

201231106A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患克服研究事業)

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  
—試薬からの希少疾病治療薬開発の試み—

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古賀 靖敏

平成 25 (2013) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告

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  
ナトリウム治療法の開発  
—試薬からの希少疾病治療薬開発の試み— ----- 1  
古賀 靖敏
2. 別添資料: 治験薬概要書(案) ----- 11

### II. 分担研究報告

1. MELAS 変異を有するモデル細胞における代謝中間体の  
動態に関する研究 ----- 31  
田中 雅嗣
2. ミトコンドリア病の新規遺伝子変異の同定に関する研究 ----- 32  
藤井 克則
3. Leigh 脳症に対するピルビン酸ナトリウム治療に  
関する研究 ----- 35  
戸川 雅美
4. ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法の検討 ----- 42  
齋藤 伸治
5. MELAS 治療薬の患者筋細胞における効果に関する研究 ----- 45  
森 雅人
6. ミトコンドリア病における診断法の確立 ----- 47  
村山 圭
7. ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法の検討 ----- 50  
但馬 剛
8. ピルビン酸ナトリウム治療の臨床効果の評価法に関する研究 ----- 51  
藤井 達哉
9. ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の遺伝子診断法の確立  
に関する研究 ----- 54  
内藤 悦雄
10. 難治性ミトコンドリア病患者 2 例へのピルビン酸ナトリウムによる  
治療経験とミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムに  
ついての研究 ----- 58  
大竹 明
11. 有機酸およびTCAサイクルの中間代謝産物解析、バイオマーカーによる  
治療効果判定呼吸鎖周辺( $\beta$ 酸化系、TCA 回路)の代謝機能解析 ----- 61  
山口 清次
12. シトリン欠損症モデル、Citrin/mGPD double-KO マウスにおける  
尿中グリセロール排泄増加— ----- 67  
佐伯 武頼
13. Leigh 脳症におけるピルビン酸ナトリウムの効果に関する研究 ----- 74  
石崎 義人

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	76
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	-----	84

# 総括研究報告

## 厚生労働科学研究費補助金

### 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業） 総括研究報告書

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  
—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、医薬品として上市するのに必要な非臨床試験、GMP 原薬製造、および第 1、第 2/3 相試験を行い、世界初の高乳酸血症治療薬を開発する事が目的である。平成 24 年度は、パートナー企業としてノーベルファーマ株式会社が参加し、PA の医薬品としての開発を進めるために、PMDA への戦略事前相談を行った。また、PA の GMP 原薬製造の委託契約を、医薬品製造経験のある 3 社でヒアリングを行い、塩野フィネス株式会社と委託契約を締結した。さらに、第 1 相試験、第 2/3 相試験を行う上で、必須の前臨床試験データパッケージについて、株式会社新日本科学と委託契約を締結した。PA は、生体内物質であり、米国では脂質代謝改善薬としてのサプリメントとして、30 年来使用されている事から、過去の PA に関する研究論文の洗い出しを行った。平成 24 年度は、主な前臨床試験のデータが揃ったところで、戦略事前相談を重ね、平成 25 年 3 月 15 日に対面助言相談を行った。平成 24 年度の事業成果として、GMP 原薬製造については、品質管理および GMP 製造工程に問題なく、医薬品として充分使用可能な状態である事が塩野フィネス社より示された。また、前臨床試験データパッケージで、PA の安全性は充分担保されている事も判明したが、長期毒性および安全性試験、幼若動物に対する安全性試験など、今後、医薬品申請までに必要な前臨床試験については、PDMA と相談を重ねた上で、必要な試験を行う事となった。難治疾患等克服研究事業の重点研究採択により、用法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伴う高乳酸血症に対する PA の新規医薬品開発が実働している。

研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

1. 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
2. 藤井 克則：千葉大学医学部小児科・

講師

3. 戸川雅美：鳥取大学医学部脳神経小児科・助手
4. 斎藤 伸治：名古屋市立大学医学部小児科・教授

5. 森 雅人：自治医科大学小児科・講師
6. 村山 圭：千葉県立こども病院代謝科・医長
7. 但馬 剛：広島大学医学部小児科・講師
8. 藤井 達哉：滋賀県立小児保健医療センター・センター長
9. 内藤悦雄：徳島赤十字ひのみね総合療育センター・小児科部長
10. 大竹 明：埼玉医科大学小児科・

#### 教授

11. 山口 清次：島根大学医学部小児科・教授
12. 佐伯 武頼：熊本大学生命資源研究・支援センター・特任教授
13. 石崎 義人：九州大学医学部小児科・講師
14. 新田 淳美：富山大学薬学部薬物治療学・教授
15. 角間 辰之：久留米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

(Neurology 2011;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として、日本から世界に発信できる独創的な開発研究を実施している。

#### 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 (Mitochondrion 2012;12:644-665)。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 2012;34(2)87-91, BBA 2012;1820:632-636)。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、医薬品開発研究に向けて、自主臨床研究として発表した。

(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の洗い出しを行った。しかしながら、データとして、非臨床試験に用いる事が出来るものは、我々が検索しうる限り、存在しなかった。今までのデータをまとめ、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) 非臨床試験の実施

「first in man」の医薬品を、試薬から開発するために、非臨床試験のデータセットの実施が必要である。このために、戦略薬事相談を行って、必須項目のデータセットについて、(株)新日本科学に委託して、以下に示すような非臨床試験を実施した (結果参照)。

(4) 第1、2/3相試験計画 (案)

将来の医師主導治験での第2/3相試験を実施する事を念頭に、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。治験へ向けたエンドポイントの探索も同時に討議し、現在までのミトコンドリア脳筋症研究およびPA の臨床研究から治験に最も鋭敏な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も検討した。

(5) 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わねばならない。この基準をクリアするために、原薬製造メーカー 3 社のヒアリングを行い、塩野フィネス社との GMP 製造委託契約を行った。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、塩野フィネス社、ノーベルファーマ社と共同し進めている。

(6) 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。

(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。疫学調査に関しては、国が定めた「疫学研究に関する倫理指針」（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号）、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。

C. 研究結果

1) 医薬品医療機器総合機構（PMDA）への戦略相談

平成 24 年の研究費採択を受けて、今後の医薬品開発の進め方につき、PMDA への戦略薬事相談を行った。平成 23 年の班研究採択通知（平成 23 年 8 月 1 日付）を受けて、平成 23 年 10 月 6 日に PMDA の薬事戦略事前相談を行った。その後、重点研究に発展したため、再度、平成 25 年 1 月 17 日に薬事戦略事前相談を行った。その相談内容調整により、3 月 15 日に対面助言相談を行った。相談内容は以下の 3 点であった。

①非臨床試験データパッケージの充足性に関する相談

臨床第 I 相試験の開始までに実施する非臨床試験の一覧を添付資料に示す。必要な非臨床試験に漏れがないかどうか、その充足性を確認したい。

【相談の背景及び根拠】

国内では PA が医薬品として承認されておらず、医薬品の承認申請を目的とした非臨床試験は実施されていない。臨床第 1 相試験を開始するまでに必要と考えられる非臨床試験の一覧をまとめ、添付資料に示した。これらの非臨床試験データパッケージの充足性を確認したい。

回答：非臨床試験データパッケージに大きな問題は無い。第 1 相試験前にイヌ 13 週反復投与試験、ラット 26 週反復投与試験が含まれているが、ラットおよびイヌの 4 週試験で問題なければ、必ずしも実施する必要はないかもしれないので、相談する事。ナトリウム負荷に関しては、プラセボの施行を含めて再

度相談する事。幼若動物を用いた毒性試験、生殖発生毒性試験についても再度相談する事。

②臨床第1相試験のデザインに関する相談  
健康成人男性を対象とした第1相試験としては、単回投与試験、反復投与試験、食事の影響を評価する試験の3試験を実施する計画である。これらの試験では、PA（原薬）を水に溶解して被験者に投与する。単回投与及び反復投与試験ではプラセボ群を設定するが、プラセボには水を用いる予定である。第1相試験の投与量・投与回数はこれまでの臨床研究成績に基づいて設定した。ここでは、その設定根拠の妥当性を確認したい。ただし、単回投与試験の初回投与量については、実施中の非臨床試験成績が揃った段階で無毒性量や最小薬理作用量を評価し、第1相試験の開始前に再度相談したい。

#### 【相談の背景及び根拠】

健康成人男性を対象とした臨床第1相試験は、「単回投与試験」「反復投与試験」「薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する試験」の合計3試験を実施する計画である。各試験計画の概要を以下に記載する。

##### (1). 単回投与試験

本試験は、PAを単回投与したときの安全性及び薬物動態を評価する目的で実施する。1ステップあたりの被験者数は8名（実薬群6名、プラセボ群2名）とし、ステップごとにピルビン酸Naとして0.08 g/kg（ステップ1）、0.17 g/kg（ステップ2）、0.33 g/kg（ステップ3）を単回投与する。この投与量は、それぞれ0.25、0.5、1.0 g/kg/dayという1日投与量を3分割したものである。

安全性の評価項目は有害事象、臨床検査値、血圧、駆出分画（心エコーを実施して算出）、推算糸球体濾過量（eGFR）とし、治験責任医師がこれらを確認してから、次ステップに移行する。あわせて、試験中は血漿中のピルビン酸・乳酸・アラニン・fibroblast growth factor 21（FGF-21）濃度等を測定し、第II/III相試験の投与量を設定する際の参考データとする。

##### i)投与量の設定根拠

上記の3用量のうち、これまでの臨床研究で主に使用されてきたのは、1回投与量とし

て0.17 g/kg、1日投与量として0.5 g/kg/dayであり（4.6項参照）、これを本試験の中心用量とした。次に、0.33 g/kg（1.0 g/kg/dayを3分割したときの1回投与量）は経口投与可能な最大量として設定した。本薬はナトリウム塩であるため、この投与量を超えるとナトリウム負荷が大きくなり、長期間にわたって服用することは困難である。たとえば、体重50 kgの患者に1.0 g/kg/dayを投与すると、ナトリウム負荷が9.1 mEq/kg/dayとなる。日本人の平均塩分摂取量は11.6 g/日で、この摂取量でのナトリウム負荷は約4 mEq/kg/dayであることから、平均的な塩分摂取に加えて本薬1.0 g/kg/dayを投与すると、通常のほぼ3倍のナトリウム負荷が生じることになる（添付資料参照）。

なお、初回投与量の設定根拠は本相談事項の末尾に記載する。

##### ii)安全性評価項目の設定根拠

これまでの臨床研究で認められたPAの主な有害事象は下痢、嘔気・嘔吐といった消化器症状である（4.6項④参照）。また、水溶液に溶解する量によっては、浸透圧性の下痢が生じる可能性も考えられる。したがって、こうした消化器症状の有無を問診することによって、ピルビン酸Naの安全性を評価する。さらに、高用量を投与するとナトリウム負荷が大きくなり、血圧や腎機能、心機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。このため、血圧・駆出分画・eGFRを測定し、有害事象の有無とこれらの測定値の変化を総合的に考慮し、次ステップに移行するかどうかを決定する。

##### (2). 反復投与試験

本試験は、PAを反復投与したときの忍容性、安全性及び薬物動態を評価する目的で実施する。被験者数は実薬群6名、プラセボ群3名とし、PA（1.0 g/kg/day）又はプラセボを1日3回に分けて、7日間反復投与する。なお、1.0 g/kg/dayは現段階で想定する投与量であり、正式な投与量は単回投与試験成績を踏まえて決定する。

安全性の評価項目は有害事象、臨床検査値、血圧、駆出分画、eGFRとする。あわせて、試験中は血漿中ピルビン酸・乳酸・アラニン濃度、FGF-21などを測定し、第2/3相試

験の投与量を設定する際の参考データとする。

#### i) 投与量の設定根拠

先に記載したように、これまでの臨床研究で主に使用されてきたのは0.5 g/kg/day であり、第2相以降の臨床試験ではこれが中心用量になると考えられる。ただし、第1相反復投与試験では忍容性評価を目的の一つとするため、単回投与試験の安全性データに問題がなければ、経口投与可能な最大量である1.0 g/kg/day を使用し、健康成人男性での忍容性を確認したい。ただし、正式な投与量は単回投与試験成績を踏まえて決定する。

#### ii) 投与回数設定根拠

1日3回という投与回数は、安定同位元素を用いたPAの薬物動態試験成績に基づいて設定した。この試験では13Cで標識したピルビン酸（PAとして100 mgを水50 mLに溶解して投与）を用いた結果、呼気中への排出は速やかで、絶食時投与の呼気への回収率は約20分、ブドウ糖摂取後投与の回収率は約60分でそれぞれピークに達した。本試験では投与後2時間までの回収量を測定したが、この試験成績から推定して、6時間以内には投与した薬物が体内から消失すると考えられる（治験薬概要書序文参照）。

一方、ミトコンドリア病患者のエネルギー産生を向上させる必要があるのは主に身体の活動中で、就寝中は向上させる必要性がそれほど高くない。このため、PAを1日3回投与すれば、身体活動に必要なエネルギー産生をもたらすことができると考え、第1相反復投与試験で1日3回投与の忍容性、安全性及び薬物動態を評価した後、第2/3相試験以降ではこの投与回数での有効性及び安全性を評価することとした。

#### (3). 薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する試験

被験者6名を対象とし、クロスオーバー法を用いて、空腹時及び食後にピルビン酸Naとして0.33 g/kgを単回投与し、薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する。0.33 g/kgは単回投与試験の最大投与量で、空腹時と食後の生物学的利用能を比較するためには、可能な限り高用量を用いたほうがよいと判断した。ただし、これは現段階で想定している投

与量であり、正式な投与量は単回及び反復投与試験成績を踏まえて決定する。

#### (4). 第1相試験（3試験）の治験薬の投与方法

被験者には、服用直前にPA（原薬）を水に溶解して投与する。服用直前に溶解する理由は、水溶液中のPAの安定性が悪く、時間が経過すると、パラピルビン酸Naに分解するためである。また、粉末だとかさばるという問題も生じる。たとえば、体重60 kgの被験者に0.17 g/kgのピルビン酸Naを投与する場合、投与量は10 gとなり、これを粉末として服用するのは困難である。

#### (5). 単回投与試験及び反復投与試験のプラセボ

単回投与試験及び反復投与試験では対照としてプラセボ群を設定し、プラセボには水を用いる予定である。ピルビン酸Naは水に溶解することができ、高用量を投与する場合でも、50~100 mLの水に溶かせば無色透明の液体となる（添付資料参照）。このため、1回投与分の水溶液はコップに入れて被験者に提供することができ、外観が識別可能な場合でも、外側を紙で覆ったコップ（又は不透明なコップ）に水溶液を入れれば、両試験を単盲検デザインで実施することが可能である。ただし、コップの中身は被験者間で比べ合わないようにする。また、PAには特有の塩辛さがあり、同様の塩辛さをもつ不活性粉末は存在しないが、服用時の味覚を被験者間で話し合わないようすれば、水をプラセボとして単盲検試験を実施することは可能と考える。

#### (6). 単回投与試験の初回投与量

単回投与試験の初回投与量は0.08 g/kgと設定した。この投与量は、これまでに実施した臨床研究成績に基づいて設定したものである（4.6項④参照）。この臨床研究では、主として0.5 g/kg/dayという投与量が採用され、これを1日3回に分けて被験者に経口投与した。この場合、1回あたりの投与量は0.17 g/kgとなり、この用量は小児でも忍容可能であった。単回投与試験では、この半量である0.08 g/kgから投与を開始したいと考える。参考までに、この臨床研究ではミトコンドリアDNAの変異（A3243G変異）を有するミトコンドリア病患者8名にピルビン酸Na

を投与した結果、有害事象は3名に認められ、その内訳は嘔気(1名)、下痢(2名)であった。嘔気は軽度で、ピルビンPA始時に発現したものの、その後は発現していない。下痢の内容は、水様便又は軽度の軟便(便性がやや柔らかくなった程度)で、いずれも投与継続中に消失した。すべての患者は現在でもPAの服薬を継続しており、重篤な有害事象や投与中止を必要とする有害事象は認められていない。

また、高コレステロール血症患者を対象とした海外臨床試験では、PAとして14~28gが1日3回に分けて投与されている2)。この試験では、ピルビン酸群の患者の平均体重が73.6kgで、平均体重から算出したPAの1日投与量は0.19~0.38g/kg/day、1回投与量は0.06~0.13g/kgとなる。さらに、高コレステロール血症患者を対象とした別の海外臨床試験では、PAとして18.8~30gが1日3回に分けて投与され、患者の体重は51~139kgの範囲であった3)。この試験に参加した患者の平均体重は公表されていないが、仮に体重100kgの患者が1日量として30gのPAを服用した場合には、1回投与量が0.1g/kgとなる。海外臨床試験の対象となったのは血清脂質が高値を示す患者で、血清脂質値を除けば、健康人に比較的類似した集団である。単回投与試験の初回投与量はこれらの試験の投与量とほぼ同程度である。

ただし、本薬については、臨床第1相試験の開始に必要な非臨床試験を実施している最中である。このため、これらの非臨床試験成績が得られた後、最小薬理作用量や無毒性量を評価し、初回投与量の妥当性を再度相談することとしたい。

### ③臨床試験に使用する製剤に関する相談

臨床試験では原薬を用時に水に溶解し、被験者に投与したいが、この考えでよいかどうかを確認したい。

なお、PAには特有の塩辛さがあり、水に溶解すると、この塩辛さが気になる患者も存在する。このため、本薬が服用しやすくなるよう、原薬に甘味料等を追加した製剤を開発することを検討している。開発途中でこうした改良を行う場合には、原製剤(原薬を用時に溶解)と甘味料等を追加した製剤との生物学

的同等性の確認方法に関して、改めて相談することとしたい。

#### 【相談の背景及び根拠】

まず、臨床試験を開始する前にGMP原薬の製造方法を決定し、原薬の規格値を定める計画である。そのうえで、臨床試験では規格を満たす原薬を用時に水に溶解し、被験者に投与することとしたい。

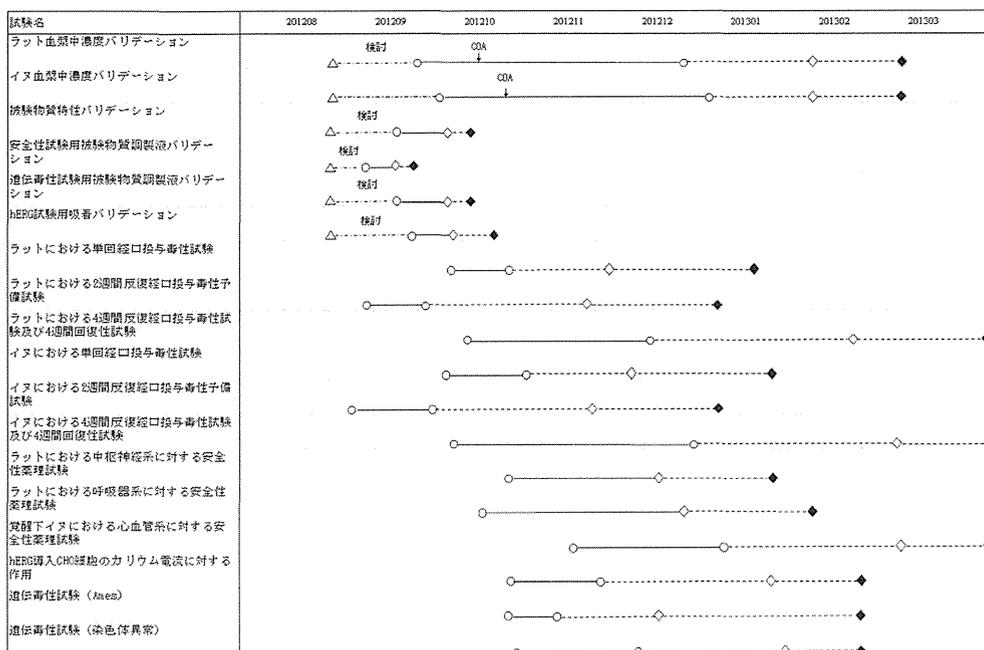
なお、PAには特有の塩辛さがあることから、水に溶解した場合には、この塩辛さが気になる患者も存在する。ミトコンドリア病は小児期に発症することが多いため、小児も服用しやすいうように、甘味料等を追加した製剤を開発できないかどうかを検討する予定である。仮にこうした製剤が開発できた場合には、原薬の用時溶解投与と甘味料等を追加した製剤との生物学的同等性をどのように確認すればよいか、改めて相談することとしたい。

#### 2) 非臨床試験データパッケージ

「first in man」の医薬品を、試薬から開発するために、非臨床試験のデータセットの実施が必要である。このために、戦略薬事相談を行って、必須項目のデータセットについて、(株)新日本科学に委託して、以下の表1に示すような非臨床試験を実施した。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、今後臨床試験への移行を考え項目を設定した。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。平成24年度に実施した実験項目を表1に示す。元来、生体内物質であるPAは、投与してもほとんど毒性らしき影響はなかった。しかし、第I相試験前に、イヌ13週反復投与試験、ラット26週反復投与試験が含まれているが、ラットおよびイヌの4週試験で毒性に問題なければ、必ずしも実施する必要はないかもしれない。今後は、機構への相談を重ねて、必要なもののみ実施

試験スケジュール

○—○ 実験    ◇ 報告書草案    ◆ 最終報告書



する予定である。ナトリウム負荷に関しては、プラセボ対照試験も視野に入れて、毒性データを確認しながら、再度相談する予定である。幼若動物を用いた毒性試験、生殖発生毒性試験についてもその必要性について再度PMDAに相談する。

3) GMP 原薬製造

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 2/3 相試験のための GMP 原薬製造に関する必須項目（原体の予備安定性試験、加速、過酷試験）について、塩野フィネス (株) に委託し、一工程ながら、武蔵野化学試験特級品を原料として、十分な純度を予備実験により得られた。今後は、原体の予備安定性試験、加速、過酷試験を行って、ヒトに使用できる法規制をクリアした後、第一相相試験への製造ラインと工程、品質管理につき、本製造を前提としての試験を行う。また、このすべての過程は、PMDA の指導の下に、ノーベルファーマ社と共同し実施する。

4) 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として研究チームを構築した (図 1)。

5) 治験薬概要書 (別添資料)

D. 考察

平成 24 年度の難治疾患研究事業の採択から、PMDA への相談および、非臨床試験データセットの実施、GMP 原薬製造会社の選定とパイロット研究により、品質管理を GLP 準拠した原薬の製造が可能となった。平成 25 年度は、治験前相談を実施し、第 I 相試験を秋から実施する。

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 に採択され、順調に実働していると考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。



- Mitochondrion 2012;12(6):644-653.
8. Kawamura R et al. Visualization of the spatial positioning of the SNRPN, UBE3A, and GABRB3 genes in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 20:659-672, 2012.
9. Tsurusaki Y et al. A DYNC1H1 mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics* 13:327-332, 2012.
10. Takenouchi T et al. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:2621-3, 2012.
11. Monden Y, Mori M, Kuwajima M, Goto T, Yamagata T, Momoi MY. Late-onset Leigh syndrome with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers. *Brain Dev*, 2012;35:582-585
12. Yamamoto T, Emoto Y, Murayama K, Tanaka H, Kuriu Y, Ohtake A, Matoba R. Metabolic autopsy with postmortem cultured fibroblasts in sudden unexpected death in infancy: Diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Mol Genet Metab.* 2012 Aug;106(4):474-7.
13. Wakiya T, Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Yamada N, Okada N, Ushijima K, Otomo S, Sakamoto K, Murayama K, Takayanagi M, Hakamada K, Yasuda Y, Mizuta K. Impact of enzyme activity assay on indication in liver transplantation for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012 Mar;105(3):404-7.
14. Kumada, T. Miyajima, T. Oda, N. Shimomura, H. Saito, K. Fujii, T. Efficacy and tolerability of modified Atkins diet in Japanese children with medication-resistant epilepsy. *Brain Dev* 2012;34(1):32-8
15. 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;1820:632-636.
16. Arakawa C, Endo A, Kohira R, Fujita Y, Fuchigami T, Mugishima H, Ohtake A, Murayama K, Mori M, Miyata R, Hatai Y: Liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency in fatal influenza encephalopathy. *Brain Dev* 34(2): 115-7, 2012.
17. Akamizu T, Sakura N, Shigematsu Y, Tajima G, Ohtake A, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K: Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II. *Eur J Endocrinol* 166(2): 235-240, 2012.
18. Tanigawa J, Kaneko K, Honda M, Harashima H, Murayama K, Wada T, Takano K, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Aida N, Ohtake A, Osaka H: Two Japanese patients with Leigh syndrome caused by novel SURF1 mutations. *Brain Dev* 34(10): 861-5, 2012.
19. Muto A, Takei H, Unno A, Murai T, Kurosawa T, Ogawa S, Iida T, Ikegawa S, Mori J, Ohtake A, Hoshina T, Mizuochi T, Kimura A, Hofmann AF, Hagey LR, Nittono H: Detection of  $\Delta(4)$ -3-oxo-steroid 5 $\beta$ -reductase deficiency by LC-ESI-MS/MS measurement of urinary bile acids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 900(1): 24-31, 2012.
20. Nagasaka H, Yorifuji T, Bandsma RH, Takatani T, Asano H, Mochizuki H, Takuwa M, Tsukahara H, Inui A, Tsunoda T, Komatsu H, Hiejima E, Fujisawa T, Hirano KI, Miida T, Ohtake A, Taguchi T, Miwa I: Sustained high plasma mannose less sensitive to fluctuating blood glucose in glycogen storage disease type Ia children. *J Inherit Metab Dis* 36(1): 75-81, 2013
21. Seki Y, Mizuochi T, Kimura A, Takahashi T, Ohtake A, Hayashi S, Morimura T, Ohno Y, Hoshina T, Ihara K, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Homma K, Hasegawa T, Matsuishi T: Two neonatal cholestasis patients with mutations in the

- SRD5B1(AKR1D1) gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment. *J Inherit Metab Dis.* 2012 Nov 16. [Epub ahead of print]
22. Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Hirano K, Mochizuki H, Ohura T, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Ohtake A, Yamato S, Miida T: Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. *Clin Chim Acta* 416 (1): 54-9, 2013
  23. Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furui M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Taketani T, Fukao T, Fukuda S: Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: Evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. *Molecular Genetics and Metabolism* 107: 87-91, 2012 (September)
  24. Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Fukao T, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 107: 237-240, 2012 (September)
  25. Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Anal Bioanal Chem* 10: Online, 2012 (November)
  26. Saheki T, Inoue K, Ono H, Katsura N, Yokogawa M, Yoshidumi Y, Furuie S, Kuroda E, Ushikai M, Asakawa A, Inui A, Eto K, Kadowaki T, Sinasac DS, Yamamura K, Kobayashi K: Effects of supplementation on food intake, body weight and hepatic metabolites in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse model of human citrin deficiency. *Mol Genet Metab*, 107:322-9, 2012.
  27. Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S: Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metab*, 105:553-8, 2012.
  28. Gómez-Galán M, Makarova J, Llorente-Folch I, Saheki T, Pardo B, Satrústegui J, Herreras O: Altered postnatal development of cortico-hippocampal neuronal electric activity in mice deficient for the mitochondrial aspartate-glutamate transporter. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32:306-17, 2012.
  29. Wang JS, Wang XH, Zheng YJ, Fu HY, Chen R, Lu Y, Fang LJ, Saheki T, Kobayashi K: Biochemical characteristics of neonatal cholestasis induced by citrin deficiency. *World J Gastroenterol.* 18:5601-7, 2012.
  30. Llorente-Folch I, Sahún I, Contreras L, Casarejos MJ, Grau JM, Saheki T, Mena MA, Satrústegui J, Dierssen M, Pardo B: AGC1-malate aspartate shuttle activity is critical for dopamine handling in the nigrostriatal pathway. *J Neurochem*, 124: 347-62, 2012.
  31. Yazaki M, Kinoshita M, Ogawa S, Fujimi S, Matsushima A, Hineno A, Tazawa KI, Fukushima K, Kimura R, Yanagida M, Matsunaga H, Saheki T, Ikeda S: A 73-year-old patient with adult-onset type II citrullinemia successfully treated by sodium pyruvate and arginine. 2013 in press
  32. Torisu H, Yoshikawa Y, Yamaguchi-Takada Y, Yano T, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sawaiishi Y, Hara T. Alexander disease with mild dorsal brainstem atrophy and infantile spasms. *Brain Dev.* 2012;35:441-444
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. PA の用法特許申請予定

別添資料

# 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（MITO-PYR）

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

版番号：第2版 2012年8月9日

版番号：第3版 2013年1月10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的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。

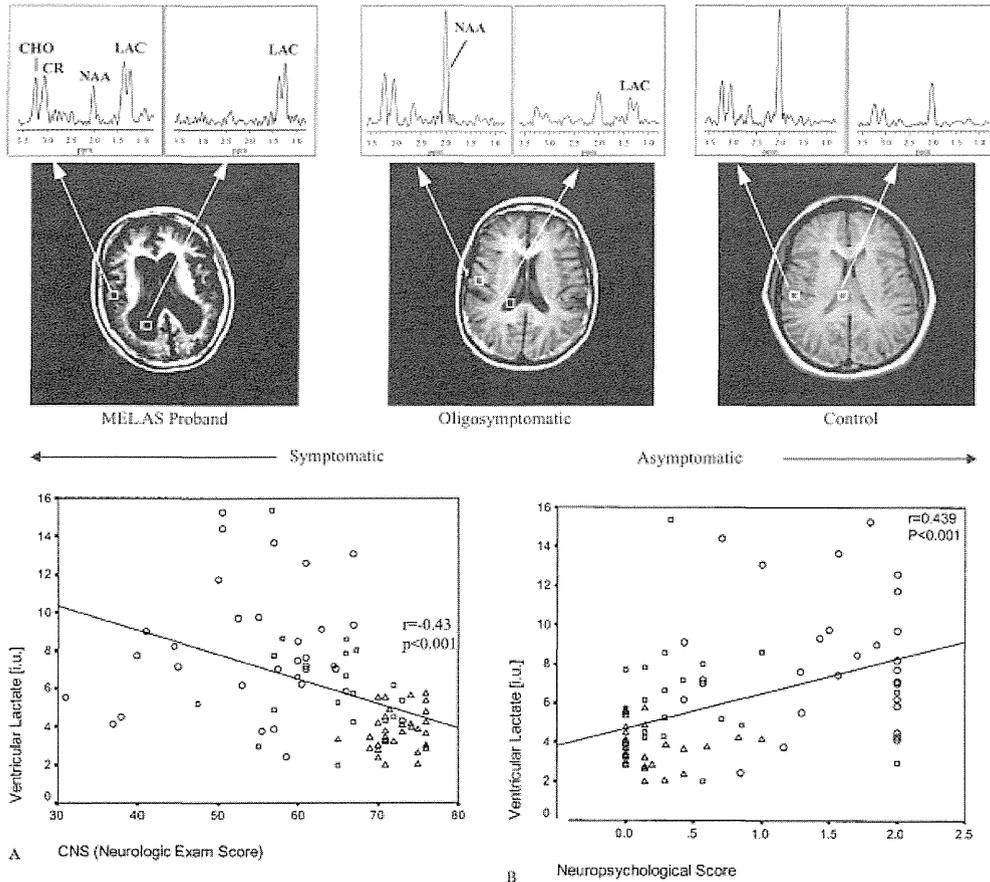
**Table** Columbia Neurological Score (CNS), global neuropsychological score (GNP), MRS ventricular lactate estimates (MRS Lac, in institutional units), venous lactate (V Lac, in mM/L), age (in years), and fasting glucose (Gluc, in mg/dL) in families harboring the A3243G mutation and the A8344G mutation

Clinical group	CNS		GNP		MRS Lac		V Lac		Age		Gluc	
Control group, n = 11	71.5 ± 2.3		0.09 ± 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。

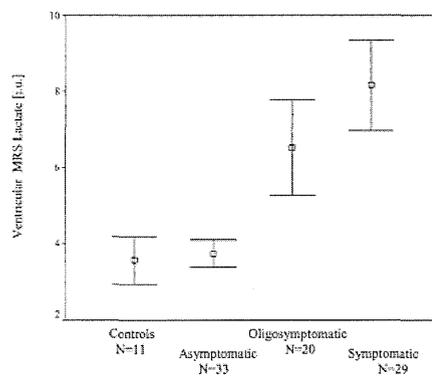


Figure 2. MRS ventricular lactate (expressed in institutional units [i.u.], mean  $\pm$  SEM in institutional units) by clinical group in MELAS/3243 families.

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。

Table 1 Baseline characteristics and follow-up data for patients with MELAS and carrier relatives<sup>a</sup>

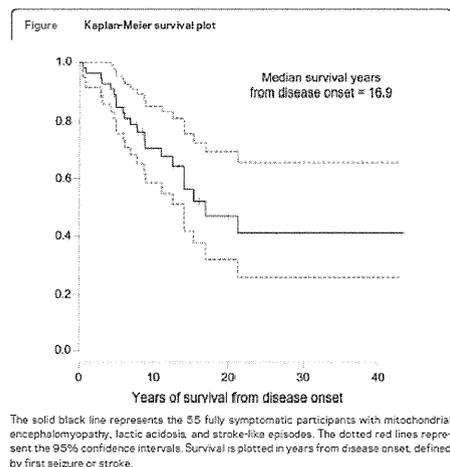
	Gender	Age, y	m.3243A>G mutation, % mutant	Follow-up, y	Age at death, y
Patients with MELAS (n = 32)	48% M/52% F	30 ± 15 (4-61)	26 ± 21 (1-65)	3.8 ± 2.2 (0.25-9)	34.5 ± 19 (1.0-82) (n = 21)
Carrier relatives (n = 54)	28% M/72% F	38 ± 17 (4-76)	19 ± 16 (0-62)	5.5 ± 3 (0.7-10.5)	NA (deaths not related to MELAS; n = 3)

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

<sup>a</sup> Data are mean ± 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±2.2年、キャリアー親戚で5.5±3.0年）をもとに報告した。結果、MELASでは、診察所見、神経精神的検査、日常生活スコア—いづれも、有意に時間経過とともに悪化した。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

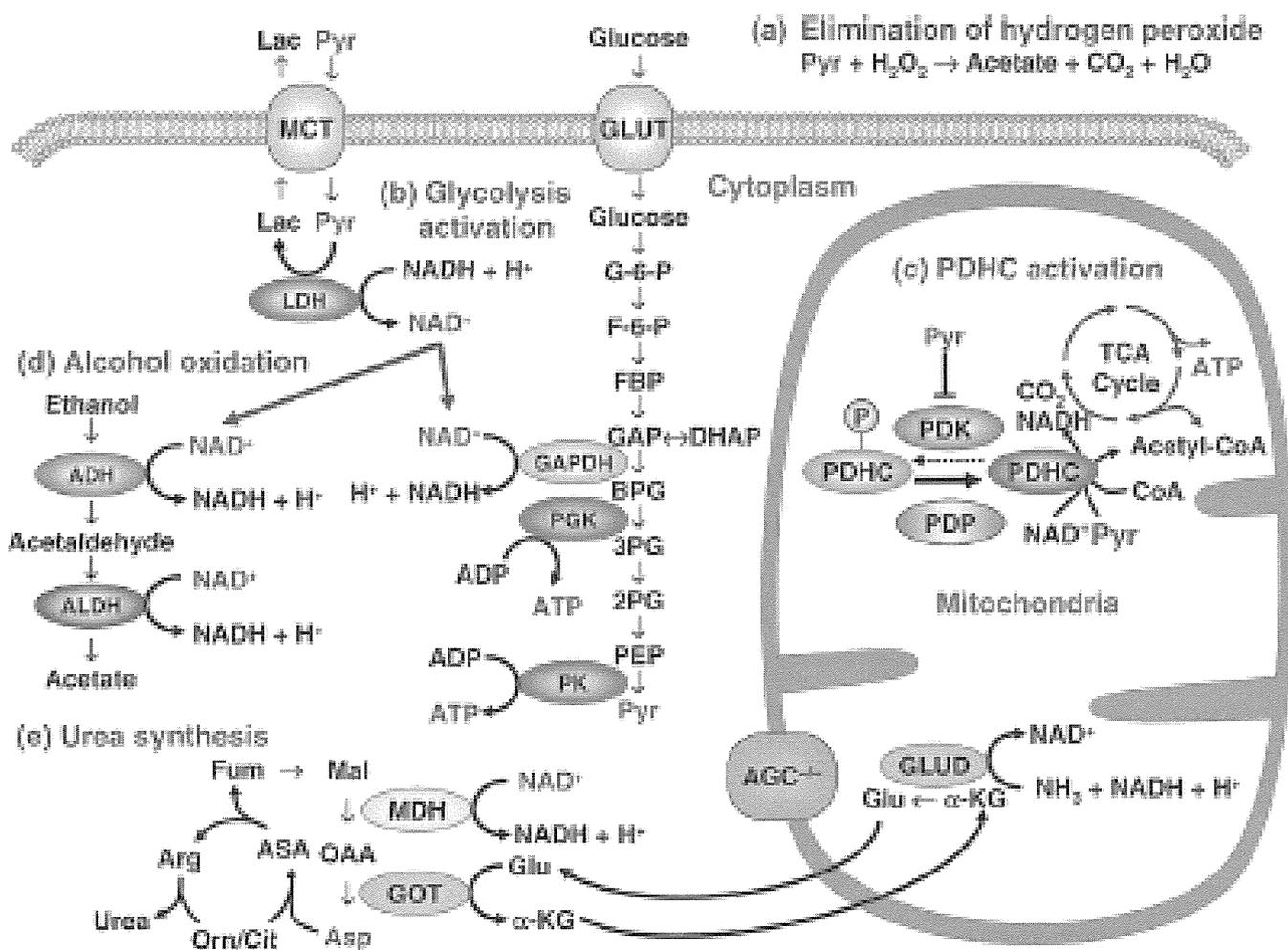
から、タイプ A 型の高乳酸血症の治療には適切ではない。炭酸ナトリウムと炭酸水素ナトリウムの合剤も、炭酸水素ナトリウムと同じ緩衝効果があるが CO<sub>2</sub> 産生を促すものではない。ジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)は、試薬であり、古典的に高乳酸血症に使用されてきたが、乳酸値は低下するものの、臨床的効果は無いと考えられてきた。日本では、ミトコンドリア病の重症型である Liegh 脳症を中心に使用されてきたが、使用開始当初から肝・腎障害のために使用できない症例の報告もあったが大きな副作用報告は成されていなかった<sup>7)</sup>。2006 年になり、MELAS に対する DCA 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。

Letters to the Editor / Mitochondrion 7 (2007) 399–403



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。

③ PDHC 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ルリン欠損症は、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、リンゴ酸からオキサロ酢酸を作る。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サロ酢酸を作る。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  $\text{NAD}^+$  の供給でオキサ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  $\alpha$  ケトグルタール酸は、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添加するだけで、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と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発揮する。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。