

(倫理面への配慮)

本研究は、2008年「ソウル版ヘルシンキ宣言」に準じ、平成25年「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び平成23年版「医療における遺伝子検査・診断に関するガイドライン」を遵守する。治験は、平成24年発令の「臨床研究・治験活性化5か年計画」に基づき、「医薬品の臨床研究の実施に関する省令(GCP)」に該当する医師主導治験として実施する。

### C. 研究結果

被験者：30歳女性

15歳から難聴、2007年から双極性うつ病がある。

2012.6.12、けいれん発作、右側頭葉から頭頂葉にかけての広範な梗塞様病変を生じ、MELAS と診断された。遺伝子解析で mt 3243 A to G 変異が判明した。

2012年8月、左後頭葉

同9月、左側頭葉前部

同10月、左側頭葉後部、右前頭葉内側

同11月、左側頭葉中部

同12月21日、左側頭葉後部

に梗塞様病変を再発してその都度頭痛と失語の悪化があったが、いずれも入院の上、ドルミカム、アルギU、ラジカットを点滴し、軽快していた。

これまでは抗けいれん剤(VPA、CBZ、LTG)、ビタミンB群、ビタミンE、CoQ10、アルギニン、バイアスピリンなどの内服を行ってきたが再発予防効果はなかった。

しかし12月の入院の時からジアゼパムの内服を開始したところ、再発が見られなくなった。

以上選択除外基準に照らし、患者登録が可能であると判断し、アルギニン併用例に分類された。

[治験同意取得] 治験プロトコルについて説明し、2013年10月6日に同意を取得した。[治験薬投与量・投与期間] 試験薬 KN01 投与量は、体重区分により規定された9g/日とした。投与期間は2013年10月31日—2014年11月6日迄の1年間。[評価期間] 2013年10月31日—2014年11月6日迄の1年間。[有効性評価] 投与期間・評価期間とも本治験の「MELAS ストローク判定基準による脳卒中様発作カウント=発作時突発性局所神経徴候+頭部 MRI 拡散強調像

高信号」は0回であった。[安全性評価] 投与期間・評価期間とも有害事象はなかった。

### D. 考察

本被験者は、試験薬タウリンの1年間の投与によって脳卒中様発作が完全抑制された。

### E. 結論

京都医療センターの1症例は、試験薬タウリン経口投与による脳卒中様発作再発抑制効果の主要評価項目である「100%レスポナー」に該当して、有効であると考えられた。試験薬投与による有害事象はなく安全性についても問題ないと考えられた。

### F. 研究発表

なし

### 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

「ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中様発作に対するタウリン療法の開発」

研究分担者 西田 勝也 国立病院機構兵庫中央病院 神経内科

研究要旨

MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes) はミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子のクローバーリーフ領域の一塩基変異によるが発症機構は不明であった。本治験で主導的役割を担っている川崎医科大学の先行研究において、正常 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドン 1 文字目はタウリン修飾をうけ、一方 MELAS 変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> ではこの修飾が欠損するため (Yasukawa, JBC 275, 2000)、転写が障害される (Yasukawa, EMBO J 20, 2001) ことが世界に先駆け報告された。この独創的知見から MELAS の基本病態は RNA 修飾異常症であると提唱し昨年度タウリンの治療特許を取得した。本治験ではタウリン経口療法によって、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率の改善、Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量の増加、ミトコンドリア遺伝子変異率 (ヘテロプラスミー) の軽減が達成されるかについて患者試料を用いて解析する。本年度は正常ヒト試料で解析の条件設定を行った。来年度はこれらが MELAS の新規バイオマーカーとなり得るのかを First-in man で検証する。これにより 国際標準化治療を見据えた PTC を得たい。

A. 研究目的

MELAS は、本邦でミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子領域の点変異 (A43243G) を同定し (Goto, et al. Nature 348, 651-651, 1990)、変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドンのタウリン修飾欠損が発見された (Yasukawa, Ohta, et al. JBC 275, 4251-4257, 2000) 希少難病である。川崎医科大学神経内科と分担研究者太田らとの共同研究により、タウリン大量投与によってモデル細胞のミトコンドリア機能異常が是正され、2 名の MELAS 患者の脳卒中様発作が 9 年以上抑制されることが報告された (Rikimaru, et al. Intern Med 51, 3351-3357, 2012)。

タウリンは、すでに 1987 年に高ビリルビン血症と心不全を適応に薬事承認されている既知薬である。本研究は、タウリン大量投与についての、これら先行 POC 研究を基盤に、新規に MELAS 脳卒中様発作の再発予防を対象とした追加薬事承認獲得を目標とする医師主導治験を骨子とする。

本年度は分担研究者として国立病院機

構兵庫中央病院で、1 名の患者を対象に、期間 1 年間の試験薬タウリン投与を実施し、その脳卒中様発作予防の有効性について検討した。

B. 研究方法

兵庫中央病院神経内科に入院中の 1 例の 40 代男性 MELAS 患者について、文書および口頭による説明の後、その同意を得て登録した。GMP 試験薬タウリンの期間 1 年の投与を実施して、その脳卒中様発作再発予防効果について検証した。治験参加に先立ち、治験審査会 (IRB) に本治験プロトコルを申請し承認を得た。

(倫理面への配慮)

本研究は、2008 年「ソウル版ヘルシンキ宣言」に準じ、平成 25 年「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び平成 23 年版「医療における遺伝子検査・診断に関するガイドライン」を遵守する。治験は、平成 24 年発令の「臨床研究・治験活性化 5 か年計画」に基づき、「医薬品の臨床研究の実施に関する省令 (GCP)」に該当する医師主導治験として実施する。

### C. 研究結果

被験者：40代男性で小学生の頃から運動が苦手で、低身長、感音性難聴があり15歳で補聴器を使用。[治験開始 78 週以前（アルギニン併用期間外）]平成 24 年 4 月 14 日朝に頭痛が出現した。他院を受診し、頭部 MRI 上、左側頭葉皮質に拡散強調画像で高信号域が確認されたため緊急入院となった。4 月 23 日には感覚性失語が出現した。4 月 27 日には右不全麻痺、5 月 2 日には右同名半盲が出現し、頭部 MRI での異常信号は拡大した。5 月 7 日に前医へ転院し脳血管造影を施行されるも頭頸部の血管に異常は認めなかった。ステロイドパルス療法により半盲、麻痺は消失した。脳梗塞としては非典型的であり、精査目的で 6 月 25 日当院に転院した。特徴的な身体所見（低身長、難聴）、血液および髄液検査での乳酸、ピルビン酸高値、家族歴（同胞がミトコンドリア病と診断）などからミトコンドリア病が強く示唆された。ミトコンドリア遺伝子解析の結果、ミトコンドリア遺伝子 A3243G 変異が認められたため、MELAS と診断された。7 月 10 日より脳卒中様発作予防のために L-アルギニン経口投与（18g/日）が開始された。[治験開始 78 週以内（アルギニン併用期間内）]脳卒中様発作①：平成 24 年 10 月 4 日に皮質性視覚障害、頭痛、意識障害が出現した。頭部 MRI 上、右側頭葉に拡散強調画像で高信号域を認め脳卒中様発作と診断した。ステロイドパルス療法を施行した。[治験開始 52 週以内]脳卒中様発作②：平成 24 年 10 月 28 日に単麻痺、痙攣、意識障害が出現した。頭部 MRI 上、右側頭葉、頭頂葉、後頭葉に拡散強調画像で高信号を認めた。前回発作よりも 2 週間以上経過しており新たな再発としてステロイドパルス療法を行った。

以上のように背景調査では、平成 24 年 10 月 4 日、平成 24 年 10 月 28 日に「発作時突発性局所神経徴候」が認められ、本治験の「選択基準による「脳卒中様発作カウント」は 2 回であった（このうち全発作で局所神経徴候に該当する MRI 異常が確認されている）。選択除外基準に照らし、患者登録が可能であると判断され、アルギニン併用例に分類された。[治験同意取得] 治験プロトコルについて説明し、平成 25 年 10 月 21 日に同意を取得した。

[治験薬投与量・投与期間]試験薬 KN01 投与量は、体重区分により規定された 12g/日とした。投与期間は平成 25 年 10 月 28 日-平成 26 年 10 月 22 日までの 1 年間。[評価期間] 平成 25 年 10 月 21 日-平成 26 年 11 月 19 日までの週間。[有効性評価]投与期間・評価期間とも本治験の「MELAS ストローク判定基準による脳卒中様発作カウント＝発作時突発性局所神経徴候＋頭部 MRI 拡散強調画像高信号」は 1 回であった。[安全性評価]投与期間・評価期間ともに重篤な有害事象は認められなかった。[FIH(First-in-human)バイオマーカー候補測定]①白血球ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>のタウリン修飾率：(投与前 0 週) 34.25±0.87%→(投与後 52 週) 30.65±2.12% (p=0.09) ②ミトコンドリア Leu(UUR)-rich ND6 蛋白質量(内部コントロールβ-actin 比)：(0 週) x 1.87→(52 週) x 1.62 (p=0.114) ③ミトコンドリア遺伝子変異率(ヘテロプラスミー)：(0 週) 29.5%→(52 週) 26.7%。

### D. 考察

本被験者は、試験薬タウリンの 1 年間の投与によって脳卒中様発作の回数は 2 回→1 回と減少し発作の抑制効果の可能性が示唆された。FIH で検討した薬効バイオマーカー候補はいずれも有意な変化は見られなかった(白血球検体で測定したミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>タウリン修飾率では有意差はないものの減少していた)。

### E. 結論

兵庫中央病院の 1 症例は、試験薬タウリン経口投与による脳卒中様発作再発抑制効果の主要評価項目である「100%レスポンス」には該当しなかったが、発作回数の減少を認め、有効性の可能性が示唆された。この点は今回試験薬投与前後で測定した各種バイオマーカーのデータを検討し、他施設での症例も合わせた総合的な解析が必要であると考えられる。試験薬投与による重篤な有害事象はなく安全性についても問題ないと考えられた。

### F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中様発作に対するタウリン療法の開発」

研究分担者 高橋 哲也

広島大学 脳神経内科・講師

研究要旨

MELAS はミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子のクローバーリーフ領域の一塩基変異によるが発症機構は不明であった。われわれは世界に先駆け、正常 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドン 1 文字目はタウリン修飾をうけ、一方 MELAS 変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> ではこの修飾が欠損するため (Yasukawa, JBC 275, 2000)、転写が障害される (Yasukawa, EMBO J 20, 2001) ことを発見した。この独創的知見から MELAS の基本病態は RNA 修飾異常症であると提唱し昨年度タウリンの治療特許を取得した。本治験ではタウリン経口療法によって、ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のタウリン修飾率の改善、Complex I 構成蛋白質 (ND6) 量の増加、ミトコンドリア遺伝子変異率 (ヘテロプラスミー) の軽減が達成されるかについて患者試料を用いて解析する。本年度は正常ヒト試料で解析の条件設定を行った。来年度はこれらが MELAS の新規バイオマーカーとなり得るのかを First-in man で検証する。これにより 国際標準化治療を見据えた PTC を得たい。

A. 研究目的

MELAS は、本邦でミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 遺伝子領域の点変異 (A43243G) を同定し (Goto, et al. Nature 348, 651-651, 1990)、変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> のアンチコドンのタウリン修飾欠損が発見された (Yasukawa, Ohta, et al. JBC 275, 4251-4257, 2000) 希少難病である。主任研究者である砂田と分担研究者太田らとの共同研究により、タウリン大量投与によってモデル細胞のミトコンドリア機能異常が是正され、2 名の MELAS 患者の脳卒中様発作が 9 年以上抑制されることが報告された (Rikimaru, et al. Intern Med 51, 3351-3357, 2012)。

タウリンは、すでに 1987 年に高ビリルビン血症と心不全を適応に薬事承認されている既知薬である。本研究は、タウリン大量投与についての、これら先行 POC 研究を基盤に、新規に MELAS 脳卒中様発作の再発予防を対象とした追加薬事承認獲得を目標とする医師主導治験を骨子とする。

本年度は分担研究者として広島大学で、1 名の患者を対象に、期間 1 年間の試験薬タウリン投与を実施し、その脳卒中様発作

予防の有効性について検討した。

B. 研究方法

川崎医科大学タウリン治験ワーキンググループが作成しPMDA本審査を経たプロトコルに従い、広島大学病院外来通院中の 1 例の 30 代男性 MELAS 患者について、その同意を得て登録した。GMP 試験薬タウリンの 1 年間の投与を実施して、その脳卒中様発作再発予防効果について検証した。治験参加に先立ち、広島大学の治験審査会 (IRB) に本治験プロトコルを申請し承認を得た。(倫理面への配慮)

本研究は、2008 年「ソウル版ヘルシンキ宣言」に準じ、平成 25 年「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び平成 23 年版「医療における遺伝子検査・診断に関するガイドライン」を遵守する。治験は、平成 24 年発令の「臨床研究・治験活性化 5 か年計画」に基づき、「医薬品の臨床研究の実施に関する省令 (GCP)」に該当する医師主導治験として実施する。

C. 研究結果

被験者：30 歳代男性

生来易疲労性があった。23 歳時頭痛、

失語、意識障害のため近医に入院した。MRI T1 強調画像にて左側頭葉に低信号域を指摘されヘルペス脳炎と暫定診断された。症状軽快後に譫妄が出現した。その後4年間は予防目的に抗てんかん薬の内服を継続し、経過は良好であった。28歳時記憶力低下、失語が相次いで出現し、近医でのMRI検査にて左側頭葉の脳梗塞を疑われた。MRI再検で病巣の拡大を認め、脳波にて病巣に一致して焦点性棘波を認めた。ミトコンドリア脳筋症が疑われ好気性運動負荷試験、筋生検により確定診断された(ミトコンドリア遺伝子解析ではA3243G変異が認められた)。同年8月に左耳側視野の欠損を自覚し再入院した。この時にHDS-R20/30と認知機能障害も指摘された。36歳時左不全片麻痺と頭痛で再発入院した。その後アルギニンの内服を開始した。2013年(38歳時)アルギニン増量中にも拘らず3ヶ月の間隔で発作を2回再発した。画像上脳の萎縮も進行してきており治験に登録した。[治験同意取得] 治験プロトコルについて説明し、平成25年12月20日に同意を取得した。[治験薬投与量・投与期間]試験薬KN01投与量は、体重が40kg以上であることから12g/日とした。投与期間は平成25年12月27日-平成26年12月19日迄の1年間。[評価期間]平成26年1月24日-平成26年12月19日までの47週間。[有効性評価]投与期間・評価期間ともMELASストローク判定基準では再発回数は0回であった。観察期間中に有害事象を認めなかった。[バイオマーカー候補測定]①白血球ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>のタウリン修飾率:(投与前0週)38.53±4.55%→(投与後52週)56.90±2.74%(P=0.0081)②ミトコンドリア Leu(UUR)-rich ND6 蛋白質量(血漿):(0週)65.6±3.0 pg/ml→(52週)44.2±4.7 pg/ml. ③ミトコンドリア遺伝子変異率(ヘテロプラスミー):(0週)21.5±1.67%→(52週)19.1±0.60%(P=0.080)

#### D. 考察

試験薬タウリンの投与期間中脳卒中様発作の再発を認めなかった。タウリンの投与前後で白血球のミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>のタウリン修飾率は50%近く有意に上昇した。ヘテロプラスミーに関し

ても有意ではないものの改善傾向を認めた。

#### E. 結論

広島大学の1症例は、試験薬タウリン経口投与による脳卒中様発作再発抑制効果の主要評価項目である「100%レスポonder」に該当した。このレスポonderにおける試験期間中のバイオマーカーの変化は、これらのマーカーが病態を適切に評価しうることを示唆する。長期的な試験による検討の余地はあるものの本試験薬の安全性についても問題ないと考えられた。

#### F. 研究発表

なし

#### 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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 別紙4

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
後藤雄一	ミトコンドリア病	一ノ瀬白帝 鈴木宏治	図説分子病態学 改訂第5版	中外医学社	東京	2014	267-271
後藤雄一	ミトコンドリア病	井田博之	小児の治療指針	診断と治療社	東京	2014	831-833
後藤雄一	ミトコンドリア病	水澤英洋	神経症候群Ⅲ (第2版)	日本臨床	大阪	2014	817-822
後藤雄一	ミトコンドリア病	小林祥泰 水澤英洋 山口修平	2015-2017 神経疾患最新の治療	南江堂	東京	2015	251-252
武藤多津郎	ギランバレー症候群に於けるバイオマーカーの探索・開発と診断薬・機器開発		最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応	技術情報協会	日本	2015	369-372

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujii T, Nozaki F, Saito K, Hayashi A, Nishigaki Y, Murayama K, Tanaka M, <u>Koga Y</u> , Hiejima I, Kumada T	Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: A semi-quantitative clinical evaluation study.	Mol Genet Metab	112(2)	133-138	2014
Katayama K, Povalko N, Yatsuga S, Nishioka J, Kakuma T, Matsushima T, <u>Koga Y</u>	New TRPM6 mutation and management of hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia.	Brain Dev	37(3)	292-298	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wei F-Y, Zhou B, Suzuki T, Miyata K, Ujihara Y, Horiguchi H, Takahashi N, Xie P, Michiue H, Fujimura A, Kaitsuka T, Matsui H, <u>Koga Y</u> , Mohri S, Suzuki T, Oike Y, Tomizawa K.	Cdk5rap 1 mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy in mice and humans.	Cell Metabolism	in press		2015
Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, <u>Koga Y</u> , Tanaka M	GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases.	Mitochondrion	20	34-42	2015
Shima S, Kawamura N, Ishikawa T, Masuda H, Iwahara C, Nimi Y, Ueda A, Iwabuchi K, <u>Mutoh T</u> .	Anti-neutral glycolipid antibodies in encephalomyeloneuropathy.	Neurology	82(2)	114-118	2014
Ikeda M, Miki T, Atsumi M, Inagaki A, Mizuguchi E, Meguro M, Kanamori D, Nakagawa K, Watanabe R, Mano K, Aihara A, Hane Y, <u>Mutoh T</u> , Matsuo K.	Effective elimination of contaminants after oral care in elderly institutionalized individuals.	Geriatr Nurs	35(4)	295-299	2014
Uemura N, Sugano K, Hiraishi H, Shimada K, Goto S, Uchiyama S, Okada Y, Origasa H, Ikeda Y; MAGIC Study Group. Collaborators: Asakura K, <u>Mutoh T</u> et al.	Risk factor profiles, drug usage, and prevalence of aspirin-associated gastroduodenal injuries among high-risk cardiovascular Japanese patients: the results from the MAGIC study.	J Gastroenterol	49(5)	814-824	2014
Asakura K, Ueda A, Shima S, Ishikawa T, Hikichi C, Hirota S, Fukui T, Ito S, <u>Mutoh T</u> .	Targeting of aquaporin 4 into lipid rafts and its biological significance.	Brain Res	2;1583	237-244	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura K, Sugaya K, Nakata Y, Shima S, <u>Mutoh T</u> , Nakano I.	Hypertrophic pachymeningitis and encephalitis in a patient with relapsing polychondritis.	Neurology and Clinical Neuroscience	3	42-43	2014
廣田政古, 植田晃広, 稲熊容子, 島さゆり, 恵美宣彦, <u>武藤多津郎</u> .	亜急性軸索型ニューロパチーに認められた抗Trk抗体の意義	Peripheral Nerve	25(1)	100-105	2014
Asakura A, Ueda A, <u>Mutoh T</u> .	Lipid rafts and their possible involvements in neuroimmunological disorders:new research arena.	Frontiers In Bioscience Landmark	1;20	303-313	2015
Hikichi C, Asakura K, Hirota S, Fukui T, Murate K, Ishikawa T, Kizawa M, Ueda A, Ito S, <u>Mutoh T</u> .	Deep Neck inflammatory Diseases: Implication of Cervical Magnetic Resonance Imaging for Early Diagnosis.	Austin Journal of Clinical Neurology	2(2)	1024-1025	2015
Fukuda Y, Fukui T, Hikichi C, Ishikawa T, Murate K, Adachi T, Imai H, Fukuhara K, Ueda A, Kaplan AP, <u>Mutoh T</u> .	Neurotrophin promotes NGF signaling through interaction of GM1 ganglioside with Trk neurotrophin receptor in PC12 cells.	Brain Res	30;1596	13-21	2015
Fukui T, Asakura K, Hikichi C, Ishikawa T, Murai R, Hirota S, Murate K, Kizawa M, Ueda A, Ito S, <u>Mutoh T</u> .	Histone deacetylase inhibitor attenuates neurotoxicity of clioquinol in PC12 cells.	Toxicology			in press
Hirota S, Ito S, Fukui T, Murate K, Shima S, Kizawa M, Ueda A, Asakura K, <u>Mutoh T</u> .	Voriconazole-responsive Disseminated Nodular Lesions on Spinal MRI.	Intern Med			in press

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 第13章 今後の研究開発のための各疾患の最新のバイオマーカー開発とその応用

### 第5節 ギラン・バレー症候群に於ける バイオマーカーの探索・開発と診断薬・機器開発

藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学 主任教授 医学博士

武藤多津郎

(株)技術情報協会 発刊書籍  
「最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応」(2015.1.30 発刊)  
抜刷

## 第5節 ギラン・バレー症候群に於けるバイオマーカーの探索・ 開発と診断薬・機器開発

はじめに

ギラン・バレー症候群（GBS）は、消化器や呼吸器などの何らかの先行感染後に、急性に四肢筋力低下・腱反射低下～消失を来す急性の末梢神経疾患である。先行感染がある事や特徴的脳脊髄液所見、後述する GM1 ganglioside（GM1）などの酸性糖脂質に対する抗体が見られ、かつその抗体価が病状に相関する事などから自己免疫性の疾患と考えられてきた。

疫学的には、世界的に人口10万人当たりの年間発症率は0.6～1.9人前後で、性差では3:2と男性に多い事、前述の先行感染が患者の7割に認められることが記載されている。従って、神経難病の筋委縮性側索硬化症（ALS）とほぼ同程度の頻度と言う事になり比較的稀な疾患と言えよう。しかし、急性の疾患であり、心臓や自律神経系の症状も合併し時に重篤な病態ともなり得る疾患で、迅速な診断と適切な治療開始が要求される。

こうした意味では、本疾患の正確かつ迅速な診断には、信頼性の高いバイオマーカーの出現が望まれている。本稿では、本疾患の代表的な2つのサブタイプについてその臨床像・診断の現状をレビューし、各々の問題点を整理する事で今後の望まれるバイオマーカー開発の戦略を考察してみたい。

### 1. GBSの臨床像・検査所見

#### 1.1 典型的 GBS

##### 1.1.1 臨床像

本疾患の歴史は1916年まで遡り、3名の仏神経学者の Guillain, Barré, Strohl により初めて記載された疾患で間もなく100年を迎えようとしている。原著論文では、自験2例について詳しい神経学的所見、脳脊髄液所見と詳細な電気生理学的検査所見が報告されている。

現在、古典的（あるいは典型的）本症では、末梢神経の髄鞘が標的となる「脱髄」が主な病像とされ、GBSと急性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（acute inflammatory demyelinating polyneuropathy:AIDP）は同義語として使用されている。この型では、通常何らかの先行感染から数日から数週間後に下肢から筋力低下が始まり、その後次第に上肢にも筋力低下が進行していく。4週までにはその進行は停止する。約半数の症例で2週までに、80%は3週までに、90%以上の症例では4週までに症候がピークに達する。また、筋力低下は比較的対称性で感覚障害は通常なく、あってもしびれ、ビリビリ感がある程度で客観的な感覚障害は軽度で留まる。脳神経も障害されることがあり、約50%で両側性の障害が見られる。球麻痺（飲み込みが障害される）、外眼筋麻痺（眼球の運動制限があり、患者は複視（物が二重に見える））が見られることがある。約5%未満の患者は、外眼筋麻痺や他の脳神経障害で発症してくる症例も確認されている。

また、症例により種々の自律神経障害も呈してくる。具体的には、頻脈その他の不整脈、起立性低血圧、血圧変動などがそれらであるが、稀にこの合併する自律神経障害で不眠の転帰をとる場合もあり、嚴重な心電図モニターが特に急性期では要求される。

さらに、典型例では通常単相性であるが、中には再発・再燃を認める症例では、しばしば治療変動性GBSと慢性炎症性脱髄性多発神経炎（chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy:CIDP）との鑑別が問題となる症例も存在する。

現在、日本で多くの医師により使用されている診断基準はAsbury&Cornblathの基準が用いられており<sup>1)</sup>、詳細はそちらを参照して頂くとして、この診断基準では、2つの異なる検査所見が重要視されている。

##### 1.1.2 脳脊髄液所見（髄液所見）

髄液中の細胞は単核球で、 $10/\text{mm}^3$ 以下で、発症から1週以降で髄液蛋白濃度が増加しているか、経時的な検査で蛋白濃度増加が観察される（蛋白・細胞乖離という）。非典型的な症例では、発症後数週を経ても髄液蛋白濃度が上昇し

て来ない症例も存在し得る。また、髄液細胞数が  $11/\text{mm}^3$  以上になる場合もある。

### 1.1.3 電気生理学的所見

症例の約 80% に、神経伝導速度検査で伝導速度の遅延、伝導ブロックを認める。伝導速度は正常人のその 60% 以下に低下する。しかし、この所見は検査を行った全ての末梢神経に観察されるとは限らず、散在性の事が多い。遠位潜時が正常の 3 倍程度までの延長がみられることがある（つまり伝導速度が正常の 1/3 になる）。但し、本検査は発症後数週間の間は正常なこともあり、こういう場合の診断には他の所見から総合的判断が要求される。また、2 割程度の症例では、本検査が正常所見しか示さない場合もある事に注意する必要がある。

### 1.1.4 治療

本疾患の治療の根幹をなすものは、いわゆる免疫療法で、血液浄化療法と大量免疫グロブリン療法（0.4g/Kg/Day5 日間点滴静注）が豊富なエビデンスを有している。一時期はステロイドパルス療法が行われたが、ステロイドの単独使用では必ずしも有効であるとするエビデンスは得られていない。詳しくは 2004 年の神経免疫疾患治療ガイドラインを参照されたい<sup>2)</sup>。

## 1.2 軸索型 GBS

### 2.1.1 本病型の位置づけ

GBS はあくまで「脱髄」が本疾患の基本的病理所見であるが、1980 年代後半から高度の軸索変性を呈し、「脱髄」所見を欠く本症と考えられる症例が複数報告され、「軸索」が一次性に障害される軸索型本症の存在が提唱された。さらに、1990 年に入り初夏の中国で流行するいわゆる chinese paralytic syndrome と呼ばれる病態が報告され<sup>3,4)</sup>、その後の詳しい研究により、急性運動軸索型ニューロパチー（acute motor axonal neuropathy: AMAN）、その重症型としての急性運動感覚軸索型ニューロパチー（acute motor and sensory axonal neuropathy: AMSAN）と呼ばれる疾患単位が提唱され、GBS の一臨床亜型として認知されるに至った。現在は、大きく「脱髄」型、「軸索」型と二大別されている。因みに、欧米では GBS の大半が「脱髄」型であるのに対し、アジアでは「軸索」型が多いとされている。これら両型では、極期までの期間や自律神経障害の合併頻度に差が見られるため、急性期にどちらの型に症例が属するのかを明らかとしておくことが肝要である。

さらに、本病型では *Campylobacter jejuni* (*c.jejuni*) による先行腸炎に罹患している患者が多いことが知られており、*jejuni* の持つリポオリゴ糖 (lipooligosaccharide: LOS) の分子構造がヒト神経系に豊富に分布する酸性糖脂質であるガングリオシド構造と近似している事からこれら患者血清には抗 - GMI 抗体をはじめとする抗 - ガングリオシド抗体が検出される場合が多い<sup>5)</sup>。この抗 - ガングリオシド抗体は本疾患の重要なバイオマーカーになり得る可能性が高く、後に詳しく解説する。

### 1.2.1 臨床像

脱髄型と共通に AMAN, AIDP 様の病像を呈する。つまり、先行感染後に上行性の四肢筋力低下を呈し、通常単相の経過をたどる。AMAN では、AIDP に比し他覚的感覚障害は軽度で自覚的なしびれがある程度である。深部腱反射は低下～消失するが、症例によっては亢進してくる場合もあり注意を要する。自律神経障害の合併は AIDP に比し稀と考えられている。又、脳神経障害の合併も AIDP よりは稀である。

### 1.2.3 電気生理学的診断

GBS 本型では、電気生理学的異常は神経終末及び神経根によく観察される。これまで、使用されてきた Ho 基準<sup>6)</sup> と Hadden 基準<sup>7)</sup> ではいずれも運動神経伝導速度検査所見に基づくもので、本型患者では遠位潜時・伝導速度の遅延などの「脱髄」所見を呈さず、複合筋活動電位振幅低下所見を示す場合本型と診断される。

## 1.2.4 抗ガングリオシド抗体

本型患者では、*c.jejuni* による腸炎を先行感染に持つ人の場合しばしば抗 GM1 抗体が陽性となる。本型患者の報告当初は軸索変性により回復に時間がかかりその予後は必ずしも良くないと思われていたが、一方で急速に回復する本型患者も少なからず存在する事が判明している。その他、例えば抗 GalNac-GD1a 抗体、抗 GD1a 抗体などが検出されている。

## 2. 本疾患のバイオマーカーとしての抗 - ガングリオシド抗体

酸性糖脂質であるガングリオシドは、細胞の脂質二重膜の outer membrane に分布し、親水性の糖鎖部分を細胞外に向けて配置されている。さらに、細胞膜上ではコレステロール、スフィンゴミエリン、細胞内外の情報伝達を司る受容体型チロシンキナーゼ（代表例は Trk 高親和性神経栄養因子受容体など）や glycosphosphatidylinositol-anchored protein (GPI アンカー蛋白) などのシグナル伝達分子と共に脂質ラフト (lipid rafts) と呼ばれるまさに“筏”のような構造物中に局在している。このことから、ガングリオシドは免疫系から認識されやすい場所に位置していると言えよう<sup>8)</sup>。

では、なぜ本 GBS 全患者の 60% に何らかの抗ガングリオシド抗体が検出されるのであろうか？先にも述べたように、本疾患では何らかの先行感染を有する患者が多い。例えば、*c.jejuni* による腸炎では、細菌が持つトリポオリゴ糖の構造が GM1 をはじめとするガングリオシドによく似ている（分子相同性があるという）ので、*c.jejuni* に対して生じた抗体は上記のような局在をとる神経系細胞に発現したガングリオシドにも反応して神経障害が生じるのではないかと考えられている。この考えが正しければ、病態が回復期に入れば当然これら抗体の抗体価が低下するはずであり、事実 GBS 患者に見られる抗ガングリオシド抗体の抗体価は回復と共に低下してくる。

現在、ある特定の抗ガングリオシド抗体とその患者の臨床像との間に特定の関係があるかとの問いには、広い意味での関連が疑われている。その詳細を表 1 にまとめるが、Fisher 症候群に於ける抗 GQ1b 抗体や咽頭・頸部・上腕型 GBS という特殊な亜型では抗 GT1a 抗体、サイトメガロウイルス感染後の GBS には抗 GM2 抗体が検出されることがあるが、これら以外の亜型 GBS 患者には検出されない。軸索型 GBS 患者の多くに、抗 GM1 抗体、GM1b 抗体、抗 GD1a 抗体、抗 GalNac-GD1a 抗体が種々の組み合わせで検出される。

表 1 Guillain-Barré 症候群亜型別抗ガングリオシド抗体の種類

臨床亜型 <sup>*1</sup>	先行感染	抗ガングリオシド抗体の種類
軸索型 AMAN 体	<i>C. Jejuni</i> , <i>H. influenzae</i> 腸炎, 上気道感染	抗 GM1 抗体, 抗 GM1b 抗体, 抗 GD1a 抗体, 抗 GalNac-GD1a 抗体
脱髄型, 感覚型, 顔面神経麻痺	CMV 感染	抗 GM2 抗体 (IgM 分画)
感覚障害, 失調, 脱髄型上気道感染		抗 GD1b 抗体
咽頭・頸部・上腕型	?	抗 GT1a 抗体
脱髄型	上気道感染	抗 LM1 抗体
外眼筋麻痺・失調 (Fisher 症候群)	<i>C. Jejuni</i> , <i>H. influenzae</i>	抗 GQ1b 抗体

CMV: cytomegalovirus, AMAN: acute motor axonal neuropathy, *C. Jejuni*: *Campylobacter Jejuni*, *H. influenzae*: *Haemophilus influenzae*, Ig: immunoglobulin

\*1 IgG 分画

## 2.1 抗 - ガングリオシド抗体の測定法

現在、一般的に抗 - ガングリオシド抗体の測定には、簡便さ、高感度、多種類の抗体の有無を一度に測定できる ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法が頻用され、これに基づきこれまで数多くの論文が出されてきた。しかし、一方この方法で測定した抗体価は必ずしも臨床障害度とは関連していない。先述したように、本来ガングリオシドは脂質ラフト中に存在し、他の種々の分子と共存している。これに対し、ELISA 法では ELISA プレート上で個々のガングリオシドが患者標品と反応させるため本来の 3 次構造を認識して反応する真の抗体とは異なる可能性が想定される。これに対し、我々のグループでは、ガングリオシドが豊富に発現する神経系培養細胞の系を用いて軸索型 GBS 患者血清中の抗 GM1 抗体の作用を生化学的・細胞生物学的に詳細に調べた結果、これら患者血清は脂質ラフト機能を明

確に傷害する事を見出した<sup>9)</sup>。そして、障害の程度はELISAの系での抗体価とは相関せず、むしろ臨床重症度に比例していると考えられた。しかし、この測定系は一度に大量の臨床サンプルを処理することは困難であり、より生理的な条件での抗体活性測定系の開発が望まれる。

## 2.2 Surface plasmon resonance を用いた測定系

この測定系は、培養系を用いるより一度に測定できるサンプル数は多く、かつ実際の生体膜に近似した条件下で抗体活性がしかも高感度に測定できる利点がある。生体膜に近似した組成の脂質と共に特定のガングリオシドを添付して作成されたリポソームをプレートに貼り付ける。そこに、患者サンプルを一定時間反応させ、ガングリオシドへの結合を高感度のBIAcoreを用いて抗体活性を測定するもので、既に中性糖脂質ではこのような測定系が開発されている<sup>10)</sup>。この系が酸性糖脂質にも応用可能か否かは今後の検討によるが、これまでのELISAの持つ限界を克服できる手段として期待されるところである。

### おわりに

これまで見てきたように、GBSは急性あるいは救急疾患であるため如何に短時間に正しい診断をし、治療に取り掛かれるかが患者の予後を大きく規定する因子であるかが理解できる。髄液検査、電気生理学的検査所見のみでは診断に苦渋する場合も実地臨床の場では少なくない。そうした観点で、抗ガングリオシド抗体測定の意義は大きいと考えられる。しかし、現在頻用されている測定系を如何に生体膜の環境に近づけるかが課題であり、そうした意味でも革新的な測定法の出現が望まれる。

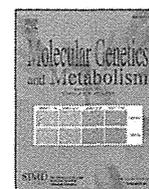
### 文 献

- 1) Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 27; S21-4, 1990
- 2) 神経免疫疾患治療ガイドライン。神経免疫疾患治療ガイドライン委員会・編。東京：共和企画，2004
- 3) McKhann GM, KcKhann GM, Cornblath DR, et al. Clinical and electrophysiological aspects of acute paralytic disease of children and young adults in Northern China. *Lancet* 338; 593-597, 1991
- 4) McKhann GM, Cornblath DR, Griffin JW, et al. Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Ann Neurol* 33; 333-42, 1993
- 5) Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T. Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter enteritis*. *Neurology* 40; 1900-2, 1990
- 6) Ho TW, Mishu B, Li CY, et al. Guillain-Barré syndrome in Northern China: relationship to *Campylobacter Jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 118; 597-605, 1995
- 7) Hadden RD, Cornblath DR, Hughes RAC, et al. Electrophysiological classification of Guillain-Barré syndrome: clinical associations and outcome. Plasma exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré syndrome Trial Group. *Ann Neurol* 44; 780-8, 1998
- 8) Mutoh T. Editorial. Emergence of new roles of lipid rafts in Neurological disorders. *J Neurol & Transl Neuroscience*. 1; 2, 2013
- 9) Ueda A, Shima S, Miyashita T, et al. Anti-GM1 Antibodies In Axonal form of Guillain-Barré Syndrome Affect The Integrity Of Lipid Rafts. *Mol Cell Neurosci* 45: 355-62, 2010
- 10) Sato T, Iwabuchi K, Nagaoka I, et al. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. *J Leuk Biol* 2006; 80: 204-11



Contents lists available at ScienceDirect

## Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymgme](http://www.elsevier.com/locate/ymgme)

## Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: A semi-quantitative clinical evaluation study



Tatsuya Fujii <sup>a,\*</sup>, Fumihito Nozaki <sup>a</sup>, Keiko Saito <sup>a,1</sup>, Anri Hayashi <sup>a</sup>, Yutaka Nishigaki <sup>b,2</sup>, Kei Murayama <sup>c</sup>, Masashi Tanaka <sup>b</sup>, Yasutoshi Koga <sup>d</sup>, Ikuko Hiejima <sup>a</sup>, Tomohiro Kumada <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatrics, Shiga Medical Center for Children, 5-7-30 Moriyama, Shiga 524-0022, Japan

<sup>b</sup> Department of Genomics for Longevity and Health, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakane-cho, Itabashi, Tokyo 173-0015, Japan

<sup>c</sup> Department of Metabolism, Chiba Children's Hospital, 579-1 Heta-cho, Midori, Chiba 266-0007, Japan

<sup>d</sup> Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University Graduate School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 February 2014

Received in revised form 25 April 2014

Accepted 25 April 2014

Available online 2 May 2014

## Keywords:

Pyruvate

Therapy

Mitochondrial disease

NAD<sup>+</sup>

Lactate-to-pyruvate ratio

## ABSTRACT

**Background:** Disorders of oxidative phosphorylation (OXPHOS) cause an increase in the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, which impairs the glycolysis pathway. Treatment with pyruvate is expected to decrease the ratio and thereby restore glycolysis. There are some case reports on the efficacy of pyruvate treatment for mitochondrial diseases. However, few of these reports assessed their results using a standardized scale.

**Methods:** We monitored 4 bedridden patients with OXPHOS disorders who continued therapies of 0.5–1.0 g/kg/day of sodium pyruvate for more than 12 months. The efficacies of these treatments were evaluated with the Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale and the Gross Motor Function Measure with 88 items.

**Results:** The ages of the patients at the treatment initiation ranged from 8–100 months. Of the 4 patients, 3 exhibited improvements within 1–3 months from the initiation of treatment. Among these 3 patients, one maintained the improvement for over 2 years. The remaining 2 regressed 3–6 months after the initiation of treatment. The blood lactate/pyruvate ratios did not correlate with the efficacy of treatment.

**Conclusion:** Pyruvate was effective even in bedridden patients with OXPHOS disorders, at least in the short term. Clinical trials with more patients and less severe disabilities are necessary to evaluate the long-term efficacy of this treatment. Biomarkers other than lactate and pyruvate need to be identified to biochemically monitor the efficacy of this treatment.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Tanaka et al. [1] proposed that pyruvate has therapeutic potential for patients with oxidative phosphorylation (OXPHOS) disorders in which the intracellular NADH/NAD<sup>+</sup> ratio is increased. Such an increased ratio impairs the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in the glycolysis pathway. Theoretically, with lactate dehydrogenase, pyruvate provides NAD<sup>+</sup> and decreases this ratio and thereby restores the activity of GAPDH, which produces ATP.

Additionally, pyruvate activates pyruvate dehydrogenase and non-enzymatically eliminates hydrogen peroxide.

There are several case reports on the efficacy of pyruvate in patients with OXPHOS disorders [2–4]. However, few of these reports have evaluated the clinical outcomes using a standardized clinical assessment scale. We semi-quantitatively evaluated the efficacy of pyruvate therapy in 4 patients with OXPHOS disorders using standardized scales. This study was approved by the Ethical Committee of our institution. Written informed consent was obtained from the parents of every patient.

## 2. Patients and methods

## 2.1. Patients

Four patients who had been on pyruvate for more than 12 months were studied (Table 1). Two patients had Leigh syndrome associated with m.8993 T>G or m.9176 T>C mutations. One patient had non-specific encephalomyopathy associated with complex I and IV combined deficiency. Another patient had myopathic mitochondrial DNA depletion syndrome. All patients were bedridden, and all but one

**Abbreviations:** NPMDS, Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale; GMFM-88, Gross Motor Function Measure with 88 items; JMDRS, Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale; OXPHOS, Oxidative phosphorylation; MELAS, Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; FGF-21, Fibroblast growth factor 21.

\* Corresponding author at: Department of Pediatrics, Shiga Medical Center for Children, 5-7-30 Moriyama, Moriyama-City, Shiga 524-0022, Japan.

E-mail address: [tatsufu@gmail.com](mailto:tatsufu@gmail.com) (T. Fujii).

<sup>1</sup> Present address: Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoinkawahara-cho, Sakyo, Kyoto, Kyoto 606-8507, Japan.

<sup>2</sup> Present address: Nishigaki Clinic & Research Laboratory, 1-177 Uchinaka, Nakagawa, Nagoya 454-0927, Japan.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.04.008>

1096-7192/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Table 1**  
Profiles of the patients.

Patients	Clinical Dx	Molecular or biochemical Dx	Age at the start of the Tx	ADL at the start of the Tx	Dose of sodium pyruvate (g/kg/day)	Duration of the Tx
Patient 1	Leigh syndrome	m.8993 T>G	8 y 4 m	Bedridden Unable to roll over Tube fed	0.5	27 m
Patient 2	Leigh syndrome	m.9176 T>C	8 m	Bedridden Unable to roll over Tube fed	0.5	66 m
Patient 3	Non-specific encephalomyopathy	Complex I + IV deficiency	1 y 8 m	Able to roll over to one direction Unable to creep Orally fed	0.5 then 1.0	17 m
Patient 4	Myopathic mitochondrial depletion syndrome	mtDNA depletion	1 y 7 m	Bedridden Unable to roll over On a respirator Tube fed	0.5	41 m

Dx, diagnosis; Tx, treatment; mt, mitochondrial; ADL, activities of daily living.

(namely, the patient with combined deficiencies of complex I and IV) were tube fed. The ages at the initiation of pyruvate therapy were 8–100 months (median 20 months). The durations of therapy were 17–66 months (median 34 months). During the pyruvate therapy monitoring period, all other concomitant mitochondrial disease medications were maintained unchanged.

## 2.2. Pyruvate

Sodium pyruvate was obtained from Musashino Chemical Laboratory (Tokyo). Sodium pyruvate was administered at 0.5 g/kg/day orally or through a feeding tube in 2 divided doses. This dose was increased to 1.0 g/kg/day in one patient. To avoid osmotic diarrhea, the pyruvate was dissolved in water at concentrations of approximately 2%–10%. Higher concentrations were utilized if the dilution caused overhydration or the volume was too large to drink.

## 2.3. Clinical evaluation

The efficacy of the pyruvate therapy was clinically evaluated with 3 standard scales: the Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale (NPMDS) [5], the Gross Motor Function Measure with 88 items (GMFM-88) [6], and the Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale (JMDRS) [7]. The NPMDS is composed of 4 domains; Section I, current function; Section II, systemic specific involvement; Section III, current clinical assessment; and Section IV, quality of life. Sections I–III are scored based on objective observations, and Section IV takes the subjective views of the parents into account. Higher scores indicate more severe clinical situations. There are 3 sets of age-specific NPMDSs. Depending on the patient's age at the time of the evaluation, the NPMDS for 0–24 months or that for 2–11 years was used. The GMFM-88 is composed of 5 dimensions: A, lying and rolling; B, sitting; C, crawling and kneeling; D, standing; and E, walking, running and jumping. The scores are expressed in percentages relative to the maximum score in each dimension. The total score is expressed as the mean of percentages across all 5 dimensions. As the patients were bedridden, only dimensions A and B could be assessed, and the scores for the dimensions C to E were considered to be zero %. Higher scores indicate better motor abilities. The JMDRS is the modified Japanese version of the European Neuromuscular Conference (ENMC) Mitochondrial Disease Rating Scale [8]. Higher scores in this scale indicate more severe symptoms. With the exception of Patient 4, who was only assessed with the NPMDS, all other patients were evaluated with the NPMDS and the GMFM at the same time. Patient 2 was initially monitored with the JMDRS. Then, after a 4-week-washout period, the patient was reassessed with the NPMDS and GMFM. Changes in motor functions that were too subtle to be detected with these scales were descriptively

recorded. Serum lactate and pyruvate levels as well as plasma amino acids were monitored.

## 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis of the biochemical data was performed using Mann–Whitney *U*-test. A value of  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

## 3. Results

The changes in motor function and assessment scores are summarized in Table 2.

### 3.1. Patient 1 (m.8993 T>G Leigh syndrome)

The therapy was initiated at the age of 8 years and 4 months, and at this time, this female patient was unable to roll over. In the supine position, she could not raise her legs more than 45 degrees from the floor (as measured at the hip joint). One month after the initiation of therapy, the patient gained the abilities to roll over and raise her legs vertically from the floor. The movement of her arms became more active and rapid. The overall NPMDS score changed from 42.3 to 38.6. The sum of the scores for sections I–III changed from 31 to 29, which indicates that the objective findings improved by 2 points over one month. Dimension A of the GMFM-88 also changed from 31.4% to 47.1%, which resulted in a change from 6.3% to 9.4% in the total score. Thus, this patient's improvement was confirmed semi-quantitatively with 2 scales. Next, pyruvate was withdrawn to confirm the effect of the pyruvate treatment. Within 1 to 2 weeks, the patient became lethargic and less active. After 19 days of washout, she developed status epilepticus. Resumption of pyruvate therapy restored her clinical status to the pre-washout state. Upon re-evaluation at the age of 10 years and 7 months (after 26 months of treatment excluding the washout period), the patient exhibited maintained improved motor ability as confirmed by the unchanged GMFM-88 score. The NPMDS was not administered at this point.

Blood lactate levels and lactate/pyruvate ratios measured twice during the pre-treatment period and once after the 19-day-washout were from 1.2 mM to 1.5 mM (median 1.2 mM), and from 14.2 to 25.6 (median 19.7), respectively. Those measured at 1, 4, 18 and 20 months after the treatment resumption following the washout period ranged from 0.81 mM to 1.2 mM (median 0.85 mM), and from 15.7 to 27.3 (median 20.0), respectively (Table 3). Thus, lactate levels decreased with pyruvate therapy, but the difference was not significant. Lactate/pyruvate ratio was not reduced. Plasma alanine, valine and lysine levels were measured after the washout and 1 month after the treatment resumption. None of these decreased with the therapy (Table 3).

**Table 2**  
Clinical effects of pyruvate therapy.

Patient 1, Leigh syndrome with m.8993 T>G				
		At the Tx initiation (Age 8 y 4 M)	1 month Tx (Age 8 y 5 m)	26 months Tx (Age 10 y 7 m)
ADL		Unable to roll over Unable to raise the legs > 45° in supine position	Able to roll over Able to raise the legs 90° Moves arms more rapidly	The same as the ADL at 8 y 5 m
NPMDS	I	18	18	ND
	II	2	1	ND
	III	11	10	ND
	IV	11.3	9.6	ND
	Overall	42.3	38.6	ND
GMFM	A	31.4%	47.1%	47.1%
	Total	6.3%	9.4%	9.4%
Patient 2, Leigh syndrome with m.9176 T>C. First treatment				
		At the Tx initiation (Age 8 m)	1-month Tx (Age 9 m)	12-month Tx (Age 20 m)
ADL		Unable to roll over Partially tube-fed	Unable to roll over Partially tube-fed	Able to roll over Orally fed
JMDRS		52	52	53
Patient 2, Second treatment after washout.				
		After 4-week washout (Age 5 y 3 m)	2 months after the Tx resumption (Age 5 y 5 m)	11 months after the resumption (Age 6 y 5 m)
ADL		Unable to roll over Tube-fed	Unable to roll over Tube-fed	Unable to roll over Tube-fed
NPMDS	I	13	13	15
	II	3	3	5
	III	14	14	17
	IV	4.2	4.2	16.7
	Overall	34.2	34.2	53.7
GMFM	A	5.9%	5.9%	3.9%
	Total	1.2%	1.2%	0.8%
Patient 3, complex I + IV deficiency				
		At the Tx initiation (Age 1 y 8 m)	2-month Tx (1 y 10 m)	12-month Tx (2 y 8 m)
ADL		Roll over one direction Head control fair Mild dysphagia	Roll over bilaterally Head control fair No dysphagia	Roll over bilaterally Head control poor
NPMDS	I	7	6	6
	II	6	6	2
	III	15	13	13
	IV	16.7	7.3	7.3
	Overall	44.7	32.3	28.3
GMFM	A	54.9%	66.7%	60.8%
	B	13.3%	13.3%	3.3%
	Total	13.6%	16.0%	12.8%
Patient 4, mitochondrial DNA depletion syndrome				
		At the Tx initiation (Age 1 y 7 m)	2-month Tx (Age 1 y 9 m)	41-month Tx (Age 5 y 0 m)
ADL		On respirator Unable to raise the forearm above the floor Myopathy only	On respirator Able to raise the forearm 90° at the elbow. Myopathy only	On respirator Unable to raise the forearm Encephalomyopathy
NPMDS	I	7	7	15
	II	6	6	15
	III	5	5	24
	IV	17	13	10.8
	Overall	35	31	64.8

Tx, treatment; ADL, Activities of daily living; NPMDS, Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale; GMFM, Gross Motor Function Measure; JMDRS, Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale; I–IV, Sections I–IV of NPMDS; A and B, Dimensions A and B of GMFM; ND, not done.

### 3.2. Patient 2 (m.9176 T>C Leigh syndrome)

Pyruvate therapy was initiated at the age of 8 months for this male patient who was unable to roll over and had poor head control. Oral feeding was partially possible. After one-month of treatment, motor

function was not altered and neither was the JMDRS score, which was 52. After 12 months of treatment, at the age of 1 year and 8 months, the patient was able to roll over and full oral feeding became possible. However, these subtle changes were not detected by JMDRS. The JMDRS score actually increased by 1 point due to seizures. At 3 years

**Table 3**  
Changes in blood lactate and amino acids levels with pyruvate therapy.

	Lactate (mM)		Lactate/Pyruvate ratio		Alanine ( $\mu$ M)		Valine ( $\mu$ M)		Lysine ( $\mu$ M)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Patient 1	1.2 (1.2–1.5) (3)	0.85 (0.81–1.2) (4)	19.7 (14.2–25.6) (3)	20.0 (15.7–27.3) (4)	256 (1)	439 (1)	165 (1)	263 (1)	104 (1)	200 (1)
Patient 2	2.8 (1.2–4.4) (2)	2.4 (0.9–3.1) (5)	23.2 (19.2–27.2) (2)	23.1 (14.7–30.5) (5)	402 (360–443) (2)	340 (320–428) (5)	173 (172–174) (2)	168 (135–171) (5)	139 (96.6–180) (2)	112 (96.2–172) (5)
Patient 3	3.9 (2.5–8.0) (4)	5.6 (3.7–9.3) (7)	25.0 (14.7–35.3) (4)	30.5 (17.7–45.9) (7)	543 (427–659) (2)	729 (549–840) (7)	171 (154–188) (2)	219 (149–280) (7)	117 (87.8–146) (2)	122 (88.7–172) (7)
Patient 4	2.3 (2.1–2.7) (4)	2.5 (2.3–2.7) (5)	16.9 (14.9–18.7) (4)	17.3 (14.1–21.2) (5)	350 (1)	384 (381–386) (2)	140 (1)	187 (182–191) (2)	108 (1)	158 (157–158) (2)

Mann–Whitney U-test did not show any significant differences.

of age, the patient developed acute encephalopathy associated with a viral infection and lost the abilities of oral feeding and rolling over. To re-evaluate the efficacy of pyruvate, the patient was reassessed with the NPMDS and GMFM-88 at the age of 5 years and 3 months after a 4-week pyruvate washout period. The washout did not cause any deterioration. Two months after the resumption of the pyruvate therapy, neither the NPMDS (overall score, 34.2) nor the GMFM-88 (total score 1.2%) scores changed. After 11 months of therapy after the washout, the scores for all sections of the NPMDS increased, and the overall score increased by 19.5 points. The total GMFM-88 score decreased from 1.2% to 0.8%. Thus, pyruvate was not effective for this patient.

Blood lactate levels and lactate/pyruvate ratios measured twice during 2 months before the first pyruvate therapy at the age of 8 months were 1.2 mM and 4.4 mM (median, 2.8 mM), and 19.2 and 27.2 (median, 23.2), respectively. Those at 1, 2, 3, 4 and 12 months after the therapy ranged from 0.9 mM to 3.1 mM (median, 2.4 mM) and from 14.7 to 30.5 (median, 23.1), respectively. Lactate levels and lactate/pyruvate ratios did not change significantly with the therapy (Table 3). Plasma alanine, valine and lysine levels measured twice before and at 1, 2, 3, 4 and 12 months after the therapy showed a mild but non-significant decrease with the therapy (Table 3).

### 3.3. Patient 3 (combined deficiencies of complex I and IV)

This male patient presented with developmental delay, nystagmus, hypertrophic cardiomyopathy and mild hearing disturbance (38 dB). At the age of 11 months, he developed status epilepticus followed by regression. Increased lactate levels and lactate/pyruvate ratio in the cerebrospinal fluid (CSF) (lactate:5.2 mM, lactate/pyruvate ratio: 20.0) and blood (lactate: 12.3 mM, lactate/pyruvate ratio: 41.6) led to a skin biopsy, which revealed deficiencies in complexes I and IV; the activities of complex I and IV relative to the activity of citrate synthase were 24.7% and 22.9% of normal controls ( $n = 12$ ), respectively, and those relative to the activity of complex II were 33.5% and 31.4% of normal, respectively. Muscle biopsy could not be obtained. The clinical signs and symptoms fulfilled the mitochondrial disease criteria for definite mitochondrial disorder proposed by Morava et al. [9]. No mutation was revealed in the mitochondrial DNA. Molecular analysis of the nuclear genes is under way. Treatment with coenzyme Q<sub>10</sub> at the age of 1 year and 6 months did not produce any improvement. Pyruvate therapy was initiated at the age of 1 year and 8 months, and at this time the patient had mild dysphagia and incomplete head-control. He could roll over only in one direction. After 2 months of pyruvate therapy with a maintenance dose of 1.0 g/kg/day, he gained the ability to roll over bilaterally and the dysphagia disappeared. The total scores for sections I–III decreased from 28 to 25, and the score for IV also decreased from 16.7 to 7.3. The GMFM-88 score increased from 13.6% to 16.0%. Thus, the efficacy of the 2-month pyruvate therapy was confirmed by both scales. However, over the next 10 months, a slow regression in motor function was observed, and at 2 years and 8 months of age (after 12 months of treatment), this patient's GMFM-88 score decreased from 16.0% to 12.8%. However, the scores for section II of the NPMDS (the version for 2–11 year-olds was used) decreased by 4 points due to improvements in seizures and gastrointestinal and hepatic function. The regression of motor function that was evident in the GMFM-88 was not detected by the NPMDS (the scores for sections I and III were unchanged).

Blood lactate levels and lactate/pyruvate ratios measured 4 times during the 9-month pre-treatment period ranged from 2.5 mM to 8.0 mM (median, 3.9 mM), and from 14.7 to 35.3 (median, 25.0), respectively. Those measured 1, 2, 3, 4, 6, 9 and 12 months after the therapy ranged from 3.7 mM to 9.3 mM (median, 5.6 mM), and from 17.7 to 45.9 (median 30.5), respectively (Table 3). Thus, neither the blood lactate levels nor the lactate/pyruvate ratios decreased with the pyruvate therapy. Among the measurements, those measured twice during the first 2-month treatment, which was clinically effective, did not show any decrease either. Plasma alanine, valine and lysine levels were