度が著明になると、細胞のエネルギー不全から種々の程度の臓器不全を来し、たとえ急性期症状が回復しても、細胞死による後遺障害を引き起こす。また、しばしば急性期の回復が見込めず、多臓器不全から死にいたる。いままで、本病態で使用されていたジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)は、肝・腎障害に加え、重篤な末梢神経障害により現在使用されていない<sup>2)</sup>。ピルビン酸ナトリウム治療は、ミトコンドリア脳筋症の細胞モデルで細胞死を防ぐ効果があり、臨床研究でもジクロロ酢酸に勝る乳酸の軽減効果と臨床の有効性がある事を報告した<sup>3)</sup>。日本では、日本小児科学会の 2 分科学会(日本小児神経学会、日本先天代謝異常学会)および日本ミトコンドリア学会から開発要望薬剤として指定されている。高乳酸血症を軽減し、細胞死を回避する治療薬を開発できれば、患者の QOL(命の輝き)を改善するとともに、病気を有する人の社会復帰および自立を助け、死亡率を低減でき、ひいては医療費抑制効果が期待できる。

### 1.1 ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム開発の背景

#### ① 高乳酸血症の治療の重要性

ミトコンドリア病では、ミトコンドリアのエネルギー産生系酵素の遺伝的異常により、電子伝達系酵素の活性低下を来し、その多くは高乳酸血症を呈する。平成 14 年の厚生労働科学研究班研究(古賀班)による全国調査では、ミトコンドリア病は日本では 740 名が確認され、その中で最も頻度の高い病型が MELAS である。日本では 233 名の MELAS 患者が存在するが、2002 年から 2007 年までのコホート研究により、小児型 MELAS の平均死亡年齢は 15.3 歳と判明し、非常に重症進行性の病気である事が判明した<sup>1)</sup>。MELAS では、多種多様な臨床症状を呈するが、中でも脳卒中様発作は本病型に特徴的である。本症では、髄液の乳酸の蓄積が病気の重症度と相関することが報告されている<sup>4)</sup>。この報告では、慢性的に高乳酸血症を来している A3243G 変異を有する MELAS 患者 34 家系の 91 名と A8344G 変異を有する MERRF の 2 家系 15 名を 4 群に分けた。父系家系に属する人を第 1 群(control)、母系家系に属する人で何ら神経学的に異常を認めない人を第 2 群(asymptomatic)、神経学的症状を有するも MELAS もしくは MERRF の診断を満足する症状が揃っていない人を第 3 群(oligosymptomatic)、

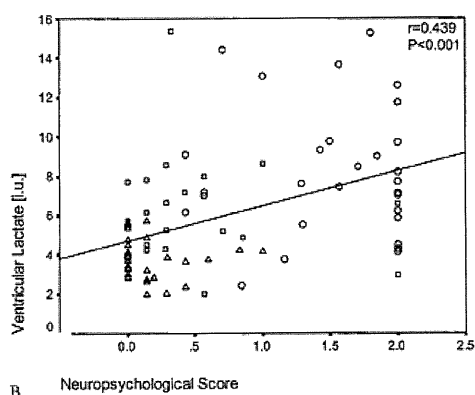
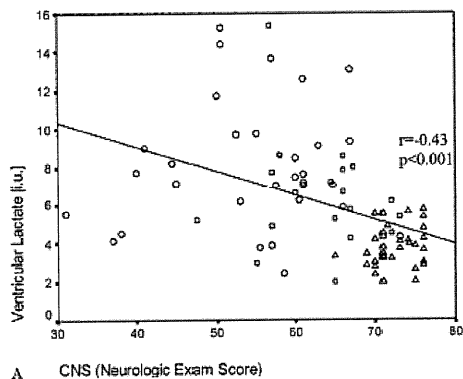
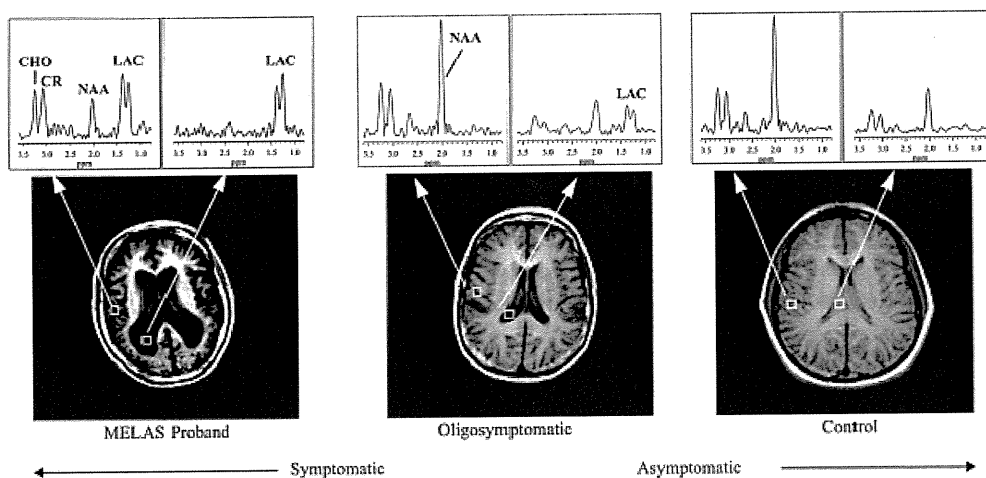
MELAS もしくは MERRF の診断を完全に満たす人を第 4 群 (symptomatic) とした。神経心理的検査、MRS、すべてのエントリー者の白血球の遺伝子の含量を測定した。下の表にこの研究に参加した患者の状態を示す。

**Table** Columbia Neurological Score (CNS), global neuropsychological score (GNP), MRS ventricular lactate estimates (MRS Lac, in institutional units), venous lactate (V Lac, in mM/L), age (in years), and fasting glucose (Gluc, in mg/dL) in families harboring the A3243G mutation and the A8344G mutation

Clinical group	CNS		GNP		MRS Lac		V Lac		Age		Gluc	
	3243	8344	3243	8344	3243	8344	3243	8344	3243	8344	3243	8344
Control group, n = 11	71.5 ± 2.3		60.9 ± 0.16		3.71 ± 1.05		1.1 ± 0.6		49 ± 14		90 ± 17	
Mutation	3243	8344	3243	8344	3243	8344	3243	8344	3243	8344	3243	8344
Asymptomatic	71.9 ± 4.1	66.7 ± 9.5	0.12 ± 0.32	0.19 ± 0.22	3.7 ± 1.15	3.9 ± 2.9	1.5 ± 0.9	2.0 ± 0.1	37 ± 15	47 ± 17	90 ± 25	87 ± 6
Oligosymptomatic	62.8 ± 8.8	62.0 ± 4.6	0.51 ± 0.58	0.36 ± 0.34	6.4 ± 2.7	3.8 ± 1.0	2.3 ± 1.2	1.5 ± 0.4	39 ± 20	50 ± 17	120 ± 57	73 ± 15
Symptomatic	55.4 ± 9.7	51.3 ± 7.8	1.36 ± 0.75	0.65 ± 0.45	8.2 ± 3.3	4.5 ± 1.6	2.8 ± 1.3	2.0 ± 0.9	32 ± 15	42 ± 18	115 ± 64	83 ± 8

Values are mean ± SD. The paternal, noncarrier controls from all families were analyzed together.

この解析の結果、症状を呈している MELAS の家系では、診断基準を満たす典型的患者ほど、髄液中の乳酸値が高値であり、その程度は、第 4 群 (symptomatic) > 第 3 群 (oligosymptomatic) > 第 2 群 (asymptomatic) = 第 1 群 (control) の順で有意に高かった。このことから、患者での臨床症状の重症度は髄液中の乳酸値の高さと相関することが明らかになった。



上記の図は、神経学的検査のスコアおよび神経精神的なスコアをそれぞれ髄液の乳酸値との関係で示したものである。神経学的検査のスコアの悪化は、髄液の乳酸値と逆相関を示しており、神経精神的なスコアの悪化は髄液の乳酸値と正相関を示す。

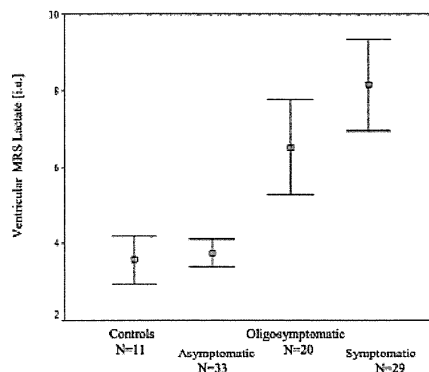


Figure 2. MRS ventricular lactate (expressed in institutional units [i.u.], mean  $\pm$  SEM in institutional units) by clinical group in MELAS/3243 families.

上図は、MRS 解析による側脳室髄液中の乳酸値を各群で示したものである。乳酸値は典型的な患者 (symptomatic) ほど高値を示し、重症度と相関することがわかった。このことは、MELAS 患者で髄液の乳酸値を測定することで、その患者の重症度および予後が明らかになる可能性を秘めていると考えられた。

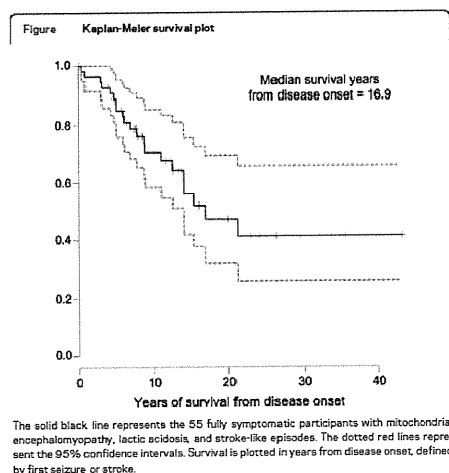
	Gender	Age, y	m.3243A>G mutation, % mutant	Follow-up, y	Age at death, y
Patients with MELAS (n = 32)	48% M/52% F	30 $\pm$ 15 (4-61)	26 $\pm$ 21 (1-65)	3.8 $\pm$ 2.2 (0.25-9)	34.5 $\pm$ 19 (10-82) (n = 21)
Carrier relatives (n = 54)	28% M/72% F	38 $\pm$ 17 (4-76)	19 $\pm$ 16 (0-62)	5.5 $\pm$ 3 (0.7-10.5)	NA (deaths not related to MELAS; n = 3)

Abbreviations: MELAS = mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; NA = not applicable.

<sup>a</sup> Data are mean  $\pm$  SD (range).

その後、2011年にMELASの自然歴に関する報告が米国からなされ、側脳室における髄液の乳酸値はMELASの病気の進行とともに高度に蓄積し、かつ、髄液の乳酸値が高値である症例群では、平均余命がMELAS全体の余命16.9年に対し、8.65年と半分に低下した<sup>5)</sup>。この研究の目的は、A3243Gをもつ患者の臨床的生化学的検査から自然歴を明確にし予後および臨床治験のための情報を提供することである。少なくとも2回の受診を行った35家系85名の患者で前方視的にコホート研究を行った。31名はMELASの診断基準を満たし、54名はそのキャリアーであった。病歴、毎日の生活状況などの基本的な標準化された評価、診察所見、神経精神科的検査、MRIなどの検査を総合的に評価した。臨床的検査学的変化は時間経過とともに生存に関してモニターした。予後は、フォローアップ期間10.6年(平均患者では3.8 $\pm$ 2.2年、キャリアー親戚で5.5 $\pm$ 3.0年)をもとに報告した。結果、MELASでは、診察所見、神経精神科的検査、日常の生活スコア—いづれも、有意に時間経過とともに悪

化したが、キャリアー親戚では、その傾向は診られなかった。



脳の MRI スコアは、MELAS 患者では有意に低下した。MRS での側脳室の乳酸値は時間経過とともに増加し、死亡率の上昇とともに悪化した。小児期に発症の患者ではしばしば重症であった。MELAS 患者ではキャリアー親戚に比較して死亡率が高かった。結論として、A3243G 変異を持つ MELAS 患者では、臨床的、検査的な症状の進行を記録できた。このデータは、症状のコースを考え臨床治験を行う上で、非常に有用となると考えられる。これらの報告により、髄液中の乳酸値を下げることで、細胞死を抑制し、MELAS での QOL を改善する可能性があり、ひいては、他の同様の代謝病態を有するミトコンドリア病でも治療的改善が見込まれる。

## ②高乳酸血症に対する標準治療の現状及び問題点

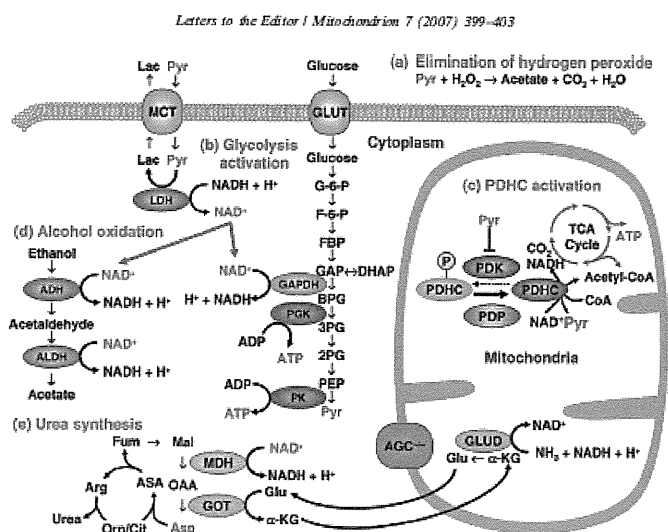
高乳酸血症は、乳酸の産生過多によるタイプ A 型と利用障害のタイプ B 型に分類される。一般的に臨床現場で問題となるのは、圧倒的にタイプ A であり、組織の低酸素血症に合併した嫌気性解糖系の亢進による事が多く、その代表的疾患として電子伝達系酵素異常を主病変とするミトコンドリア病がある。高乳酸血症の標準的治療としては、種々の方法が取られてきたが、満足できる治療法はない<sup>6)</sup>。炭酸水素ナトリウム(メイロン)投与は、乳酸の産生を増加しすることから、タイプ A 型の高乳酸血症の治療には適切ではない。炭酸ナトリウムと炭酸水素ナトリウムの合剤も、炭酸水素ナトリウムと同じ緩衝効果があるが CO<sub>2</sub> 産生を促すものではない。ジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)は、試薬であり、古典的に高乳酸血症に使用されてきたが、乳酸値は低下するものの、臨床的効果は無いと考えられてきた。日本では、ミトコンドリア病の重症型である Liegh 脳症を中心に使用されてきたが、使用開始当初から肝・腎障害のために使用できない症例の報告もあったが大きな副作用報告は成されていなかった<sup>7)</sup>。2006 年になり、MELAS に対する DCA による臨床治験成績が発表され、本病態で使用されていたジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)は、肝・腎障害に加え、重篤な末梢神経障害により、全例治験を中止せざるを得ないという報告であった。この報告以後、DCA は世界的に使用されなくなり、本症の治療としては、姑息的に炭酸水素ナトリウムを使用するか、血液透析もしくは腹膜透析しか残されていない。以上の理由で、高乳酸血症の病態生理を踏まえた治療薬

の開発が世界的な視点で急務となっている。

## 1.2 なぜピルビン酸ナトリウムが候補に挙がるのか

ピルビン酸は、3つの炭素骨格をもつ構造を持ち、解糖系代謝ステップの終末産物として位置し、ピルビン酸脱水素酵素反応によりアセチル CoA に代謝され TCA サイクルに入る。また、乳酸脱水素酵素の働きで代謝の袋小路である乳酸に転換される。また、アラニンアミノ転移酵素の反応によりアラニンに変換される。東京都健康長寿医療センター研究所の田中雅嗣博士によると、ピルビン酸には、以下に示す薬理効果が期待されている<sup>3)</sup>。(添付図参照)

① 過酸化水素の除去:ピルビン酸は非酵素的に過酸化水素と反応し酢酸、二酸化炭素、水を生成する。



② 解糖系の賦活化:細胞外から添加されたピルビン酸は細胞外膜に存在する monocarboxylate transporter (MCT)の作用により細胞内の乳酸と交換される。lactate dehydrogenase (LDH)の反応を介して、ピルビン酸は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の基質となる  $\text{NAD}^+$ を供給する。Phosphoglycerate kinase (PGK)は、1,3-bisphosphoglycerate (BPG)のリンを ADPとして供給し、ATPと 3-phosphoglycerate (3PG)を作る。つまり、ピルビン酸は L/P 比の高い状態であっても、glyceraldehyde-3-phosphate の酸化に必要な  $\text{NAD}^+$ を供給することで、解糖系反応を賦活化する。

③PDHCの賦活化:ピルビン酸は、生理学的に PDK の非活性化を通して PDHC の賦活化に働く。非活性化されたリン酸化 PDHC は PDK の不活性化を通して脱リン酸化され活性型 PDHC となる。

④アルコールの酸化:ピルビン酸は、 $\text{NAD}^+$ を alcohol dehydrogenase (ADH) と acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)に供給することで、エタノールを酸化し酢酸合成を促進する。

⑤尿素合成: aspartate glutamate carrier (AGC)の遺伝的異常であり、type II adult- や neonatal-onset hypercitrullinemia (CTLN2)が原因遺伝子異常であるシトリン欠損症は、アスパラギン酸のミトコンドリアから細胞質への転送が障害されている。ピルビン酸は、malate (Mal)

dehydrogenase (MDH) に  $\text{NAD}^+$  を供給し、リンゴ酸からオキザロ酢酸を作る。アスパラギン酸は、アミノ転移反応により、glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) でグルタミン酸からオキザロ酢酸を作る。つまり、アスパラギン酸は、細胞質で合成され、尿素サイクルに入ってシトルリンと反応しアルギノコハク酸を合成する。アルギノコハク酸リアーゼは、アルギノコハク酸からアルギニンとフマル酸を合成する。フマラーゼは、フマル酸の水酸化しリンゴ酸へ転換するが、このフマル酸はピルビン酸の添加による  $\text{NAD}^+$  の供給でオキザロ酢酸から作られる。アルギナーゼは、アルギニンから尿素とオルニチンを合成するが、このオルニチンはシトルリンと交換でミトコンドリア内に転送される。細胞質で作られた  $\alpha$  ケトグルタル酸は、ミトコンドリア内に転送されアミノ基の受容体となり glutamate dehydrogenase (GLUD) により反応は進む。結果的に合成されたグルタミン酸は、ミトコンドリアから細胞質に転送される。全体的な代謝反応から考えると、シトルリン欠損におけるアスパラギン酸のミトコンドリアから細胞質への転送障害は、ピルビン酸の添加により、グルタミン酸のミトコンドリアから細胞質への転送される。

#### ⑥ $\rho 0$ サイブリドでの栄養要求因子 (auxotrough)<sup>8)</sup>

ミトコンドリア病の細胞モデルである  $\rho 0$  サイブリドは、細胞質には MELAS や MERRF 型の 100% 変異ミトコンドリアが存在し、電子伝達系の酵素活性はほぼ 0 となっている。しかし、ピルビン酸とウリジンを追加するだけで、正常のミトコンドリア DNA を持っている同じ個体由来の細胞と同等に細胞増殖能は改善する。つまり、この  $\rho 0$  サイブリドは、電子伝達系酵素活性が無くても正常細胞と同等に生きながらえる事が可能である。これは、ピルビン酸の添加により L/P 比を正常化し、解糖系での ATP 合成を温存することで起こる現象と考えられている。ミトコンドリア病の細胞モデルである  $\rho 0$  サイブリドでも、正常細胞と同等の細胞増殖能を回復できたことで、ピルビン酸の生体内(ヒト)での効果も期待できる。

#### ⑦ 臓器移植、体外循環時の心肺保護液、もしくは IVF などの卵子保存時に用いられる保存液にも使用されている<sup>9)</sup>

ピルビン酸は、自然界に存在する代謝燃料であり心筋や他の組織の抗酸化剤でもあり、生理的濃度以上に上げた場合、種々の程度の心筋保護を發揮する。ピルビン酸は、心筋収縮力を増し、心筋細胞のエネルギー状態を増加させ、内因性の抗酸化システムを活性化し、虚血再灌流やオキシダントストレスからの心筋保護に働く。このレビューでは、最近数年間に明らかになったピルビン酸の心筋収縮と心筋保護についての基礎および臨床研究の成果を紹介する。特にピルビン酸の筋小胞体での Ca 転送、抗酸化作用、心筋障害における可逆性および不可逆性の作用について解説する。これらの研究は、基本的にはピルビン酸治療の臨床的適応に基づく研究努力であり、心肺バイパス手術、心肺蘇生術、心筋障害と心不全などが含まれる。

⑧ 生体内に存在する物質であり、副作用がほとんどなく、多くの臨床研究がすでに存在している (臨床使用については公知の事実となっている)。

#### 項目 1 の引用文献

- 1) Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, Katayama K, Kakimoto N, Matsuishi T, Kakuma T, Koga Y, Taro Matsuoka for MELAS Study Group in Japan. MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr 1.
- 2) Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Jhung S, Sano MC, Shungu DC, Millar WS, Hong X, Gooch CL, Mao X, Pascual JM, Hirano M, Stacpoole PW, DiMauro S, De Vivo DC. Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology*. 2006 Feb 14;66(3):324-30.
- 3) Tanaka M, Nishigaki Y, Fuku N, Ibi T, Sahashi K, Koga Y. Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion*. 2007 Dec;7(6):399-401.
- 4) P. Kaufmann, MD, D.C. Shungu, Sano, S. Jhung, K. Engelstad, E. Mitsis, X. Mao, S. Shanske, M. Hirano, S. DiMauro, and D.C. De Vivo. Cerebral lactic acidosis correlates with neurological impairment in MELAS. *NEUROLOGY* 2004;62:1297–1302
- 5) P. Kaufmann, MD, D.C. Shungu, Sano, S. Jhung, K. Engelstad, E. Mitsis, X. Mao, S. Shanske, M. Hirano, S. DiMauro, and D.C. De Vivo. Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype. *Neurology* 2011;77:1965–1971.
- 6) FRIEDRICH C. LUFT. Lactic Acidosis Update for Critical Care Clinicians. *J Am Soc Nephrol* 12: S15–S19, 2001
- 7) Kuroda Y, Ito M, Toshima K, Takeda E, Naito E, Hwang TJ, Hashimoto T, Miyao M, Masuda M, Yamashita K, et al. Treatment of chronic congenital lactic acidosis by oral administration of dichloroacetate. *J Inherit Metab Dis*. 1986;9(3):244-52.
- 8) MICHAEL P. KING, YASUTOSHI KOGA, MERCY DAVIDSON AND ERIC A. SCHON. Defects in Mitochondrial Protein Synthesis and Respiratory Chain Activity Segregate with the tRNA<sup>LeU</sup>(UUR) Mutation Associated with Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Feb. 1992, p. 480-490
- 9) Robert T. Mallet, Jie Sun, E. Marty Knott, Arti B. Sharma, Albert H, Olivencia-Yurvati. Metabolic Cardioprotection by Pyruvate: Recent Progress. *Experimental Biology and Medicine* 2005, 230:435-443.

## 2 物理的、化学的及び薬剤学的性質並びに製剤組成

### 2.1 化学式及び構造式

CAS番号. 113-24-6

化学名: ピルビン酸ナトリウム

別名: ピルビン酸ナトリウム;2-オキソプロパン酸ナトリウム;2-オキソプロピオン酸ナトリウム;ピルビン酸ナトリウム塩

英語化学名: Sodium pyruvate

### 2.2 物理的・化学的性質

融点: >300 °C(lit.)

比重(密度): 1,267g/cm

屈折率: 1,426-1,43

貯蔵温度: 2-8° C

solubility: H<sub>2</sub>O: 100 mg/mL

外観: 白色粉末

純度: 99.0%以上

BRN: 3568341

安定性: Stable. Incompatible with strong oxidizing agents.

CAS データベース: 113-24-6(CAS DataBase Reference)

EPAの化学物質情報: Propanoic acid, 2-oxo-, sodium salt(113-24-6)

2.3 薬剤学的性質並びに製剤組成 データなし

2.4 製剤の安定性 データなし

2.5 再溶解液の安定性 データなし

## 3 薬理試験

### 3.1 効力を裏付ける試験

①ピルビン酸はシトリン欠損マウス (Ctrn<sup>-/-</sup>) におけるアンモニアからの尿素合成障害を改善する<sup>1)</sup>

ミトコンドリアのアスパラギンとグルタミン酸キャリアーであるシトリンをコードしている SLC25A13 の変異は、成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の原因である。シトリン KO マウス (Ctrn<sup>-/-</sup>) では CTLN2 の症状は呈さないが、肝の還流では乳酸/ピルビン酸比の上昇を伴うアンモニアからの尿素合成障害を来す。この研究では、ピルビン酸の効果を確かめるために、シトリン KO マウス (Ctrn<sup>-/-</sup>) でのアスパラギンとシトリンについて検討した。方法は、肝還流実験によりアンモニウムクロライドからの尿素合成率を測定した。その結果、シトリン KO マウス (Ctrn<sup>-/-</sup>) の肝を用いた還流実験では、ピルビン酸の投与により、L/P 比は低下し、アンモニアからの尿素合成障害を改善した。この影響は用量依存性であつ



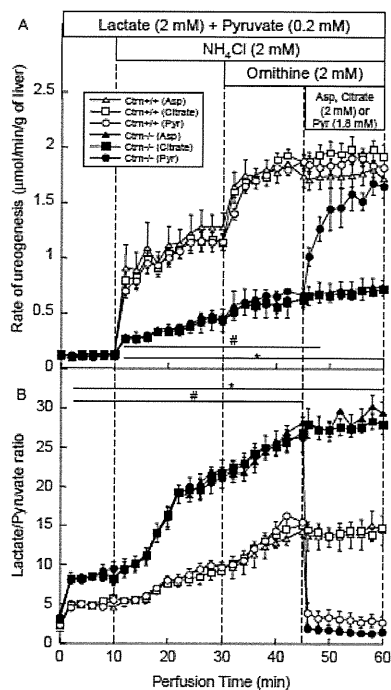


Fig. 1. Effects of Asp, citrate and Pyr on ureogenesis (A) and L/P ratio (B) in perfused liver. Ureogenesis from  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and L/P ratio were measured by perfusion with Lac, Pyr,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Orn, Asp and citrate infused for times indicated in figure. The concentrations for each are shown. Livers from  $\text{Ctrn}^{+/+}$  or  $\text{Ctrn}^{-/-}$  mice were perfused as described in Section 2. Results are expressed as means  $\pm$  SEM for 5-6 independent experiments. Significant difference between genotypes within the same treatment group are indicated by \* ( $P < 0.05$ ) for Asp and citrate, and # ( $P < 0.05$ ) for Pyr.

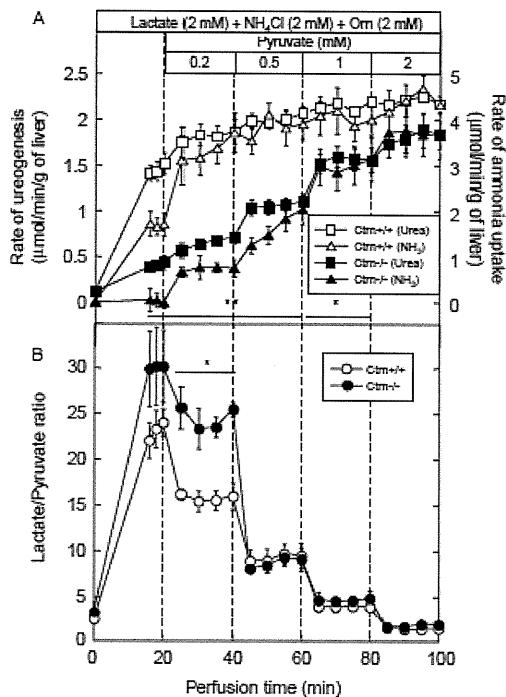


Fig. 2. Dose-dependent effect of Pyr on ureogenesis and ammonia uptake (A), and L/P ratio (B). Following Lac,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and Orn infusion, the Pyr concentration was gradually raised, as shown in figure. Results are expressed as means  $\pm$  SEM for four independent experiments. \* ( $P < 0.05$ ) and \*\* ( $P < 0.01$ ) for significant differences in urea, ammonia and L/P values compared to  $\text{Ctrn}^{+/+}$  mice.

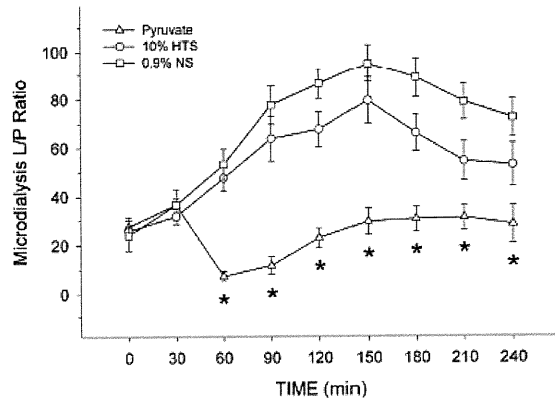
た。一方、細胞質での酸化剤である phenazine methosulfate でも、尿素合成障害を改善し、L/P 比も低下した。アスパラギンとシトリンの添加は、尿素合成障害も L/P 比もいずれも変化しなかった。シトリン欠損は、還元等量の再酸化の限界により一次的に細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比が上昇することで、尿素合成障害を来すと考えられた。この実験から、ノックアウトマウスの肝を使った還流実験では、ピルビン酸は細胞質の NADH/NAD<sup>+</sup>比を低下することが示された。

## ②ピルビン酸は豚での出血性ショックにおいて酸化還元状態を改善させ肝臓でのアポトーシス指標を減少させる<sup>2)</sup>

出血性ショックにおいては、肝での障害が最初の兆候となる。豚でのハロセン麻酔時の出血性ショックにおいて、ピルビン酸が肝障害を予防するメカニズムについて検討した。血圧 40mmHg での 4 時間の出血後の 30 分後に、ピルビン酸ナトリウムを動脈内濃度が 5mM となるように (0.5g/kg/h) で投与した。量と浸透圧は 10% 食塩水 (HTS) と 0.9% の生理的食塩水 (NS) と同じ様に調整した。最大出血量はピルビン酸および HTS いずれも増加したが、ピルビン酸投与群では心循環不全を来す時期を遅らせることが出来た。さらに、ピルビン酸は、ピルビン酸レベルを微小透析することで、乳酸/ピルビン酸比を有意に減少させ、

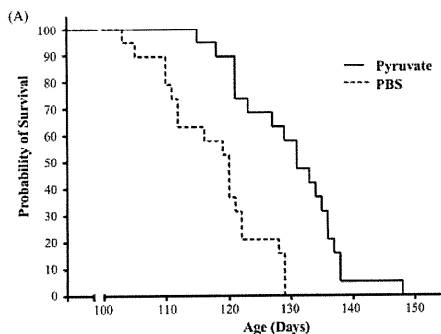
Table 4. Caspase 3 and PARP immunoblot signal intensity

Protein	Pyruvate	0.9% NaCl	10% NaCl
Intact caspase 3 (32 kDa)	0.81 ± 0.03*	0.43 ± 0.02	0.64 ± 0.16
Activated caspase 3 (21 kDa)	0.02 ± 0.01*	0.54 ± 0.10	0.41 ± 0.11
Total caspase 3 (32 + 21 kDa)	0.83 ± 0.17	0.97 ± 0.21	1.05 ± 0.62
%Activated caspase 3 [(21/32 kDa)/100]	3%*	56%	40%
Intact PARP (116 kDa)	3.27 ± 0.27	2.94 ± 0.33	2.63 ± 0.16
Fragmented PARP (85 kDa)	0.05 ± 0.03*	1.15 ± 0.08	0.93 ± 0.05
Total PARP (116 + 85 kDa)	3.32 ± 0.63	4.09 ± 0.92	3.56 ± 0.41
%PARP fragmentation [(85 kDa/116)/100]	1.5%*	28%	26%



NADH/NAD の酸化還元状態を効率よく維持できた。ピルビン酸は、細胞内抗オキシダントである GSH の減少を抑制し、GSH/GSSG 比を減少させた。このような酸化還元状態を好ましい方向に変化することで、アポトーシス環境における肝細胞死を防ぐ事が可能である。ピルビン酸は、有意に Bcl-X1 (antiapoptotic molecule)/Bax (proapoptotic molecule)比を増加させ、ミトコンドリアからのチトクローム C の放出を抑制し、caspase 3 と poly(ADP ribose) polymerase (DNA repair enzyme)の断片化を減少させた。これらの効果は、重篤な出血性ショックの発現から 30 分以内にピルビン酸を静注する事で、還元状態を保ち抗オキシダントの中心的役割を担う GSH の減少を抑制でき、初期の細胞死のマーカーを減少させることが出来る。

③ピルビン酸は G93A SOD1 トランスジェニックマウス (筋萎縮性側索硬化症のモデル) の病気の進行を遅らせる<sup>3)</sup>



Group	Disease Onset	Mean Survival
PBS-treated	97.1 ± 9.1	117.8 ± 8.0
Pyruvate-treated	98.1 ± 8.5	130.1 ± 8.5
	n.s.	P < 0.05

ALS (筋萎縮性側索硬化症) は、選択的な運動神経の神経細胞死を特徴とする進行性神経変性疾患であり、有効な治療法が無い遺伝病である。この動物モデルである G93A SOD1 トランスジェニックマウスを用い、ピルビン酸が病気の進行を抑えられるかの検討を行った。

マウスは、生後 70 日からピルビン酸を 1000mg/kg/week で腹腔内投与したところ、その生存期間が平均 12.3 日 (10.5%) 延長し、病気の進行を遅くし運動能力も改善したが病気の発現時期に変化はなかった。ピルビン酸の治療効果は、nitrotyrosine の免疫反応性やグリリア造成も低下させ、マウス脊髄の Bcl-2 発現を増加させた。これらの事実から、ピルビン酸治療は、ALS の治療方法として期待できる。

#### ④ピルビン酸は心肺停止時の救急蘇生において神経学的回復を促す<sup>4)</sup>

目的：心停止から蘇生する場合に脳内酸化ストレスと代謝不全が神経学的回復に重要である。主要な抗酸化作用とエネルギー源となるピルビン酸は酸化—虚血に起因する神経障害に対して抗オキシダントを示す。この研究では、心肺蘇生を行う中で急性にピルビン酸治療を行う事で心停止から神経機能不全や神経障害を防ぐことが出来るかどうかを検証した。

方法：麻酔後、5 分間開胸下で心停止を起こし 5 分間心臓圧迫を行い除細動をしたのち 3 日で回復した。ピルビン酸 (9 匹)、塩化ナトリウム (8 匹) は 0.125mmol/kg/min で OCCC で投与し最初の 55 分で回復した。同朋のイヌ (6 匹) は手術し心停止—蘇生なく回復した。

結果：2 日目の回復度では、神経学的障害スコア (NDS) は NaCl 処理したイヌ (10.3±3.5) で同朋イヌ (1.2±0.4) に比較しより鮮明に回復したが、ピルビン酸処理したものではさらに有意に回復した (NDS = 3.3±1.2;  $P < 0.05$  versus NaCl)。脳組織は組織学的に検討され 3 日目の回復状態を炎症細胞や細胞死で評価した。海馬の CA1 領域の橋神経細胞は、ピルビン酸群より NaCl 群で有意に減少した (11.7±2.3% versus 4.3±1.2%;  $P < 0.05$ )。心停止は、caspase-3 活性, matrix metalloproteinase 活性と DNA 断片化を CA1 領域で認めたが、ピルビン酸群では caspase-3 活性上昇と DNA 断片化を防ぎ、matrix metalloproteinase を抑制した。

#### 文献

- 1) Moriyama, M.a , Li, M.X.b , Kobayashi, K.b , Sinasac, D.S.c , Kannan, Y.a , Iijima, M.b , Horiuchi, M.b , Tsui, L.-C.c , Tanaka, M.d , Nakamura, Y.a , Saheki, T.b. Pyruvate ameliorates the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice. *Journal of Hepatology* Volume 44, Issue 5, May 2006, Pages 930-938
- 2) Mongan, Paul D., John Capacchione, Shanda West, John Karaian, Dawn Dubois, Ryan Keneally, and Pushpa Sharma. Pyruvate improves redox status and decreases indicators of hepatic apoptosis during hemorrhagic shock in swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1634–H1644, 2002.
- 3) Jong-Ha Park, Yoon-Ho Hong, Hyun-Jung Kim, Sung-Min Kim, Min-Jeong Kim, Kyung-Seok Park, Jung-Joon Sung, Kwang-Woo Lee. Pyruvate slows disease progression in a G93A SOD1 mutant transgenic mouse model. *Neuroscience Letters* 413 (2007) 265–269

4) Arti B. Sharmaa, Matthew A. Barlowa, Shao-Hua Yangb, James W. Simpkinsb, Robert T. Mallet.  
 Pyruvate enhances neurological recovery following cardiopulmonary arrest and resuscitation.  
 Resuscitation (2008) 76, 108—119.

3.2 安全性薬理試験 データなし

4 薬物動態試験 データなし

4.1 吸収 データなし

4.2 分布 データなし

4.3 代謝 データなし

4.4 排泄 データなし

5. 毒性試験 データなし

5.1 毒性試験のまとめ データなし

5.2 単回投与毒性試験 データなし

5.3 反復投与毒性試験 データなし

5.4 遺伝毒性試験 データなし

5.5 生殖発生毒性試験 データなし

5.6 局所刺激性試験 データなし

5.7 その他の毒性試験 データなし

## 6 臨床試験成績

### 1. ミトコンドリア病での臨床研究

Table 1  
 Changes of the NPMDS scores with pyruvate therapy.

Section	Before Tx	1 month after Tx	2 months after Tx
I	7	7	7
II	6	6	6
III	5	5	5
IV	17	13	13
Overall	35	31	31

NPMDS, Newcastle Paediatric Mitochondrial Disease Scale; Tx, treatment.

Table 2  
 Changes in motor function and lactate levels with pyruvate therapy.

	Before Tx	1 month	2 months
Lip pouting	6	15	ND
Winking	6	10	11
Pulling the mouth corner	None	None	8
Tapping a xylophone with a stick	5	7	ND
Raising the forearms from the bed floor	None	30°	90°
Raising the lower legs against gravity	Barely	Possible	Can hold
Flexing the wrists against gravity	Impossible	Possible	Possible
Blood lactate level	2.5 mM	2.7 mM	2.3 mM
Lactate-to-pyruvate ratio	18	18	18

#### ①ミトコンドリア DNA 欠乏症による Leigh 脳症に対する治療効果<sup>1)</sup>

ミトコンドリア DNA 欠乏症により臨床的に Leigh 脳症と診断した症例に、ピルビン酸ナトリウムを胃管チューブより 0.5g/Kg/Day TID し、その臨床的効果を検討した。患者の臨床的評価は、Newcastle Paediatric Mitochondrial Disease Scale (NPMDS)と徒手筋力テストで行った。この重度の発達遅滞を来している患者での改善効果の評価は、NPMDS ではきちんとした評価が出来なかったため、舌の突出、ウインク、楽器をスティックでたたく回数などで評価した。同時に血