

| 検査項目  | ステップ  | 投与群         | Day     | N | Mean   | SD    | Min | Q1     | Median | Q3     | Max  | Skewness | Kurtosis |
|-------|-------|-------------|---------|---|--------|-------|-----|--------|--------|--------|------|----------|----------|
|       |       | 0.5g/kg/Day | Day1    | 6 | 1098.7 | 134.4 | 938 | 960.0  | 1110.5 | 1226.0 | 1247 | -0.2     | -2.4     |
|       |       |             | Day4    | 6 | 1119.2 | 122.1 | 952 | 1077.0 | 1085.0 | 1214.0 | 1302 | 0.4      | 0.0      |
|       |       |             | Day8    | 6 | 1068.2 | 137.1 | 843 | 1014.0 | 1070.5 | 1182.0 | 1229 | -0.7     | 0.5      |
|       |       |             | Day14   | 6 | 975.0  | 131.6 | 793 | 883.0  | 980.5  | 1063.0 | 1150 | -0.1     | -1.1     |
|       |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 1082.5 | 89.9  | 927 | 1063.0 | 1083.5 | 1160.0 | 1178 | -1.0     | 1.3      |
|       |       | 1.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 1054.8 | 152.1 | 848 | 959.0  | 1060.5 | 1109.0 | 1292 | 0.3      | 0.4      |
|       |       |             | Day4    | 6 | 1040.0 | 118.5 | 879 | 947.0  | 1048.0 | 1103.0 | 1215 | 0.1      | -0.2     |
|       |       |             | Day8    | 6 | 1047.8 | 104.3 | 893 | 987.0  | 1056.0 | 1133.0 | 1162 | -0.4     | -1.3     |
|       |       |             | Day14   | 6 | 964.2  | 168.6 | 770 | 841.0  | 962.0  | 989.0  | 1261 | 1.1      | 1.9      |
|       | ステップ2 | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 1057.0 | 142.1 | 856 | 989.0  | 1029.5 | 1208.0 | 1230 | 0.0      | -1.0     |
|       |       | 2.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 1007.5 | 113.2 | 851 | 928.0  | 1020.5 | 1095.0 | 1130 | -0.3     | -2.0     |
|       |       |             | 中止時     | 6 | 883.5  | 140.0 | 726 | 784.0  | 852.5  | 992.0  | 1094 | 0.6      | -1.0     |
|       |       |             | Day14   | 6 | 905.7  | 148.1 | 654 | 875.0  | 906.5  | 994.0  | 1098 | -0.8     | 1.7      |
| PR 間隔 | ステップ1 | 対照群         | スクリーニング | 3 | 169.0  | 9.6   | 162 | 162.0  | 165.0  | 180.0  | 180  | 1.5      |          |
|       |       |             | Day1    | 3 | 167.3  | 9.0   | 158 | 158.0  | 168.0  | 176.0  | 176  | -0.3     |          |
|       |       |             | Day4    | 3 | 170.7  | 9.6   | 162 | 162.0  | 169.0  | 181.0  | 181  | 0.8      |          |
|       |       |             | Day8    | 3 | 175.3  | 7.5   | 168 | 168.0  | 175.0  | 183.0  | 183  | 0.2      |          |
|       |       |             | Day14   | 3 | 170.0  | 8.0   | 162 | 162.0  | 170.0  | 178.0  | 178  | 0.0      |          |
|       |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 166.7  | 15.4  | 144 | 160.0  | 165.5  | 175.0  | 190  | 0.1      | 0.9      |
|       |       | 0.5g/kg/Day | Day1    | 6 | 170.0  | 21.2  | 139 | 155.0  | 173.0  | 179.0  | 201  | -0.1     | 0.3      |
|       |       |             | Day4    | 6 | 176.3  | 20.6  | 152 | 165.0  | 173.5  | 181.0  | 213  | 1.1      | 2.2      |
|       |       |             | Day8    | 6 | 172.2  | 18.9  | 153 | 164.0  | 166.5  | 175.0  | 208  | 1.7      | 3.5      |
|       |       |             | Day14   | 6 | 156.8  | 25.3  | 132 | 139.0  | 150.5  | 167.0  | 202  | 1.3      | 1.7      |
|       |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 159.8  | 18.6  | 132 | 150.0  | 160.0  | 171.0  | 186  | -0.1     | 0.1      |
|       |       | 1.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 167.2  | 15.0  | 145 | 155.0  | 171.0  | 180.0  | 181  | -0.6     | -1.5     |
|       |       |             | Day4    | 6 | 167.0  | 17.7  | 140 | 155.0  | 168.0  | 185.0  | 186  | -0.5     | -0.6     |
|       |       |             | Day8    | 6 | 164.7  | 21.0  | 133 | 151.0  | 168.0  | 184.0  | 184  | -0.6     | -1.3     |

301

| 検査項目   | ステップ  | 投与群         | Day     | N | Mean  | SD   | Min | Q1    | Median | Q3    | Max | Skewness | Kurtosis |
|--------|-------|-------------|---------|---|-------|------|-----|-------|--------|-------|-----|----------|----------|
|        |       |             | Day14   | 6 | 159.7 | 11.8 | 151 | 151.0 | 154.5  | 166.0 | 181 | 1.5      | 1.7      |
|        | ステップ2 | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 177.3 | 32.5 | 142 | 144.0 | 176.5  | 198.0 | 227 | 0.4      | -0.6     |
|        |       | 2.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 186.3 | 50.5 | 143 | 149.0 | 171.5  | 205.0 | 278 | 1.4      | 2.0      |
|        |       |             | 中止時     | 6 | 193.2 | 64.9 | 142 | 155.0 | 172.5  | 197.0 | 320 | 2.0      | 4.3      |
|        |       |             | Day14   | 6 | 163.7 | 20.2 | 146 | 147.0 | 157.5  | 180.0 | 194 | 0.7      | -1.4     |
| QRS 間隔 | ステップ1 | 対照群         | スクリーニング | 3 | 101.3 | 8.1  | 94  | 94.0  | 100.0  | 110.0 | 110 | 0.7      |          |
|        |       |             | Day1    | 3 | 104.0 | 8.5  | 95  | 95.0  | 105.0  | 112.0 | 112 | -0.5     |          |
|        |       |             | Day4    | 3 | 109.0 | 9.8  | 101 | 101.0 | 106.0  | 120.0 | 120 | 1.2      |          |
|        |       |             | Day8    | 3 | 106.3 | 9.5  | 97  | 97.0  | 106.0  | 116.0 | 116 | 0.2      |          |
|        |       |             | Day14   | 3 | 105.0 | 5.3  | 99  | 99.0  | 107.0  | 109.0 | 109 | -1.5     |          |
|        |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 104.8 | 5.4  | 97  | 102.0 | 104.5  | 108.0 | 113 | 0.1      | 0.6      |
|        |       | 0.5g/kg/Day | Day1    | 6 | 104.5 | 7.3  | 92  | 102.0 | 105.5  | 109.0 | 113 | -0.9     | 1.0      |
|        |       |             | Day4    | 6 | 104.7 | 5.2  | 97  | 102.0 | 104.5  | 108.0 | 112 | -0.1     | 0.0      |
|        |       |             | Day8    | 6 | 104.0 | 7.2  | 92  | 100.0 | 105.0  | 111.0 | 111 | -0.9     | 0.4      |
|        |       |             | Day14   | 6 | 104.0 | 7.2  | 93  | 100.0 | 104.0  | 110.0 | 113 | -0.4     | -0.4     |
|        |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 107.2 | 12.6 | 92  | 99.0  | 104.0  | 121.0 | 123 | 0.3      | -1.8     |
|        |       | 1.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 105.2 | 11.2 | 93  | 96.0  | 102.5  | 116.0 | 121 | 0.5      | -1.5     |
|        |       |             | Day4    | 6 | 104.2 | 11.6 | 91  | 96.0  | 101.5  | 116.0 | 119 | 0.3      | -2.1     |
|        |       |             | Day8    | 6 | 104.3 | 9.0  | 96  | 96.0  | 102.0  | 112.0 | 118 | 0.7      | -1.1     |
|        |       |             | Day14   | 6 | 106.5 | 10.7 | 94  | 99.0  | 104.5  | 118.0 | 119 | 0.2      | -2.3     |
|        | ステップ2 | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 106.8 | 9.1  | 97  | 97.0  | 107.5  | 111.0 | 121 | 0.4      | -0.2     |
|        |       | 2.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 107.2 | 7.1  | 101 | 104.0 | 105.0  | 107.0 | 121 | 2.0      | 4.4      |
|        |       |             | 中止時     | 6 | 108.5 | 9.8  | 96  | 99.0  | 110.5  | 112.0 | 123 | 0.1      | -0.3     |
|        |       |             | Day14   | 6 | 108.2 | 10.7 | 95  | 102.0 | 106.5  | 113.0 | 126 | 0.8      | 0.9      |
| QT 間隔  | ステップ1 | 対照群         | スクリーニング | 3 | 410.0 | 13.7 | 395 | 395.0 | 413.0  | 422.0 | 422 | -0.9     |          |
|        |       |             | Day1    | 3 | 425.0 | 3.5  | 421 | 421.0 | 427.0  | 427.0 | 427 | -1.7     |          |
|        |       |             | Day4    | 3 | 411.7 | 16.4 | 393 | 393.0 | 418.0  | 424.0 | 424 | -1.5     |          |

302

| 検査項目   | ステップ  | 投与群         | Day     | N | Mean  | SD   | Min | Q1    | Median | Q3    | Max | Skewness | Kurtosis |
|--------|-------|-------------|---------|---|-------|------|-----|-------|--------|-------|-----|----------|----------|
|        |       |             | Day8    | 3 | 413.0 | 21.0 | 395 | 395.0 | 408.0  | 436.0 | 436 | 1.0      |          |
|        |       |             | Day14   | 3 | 395.3 | 25.1 | 369 | 369.0 | 398.0  | 419.0 | 419 | -0.5     |          |
|        |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 393.7 | 21.5 | 373 | 377.0 | 390.0  | 404.0 | 428 | 0.8      | -0.6     |
|        |       | 0.5g/kg/Day | Day1    | 6 | 421.2 | 28.1 | 388 | 402.0 | 415.5  | 442.0 | 464 | 0.6      | -0.7     |
|        |       |             | Day4    | 6 | 416.5 | 20.8 | 394 | 400.0 | 414.5  | 423.0 | 453 | 1.1      | 1.6      |
|        |       |             | Day8    | 6 | 412.0 | 28.8 | 384 | 389.0 | 404.0  | 431.0 | 460 | 1.0      | 0.2      |
|        |       |             | Day14   | 6 | 396.0 | 27.0 | 367 | 373.0 | 393.0  | 408.0 | 442 | 0.9      | 0.9      |
|        |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 415.5 | 18.7 | 397 | 399.0 | 412.0  | 433.0 | 440 | 0.3      | -2.3     |
|        |       | 1.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 416.0 | 30.7 | 378 | 396.0 | 409.5  | 442.0 | 461 | 0.5      | -0.9     |
|        |       |             | Day4    | 6 | 416.8 | 26.4 | 379 | 401.0 | 414.5  | 440.0 | 452 | 0.0      | -0.6     |
|        |       |             | Day8    | 6 | 419.2 | 17.8 | 398 | 402.0 | 421.0  | 428.0 | 445 | 0.2      | -1.1     |
|        |       |             | Day14   | 6 | 408.2 | 29.5 | 389 | 389.0 | 396.5  | 413.0 | 465 | 1.9      | 3.8      |
|        | ステップ2 | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 402.7 | 22.1 | 370 | 384.0 | 407.0  | 421.0 | 427 | -0.6     | -1.1     |
|        |       | 2.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 407.7 | 26.1 | 364 | 394.0 | 413.0  | 423.0 | 439 | -0.8     | 0.8      |
|        |       |             | 中止時     | 6 | 386.0 | 30.1 | 347 | 359.0 | 391.0  | 396.0 | 432 | 0.2      | 0.0      |
|        |       |             | Day14   | 6 | 398.3 | 29.0 | 349 | 397.0 | 400.5  | 403.0 | 440 | -0.6     | 2.6      |
| QTc 間隔 | ステップ1 | 対照群         | スクリーニング | 3 | 384.7 | 22.4 | 359 | 359.0 | 395.0  | 400.0 | 400 | -1.6     |          |
|        |       |             | Day1    | 3 | 396.3 | 8.5  | 388 | 388.0 | 396.0  | 405.0 | 405 | 0.2      |          |
|        |       |             | Day4    | 3 | 388.3 | 12.7 | 377 | 377.0 | 386.0  | 402.0 | 402 | 0.8      |          |
|        |       |             | Day8    | 3 | 399.3 | 15.5 | 382 | 382.0 | 404.0  | 412.0 | 412 | -1.2     |          |
|        |       |             | Day14   | 3 | 387.7 | 14.3 | 372 | 372.0 | 391.0  | 400.0 | 400 | -1.0     |          |
|        |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 399.8 | 19.3 | 380 | 386.0 | 394.5  | 414.0 | 430 | 0.7      | -0.8     |
|        |       | 0.5g/kg/Day | Day1    | 6 | 402.2 | 13.6 | 391 | 392.0 | 395.5  | 419.0 | 420 | 0.9      | -1.9     |
|        |       |             | Day4    | 6 | 394.3 | 17.7 | 378 | 379.0 | 390.0  | 407.0 | 422 | 0.7      | -0.8     |
|        |       |             | Day8    | 6 | 399.0 | 13.6 | 386 | 389.0 | 393.5  | 414.0 | 418 | 0.8      | -1.7     |
|        |       |             | Day14   | 6 | 401.5 | 13.3 | 383 | 390.0 | 403.0  | 412.0 | 418 | -0.3     | -1.2     |
|        |       | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 399.3 | 18.7 | 368 | 389.0 | 403.5  | 414.0 | 418 | -1.0     | 0.4      |

303

| 検査項目 | ステップ  | 投与群         | Day     | N | Mean  | SD   | Min | Q1    | Median | Q3    | Max | Skewness | Kurtosis |
|------|-------|-------------|---------|---|-------|------|-----|-------|--------|-------|-----|----------|----------|
|      |       | 1.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 405.8 | 19.3 | 375 | 395.0 | 408.0  | 419.0 | 430 | -0.6     | 0.3      |
|      |       |             | Day4    | 6 | 408.8 | 13.0 | 389 | 403.0 | 408.0  | 418.0 | 427 | -0.2     | 0.3      |
|      |       |             | Day8    | 6 | 409.8 | 17.9 | 377 | 405.0 | 414.0  | 421.0 | 428 | -1.5     | 2.6      |
|      |       |             | Day14   | 6 | 417.3 | 21.1 | 391 | 399.0 | 415.5  | 439.0 | 444 | 0.1      | -1.6     |
|      | ステップ2 | PYRNA       | スクリーニング | 6 | 392.8 | 23.4 | 362 | 369.0 | 398.5  | 414.0 | 415 | -0.4     | -2.2     |
|      |       | 2.0g/kg/Day | Day1    | 6 | 406.0 | 11.1 | 394 | 397.0 | 403.5  | 418.0 | 420 | 0.4      | -2.2     |
|      |       |             | 中止時     | 6 | 411.8 | 23.9 | 378 | 391.0 | 415.0  | 433.0 | 439 | -0.4     | -1.4     |
|      |       |             | Day14   | 6 | 420.2 | 20.8 | 382 | 413.0 | 427.0  | 431.0 | 441 | -1.5     | 2.6      |

304

表 12.5-10 心エコーの要約；反復投与パート

| 検査項目   | ステップ   | 投与群    | Day               | N     | Mean  | SD    | Min  | Median | Max   |      |
|--------|--------|--------|-------------------|-------|-------|-------|------|--------|-------|------|
| LVEDd. | ステップ 1 | 対照薬    | Day-1             | 3     | 50.27 | 7.22  | 43.4 | 49.60  | 57.8  |      |
|        |        |        | Day4              | 3     | 49.33 | 5.95  | 43.3 | 49.50  | 55.2  |      |
|        |        |        | Day8              | 3     | 47.90 | 9.21  | 39.0 | 47.30  | 57.4  |      |
|        |        |        | PYRNA 0.5g/kg/Day | Day-1 | 6     | 50.53 | 2.42 | 47.0   | 51.70 | 53.0 |
|        |        |        |                   | Day4  | 6     | 50.17 | 3.06 | 46.6   | 50.65 | 54.4 |
|        |        |        |                   | Day8  | 6     | 49.55 | 2.85 | 46.0   | 49.85 | 53.8 |
|        |        |        | PYRNA 1.0g/kg/Day | Day-1 | 6     | 48.77 | 4.90 | 41.3   | 49.50 | 54.3 |
|        |        |        |                   | Day4  | 6     | 48.90 | 4.68 | 41.0   | 49.40 | 53.6 |
|        |        |        |                   | Day8  | 6     | 48.98 | 3.14 | 44.0   | 49.15 | 53.0 |
|        |        | ステップ 2 | PYRNA 2.0g/kg/Day | Day-1 | 6     | 50.32 | 3.34 | 45.7   | 50.30 | 54.0 |
|        |        |        |                   | 中止時   | 6     | 48.85 | 2.56 | 45.5   | 48.95 | 52.8 |
|        | LVESd. | ステップ 1 | 対照薬               | Day-1 | 3     | 8.93  | 0.75 | 8.2    | 8.90  | 9.7  |
| Day4   |        |        |                   | 3     | 8.30  | 0.72  | 7.5  | 8.50   | 8.9   |      |
| Day8   |        |        |                   | 3     | 8.17  | 1.11  | 7.0  | 8.30   | 9.2   |      |
|        |        |        | PYRNA 0.5g/kg/Day | Day-1 | 6     | 8.05  | 0.74 | 7.0    | 7.95  | 9.2  |
|        |        |        |                   | Day4  | 6     | 7.98  | 0.90 | 7.0    | 8.10  | 9.2  |
|        |        |        |                   | Day8  | 6     | 8.28  | 0.80 | 7.0    | 8.35  | 9.1  |
|        |        |        | PYRNA 1.0g/kg/Day | Day-1 | 6     | 8.63  | 0.95 | 7.3    | 8.65  | 9.8  |
|        |        |        |                   | Day4  | 6     | 8.47  | 0.82 | 7.0    | 8.90  | 9.0  |
|        |        |        |                   | Day8  | 6     | 8.82  | 0.94 | 7.3    | 8.95  | 10.0 |
|        |        | ステップ 2 | PYRNA 2.0g/kg/Day | Day-1 | 6     | 7.95  | 0.46 | 7.3    | 7.95  | 8.5  |
|        |        |        |                   | 中止時   | 6     | 8.70  | 1.20 | 7.5    | 8.55  | 10.8 |
| LVSD.  |        | ステップ 1 | 対照薬               | Day-1 | 3     | 8.93  | 0.75 | 8.2    | 8.90  | 9.7  |
|        | Day4   |        |                   | 3     | 8.30  | 0.72  | 7.5  | 8.50   | 8.9   |      |
|        | Day8   |        |                   | 3     | 8.17  | 1.11  | 7.0  | 8.30   | 9.2   |      |

305

| 検査項目 | ステップ   | 投与群               | Day               | N                 | Mean  | SD    | Min  | Median | Max   |      |
|------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|------|--------|-------|------|
|      |        | PYRNA 0.5g/kg/Day | Day-1             | 6                 | 8.05  | 0.74  | 7.0  | 7.95   | 9.2   |      |
|      |        |                   | Day4              | 6                 | 7.98  | 0.90  | 7.0  | 8.10   | 9.2   |      |
|      |        |                   | Day8              | 6                 | 8.28  | 0.80  | 7.0  | 8.35   | 9.1   |      |
|      |        |                   | PYRNA 1.0g/kg/Day | Day-1             | 6     | 8.63  | 0.95 | 7.3    | 8.65  | 9.8  |
|      |        |                   |                   | Day4              | 6     | 8.47  | 0.82 | 7.0    | 8.90  | 9.0  |
|      |        |                   |                   | Day8              | 6     | 8.82  | 0.94 | 7.3    | 8.95  | 10.0 |
|      |        | ステップ 2            | PYRNA 2.0g/kg/Day | Day-1             | 6     | 7.95  | 0.46 | 7.3    | 7.95  | 8.5  |
|      |        |                   |                   | 中止時               | 6     | 8.70  | 1.20 | 7.5    | 8.55  | 10.8 |
|      | LVPWd. | ステップ 1            | 対照薬               | Day-1             | 3     | 8.87  | 0.72 | 8.4    | 8.50  | 9.7  |
|      |        |                   |                   | Day4              | 3     | 8.27  | 0.49 | 7.7    | 8.50  | 8.6  |
|      |        |                   |                   | Day8              | 3     | 8.43  | 0.40 | 8.0    | 8.50  | 8.8  |
|      |        |                   |                   | PYRNA 0.5g/kg/Day | Day-1 | 6     | 7.97 | 0.80   | 6.8   | 8.10 |
| Day4 |        |                   |                   |                   | 6     | 8.28  | 0.84 | 7.0    | 8.15  | 9.4  |
| Day8 |        |                   |                   |                   | 6     | 8.12  | 0.53 | 7.3    | 8.00  | 8.8  |
|      |        |                   | PYRNA 1.0g/kg/Day | Day-1             | 6     | 8.40  | 0.72 | 7.3    | 8.75  | 9.1  |
|      |        |                   |                   | Day4              | 6     | 8.58  | 0.49 | 8.0    | 8.75  | 9.0  |
|      |        |                   |                   | Day8              | 6     | 8.65  | 0.51 | 7.7    | 8.80  | 9.1  |
|      |        | ステップ 2            | PYRNA 2.0g/kg/Day | Day-1             | 6     | 7.83  | 0.60 | 7.3    | 7.75  | 8.9  |
|      |        |                   |                   | 中止時               | 6     | 8.67  | 1.02 | 7.4    | 8.55  | 10.5 |
| EF   |        | ステップ 1            | 対照薬               | Day-1             | 3     | 65.10 | 3.30 | 63.0   | 63.40 | 68.9 |
|      | Day4   |                   |                   | 3                 | 68.07 | 3.44  | 64.1 | 70.00  | 70.1  |      |
|      | Day8   |                   |                   | 3                 | 65.70 | 1.21  | 65.0 | 65.00  | 67.1  |      |
|      |        |                   | PYRNA 0.5g/kg/Day | Day-1             | 6     | 64.32 | 3.14 | 60.5   | 64.70 | 68.3 |
|      |        |                   |                   | Day4              | 6     | 65.57 | 3.10 | 61.8   | 65.65 | 70.4 |
|      |        |                   |                   | Day8              | 6     | 64.00 | 3.05 | 60.2   | 63.25 | 67.7 |
|      |        |                   | PYRNA 1.0g/kg/Day | Day-1             | 6     | 64.25 | 2.24 | 61.2   | 65.00 | 67.1 |
|      |        |                   |                   | Day4              | 6     | 69.35 | 3.17 | 63.7   | 69.95 | 72.4 |

306

## 12. 6. 安全性の結論

### (1) 単回投与パート

軽度の一つ以上の有害事象を発現した被験者の人数は、ステップ 1 (PYRNA 0.08g/kg) では 4 名 66.7% (下痢 1 名、硬便 1 名、消化管運動過剰 3 名、異常感 1 名、血中ブドウ糖増加 1 名、血中尿酸増加 1 名、発疹 1 名)、ステップ 2 (PYRNA 0.17g/kg) では 2 名 33.3% (下痢 1 名、血中尿酸増加 1 名)、ステップ 3 (PYRNA 0.33g/kg) では 6 名 100% (腹痛 1 名、下痢 5 名、嘔吐 1 名、消化管運動過剰 1 名、頭痛 2 名、緊張性頭痛 1 名)、ステップ 4 (PYRNA 0.66g/kg) では 6 名 100% (下痢 6 名、倦怠感 1 名、食欲減退 1 名、感覚鈍麻 1 名) であった。中等度あるいは重度の有害事象に分類した有害事象は発現しなかった。これら軽度と評価された有害事象は全て、投与終了後に回復したものの、治験薬との因果関係を否定できないことから副作用とされた。

副作用のうち、ステップ 1 (PYRNA 0.08g/kg) とステップ 2 (PYRNA 0.17g/kg) では下痢 1 名 (16.7%) であった。これに対して、ステップ 3 (PYRNA 0.33g/kg) 及びステップ 4 (PYRNA 0.66g/kg) においては被験者 6 名全員に一つ以上の胃腸障害の副作用が発現し、ステップ 3 では下痢が 5 名 (83.3%)、ステップ 4 では下痢が 6 名 (100.0%) 発現したことから、器官別大分類の胃腸障害は PYRNA の用量依存的に発現増加する傾向があると考えられた。重篤な有害事象及び死亡例は報告されなかった。また、有害事象による試験中止はなかった。

以上より、PYRNA の用量をステップ 1 の 0.08g/kg から公比 2 で 4 段階、ステップ 4 の 0.66g/kg まで漸増させた場合、副作用の胃腸障害発生を基準にして、最大耐用量はステップ 2 の PYRNA 0.17g/kg、無毒性量はステップ 1 の 0.08g/kg より下と考えられた。

### (2) 食事の影響の評価パート

軽度の一つ以上の有害事象を発現した被験者の人数は、空腹時投与 (PYRNA 0.17g/kg) が 3 名 50.0% (下痢 3 名)、食後投与 (PYRNA 0.17g/kg) は 4 名 66.7% (下痢 1 名、消化管運動過剰 2 名、血中ビリルビン増加 1 名、尿中ケトン体陽性 1 名) であった。食後投与の 1 名に発現した血中ビリルビン増加、尿中ケトン体陽性は、治験薬投与との因果関係なしと評価された。その他に発現したいずれの有害事象も投与終了後に回復したが、治験薬との因果関係を否定できないことから副作用とされた。中等度あるいは重度に分類した有害事象は、空腹時投与ならびに食後投与ともに無かった。

副作用のうち、器官別大分類の胃腸障害が空腹時投与及び食後投与ともに 3 名 (50.0%) で発現したが、両群間でその他には顕著な差は認められなかった。重篤な有害事象及び死亡例は報告されなかった。また、有害事象による試験中止はなかった。

### (3) 反復投与パート

ステップ 1 で軽度の一つ以上の有害事象を発現した被験者の人数は、PYRNA 0.5g/kg/day 投与群が 2 名 33.3% (事象 PT の内容は下痢 1 名、アラニンアミノトランスフェラーゼ増加 1 名)、PYRNA 1.0g/kg/day 投与群は 6 名 100.0% (事象の内容は眼瞼浮腫 2 名、下痢 6 名、末梢性浮腫 1 名、ヘモグロビン減少 1 名) であった。いずれも投与終了後に回復したが、治験薬との因果関係を否定できないことから副作用とされた。中等度あるいは重度に分類した有害事象は発現しなかった。

307

| 検査項目 | ステップ   | 投与群               | Day   | N | Mean  | SD   | Min  | Median | Max  |
|------|--------|-------------------|-------|---|-------|------|------|--------|------|
|      | ステップ 2 | PYRNA 2.0g/kg/Day | Day 8 | 6 | 67.08 | 3.20 | 62.0 | 67.55  | 70.7 |
|      |        |                   | Day-1 | 6 | 67.40 | 4.17 | 61.3 | 68.40  | 71.8 |
|      |        |                   | 中止時   | 6 | 66.70 | 6.33 | 58.6 | 65.10  | 77.4 |
| FS   | ステップ 1 | 対照薬               | Day-1 | 3 | 35.83 | 2.25 | 34.2 | 34.90  | 38.4 |
|      |        |                   | Day 4 | 3 | 38.10 | 2.71 | 35.0 | 39.30  | 40.0 |
|      |        |                   | Day 8 | 3 | 36.07 | 0.55 | 35.5 | 36.10  | 36.6 |
|      |        | PYRNA 0.5g/kg/Day | Day-1 | 6 | 35.25 | 2.31 | 32.5 | 35.45  | 38.4 |
|      |        |                   | Day 4 | 6 | 36.22 | 2.37 | 33.3 | 36.30  | 40.0 |
|      |        |                   | Day 8 | 6 | 34.98 | 2.30 | 32.2 | 34.55  | 37.8 |
|      |        | PYRNA 1.0g/kg/Day | Day-1 | 6 | 35.13 | 1.91 | 32.7 | 35.70  | 37.6 |
|      |        |                   | Day 4 | 6 | 39.12 | 2.42 | 34.9 | 39.60  | 41.2 |
|      |        |                   | Day 8 | 6 | 37.28 | 2.62 | 33.2 | 37.65  | 40.4 |
|      | ステップ 2 | PYRNA 2.0g/kg/Day | Day-1 | 6 | 37.68 | 3.20 | 33.0 | 38.60  | 41.1 |
|      |        |                   | 中止時   | 6 | 37.22 | 5.14 | 31.1 | 35.85  | 46.2 |

ステップ1の各被験者に安全性上問題となる所見は認められないと評価されたことから、治験実施計画の手順に従い、ステップ2のPYRNA 2.0g/kg/day投与を実施した。その結果、Day-1投与終了後に有害事象器官別大分類の胃腸障害が6名(100.0%)、一般・全身障害及び投与部位の状態が3名(50.0%)、神経系障害が3名(50.0%)認められ、治験薬との因果関係を否定できないことから副作用と評価された。そのため、被験者の安全性上問題ありと判断し、全6名の治験が中止された。なお、発現したいずれの事象も投与終了後に回復した。

PYRNA用量と副作用発現の評価では、ステップ1のPYRNA 0.5g/kg/day投与群では下痢の発現が1名(16.7%)であったが、PYRNA 1.0g/kg/day投与群では被験者6名全員(100.0%)に下痢が発現した。加えて、引き続き実施したステップ2 PYRNA 2.0g/kg/day投与群では、Day-1投与終了後に6名全員(100.0%)に下痢が発現したことから、器官別大分類の胃腸障害はPYRNAの用量依存的に発現増加する傾向があると考えられた。

以上より、反復投与における最大耐用量はPYRNA 0.5g/kg/dayと考えられた。

- 4) 臨床検査値に関しては、各パートで検査項目の各測定時点での記述統計量を算出した。また、検査項目ごとに、個々の被験者のDay1投与前の値をX軸、投与終了翌日の値をY軸にプロットした散布図を作成した。その結果、本治験において発現した臨床検査値異常は、全て軽微な変動であり臨床意義がないものと判断された。
- 5) バイタルサイン、体重推移(反復投与パート)、12誘導心電図、心エコー(反復投与パート)の記述統計量を評価した結果、各血圧、脈拍数、体温、体重(反復投与パート)、12誘導心電図及び心エコー(反復投与パート)において特記すべき変動は認められなかった。

### 13. 考察と全般的結論

#### 13.1. 薬物動態に関して

##### (1) 単回投与パート

1群の被験薬投与6名、対照薬投与2名で、PYRNAの用量をステップ1(0.08g/kg)、ステップ2(0.17g/kg)、ステップ3(0.33g/kg)、ステップ4(0.66g/kg)、用量公比2の漸増法で空腹時単回投与した。血漿中薬物濃度の薬物動態パラメータは、ステップ1では  $AUC_{0-t} = 0.911 \text{ hr} \cdot \text{mg/dL}$ 、 $C_{\max} = 0.422 \text{ mg/dL}$ 、 $T_{\max} = 0.653 \text{ hr}$ 。ステップ2では  $AUC_{0-t} = 0.560 \text{ hr} \cdot \text{mg/dL}$ 、 $C_{\max} = 0.765 \text{ mg/dL}$ 、 $t_{\max} = 0.833 \text{ hr}$ 。ステップ3では  $AUC_{0-t} = 0.651 \text{ hr} \cdot \text{mg/dL}$ 、 $C_{\max} = 0.752 \text{ mg/dL}$ 、 $t_{\max} = 0.833 \text{ hr}$ 。ステップ4では  $AUC_{0-t} = 3.210 \text{ hr} \cdot \text{mg/dL}$ 、 $C_{\max} = 1.883 \text{ mg/dL}$ 、 $t_{\max} = 0.611 \text{ hr}$ であった。

次に、PYRNA投与量を漸増した場合の血漿中PYRNA濃度と投与量との関係の評価を目的で求めた散布図ならびに線形回帰分析では、 $AUC_{0-t}$ に関して、 $\alpha = -2.589$ 、 $\beta = 0.827$ (両側90%信頼区間 0.423-1.232)、相関係数  $r = 0.5993$ で正の相関であった。 $AUC_{0-inf}$ に関しては  $n=9$ となってしまうが、 $\alpha = 0.918$ 、 $\beta = 0.086$ (両側90%信頼区間 -0.818-0.989)、相関係数  $r = -0.0676$ であった。 $C_{\max}$ に関しては、 $\alpha = -1.970$ 、 $\beta = 0.599$ (両側90%信頼区間 0.336-0.862)、相関係数  $r = 0.6403$ で正の相関を認めた。

以上より、PYRNAの単回投与により投与量を0.08g/kgから0.66g/kgまで公比2の4段階で漸増させた場合に、 $AUC_{0-t}$ と $C_{\max}$ は用量依存的な増加傾向が認められたが、相関は強くなかった。これは、内因性のピルビン酸血中濃度が高く、またその変動も大きいため、測定値を投与前値で補正した血漿中PYRNA濃度が、低投与量群では血漿中PYRNA濃度を正確に反映していないためと考えられる。

また、ステップ2(PYRNA 0.17g/kg)で治験薬投与後の尿中・糞中薬物濃度の記述統計量を求めた結果では、投与前  $A_e = 4.016 \text{ mg}$ 、 $A_e \% = 0.0378 \%$ 、 $CL_R = 0.4748 \text{ dL/hr}$ 、 $A_f = 0.027 \text{ mg}$ 、 $A_f \% = 0.0003 \%$ となり、投与後  $A_e = 2.635 \text{ mg}$ 、 $A_e \% = 0.0253 \%$ 、 $CL_R = 0.3211 \text{ dL/hr}$ 、 $A_f = 0.050 \text{ mg}$ 、 $A_f \% = 0.0005 \%$ であった。PYRNAの尿中及び糞中への排泄は極めて少ないことが認められた。したがって、経口投与されたPYRNAはほぼ全量が吸収されることが示唆された。

##### (2) 食事の影響の評価パート

空腹時先行投与群と食後先行投与群の2群各3名のクロスオーバー法で、食事の影響の評価を行った。その結果、空腹時投与群の血漿中濃度は緩やかに上昇し、 $AUC_{0-t} = 0.518 \text{ hr} \cdot \text{mg/dL}$ 、 $C_{\max} = 0.283 \text{ mg/dL}$ 、 $t_{\max} = 2.167 \text{ hr}$ であった。食後投与群では、血漿中濃度は投与後直ちに上昇して、 $AUC_{0-t} = 2.294 \text{ hr} \cdot \text{mg/dL}$ 、 $C_{\max} = 0.845 \text{ mg/dL}$ 、 $t_{\max} = 0.083 \text{ hr}$ であった。

一方、食事条件間での各パラメータの比(空腹時投与/食後投与)は、 $AUC_{0-t} = 1.75046$ 、 $C_{\max} = 0.53604$ 、 $T_{\max} = 26.00000$ であった。各パラメータの平均値から求めた食事の影響の結果と異なり、 $AUC_{0-t}$ は食事により減少するが、 $C_{\max}$ は増大している。個々の薬物動態パラメータ(表11.4.1.2-3)によると、 $AUC_{0-t}$ と $C_{\max}$ の食事による影響が逆転しているケースが6例中2例あり、その差が大きいため、平均値をも逆転していることが認められる。このことも内因性のピルビン酸の濃度が高く、変動も大きいことが原因していると考えられる。また、 $AUC_{0-t}$ の大きな上昇は、ピルビン酸の吸収促進か、食事時のピルビン酸の影響かが考察されるところであるが、糞中ピルビン酸排泄量は少ないことから、空腹時においてもPYRNAのほとんどは吸収さ

れていることが示唆されていることから、食事中的ピルビン酸の影響であることが推察される。

以上を総合して、PYRNAの血漿中薬物動態は食事の影響を受け、空腹時投与に比べ、食後投与でAUC<sub>0-4</sub>及びC<sub>max</sub>は増大、t<sub>max</sub>は短縮することが確認された。

### (3) 反復投与パート

ステップ1の対照薬投与3名、PYRNA 0.5 g/kg/day投与6名、PYRNA 1.0 g/kg/day投与6名で、1日3回食後7日間反復投与を行った。その結果、PYRNA 0.5 g/kg/day投与群 Day-1のAUC<sub>0-4</sub>=1.596 hr\*mg/dL、C<sub>max</sub>=1.320 mg/dL、t<sub>max</sub>=0.306 hr、Day-7のAUC<sub>0-4</sub>=1.816 hr\*mg/dL、C<sub>max</sub>=1.135 mg/dL、t<sub>max</sub>=0.306 hrであった。一方、PYRNA 1.0 g/kg/day投与群では、Day-1のAUC<sub>0-4</sub>=1.682 hr\*mg/dL、C<sub>max</sub>=0.918 mg/dL、t<sub>max</sub>=0.333 hr、Day-7のAUC<sub>0-4</sub>=1.777 hr\*mg/dL、C<sub>max</sub>=0.857 mg/dL、t<sub>max</sub>=0.333 hrであった。

また、血漿中PYRNA濃度のトラフ値(C<sub>min</sub>)について、被験者ごとにDay7とDay1~Day6との比を算出(表11.4.1.3-4)し、その記述統計量を算出(表11.4.1.3-5)したが、バラツキも大きく一定の傾向は見られなかった。

さらに、PYRNA反復投与による体内蓄積性に関しては、血漿中PYRNA濃度のトラフ値(C<sub>min</sub>)を確認し、さらに血漿中PYRNA濃度のC<sub>max</sub>及びAUC<sub>0-4</sub>について、被験者ごとにDay7とDay1との比(Day7/Day1)を算出し、蓄積係数を求めた。その結果、トラフ値(C<sub>min</sub>)の増加は認められず、さらにPYRNA 0.5 g/kg/day投与群ではC<sub>max</sub>の比は平均0.85317、AUC<sub>0-4</sub>の比は平均1.10922、PYRNA 1.0 g/kg/day投与群ではC<sub>max</sub>の比は平均0.93910、AUC<sub>0-4</sub>の比は平均1.06795となった。

以上より、1日3回食後投与の7日間反復投与において、ステップ1の両投与量群で、血漿中のPYRNAが蓄積されるかどうかを、C<sub>max</sub>、AUC<sub>0-4</sub>を比較した結果、PYRNAの蓄積は認められなかった。

なお、ステップ1投与終了後に実施したステップ2のPYRNA 2.0 g/kg/day投与群では、Day-1投与後24時間目に6名全員が治験中止となったため、薬物動態パラメータについては、Day-1についてのみ算出した。その結果、AUC<sub>0-4</sub>=3.115 hr\*mg/dL、C<sub>max</sub>=1.323 mg/dL、T<sub>max</sub>=0.569 hrであった。

## 13.2. 臨床薬理に関して

### (1) 単回投与パート

血漿中乳酸濃度の平均値推移は、ステップ1(PYRNA 0.08g/kg)、ステップ2(PYRNA 0.17g/kg)、ステップ3(PYRNA 0.33g/kg)およびステップ4(PYRNA 0.66g/kg)の各群で、PYRNA投与後1hrから1.5hrにかけて上昇して最高値を示し、2hr以降は減少し始めて、24hr値ではPre値に近い値に回復した。しかしながら、各ステップの対照薬投与群においても、投与後2hr以降に血漿中乳酸濃度が上昇して最高値を示す傾向がみられたことから、被験薬投与群の血漿中乳酸濃度の推移がPYRNAに影響したものであるかどうか明確にはならなかった。

血漿中乳酸濃度と血漿中PYRNA濃度の比であるL/P比の推移に関しては、各ステップともにPYRNA投与後4hrから8hrにかけて最大値を示す傾向であった。しかしながら、各ステップの対照薬投与群においても、投与後2hr以降に上昇して最高値を示す傾向がみられたことから、被験薬投与群の血漿中乳酸濃度の推移がPYRNAに影響したものであるかどうか明確にはならなかった。

血漿中ケトン体比に関しては、各ステップともにPYRNA投与群と対照薬投与群の両群ともに、投与後8hrに上昇して最高値を示したことから、血漿中ケトン体濃度がPYRNA投与の影響によるものかどうかは明確にはならなかった。Na濃度、K濃度、Cl濃度に関しては、各ステップともに臨床上重要な変動は認められなかった。

### (2) 反復投与パート

血漿中乳酸濃度の平均値推移ならびにL/P比は、ステップ1(PYRNA 0.5g/kg/day)及びステップ1(PYRNA 1.0g/kg/day)の両群で、7日間の連続投与期間をとおして重要な変動は認められなかった。ステップ2においても、治験中止になるDay-2のpre値測定までの期間で、重要な変動は認められなかった。このことから、健常被験者においては、PYRNA投与による解糖系賦活化の影響で血漿中乳酸濃度が異常変動することはなかった。ケトン体比、Na濃度、K濃度、Cl濃度に関しては各ステップともに臨床上重要な変動は認められなかった。

## 13.3. 安全性に関して

### (1) 単回投与パート

ステップ1(PYRNA 0.08g/kg)とステップ2(PYRNA 0.17g/kg)では、副作用と評価された下痢の発現がそれぞれ1名(16.7%)であった。これに対して、ステップ3(PYRNA 0.33g/kg)及びステップ4(PYRNA 0.66g/kg)においては被験者6名全員に一つ以上の胃腸障害の副作用が発現し、ステップ3では下痢が5名(83.3%)、ステップ4では下痢が6名(100.0%)発現した。この結果から、器官別大分類の胃腸障害はPYRNAの用量依存的に発現増加する傾向があると考えられた。重篤な有害事象及び死亡例は報告されなかった。また、有害事象による試験中止はなかった。

以上より、PYRNA用量を公比2の4段階増法で、ステップ1の0.08g/kgからステップ4の0.66g/kgまで投与したところ、副作用の胃腸障害発生を基準にして、最大耐用量はステップ2のPYRNA 0.17g/kg、無毒性量はステップ1の0.08g/kgより下と考えられた。

### (2) 食事の影響の評価パート

副作用としては器官別大分類の胃腸障害が、空腹時投与及び食後投与ともに3名(50.0%)で発現したが、両群間でその他には顕著な差は認められなかった。重篤な有害事象及び死亡例は報告されなかった。また、有害事象による試験中止はなかった。

### (3) 反復投与パート

PYRNA用量と副作用発現の評価では、ステップ1(PYRNA 0.5g/kg/day)投与群では下痢の発現が1名(16.7%)であったが、ステップ1(PYRNA 1.0g/kg/day)投与群では被験者6名全員(100.0%)に下痢が発現した。その結果、器官別大分類の胃腸障害はPYRNAの用量依存的に発現増加する傾向があると考えられた。

一方、ステップ1の各被験者に安全性上問題となる所見は認められないと評価されたことから実施したステップ2(PYRNA 2.0g/kg/day)投与群では、Day-1投与終了後に有害事象器官別大分類の胃腸障害が6名(100.0%)、一般・全身障害及び投与部位の状態が3名(50.0%)、神経系障害が3名(50.0%)発現した。これらの有害事象は、治験薬との因果関係を否定できないことから副作用と評価された。そのため、被験者の安全性上問題ありと判断し、全6名

の治験が中止された。なお、発現したいずれの事象も投与終了後に回復した。

以上より、反復投与における最大耐用量は PYRNA 0.5g/kg/day と考えられた。

- 4) 臨床検査値に関しては、各パートで検査項目の各測定時点での記述統計量を算出した。また、検査項目ごとに、個々の被験者の Day1 投与前の値を X 軸、投与終了翌日の値を Y 軸にプロットした散布図を作成した。その結果、本治験において発現した臨床検査値異常は、全て軽微な変動であり臨床上意義がないものと判断された。
- 5) バイタルサイン、体重推移（反復投与パート）、12 誘導心電図、心エコー（反復投与パート）の記述統計量を評価した結果、各血圧、脈拍数、体温、体重（反復投与パート）、12 誘導心電図及び心エコー（反復投与パート）において特記すべき変動は認められなかった。

#### 13.4. 全般的結論

本治験は新規な製剤であるPYRNAの単回投与、食事の影響の評価、および反復投与時の薬物動態、臨床薬理ならびに安全性を確認することを目的に計画した。

薬物動態評価の単回投与では、用量0.08g/kg、0.17g/kg、0.33g/kg、0.66g/kg の公比2の4群で漸増、空腹時投与を実施した結果、AUC<sub>0-4</sub> と C<sub>max</sub> は用量依存的に増加することを確認した。

食事の影響の評価では、0.17g/kg用量を空腹時及び食後に単回投与した結果、空腹時投与に比べ食後投与でAUC<sub>0-4</sub> 及びC<sub>max</sub> は増大、T<sub>max</sub> は短縮した。

反復投与では、0.5g/kg/day 及び1.0g/kg/day の分3、1日3回食後7日間投与した結果、両投与量群で、トラフ値の増加及び血漿中のピルビン酸の蓄積は認められなかった。

安全性では、胃腸障害（下痢）の発現が、PYRNA の用量に依存して増加する傾向が認められた。単回投与では、副作用（下痢）発現の頻度を基に、最大耐用量はステップ2のPYRNA 0.17g/kg、無毒性量はステップ1の0.08g/kgより下と考えられた。食事の影響の評価では、PYRNA 0.17g/kgの空腹時単回投与及び食後単回投与ともに3名（50.0%）の胃腸障害（下痢）が発現したが、両群間でその他副作用発現には臨床的に問題となる重要な差は認められなかった。反復投与では、胃腸障害（下痢）が用量依存的に発現増加する傾向が認められた。従って、薬物動態評価で血漿中PYRNAの蓄積は認められない点を考慮して、反復投与における最大耐用量はPYRNA 0.5g/kg/dayと考えられた。

臨床検査値及びバイタルサインに関しては、臨床的重要な変動は認められなかった。

#### 14. 本文中には含めないが、引用する表、図及びグラフ

本治験で取得したデータのうち、統計解析計画書に基づき作成した人口統計学的データ、有効性データ、安全性データおよび有害事象の表示に関する図表ならびにグラフは、全て10章、11章、12章に記載し、生データ一覧表を16章に付録として記載した。また、本治験では死亡例を含む重篤な有害事象、重要な有害事象は認められなかったため、安全性に関する図表、グラフ、一覧表、叙述事項、被験者ごとの臨床検査異常値一覧表は全て12章に記載し、生データ一覧表を16章に付録として記載した。

##### 14.1. 人口統計学的データ

##### 14.2. 有効性データ

##### 14.3. 安全性データ

##### 14.3.1. 有害事象の表示

##### 14.3.2. 死亡、その他の重篤な有害事象及び他の重要な有害事象の一覧表

##### 14.3.3. 死亡、その他の重篤な有害事象及び他の特に重要な有害事象の叙述

##### 14.3.4. 被験者ごとの個々の臨床検査異常値の一覧表

## 15. 引用文献の一覧表

- 1) 厚生労働科学研究費小児疾患臨床研究事業（小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対する L-アルギニンおよびジクロ酢酸療法の効果判定と分子病態を踏まえた新しい治療法開発に関する臨床研究）研究班。ミトコンドリア病パンフレット。2005年3月。
- 2) Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, et al. MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta-general* 2012;1820:619–24.
- 3) 壘中征哉。臨床のための筋病理。第3版増補。日本医事新報社；2005。
- 4) Kaufmann P, Shungu DC, Sano MC, et al. Cerebral lactic acidosis correlates with neurological impairment in MELAS. *Neurology* 2004;62:1297–302.
- 5) Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, et al. Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype. *Neurology* 2011;77:1965–71.
- 6) Luft FC. Lactic acidosis update for critical care clinicians. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:S15–9.
- 7) Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, et al. Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology* 2006;66:324–30.
- 8) Tanaka M, Nishigaki Y, Fuku N, Ibi T, Sahashi K, Koga Y. Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 2007;7:399–401.
- 9) Saito K, Kimura N, Oda N, et al. Pyruvate therapy for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta-general* 2012;1820:632–6.
- 10) Koga Y, Povalko N, Katayama K, et al. Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation in PDH E1 $\alpha$  gene. *Brain Dev* 2012;34:87–91.
- 11) Komaki H, Nishigaki Y, Fuku N, et al. Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:313–5.
- 12) Wu IC, Ohsawa I, Fuku N, Tanaka M. Metabolic analysis of <sup>13</sup>C-labeled pyruvate for noninvasive assessment of mitochondrial function. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1201:111–20.
- 13) 厚生労働省医薬局審査管理課長通知。医薬品の臨床薬物動態試験。平成13年6月1日付け医薬審発第796号。
- 14) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Clinical Review Template. Attachment B: Clinical Safety Review of an NDA or BLA. (<http://www.fda.gov/cder/guidance>)
- 15) Ioannidis JPA, Evans SJW, Gøtzsche PC, et al. Better reporting of harms in randomized trials: An extension of the CONSORT statement. *Ann Intern Med* 2004;141:781–8.
- 16) Friedman LM, Furberg CD, DeMets DL. *Fundamentals of clinical trials*. 4th ed. New York: Springer;2010.

## 16. 付録

### 16.1. 治験に関する情報

- 16.1.1. 治験実施計画書及びその検討
- 16.1.2. 症例記録用紙の見本
- 16.1.3. 治験審査委員会の一覧表（確認が行われた年月日、並びに医院の氏名及び職名）、被験者への説明文書及び同意書の見本
- 16.1.4. 治験責任医師及び他の重要な治験参加者の一覧表及び説明
- 16.1.5. 治験総括（調整）医師又は治験依頼者の医学責任者の署名
- 16.1.6. 治験に用いられたロットごとの薬剤を投与された被験者の一覧表
- 16.1.7. 無作為化の方法及びコード（被験者の識別及び割り付けられた治療）
- 16.1.8. 監査手順に関する資料、監査証明書
- 16.1.9. 統計手法に関する文書
- 16.1.10. 臨床検査に関して施設間の標準化及び品質保証を行った方法と手順に関する文書
- 16.1.11. 治験に基づく公表文献
- 16.1.12. 総括報告書で引用された重要な公表文献

### 16.2. 被験者データ一覧表

- (1) 被験者背景一覧
- (2) 中止一覧
- (3) 血中ビルビン酸濃度一覧
- (4) 薬物動態パラメーター一覧
- (5) 臨床薬理評価項目血中濃度一覧
- (6) 有害事象一覧
- (7) 重篤な有害事象一覧
- (8) 臨床検査値一覧
- (9) 臨床検査値異常変動一覧
- (10) バイタルサイン一覧
- (11) 12誘導心電図一覧
- (12) 心エコー一覧

#### 16.2.1. 中止症例

- 16.2.2. 治験実施計画書から逸脱した症例
- 16.2.3. 有効性の解析から除外された症例
- 16.2.4. 人口統計学的データ
- 16.2.5. 服薬遵守及び薬物濃度データ
- 16.2.6. 個々の有効性反応データ
- 16.2.7. 被験者ごとの有害事象一覧表

### 16.3. 症例報告書

- 16.3.1. 死亡、その他の重篤な有害事象発現例及び有害事象による投与中止例の症例報告書
- 16.3.2. 提出された他の症例報告書



# 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）  
分担研究報告書

ミトコンドリア脳筋症の生化学的スクリーニング法の開発に関する研究

研究分担者 村山 圭 千葉県こども病院代謝科 部長

研究要旨

ミトコンドリア病は新生児期から成人まで幅広く発症するエネルギー産生異常に基づく遺伝性疾患であり、その頻度は 5000 人に 1 人ともいわれている。ピルビン酸ナトリウムはミトコンドリア病における高乳酸血症に基づく病態を改善させる生化学的合理性に基づいた数少ない薬剤である。本研究において、今年度も引き続き患者エントリー・患者サンプリングに関わった。全国から依頼のあったミトコンドリア病疑い症例に対して酵素診断を行うことで本症の診断を行った。また当院でミトコンドリア病と診断し外来フォローしている 6 症例（今年度は 1 人加わった）にピルビン酸ナトリウムの投与を行い、その効果をみた。体重増加や動きの増加に加え MELAS 症例は高乳酸血症が改善するなど投薬の効果が認められた。

**A. 研究目的**

ミトコンドリア病 (MRCD) は少なくとも 5000 人に 1 人の割合で発症する、最も頻度の高い先天代謝異常症であり、その症状、臨床病型は多彩である。これまで有効な治療法がない小児難病である。本研究の目的は、MRCD の酵素診断を確実にし、新しい治療として出てきたピルビン酸ナトリウム（以下ピルビン酸 Na）治療へと結びつけて行くことである。

**B. 研究対象と方法**

**診断について**

本研究で対象とした症例は、Bernier らの MRCD 診断基準において“可能性例 (possible)”以上を満たした症例である。平成 27 年 12 月末現在、日本全国の臨床医（主に小児科医）の協力により、合計 1268 症例から 1964 検体（皮膚線維芽細胞 968 検体、肝臓 409 検体、筋肉 404 検体、心臓 183 検体）の

提供を頂いた。臨床症状は、新生児致死性高乳酸血症から Leigh 脳症、慢性肝不全を呈する肝型ミトコンドリア DNA 枯渇症候群など多岐にわたる。試料は、組織については  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存された肝や筋肉の一片をホモジナイズし、600G にて遠心後の上清を用いた。また皮膚線維芽細胞については、ミトコンドリア分画を単離したあと、界面活性剤であるドデシルマルトシドまたは Triton X によって可溶化し行った。酵素活性は分光光度計を用い、光化学的に呼吸鎖 I, II, III, IV 及び対象としてクエン酸合成酵素 (Citrate Synthase; CS) を測定した。呼吸鎖酵素活性は CS 及び Complex II との相対比で表し、対照 12 人の平均に対する % で示した。

Blue-native PAGE 解析は 4~13% 濃度勾配ゲルを用いて展開し、イムノプロット法を用いて呼吸鎖複合体の量と大きさを解析した。呼吸鎖複合体に対する各種モノクロ

ーナル抗体を用いて行った。

#### ピルビン酸 Na について

前述の診断法にて診断された 6 症例について、ピルビン酸 Na の投与を行った。本年度は 1 人新規症例として加わった。投与量は 0.25—0.5kg/kg/day で行い、体重増加に伴い量の調整を行った。

#### 倫理面への配慮

検体検査にあたっては、患者さんご家族に十分説明した上で、千葉県こども病院倫理委員会において承認された検査同意書・承諾書を頂いた後に行った。

### C. 研究結果

#### 診断数

今年度は全国の小児科医から 261 例の検査依頼を受け付けた(断った症例は一例もない)。受け付けた検体は、皮膚線維芽細胞 197 例、筋肉 73 例、肝臓 106 例、心筋 73 例であった。そのうち MRCD と診断した症例は 66 例であった。診断された 66 例のうち、神経筋疾患及び突然死症例がそれぞれ 21 例、乳児ミトコンドリア病が 7 例、肝症 11 例、心筋症が 6 例、突然死症例が 21 例であった。酵素診断では Complex I 欠損症 36 例、Complex II 欠損症 2 例、Complex IV 欠損症 6 例、複合型酵素欠損症 19 例であり、mtDNA 解析のみで診断に至ったものは 3 例であった。これまでにサンプルを提供して頂いた 1268 症例のうち、402 症例(33%)を、MRCD と診断した。各年度別の診断数を図 1 に示したが、年々増加の一途を辿っている。また各臨床診断を図 2 に示す。この中で、神経疾患(Leigh 脳症、MELAS などのサイトパチー、神経変性疾患)は全体の 41%を占めた。

図 1. 年度別 MRCD 診断数

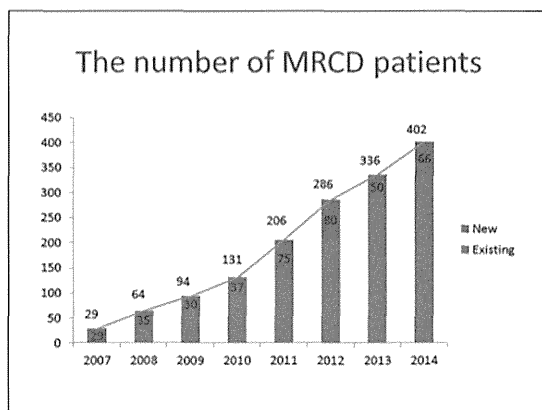
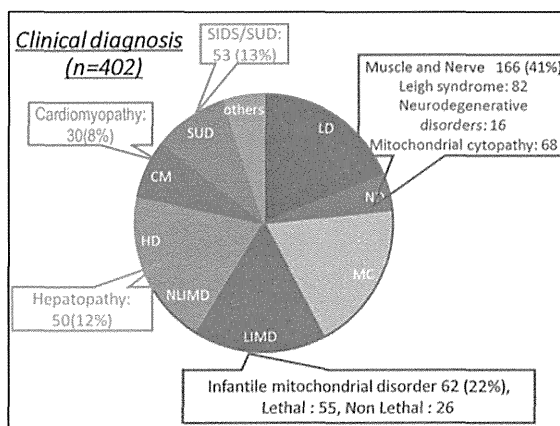


図 2 MRCD の臨床分類別の症例数



ピルビン酸Naが投与された 6 例の患者概要を図 3 に示す。平均年齢が 8.3 歳で投与期間は約 197 日だった。診断の内訳は Leigh 脳症が 3 例、MELAS が 2 例、PDHC 欠損症が 1 例である。多くの症例でけいれんや呼吸のコントロールがしやすくなり、身体を動かしやすくなるなどの機能改善も認めた(図 4)。一方、副作用として下痢が認められた症例があったが増悪せず投薬を続行できた。

図 3 ピルビン酸Na投与の患者概要

| 患者概要               |                      |
|--------------------|----------------------|
| 【症例数】              | 6【今回の対象期間】           |
| 2013/2/4～2015/3/20 |                      |
| 【患児平均年齢】           | 8.3才 (1Y11M～18Y7M)   |
| 【平均投与期間】           | 479 日 (min65～max659) |
| 【ピルビン酸Na投与量】       | 0.5g/kg/日 分3         |

図 4 ピルビン酸 Na 投与 6 症例のまとめ

| 6症例のまとめ  |
|--|
| 【臨床経過】   |
| けいれん・呼吸コントロールは多くの症例で出来ており、身体を動かしたりやすくなった等身体機能の改善もみられる。 |
| 2症例で約9か月で10%以上体重増加を認める。                                |
| 乳酸値の改善は認めないが、臨床症状の改善がみられる症例があった。                       |
| 副作用としては、下痢が多い  |
| 【L/D】  |
| 乳酸:いずれも高値。緩徐な減少例認める。                                   |
| L/Pratio:②(PDHC欠損症)以外は比較的高値                            |
| 期間を通じて、変化乏しく、改善は見られない                                  |
| AKBR:いずれの症例も正常値0.7以上                                   |
| 投与期間を通じて、肝細胞障害は認められない                                  |
| Ala:高アラニン血症改善見られる症例もあるが、まちまち                           |

新規症例に関して患者プロフィールおよび経過を図 5・6 に示す。本症例は典型的な MELAS であり、投与後に症状は改善しているものの、を乳酸値や LP 比、AKBR、血中アラニンなどのバイオマーカーの改善は認めなかった(図 7)。

図 5・6 新規患者 (MELAS 症例) のプロフィール・経過

### 症例 男児 13Y2M

#### 【診断】 MELAS

5歳より嘔吐発作みられ、10歳時に脳卒中様発作で診断にいたった。血液にてA3243G遺伝子変異あり

#### 【患者背景】

父:日本人、母:中国人。父の仕事のため中国に長期滞在。一部介助を要するが自力歩行可能。

併存症:てんかん、糖尿病、難聴、皮質盲、知的退行

#### 【ピルビン酸Na治療開始前の処方】

アルギニン、イーケブラ、ミトコンドリアカクテル (VitB1,VitC,VitH, VitE,CoQ,カルニチン)⇒ピルビン酸Na 9g分3 毎食後追加

【治療開始年齢】 13Y1M

#### 【経過】

12Y11M(開始前2か月)より間代性けいれんが頻発

Day0 脳卒中発作あり、ピルビン酸Na開始。

Day1 部分発作にミダゾラム持続投与

Day4 下痢の出現ないことを確認しピルビン酸Naを9⇒18gに増量

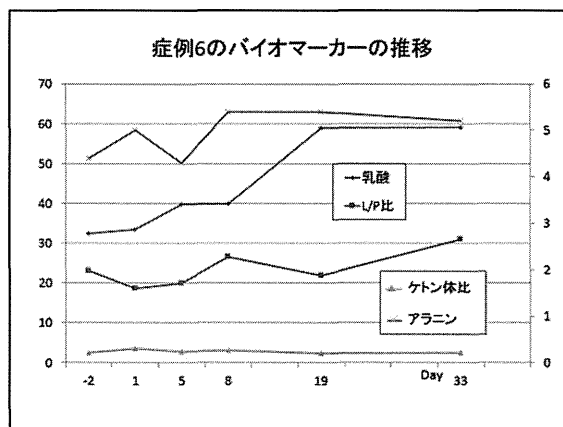
Day5 ミダゾラムよりマイスタンに変更

治療開始時体重33kg、開始後1か月で1kgの体重増加あり。

Day63現在 発作なく全身状態安定している。

ピルビン酸使用開始後、血液データの改善はみられなかった。部分発作はみられるものの、頻発していた間代性けいれんはみられなくなった。

図 7 バイオマーカーの推移



#### D. 考察

MRCDC は、非常に多い先天代謝異常症であり、発症年齢も様々である。酵素診断から包括的遺伝子診断といった診断システムの確立は、早期治療にも結びつくことになり、非常に重要である。今年度から厚生労働科学

研究委託費(難治性疾患実用化研究事業)の「ミトコンドリア病診療の質を高める、レジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究」班(主任研究者:村山)が立ち上がり、診療指針の策定、レジストリ策定、特殊診断システムの確立を柱にしている。このシステムからピルビン酸ナトリウムなどの新しい知見への組み込みは、非常に重要なことである。また、ピルビン酸Naを投与したケースは大きな副作用なく投与できている。有意なバイオマーカーの改善はみられなかったが、ご両親の主観的な要因による肯定的な評価もみられた。特に呼吸サポートやけいれんコントロールの改善は客観的な評価であり、それなりの効果が認められたといえることができる。FGF21やGDF15などの有用なバイオマーカーの普及が待たれる。

#### E. 結論

本年も引き続きミトコンドリア病の生化学診断を行い、ピルビン酸ナトリウム投与へのエントリーを行った。ピルビン酸NaはMRCDにおいて明らかな臨床的効果を認めており、本剤を含めた新しい治療薬の開発が待たれる。効果を明らかにさせるためには新しいバイオマーカーによる評価が必要である。

以上に関連した論文として、2015年3月までに文献1-9)を公表した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Brea-Calvo G, Haack TB, Karall D, Ohtake A, Invernizzi F, Carrozzo R, Kremer L, Dusi S, Fauth C, Scholl-Bürgi S, Graf E, Ahting U, Resta N, Laforgia N, Verrigni D, Okazaki Y, Kohda M, Martinelli D, Freisinger P, Strom TM, Meitinger T, Lamperti C, Lacson A, Navas P, Mayr JA, Bertini E, Murayama K, Zeviani M, Prokisch H, Ghezzi D. COQ4 Mutations Cause a Broad Spectrum of Mitochondrial Disorders Associated with CoQ10 Deficiency. *Am J Hum Genet.* 2015 Feb 5;96(2):309-17. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.12.023.
2. Kopajtich R, Nicholls TJ, Rorbach J, Metodiev MD, Freisinger P, Mandel H, Vanlander A, Ghezzi D, Carrozzo R, Taylor RW, Marquard K, Murayama K, Wieland T, Schwarzmayer T, Mayr JA, Pearce SF, Powell CA, Saada A, Ohtake A, Invernizzi F, Lamantea E, Sommerville EW, Pyle A, Chinner PF, Crushell E, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Assouline Z, Rio M, Feillet F, Mousson de Camaret B, Chretien D, Munnich A, Menten B, Sante T, Smet J, Régál L, Lorber A, Khoury A, Zeviani M, Strom TM, Meitinger T, Bertini ES, Van Coster R, Klopstock T, Rötig A, Haack TB, Minczuk M, Prokisch H. Mutations in GT PBP3 Cause a Mitochondrial Translation Defect Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy, Lactic Acidosis, and Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2014 Dec 4;95(6):708-20. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.10.017. Epub 2014 Nov 26
3. Kunii M, Doi H, Higashiyama Y, Kugimoto C, Ueda N, Hirata J, Tomita-Katsumoto A, Kashikura-Kojima M, Kubota S, Taniguchi M, Murayama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, Tanaka F. A Japanese case of cerebellar ataxia, spastic paraparesis and deep sensory impairment associated with a novel homozygous TTC19 mutation. *J Hum Genet.* 2015 Feb 5. doi: 10.1038/jhg.2015.7. [Epub ahead of print]
4. Montassir H, Maegaki Y, Murayama K, Yamazaki T, Kohda M, Ohtake A, Iwasa H, Yatsuka Y, Okazaki Y, Sugiura C, Nagata I, Toyoshima M, Saito Y, Itoh M, Nishino I, Ohno K. Myocerebrohepatopathy spectrum disorder due to POLG mutations: A clinicopathological report. *Brain Dev.* doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.013. [Epub ahead of print]
5. Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y, Nakachi Y, Matoba N, Sakai T, Yamazaki

- T, Harashima H, Murayama K, Hattori K, Hayashi J, Yamagata T, Fujita Y, Ito M, Tanaka M, Nibu K, Ohtake A, Okazaki Y. New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014 May;1(5):361-9. doi: 10.1002/acn3.59. Epub 2014 Apr 28.
6. Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet*. 2014 Sep 18. doi: 10.1038/jhg.2014.79. [Epub ahead of print]
7. Fujii T, Nozaki F, Saito K, Hayashi A, Nishigaki Y, Murayama K, Tanaka M, Koga Y, Hiejima I, Kumada T. Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: a semi-quantitative clinical evaluation study. *Mol Genet Metab*. 2014 Jun;112(2):133-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.04.008. Epub 2014
8. Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr;1840(4):1355-9. doi: 10.1016/j.bbagen. 2014.

#### 邦文

- 1) 村山 圭 テーマ：IV消化器疾患 ミトコンドリア肝症 小児疾患診療のための病態生理1改訂第5版 「小児内科」「小児外科」編集委員会共編 東京医学社 692-696
- 2) 村山 圭 各論：肝胆道疾患、II胆汁うっ滞 ミトコンドリア肝疾患 小児栄養消化器肝臓病学 日本小児栄養消化器肝臓学会編集 診断と治療社 432-434, 2014
- 3) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2) ミトコンドリア呼吸鎖異常症  
a) Complex I (ミトコンドリア呼吸鎖複合体I) 欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 201-204, 2014
- 4) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2) ミトコンドリア呼吸鎖異常症  
b) Complex II(ミトコンドリア呼吸鎖複合体II) 欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 205-208, 2014

- 5) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2) ミトコンドリア呼吸鎖異常症  
c) Complex III (ミトコンドリア呼吸鎖複合体III) 欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 209-212, 2014
- 6) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2) ミトコンドリア呼吸鎖異常症  
d) Complex IV (ミトコンドリア呼吸鎖複合体IV) 欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 213-216, 2014
- 7) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2) ミトコンドリア呼吸鎖異常症  
e) Complex V (ミトコンドリア呼吸鎖複合体V) 欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 217-220, 2014

#### 2. 学会発表

Murayama K et al. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Exome sequencing for disease genes identification 欧州先天代謝異常学会 2014.9.5 インスブルック

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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

研究分担者 齋藤 伸治 名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野 教授

研究要旨

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有効性と安全性を評価することを目的としてピルビン酸ナトリウム治療法を8名のミトコンドリア病患者に実施し、長期経過を検討した。対象はMELAS症候群4例、Leigh症候群2例、複合体I, III, IV欠損症1例、PDHC欠損症1例である。年齢は1歳から21歳であり、性別は男2名、女6名である。高乳酸血症（20mg/dl以上）は5例であった。ピルビン酸療法は投与量0.5g/kgにて開始した。4名が中止となった。理由は、効果不十分が2名、下痢の副作用と効果不十分が1例、本人が内服を嫌がる1例であった。それ以外の副作用として特別なものはなかった。MELASの1例では、活動性は改善したが、心筋症の悪化が見れた。

A. 研究目的

ミトコンドリア病に対する保険収載された薬物は未だに存在しない。ピルビン酸ナトリウムはミトコンドリア病の細胞モデルにおいて細胞死を防ぐ効果があることが示され、先行する臨床研究において、乳酸の軽減効果と臨床的有效性が報告されている。現在、ピルビン酸ナトリウムを用いた医師主導治験が企画されているが、すべてのミトコンドリア病が対象とはならない。また、ミトコンドリア病は進行性の疾患であり、治験開始まで待てない患者様が存在する。そこで、今回私たちは、ミトコンドリア病8例を対象として、ピルビン酸ナトリウム治療法の有効性と安全性を評価する臨床研究を開始した。第1例の開始から2年が経過したので、長期経過について報告する。

B. 研究方法

対象とした患者は、MELAS 4名（m.3243A>G変異3例、不明1例）、Leigh症候群2名（m.3687G>A変異1名、不明1名）、複合体I, III, IV欠損症1例、ピルビン酸脱水素酵素（PDHC）欠損症である。年齢は1歳～21歳、男2名、女6名である。

ピルビン酸ナトリウムは一日量0.5g/kgを毎食後に内服とし、最大1g/kgまで増量可とした。下痢の副作用を防ぐために、ピルビン酸ナトリウム3.3gに対して200ml程度の水で薄めて内服するように指導した。

評価については、ミトコンドリア病の重症度スコアおよびNPMDS(The Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale)を利用して判定した。開始前、投与開始1, 2, 3, 6, 12か月後に臨床症状と血液ガス、血中乳酸、ピルビン酸、血漿アミノ酸の評価を行う予定とした。副作用チェックとしてNa, K, Cl, Ca, ALT, AST, BUN, Cre, ALP, LDH, CK, TP, Glu, 血算ならびにアンモニアを測定

する。心臓エコー検査、心電図は開始前と3-6か月ごとに評価、脳MRI、脳波は開始前と開始後1-2か月に評価する予定とした。

（倫理面への配慮）

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会の承認を受け、解析にあたっては、ご家族から書面による同意を得た。

C. 研究結果

治療継続期間は平均17か月である。現在4例が中止となった。中止例について記す。1例目はLeigh脳症の6歳女児である。明らかな副作用はなかったが、効果の実感が得られず、親の希望にて1年で中止となった。2例目はMELASの17歳男性である。本例では下痢の副作用を認め、明確な効果もみられなかったために、8か月で中止となった。3例目はPDHC欠損症の5か月女児である。本例では内服開始後活動性が改善する印象をご家族がもたれたが、本人が内服を嫌がるようになり、10か月で中止となった。4例目はMELASの7歳男児である。重症度スコア、MRI病変ともに悪化があり、11か月で中止となった。

4例では現在も継続している。その中で、MELASの7歳女児は活動性の改善により、ご家族が継続を希望されているが、心筋症による心機能は次第に悪化しており、心機能の改善効果はみられていない。

長期継続例では活動性の改善をご家族が評価する機会が多く、また、副作用はみられていない。

D. 考察

倫理審査委員会の審査と承認を受けて、平成24年9月からピルビン酸ナトリウム治療研究を開始した。開始から2年経過した所で、8名中4名が中止

を希望された。服薬中止の理由は明確な効果がみられなかったことである。副作用が問題となったのは下痢の1例のみであった。この例においても下痢の程度は強くなかったものの、明らかな効果がなかったこともあり、中止となった。また、PDHC欠損例では乳児が服薬を嫌がることで継続が困難になった。このように、少ないとはいえ、下痢の副作用と飲みづらさについては改善が求められる。しかし、それ以上に家族が服薬の継続を実感できるほどの効果が得られなかったことが主要な中止要因であった。

継続を続けている4例においては、ご家族は活動性の改善を評価して、服薬継続を希望されている。臨床スコアに反映されるような程度の改善はみられていないが、活動性の改善は多くのかたが述べられており、共通した効果である可能性がある。継続の1例では、しかし、活動性は改善したが、心機能は持続的に低下し、改善効果はみられていない。ピルビン酸の副作用とは考えづらいが、改善効果は認められなかった。

治療中止例の4例はいずれも治療開始前の血中乳酸値がそれ程たかくなかった。また、臨床的重症度は高めであった。明確な効果が得られなかった理由のひとつとして、血中乳酸値があまり高くなかったことが考えられる。乳酸値が高い例のほうが、乳酸低下が得られ、その結果としての臨床効果が実感されるのかもしれない。一方、多少の副作用はあったものの、著明な悪化や退行はみられず、長期投与においてもピルビン酸療法自体の安全性は高いと考えられた。

## E. 結論

ピルビン酸ナトリウム治療法を8名のミトコンドリア病患者に実施し、長期経過を検討した。この経験は、来るべき医師主導治験でのプロトコールに反映される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Goto M, Saito Y, Honda R, Saito T, Sugai K, Matsuda Y, Miyatake C, Takeshita E, Ishiyama A, Komaki H, Nakagawa E, Sasaki M, Uto C, Kikuchi K, Motoki T, Saitoh S. Episodic tremors representing cortical myoclonus are characteristic in Angelman syndrome due to UBE3A mutations. *Brain Dev* 37:216-222, 2015.
- 3) Negishi Y, Hattori A, Takeshita E, Sakai C, Ando N, Ito T, Goto Y-I, Saitoh S. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. *J Hum Genet* 59: 405-407, 2014.
- 4) Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Yanagihara K, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K. KIF1A mutation in a patient with progressive neurodegeneration. *J Hum Genet*

59:639-641, 2014.

- 5) Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Shimizu A, Torii C, Kanemura Y, Kosaki K. Targeted next-generation sequencing in the diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* [Epub ahead of print]
- 6) Negishi Y, Miya F, Hattori A, Mizuno K, Hori I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in *NFLA* causes brain malformation and urinary tract defects. *Hum Genome Var* 2:15007, 2015.

## 2. 学会発表

- 1) Yutaka Negishi, Ayako Hattori, Ikumi Hori, Naoki Ando, Fuyuki Miya, Tsunoda Tatsuhiko, Nobuhiko Okamoto, Mitsuhiro Kato, Mami Yamasaki, Yonehiro Kanemura, Kenjiro Kozaki, Shinji Saitoh. Truncating mutation of *NFLA* causes a brain malformation and urinary tract defect. 64th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Diego, USA, 10/18-21/20
- 2) 根岸豊、堀いくみ、服部文子、安藤直樹、齋藤伸治、水野健太郎、宮冬樹、角田達彦、岡本伸彦、加藤光広、山崎麻美、金村米博、小崎健次郎 *NFLA* 遺伝子変異は1p32-p31欠失症候群の中核症状を規定する 第59回日本人類遺伝学会 平成26年11月20-22日(東京)
- 3) 横井摂理、石原尚子、夏目淳、堤真紀子、大江瑞恵、加藤武馬、稲垣秀人、柳原格、齋藤伸治、倉橋浩樹 水無脳症を呈した *TUBA1A* 遺伝子異常の一例 第59回日本人類遺伝学会 平成26年11月20-22日(東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



難治性ミトコンドリア病患者4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

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学小児科 教授

研究要旨

難治性ミトコンドリア病4症例にピルビン酸ナトリウムを投与した。筋力を中心に病像改善の印象は強く、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。今後NPMDsなど種々の臨床評価スケールによる評価を継続し、バイオマーカー等を含めた客観的評価も行って行きたい。

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者399家系403例をミトコンドリア呼吸鎖異常症(MRCD)と診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く88例、次いでLeigh脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が53例、腸症、その他と極めて多岐にわたっていた。210例についてミトコンドリア遺伝子解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を59例(28%)に同定した。つまり7割のMRCDは核遺伝子異常と考えられた。142例についてエキソーム解析が終了し、まず25例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、*BOLA3*, *ACAD9*, *EFTu*異常患者等が含まれる。次いで10例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に52例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。

研究協力者

荒尾 正人（埼玉医科大学小児科）

A. 研究目的

前段ではピルビン酸ナトリウムを投与した難治性ミトコンドリア病4症例の経過を報告する。次いで後段ではミトコンドリア病に対する酵素診断に始まる系統的病因探索システムの構築について報告する。

B. 研究方法

【対象】ピルビン酸ナトリウムは以下の3症例に投与した。①易感染性と発達遅滞を主訴に1歳前に発病した、3243A>G変異を持つMELAS/Leighオーバーラップ症候群男児、②1歳前に退行で発病しG14439A (ND6:P to S)変異を持つLeigh脳症の女兒。③胎児期から脳質拡大を指摘されていたPDHCE1 $\alpha$ 遺伝子に8塩基挿入変異を持つLeigh脳症の女兒。④3歳時に言語発達遅滞を指摘され、6歳児にけいれん群発で発症した14453A>G変異を持つMELASの8歳の女兒。

病因解析システムは、1,240家系1,270症例から得た2078検体（皮膚線維芽細胞977検体、肝臓426検体、筋肉418検体、心臓198検体、腎臓45検体、脳10検体など）を対象とした。

【方法】ピルビン酸ナトリウムは病院倫理委員会の承認の下、保護者より文書での同意をいただき、0.5mg/kg/日で経口投与する。

系統的病因解析システムは以下の項目から成る。

1) Blue Native 電気泳動を用いたWestern Blotとin gel enzyme stain、およびin vitro酵素アッセイ

を用いた呼吸鎖酵素複合体蛋白レベルの解析。2) サンガーシーケンス法や次世代シーケンス法によるミトコンドリアDNA全塩基配列の解析。3) ミトコンドリアDNA枯渇症候群 (mitochondrial DNA depletion syndrome: MTDPs) 疑い例については、定量的PCR (qPCR)による診断確定後、サンガーシーケンス法による頻度の高い11種類の原因遺伝子解析。4) 以上で病因が判明しない症例に対する次世代シーケンス法を用いた全エキソーム解析。

（倫理面への配慮）

本研究の患者解析の部分は申請番号482（現在更新されて482-IX）で埼玉医科大学倫理委員会における審査を受け承認を得て行った。遺伝子解析研究についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）および、医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン（日本医学会2011年2月）に基づいて行い、さらにこれとは別に各研究機関の倫理審査委員会において承認を得て行った。

C. 研究結果

ピルビン酸ナトリウム投与により筋力を中心に病像改善の印象は強く、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。今後NPMDsなど種々の臨床評価スケールによる評価を継続し、バイオマーカー等を含めた客観的評価も行って行きたい。

現在までのところ、399家系403例をMRCDと診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多

く 88 例、次いで Leigh 脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が 53 例、腸症、その他と極めて多岐にわたっていた。

210 例についてミトコンドリア遺伝子解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を 59 例 (28%) に同定した。つまり 7 割の MRCD は核遺伝子異常と考えられた。

142 例についてエキソーム解析が終了し、まず 25 例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、*BOLA3*, *ACAD9*, *EFTu* 異常患者等が含まれる。次いで 10 例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に 52 例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。

以上の結果を元に可能性のある薬物についても検討を行った。その結果、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) が一部の患者細胞の ATP 合成能を回復し、その機序は主に呼吸鎖 III と IV の活性回復であることを確認した。

#### D. 考察

何れの症例も自発運動、筋力の改善を認め、治療による副作用は認めなかった。NPMDSなどは現在集計中である。ピルビン酸ナトリウム投与は、ミトコンドリア病に対する有望な治療ではあるが、その評価法については検討の余地がある。

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も、今後例数を増やして検討を重ね、日本と世界の症例の趨勢の比較等も行っていきたい。

#### E. 結論

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者につき、ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) の系統的な診断解析を行い、核の新規遺伝子スクリーニングシステムを確立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihsara M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, Murayama K, Ohtake A: Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy: A case report. *Brain Dev* 36(8): 730-3, 2014. doi: 10.1016/j.braindev.2013.09.005. Epub 2013 Oct 7.
- 2) Yamazaki T, Murayama K, Compton AG, Sugiana C, Harashima H, Amemiya S, Ajima M, Tsuruoka T, Fujinami A, Kawachi E, Kurashige Y, Matsushita K, Wakiguchi H, Mori M, Iwasa H, Okazaki Y, Thorburn DR, Ohtake A: Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome. *Pediatr Int* 56(2):180-187, 2014. doi: 10.1111/ped.12249. Epub 2014 Mar 6.
- 3) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita Y, Kishita Y, Nakachi Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders:

exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta* 1840(4):1355-1359, 2014. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.025. Epub 2014 Jan 24.

- 4) Nagasaka H, Tsukahara H, Okano Y, Hirano K, Sakurai T, Hui S-P, Ohura T, Usui H, Yorifuji T, Hirayama S, Ohtake A, Miida T: Changes of lipoproteins in phenylalanine hydroxylase-deficient children during the first year of life. *Clin Chim Acta* 433:1-4, 2014. doi: 10.1016/j.cca.2014.02.020. Epub 2014 Mar 5.
- 5) Saito H, Tohyama J, Walsh T, Kato M, Kobayashi Y, Lee M, Tsurusaki Y, Miyake N, Goto Y, Nishino I, Ohtake A, King M-C, Matsumoto N: A girl with West syndrome and autistic features harboring a de novo TBL1XR1 mutation. *J Hum Genet* 59(10):581-3, 2014. doi: 10.1038/jhg.2014.71. Epub 2014 Aug 7.
- 6) Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y: The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet* 59(11): 609-14, 2014. doi: 10.1038/jhg.2014.79. Epub 2014 Sep 18.
- 7) Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y, Nakachi Y, Matoba N, Sakai T, Yamazaki T, Harashima H, Murayama K, Hattori K, Hayashi J, Yamagata T, Fujita Y, Ito M, Tanaka M, Nibu K, Ohtake A, Okazaki Y: New *MT-ND6* and *NDUFA1* mutations in mitochondrial respiratory chain disorders. *Ann Clin Transl Neurol* 1(5):361-9, 2014. doi: 10.1002/acn3.59. Epub 2014 Apr 28. PMID: 25356405 [PubMed]
- 8) Izumi Y, Musha I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, Ogata T, Fukami M, Ohtake A: Hypogonadotropic Hypogonadism in a Female Patient Previously Diagnosed as Having Waardenburg Syndrome Due to a *SOX10* Mutation. *Endocrinology*. 2014 Oct 2. [Epub ahead of print]
- 9) Kopajtich R, Nicholls TJ, Rorbach J, Metodiev M D, Freisinger P, Mandel H, Vanlander A, Ghezzi D, Carozzo R, Taylor RW, Marquard K, Murayama K, Wieland T, Schwarzmayr T, Mayr JA, Pearce SF, Powell CA, Saada A, Ohtake A, Invernizzi F, Lamantea E, Sommerville EW, Pyle A, Chinnery PF, Crushell E, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Assouline Z, Rio M, Feillet F, de Camaret BM, Chretien D, Munnich A, Menten B, Sante T, Smet J, Régal L, Lorber A, Khoury A, Zeviani M, Strom TM, Meitinger T, Bertini ES, Van Coster R, Klopstock T, Rötig A, Haack TB, Minczuk M, Prokisch H: Mutations in *GTPBP3* cause a mitochondrial translation defect associated with hypertrophic cardiomyopathy, lactic acidosis and encephalopathy. *Am J Hum Genet* 95(6):708-20, 2014. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.10.017. Epub 2014 Nov 26.
- 10) Montassir H, Maegaki Y, Murayama K, Yamazaki T, Kohda M, Ohtake A, Iwasa H, Yatsuka Y, Okazaki Y, Sugiura C, Nagata I, Toyoshima M, Saito Y, Itoh M, Nishino I, Ohno K: Myocerebrohepat

- opathy spectrum disorder due to *POLG* mutations: A clinicopathological report. *Brain Dev.* 2014 Nov 18. pii: S0387-7604(14)00261-7. doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.013. [Epub ahead of print]
- 11) Akatsuka J, Mochizuki M, Musha I, Ohtake A, Kobayashi K, Kikuchi T, Kikuchi N, Kawamura T, Urakami T, Sugihara S, Hoshino T, Amemiya S: The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes: The ratio of glycosylated albumin to hemoglobin A1c measured in IFCC units accurately represents the glycation gap. *Endocr J* 62(2): 161-172, 2015. 2014 Nov 2. [Epub ahead of print]
- 12) Nozaki F, Kumada T, Kusunoki T, Fujii T, Murayama K, Ohtake A: Fever of Unknown Origin as the Initial Manifestation of Valproate-Induced Fanconi Syndrome. *Pediatr Neurol* 51(6): 846-849, 2014. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.09.007. Epub 2014 Sep 21.
- 13) Brea-Calvo G, Tobias B Haack, Karall D, Ohtake A, Invernizzi F, Carozzo R, Kremer L, Dusi S, Fauth C, Scholl-Bürgi S, Graf E, Ahting U, Restani N, Laforgia N, Verrigni D, Okazaki Y, Kohda M, Martinelli D, Freisinger P, Strom TM, Meitinger T, Lamperti C, Lacson A, Navas P, Mayr JA, Bertini E, Murayama K, Zeviani M, Prokisch H, Ghezzi D: COQ4 mutations cause a broad spectrum of mitochondrial disorders associated with CoQ10 deficiency. *Am J Hum Genet* 96: 309-317, 2015. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.12.023. Epub 2014 Dec.
- 14) Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H: A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mol Genet Metab* in press, 2015.
- 15) Haack T, Jackson C, Murayama K, Kremer L, Schaller A, Kotzaeridou U, de Vries M, Schottmann G, Santra S, Büchner B, Wieland T, Graf E, Freisinger P, Eggimann S, Ohtake A, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Sauer S, Memari Y, Kolb-Kokocinski A, Durbin R, Hasselmann O, Cremer K, Albrecht B, Wieczorek D, Engels H, Hahn D, Zink A, Alston C, Taylor R, Rodenburg R, Trollmann R, Sperl W, Strom T, Hoffmann G, Mayr J, Meitinger T, Bolognini R, Schuelke M, Nuffer J-M, Kölker S, Prokisch H, Klopstock T: Deficiency of multifunctional ECHS1 causes mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Clin Transl Neurol*, in press, 2015.
- 16) Abe Y, Terashima H, Hoshino H, Sassa K, Sakai T, Ohtake A, Kubota M, Yamanouchi H: Characteristic MRI features of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain Dev.* 2015 Feb 13. pii: S0387-7604(15)00022-4. doi: 10.1016/j.braindev.2015.01.006. [Epub ahead of print]

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

## 2. 学会発表

以下の患者会フォーラムの実施

- 1) 第3回先天代謝異常症患者会フォーラム  
2014.11.9 TKP ガーデンシティ品川
- 2) 第4回有機酸・脂肪酸代謝異常症 医師と患者の

ミトコンドリア機能とヘッジホッグシグナルに関する研究

研究分担者 藤井 克則 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 講師

研究要旨

ミトコンドリアがエネルギー産生をするためには、外部からの増殖刺激によりシグナル伝達が適切に行われる必要がある。ヘッジホッグシグナリングは高度に保存されたシグナル伝達経路であり、細胞エネルギーを用いて細胞を増殖に導く。ミトコンドリアによるエネルギー産生が潤滑に行われるためのヘッジホッグシグナルが正しく機能することが必要だが、その機序はまだ不明な点が多い。我々は線維芽細胞を用いた実験において、血清飢餓時にリガンドを添加することで最もシグナルが増強されることを見出した。これらは根本的治療のないミトコンドリア病における病態機序を明らかにするとともに治療開発を目指すものである。

A. 研究目的

ミトコンドリアは細胞内におけるエネルギー産生を司る細胞内小器官である。細胞が恒常性を保つためには、外部からの増殖シグナルに応じて適切にエネルギー産生が行われる必要がある。ヘッジホッグシグナリングは細胞増殖において重要なシグナル伝達経路であり、ミトコンドリアによるエネルギー供給を必要とする。本研究ではヒト線維芽細胞を用いてヘッジホッグシグナリングの伝達経路を検証し、ミトコンドリアエネルギー産生能にどのような影響を与えているかを明らかにすることとした。

B. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞とヘッジホッグ経路の構成分子であるPTCH1に遺伝子変異をもつ線維芽細胞を用いて血清飢餓の有無およびligandであるヘッジホッグ刺激の有無で、下流のGLI 1の発現量の変化をRT-PCRで定量化した。血清飢餓およびヘッジホッグ刺激によって生じるmRNA変化をパスウェイキットで解析し、ヘッジホッグシグナリングと相互作用をもつ分子群を同定した。ミトコンドリア電位変化をこれらヘッジホッグシグナリングに対する刺激で観察し、外的刺激によるエネルギー産生能の変化を解析した。

（倫理面への配慮）

一連の研究計画は千葉大学医学部生命倫理委員会の承認を得て実行した。正常コントロール線維芽細胞はATCCより購入し使用した。本研究では遺伝子導入は行わず、内因性分子の解析のみを行っている。

C. 研究結果

コントロールと比較してヘッジホッグ受容体であるPTCH1変異をもつ線維芽細胞ではその最下流であるGli1ならびにSmo mRNAが亢進していた。このGli mRNAはヘッジホッグリガンド添加により増加し、加えて血清飢餓状態にすると相乗的に増加した。栄養飢餓状態の細胞において、 $\alpha$ アセチル化tubulin抗体により細胞表面上のprimary ciliaが確認されたが、これはコントロール線維芽細胞とPTCH1変異細胞で同様に観察され有意差は認めなかった。mRNAを用いたパスウェイ解析ではPTCH1変異細胞において有意にGli,

FGF4, Zic1, Zic2の発現亢進が認められた。これらは小脳および骨でシグナル亢進に関与していると考えられた。

D. 考察

細胞におけるエネルギー産生が適切に行われるためには、細胞自体の増殖シグナルが正しく核に伝達される必要がある。ヘッジホッグシグナルはそのために必須な経路であり、細胞が血清飢餓状態になり、さらにリガンドが加わった時に相乗的に増大することが示された。これらはエネルギー産生には複数の条件が必要であることを示唆しており、今後ミトコンドリア形態異常を検査することでその意義を確かめてゆきたい。

E. 結論

ヒト細胞におけるミトコンドリアエネルギー産生には細胞増殖シグナルが正しく核に伝達される必要がありヘッジホッグシグナルはその中核に存在する。

F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

Mizuochi H, Fujii K et al. Hedgehog signaling is enhanced by nutritional deprivation in human fibroblasts of Gorlin syndrome. Hedgehog Meeting (2015.8.5-7, Ann Arbor, US A)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし  
2. 実用新案登録 なし  
3. その他 なし