

表4 誘因薬剤

誘発薬物として疑われているもの
すべての揮発性麻酔薬(エンフルレン, ハロセン, イソフルレン, セボフルレン, エーテル, シクロプロパン), 脱分極性筋弛緩薬(サクシニルコリン)
比較的安全な薬剤とされているもの
局所麻酔薬(アミド型麻酔薬, エステル麻酔薬)
静脈麻酔(barbiturate, オピエト, プロポフォール, ケタミン, ベンゾジアゼピン誘導体, エトミデート)
ダントロレン
ジギタリス
エピネフリン, ノルエピネフリン
亜酸化窒素(笑気)
非脱分極性筋弛緩薬(クラーレを除く): パンクロニウム, ベクロニウムなど

ある。skinned fiber を用いて、①カフェイン<sup>7)</sup> およびハロセン感受性テスト<sup>8)</sup>、②カルシウム誘発性カルシウム遊離(CICR)が行われている<sup>9)</sup>。前者の感度と特異度はそれぞれ91%と86%であった。現在、広島大学と東邦大学の麻酔科で行われている。診断的筋生検が行われる場合に、ダントロレンは試験結果に影響を与えるため投与しない。

### c) 遺伝子診断

前述したように、MHに関連したRYR1領域の点変異は20カ所以上も報告されている<sup>2)</sup>。ヒトMHは単一変異の遺伝子疾患ではないため、これで診断できる確率は低いであろう。さらに、現在判明している遺伝子異常がない場合でも本症は否定できない。

### 5. 誘因薬剤

succinylcholine (脱分極性筋弛緩薬)とhalothaneの併用がもっとも多いが、いずれかの単独使用でも発症しうる。そのほかの吸入麻酔薬でも原因となりうる。局所麻酔、脊髄麻酔、硬膜外麻酔は通常は本症を発症しないとされている。また、患者の不安や緊張、体動といった状態が発症に対して促進的に作用するといわれる(表4)<sup>10)</sup>。

### 6. 治療

適切な治療が行われないと、多くは急速に進展して、さらに腎不全、DIC、呼吸不全、心不全など多臓器不全へと移行する。

① 発症時の治療: 症状発現が緩徐な症例、あるいはまだ麻酔時間が短いときは麻酔薬投与を中止することで十分である。ただちに外科医に診断を告げ手術を中止してもらい応援をよぶ。

② 吸入器は100%酸素とし、過換気とする。麻酔回路は可能な限り麻酔ガスに曝露されていない麻酔器と交換する。

③ ほとんどが対症療法であるが、ダントロレン投与が唯一の特異的治療法である<sup>11)</sup>。2 mg/kgを静注する。有効な血中濃度は数時間維持される。心拍数が低下して不整脈がなくなり明らかに筋緊張が低下し、体温が低下しはじめるまで効果をみて5分以上の間隔で反復する(total 10 mg/kg以下)。ダントロレンナトリウムは、ジヒドロピリジン受容体と結合してリアノジン受容体との共役を阻害し、筋小胞体からのCa放出を抑制することにより、筋の興奮収縮連関に作用して収縮力を減弱させる(図)。1バイアル20 mgであり、蒸留水60 mlで溶解。専用静脈路から10~15分かけゆっくり投与(通常の輸液剤と混注すると、ダントロレンが析出)。症状によって随時追加投与が必要。通常2.5 mg/kgが平均投与量である。ダントロレンの作用点は骨格筋内の筋小胞体であり、筋強直が強い場合、血流が阻害され、薬物が作用点に到達できない可能性がある。対症療法を十分に行うことが必要である。

④ 代謝性アシドーシスをメイロンで補正す

る。

⑤ 体温冷却(表面冷却, 体腔冷却, 血液冷却)を行い 38~39°Cを目標とする。急激な冷却による低体温にも注意する。

⑥ ミオグロビン尿による腎前性腎不全の徴候に対して, カリウム free の補液および利尿剤の投与により尿量の確保を行い予防する。2 ml/kg/hr 以上を目標とする。腎不全に伴う高カリウム血症に対して, グルコース・インスリン療法を行う。

⑦ 脳浮腫に対し, 浸透圧性利尿剤マンニトール 0.25~1.0 g/kg を 6~8 時間ごとに 30~60 分で点滴静注する。マンニトールはダントロレンにも多少含まれているが (1 mg 当り 150 mg), 十分な尿量確保のため追加投与が必要である。やや過換気状態 (PaCO<sub>2</sub> 25~30 mmHg) に維持する。脳代謝を抑える目的で, バルビタール投与を含めた低体温療法を検討する。

⑧ 血液凝固異常発生の可能性は高く, 欠乏因子に応じた治療を行う。

⑨ 他の治療薬選択に関する留意点として, 状況を複雑にする可能性のある薬物投与を避ける。塩化カルシウム, グルコン酸カルシウム, ジギタリス, 交感神経刺激薬は以前から禁忌といわれている。実際は問題を悪化させないようであるが, 明確な適応がない限り避けたほうがいい。カルシウムチャネル拮抗薬は禁忌である。ダントロレンと干渉して重篤な心筋抑制を生じるうえ, 悪性高熱症での治療意義をもたない。

⑩ 各種モニタリングについて: 通常モニター(心電図, パルスオキシメーター, 血圧計)に加え, ET CO<sub>2</sub>, core BT (15 min おきに check), 採尿パック。必要があれば, CVP を計測する。

## 7. MH を発症しやすい症例の検知

### MH 素因患児

- ① MH の発症既往者
- ② 筋生検検査陽性患児
- ③ MH 素因患者(発作既往患者, 筋生検検査

陽性患者) の肉親兄弟

④ 筋肉疾患や血清 CK 値異常から悪性高熱素因が疑われる症例

### ⑤ 脊髄疾患患者

実際の麻酔管理には“肉親に麻酔時にトラブルがあったが筋生検は行われていない”などの既往歴から推察しなければならない場合が多い。こうした場合, 誘発因子を含まない麻酔を行うのがもっとも簡単である。素因者を術前に検知する簡単で確実な方法はまだない。

まず, 素因者を検出するうえで, 本人家族の詳細な問診が重要であり, 既往歴, 麻酔歴, 家族歴(関連疾患の有無および MH 罹患者の有無)を聴取し, 麻酔薬投与前に把握しておく必要がある。クレアチンホスホキナーゼ(CK)は通常高値を示すが, 非特異的であり素因の検出, 確認には不十分であるが, 家族素因のある人に CK 高値の人は素因を有する可能性はある。さらに, 本症と関連する遺伝子素因をもつ患者では, 2 回目以後の麻酔で発症する可能性が高いことを念頭に置く。

ルーチンのダントロレン術前予防的投与は勧められないが, きわめて高リスクの患者や, MH 素因が知られている患者では術前のダントロレン 2.4 mg/kg 静注は利点があると考えられる。

---

## II. 悪性症候群 (neuroleptic malignant syndrome : NMS)

---

向精神病薬(ことにメジャーランキライザーや抗うつ薬)の使用時にみられる重篤な中枢神経系の副作用であり, MH とは病態を異にしている<sup>10)</sup>。NMS の病態としてドパミン・セロトニン系の不均衡(ドパミン系の相対的な低下), あるいはアセチルコリン, GABA 系の不均衡説があるほか, カルシウム遊離機構に問題があるという説もあるが, 確立されていない。

臨床症状は発熱，筋固縮，頻脈，ミオグロビン尿，自律神経不安定症状に特徴づけられ，MHに類似する。まれに小児でも報告されており，その場合診断がつかなくなったり，MHと混同されたりしている。病態が肝不全，腎不全へと進行する場合もある。

治療は，向精神病薬を中止するほか dopamine 作動薬やダントロレンが投与される。NMS は再発することが多い。NMS 回復後の現病の治療には，抗 dopamine 作用の少ない thioridazine が勧められている。

### III. 横紋筋融解症 (rhabdomyolysis)

#### 1. 概 念

骨格筋の筋鞘の崩壊により，筋細胞の内容成分が流出したことで引き起こされた病態をいう。臨床的には筋由来酵素が上昇するのみの無症候性のものから，ミオグロビン尿を呈し急性腎不全を惹起するものまで多彩である<sup>12)</sup>。原因はさまざまであるが，先天性筋疾患の初発として発見される可能性もあり，小児科医としても重要な疾患である。

#### 2. 発生機序

横紋筋融解症の原因は，外傷性と非外傷性に大別される(表5)<sup>13)</sup>。外傷性は，マラソンなどの過度の運動，倒壊した建物の下敷による圧迫(挫滅症候群)，激しい全身性けいれん，熱射病，閉塞性動脈硬化症などによる動脈閉塞などが原因となる。筋肉の虚血もしくは機械的障害によって骨格筋細胞内の ATP の減少，引き続く筋細胞内の Ca の貯留により細胞消化誘導が起こる。以後，融解した筋肉から，ミオグロビン，CK，LDH，GOT，GPT，アルドラーゼなどの筋逸脱酵素群が流出する。なかでもミオグロビンはその代謝産物(ヘマチンなど)とともに，尿細管細胞障害，血管収縮，尿細管閉塞(ミオグロビンなどが腎臓に詰まる)により腎尿細管

細胞を著しく障害し，急性腎不全症状を併発する。近年の報告によれば4.7~36%に急性腎不全を発症するといわれている。

そのほか，まれに呼吸筋が障害され呼吸困難をきたす場合もある。非外傷性の横紋筋融解症の原因には，先天性代謝性筋疾患，感染症，低カリウムや低リン血症，薬剤，麻薬などによる。小児では，横紋筋融解症の発症により，先天性の筋酵素欠損による種々の筋疾患が診断されることもある。

#### 3. 臨床症候

横紋筋融解症の自覚症状としては，急激な四肢近位筋の脱力，腫脹，しびれ，痛みなどから発症する。さらに筋肉から流出したミオグロビンによる赤褐色尿などが，筋症状出現後2~24時間以内に出現し，1~3日間持続する。筋症状は数週間持続し，症例によっては2~3カ月持続することがある。発症時に悪寒，発熱，嘔気を伴うことがある。横紋筋融解症が繰り返し，継続的に起こると，筋萎縮，筋力低下などの障害を起こすが，重篤な横紋筋融解症では1回の発症で急性腎不全を起こすことがある。

#### 4. 検 尿

肉眼的に特徴的な赤褐色の尿を呈する。尿潜血反応は陽性であるが，沈渣に赤血球はみられない。着色尿(ヘモグロビン尿，ポルフィリン尿，薬物尿など)との鑑別が必要である。ミオグロビンは血中で15~20 mg/dl まではミオグロビン蛋白と結合しており，20 mg/dl 以上で尿中に出現する。25 mg/dl 以上で肉眼的に暗褐色の着色尿が観察される。

尿中ミオグロビン上昇による急性腎不全が発症すると，急性腎不全による乏尿その他の症状が加わる。ミオグロビンによって急性腎不全が起きるのは，脱水，全身循環動態の変化などを伴った場合が多い。

#### 5. 血液生化学的検査

生化学では，筋系酵素である血清CK，アルドラーゼ，GOT，LDHの上昇がみられる。崩壊筋

表 5 横紋筋融解症の原因

1. 外傷性	CPT II deficiency
1) 労作性：過激な運動，熱射病，けいれん重積，喘息発作重積，長時間の心肺蘇生	Satoyoshi syndrome
2) 挫傷 (crush syndrome)，熱傷，感電	8. その他
3) 虚血：塞栓，コンパートメント症候群，鎌状赤血球症，DIC	肢体型筋ジストロフィー
2. 非外傷性	Marinesco-Sjögren syndrome
1) 遺伝的原因	2) 感染症
1. 解糖系酵素	1. ウイルス
Myophosphorylase deficiency (McArdle's disease)	EBV, CMV, HSV, インフルエンザ A, パラインフルエンザ, コクサッキー A 9, B 5, エコー-6, 9, アデノ 21 など
Phosphofructokinase deficiency	2. 細菌
Phosphoglycerate kinase deficiency	黄色ブドウ球菌 (toxic shock syndrome), サルモネラ菌, 肺炎球菌, レジオネラ菌, 大腸菌, 腸チフス, プルセラ症, 野兔病, ガス壊疽, 敗血症など
Phosphoglycerate mutase deficiency	3. その他
Lactate dehydrogenase (LDH)-A deficiency	アスペルギルス, カンジダ, マイコプラズマ, ワイル病など
Phosphorylase b kinase deficiency	3) 代謝性
Debrancher enzyme deficiency	1. 電解質異常
2. 脂質代謝	低カリウム血症, 低リン血症, 低ナトリウム血症, 高ナトリウム血症
Carnitine palmitoyl transferase (CPT) II deficiency	2. 糖尿病性昏睡
Carnitine deficiency	3. 腎尿細管性アシドーシス
Acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiencies	4. 甲状腺機能低下症
Electron transfer flavoprotein (ETF) deficiency	5. 水中毒
ETF dehydrogenase deficiency	4) 炎症性または自己免疫性筋疾患
Ketoacyl CoA thiolase deficiency	多発性筋炎, 皮膚筋炎, カルチノーマ
Long-chain fatty acid $\beta$ -oxidation defects	5) 薬物・毒素
3. クレブス回路	1. 代謝異常 (抗コリン剤, 抗うつ剤, 抗ヒスタミン剤, 高脂血症治療薬, アルコール)
Aconitase deficiency	2. 低カリウム血症 (アンフォテリシン, カフェイン, テオフィリン, サイアザイド系利尿剤)
Lipoamide dehydrogenase deficiency	3. 虚血 (アミノカブロン酸, コカイン, バソプレッシン)
4. ペントースリン酸系	4. 自己免疫 (シクロスポリン, レボドーパ)
G 6 PDH deficiency	5. 膜への影響 (サクシニルコリン, コルヒチン, トルエン, 四塩化炭素, パンクロニウム)
5. プリンヌクレオチド系	6. 過興奮 (ケタミン, リチウム, LSD, ストリキニン)
Myoadenylate deaminase deficiency	7. 悪性症候群 (レボドーパやドーパミン作動薬の中止, プチロフェノン, フェノチアジン)
6. ミトコンドリア呼吸鎖	8. セロトニン作動性症候群 (アンフェタミン, ペチジン, MAO 阻害剤, SSRI, 三環系抗うつ剤)
Succinate dehydrogenase/complex II deficiency	6) 毒素
Complex III deficiency	膜への影響 (ヘビ毒, クモ毒, スズメバチ毒), きのこ毒?
Cytochrome c oxidase deficiency	
Mitochondrial tRNA point mutations	
Multiple mitochondrial DNA deletions?	
nuclear gene dysregulation	
Uncharacterised mitochondrial myopathies	
7. 悪性高熱症 (MH)	
Familial MH (RYR 1, CACNA 1 S mutations)	
Central core disease	
Duchenne and Becker muscular dystrophies	
Myotonic dystrophy	
Schwartz-Jampel syndrome	
King syndrome	

由来の P, K, プリン体の遊離により, 高 K 血症, 高 P 血症, 高尿酸血症を示し, さらに筋細胞内の Ca 貯蔵のため低 Ca 血症をきたすといわれる。さらに血中あるいは尿中のミオグロビンの上昇をみる。筋融解の程度と血清中の CK 濃度は必ずしも相関しない。これは脱水, 血圧低下などの因子が急性腎不全の発症に大きくかわりをもつからであろう。

そのほか, 原因疾患および脱水, 腎不全の検索のために, 電解質 (Na, K, Cl, P, Ca) また BUN, Cr や, 血糖, 乳酸, 血液ガス, 血漿浸透圧を測定する必要がある。

## 6. 筋生検

生検部位は大腿直筋または上腕二頭筋の筋腹中央を採取する。画像診断で壊死や浮腫が疑われた箇所を局所麻酔にて採取する。各代謝性筋疾患を検出するために, 各種酵素活性の測定や免疫染色などを行う必要がある。ただし, 急性期では各代謝系酵素は活性が低下しているため, 回復期に行うこととなる。

## 7. 画像診断

筋 CT や MRI, 超音波検査などの画像診断法のほか,  $^{99m}\text{Tc}$  phosphate analogue や Ga を用いたシンチグラムにより局在がはっきりする。

## 8. 診断

横紋筋融解症が発症すれば, 細胞内物質の血中濃度が異常値を示すが, とくに筋逸脱酵素群が急激に上昇する。横紋筋融解症の確定診断には, 筋組織所見による壊死像の確認が必要であるが, 一般には血清中のミオグロビン, アルドラーゼ, CK の上昇を指標にする。一般に血清 CK, ミオグロビンの増加は, 骨格筋病変ないしは心筋障害が疑われる。高脂血症治療剤による横紋筋融解症の発現症例の多くは, 全身倦怠感, 筋肉痛とともに CK, 血中・尿中ミオグロビンの急激な上昇などが認められる。

## 9. 治療

まず原因の除去につとめる。外傷的な誘因があればその対処とともに, 進行をただちに防ぐ必要がある。急性期には基本的に, 数日間絶対安静である。尿のアルカリ化を行って利尿をはかり, 急性腎不全を予防することが予後にかかわる。急性尿細管壊死による急性腎不全では, 人工透析が必要となる。

## 文 献

- 1) Denborough MA, Lovell RRH: Anesthetic death in a family. *Lancet* 2: 45, 1960
- 2) Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F: Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 23: 4-17, 2000
- 3) 遠藤 実: ダントロレンの薬理. *Anesthesia Today* 6: 56-61, 1997
- 4) 盛生倫夫ほか: 悪性高熱症診断基準の見直し. 麻酔と蘇生 24: S 104-110, 1988
- 5) Larach MG et al: A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology* 80: 771-779, 1994
- 6) 弓削孟文: 悪性高熱症. *日本臨床* 60: 635-642, 2002
- 7) Kalow W et al: *Lancet* 2: 895-898, 1970
- 8) Takagi A et al: *Proc Jpn Acad* 52: 603-606, 1976
- 9) 遠藤 実: 筋生検による MH スクリーニングテスト. 麻酔と蘇生 23: S 145-151, 1987
- 10) 高木昭夫: 悪性高熱・悪性症候群. *新筋肉病学*, 南江堂, pp 789-794, 1995
- 11) 古賀靖敏: 悪性症候群. *小児内科* 33(増刊号): 762-763, 2001
- 12) Warren JD, Blumberg PC, Thompson PD: Rhabdomyolysis; A review. *Muscle Nerve* 25: 332-347, 2002
- 13) 三牧孝至: 横紋筋融解症. *小児内科* 30: 1329-1333, 1998

# 綜 説

## 神経症状を有する ミトコンドリア遺伝子異常

古賀 靖敏\* 古賀 敦子\*

### 要 旨

ミトコンドリア病は、ミトコンドリアのエネルギー産生系酵素の遺伝的異常により引き起こされる難治性進行性疾患である。その臨床症状は多岐にわたるが、なかでも神経系症状はミトコンドリア病のもっとも普遍的な症候の一つである。West 症候群、Lennox-Gastaut 症候群などの難治性けいれん性疾患、精神運動発達遅滞、Leigh 脳症、ミオクローヌス、慢性の片頭痛、行動異常、急性脳症、筋力低下、外眼筋麻痺、視野異常(失明)、神経難聴(感音性難聴)、脳卒中、知的退行、まだら痴呆などさまざまな症候を呈する。本稿では、われわれが経験した遺伝子異常が判明したミトコンドリア病の多岐にわたる神経症状を紹介し、その臨床的多様性に関し報告する。

### I. ミトコンドリア病と遺伝子変異

ミトコンドリア病は、ミトコンドリアのエネルギー産生系酵素の遺伝的異常により引き起こされる難治性進行性疾患である。エネルギー産生障害を伴うことから、エネルギー依存度の高い中枢神経系、骨格筋、心筋などの臓器障害をきたすことが多い。

病因としての遺伝子変異は、核もしくはミトコンドリア DNA のいずれかの異常が考えられる。現在までに、150 種類以上の点変異、微小欠失、大欠失、増幅などがミトコンドリア DNA 異常症として(図 1)、また、50 種以上の核 DNA の異常がミトコンドリア病の責任遺伝子異常として報告されている(図 2)。

今回、神経学的異常をきたした種々の点変異

を有する症例の臨床像、頭部画像、生化学検査、筋および脳病理所見を紹介し、ミトコンドリア病における神経所見に関し考察する。表に代表的なミトコンドリア病各病型の特徴的症候を示す。

### II. MELAS タイプのミトコンドリア tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) 遺伝子の A 3243 G 変異の臨床スペクトル

MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes) の 80% の患者でミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 遺伝子の A 3243 G 変異が<sup>1)</sup>、10% の患者で同じ遺伝子の T 3271 C

\* Yasutoshi KOGA, Atsuko KOGA 久留米大学医学部小児科

[連絡先] ☎ 830-0011 福岡県久留米市旭町 67 久留米大学医学部小児科

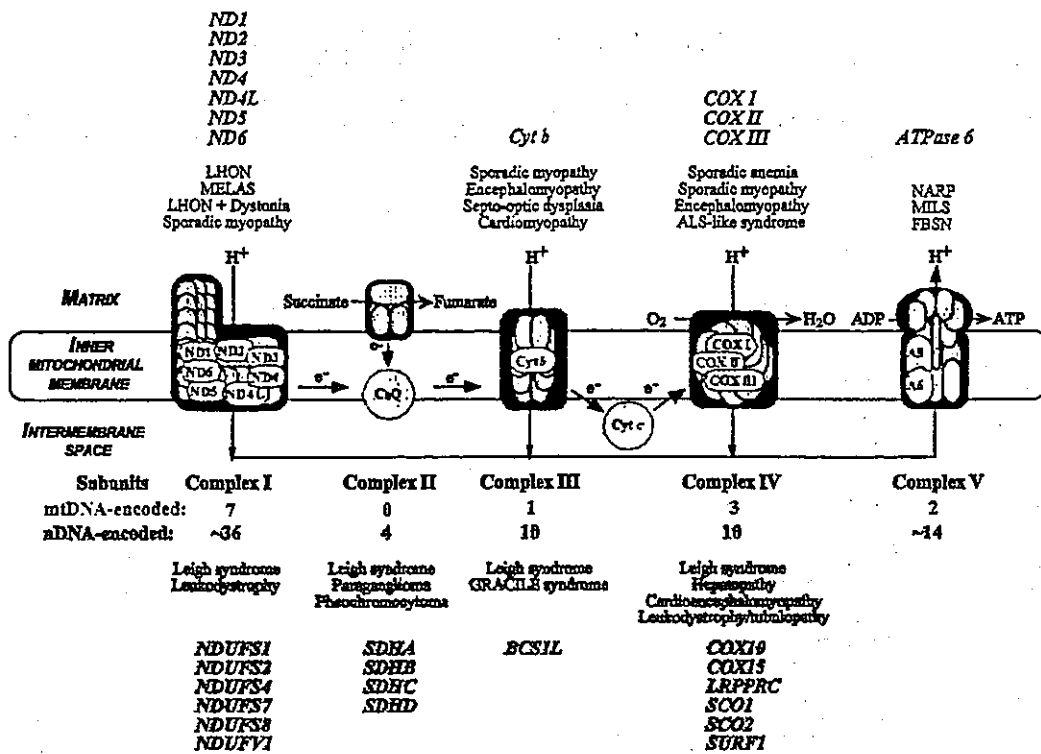


図1 ミトコンドリア病と遺伝子変異

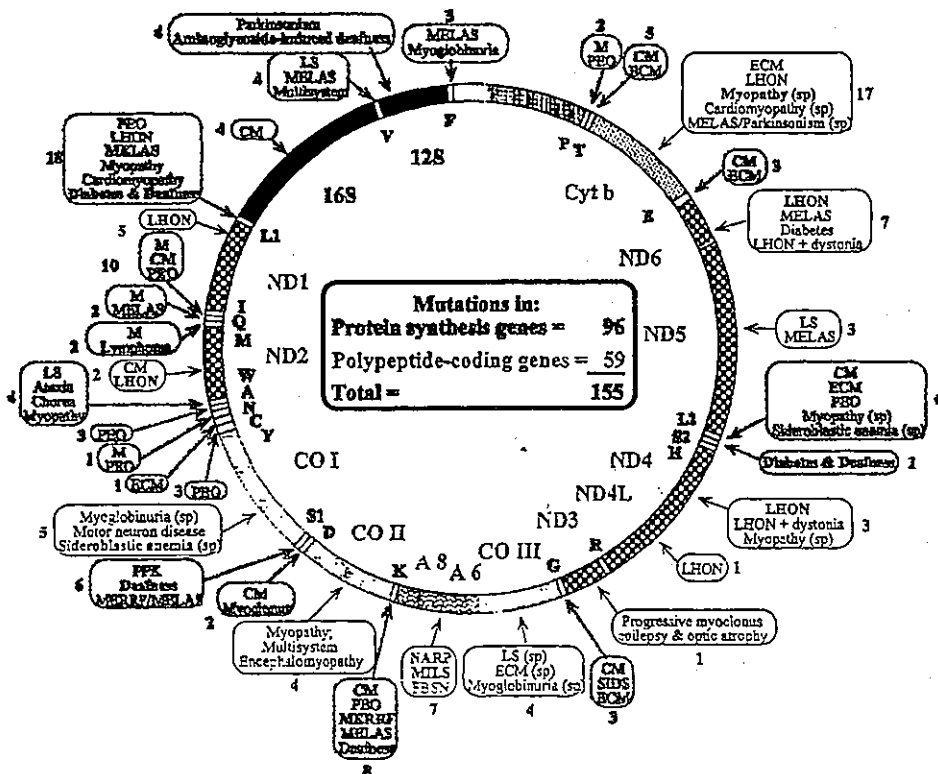


図2 ミトコンドリア病とミトコンドリア DNA 異常の関係

表 代表的なミトコンドリア病各病型の特徴的症候

Tissue	Symptom/Sign	D-mtDNA		tRNA		ATPase6	
		KSS	Pearson	MERRF	MELAS	NARP	MILS
CNS	Seizures	-	-	+	+	-	+
	Ataxia	+	-	+	+	+	+/-
	Myoclonus	-	-	+	+/-	-	-
	Psychomotor Retardation	-	-	-	-	-	+
	Psychomotor Regression	+	-	+/-	+	-	-
	Hemiparesis/hemianopia	-	-	-	+	-	-
	Cortical blindness	-	-	-	+	-	-
	Migraine-like headaches	-	-	-	+	-	-
	Dystonia	-	-	-	+	-	+
PNS	Peripheral Neuropathy	+/-	-	+/-	+/-	+	-
Muscle	Weakness	+	-	+	+	+	+
	Ophthalmoplegia	+	+/-	-	-	-	-
	Ptosis	+	-	-	-	-	-
Eye	Pigmentary retinopathy	+	-	-	-	+	+/-
	Optic Atrophy	-	-	-	-	+/-	+/-
	Cataracts	-	-	-	-	-	-
Blood	Sideroblastic Anemia	+/-	+	-	-	-	-
Endocrine	Diabetes Mellitus	+/-	-	-	+/-	-	-
	Short stature	+	-	+	+	-	-
	Hypoparathyroidism	+/-	-	-	-	-	-
Heart	Conduction block	+	-	-	+/-	-	-
	Cardiomyopathy	+/-	-	-	+/-	-	+/-
GI	Exocrine pancreas Dysfunction	+/-	+	-	-	-	-
	Intestinal pseudo-obstruction	-	-	-	-	-	-
ENT	Sensorineural hearing loss	-	-	+	+	+/-	-
Kidney	Fanconi's Syndrome	+/-	+/-	-	+/-	-	-
Lab	Lactic Acidosis	+	+	+	+	-	+/-
	Muscle bx: RRF	+	+/-	+	+	-	-
Inheritance	Maternal	-	+	+	+/-	+	+
	Sporadic	+	-	-	+/-	-	-

遺伝子の変異が報告された<sup>2)</sup>。その後、同じ遺伝子の A 3252 G, C 3256 T, T 3291 C などの変異が同じ病型で見出された。いずれの点変異もミトコンドリア tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 遺伝子に存在することから、生物学的な特別の意味が考えられるが現在のところ不明である。

われわれは、同じ A 3243 G 変異をもちながら、臨床的には Leigh 脳症, MELAS, PEO (慢性進行性外眼筋麻痺), そしてミトコンドリア糖尿病と臨床的に異なる病型を示す家系を経験した<sup>3,4)</sup>。各々の病型で、点変異の含量, 臓器分布と臨床的多様性の関係につき考察する。

### 1. Leigh 脳症

症例は、0 歳時より精神運動発達の遅れとフロッピーインファントで発見された。常時高乳酸, ピルビン酸血症が観察され、髄液での値は

血中より高値であった。その後けいれんがみられ、脳波異常より West 症候群と診断され、抗けいれん剤を投与された。極端な筋力低下から 3 歳でも loose shoulder sign が観察され、独歩不可能であった。難治性けいれんが続き、脳波所見より Lennox-Gastaut 症候群への移行が考えられた。

6 歳時、フロッピーインファントの鑑別目的で筋生検が施行された。筋生検では、modified Gomori-trichrome (mGT) 染色ですべての筋線維が赤ボロ線維 (ragged-red fiber: RRF) 化していた。チトクローム C 酸化酵素染色では、酵素活性の低下を示す筋線維が多くみられた。経過中、感染を契機とし、高乳酸血症を伴う代謝性アシドーシスを何度も繰り返し、10 歳で多臓器不全で死亡した。



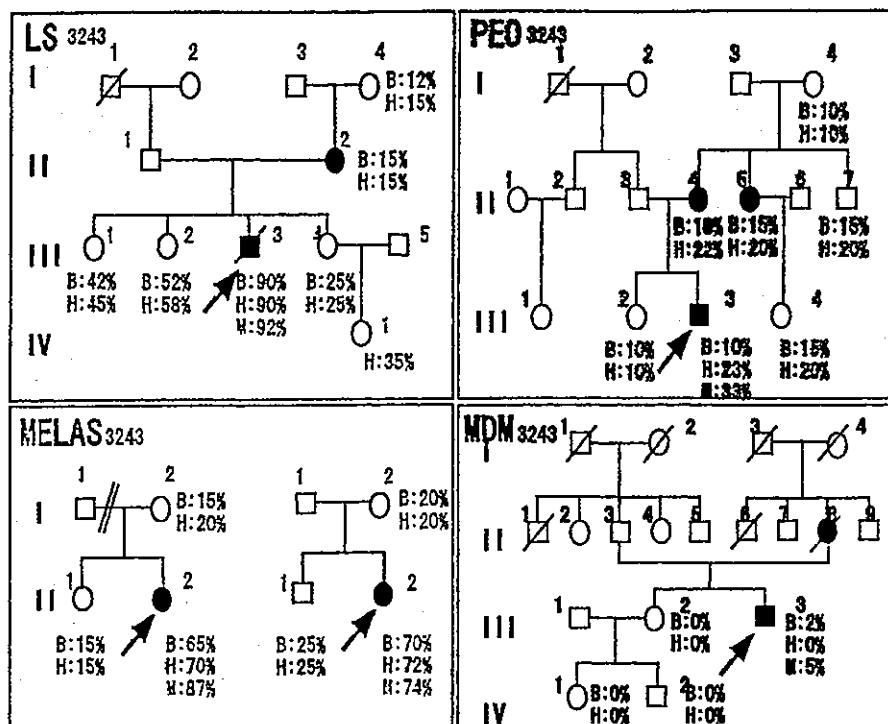


図3 家系図 (Koga Y et al, 2000<sup>3)</sup>)

頭部 CT では、大脳基底核の石灰化と著明な脳実質の萎縮をきたし、剖検で大脳基底核の両側対称性壊死とグリアの増生が確認され、臨床的、神経病理学的に Leigh 脳症と確定できた。剖検後の検索で、ミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 遺伝子の A 3243 G 変異がいずれの体細胞でも 90% 以上と高度に蓄積していた。家系検索を図 3 LS<sup>3243</sup> (LS<sup>3243</sup> III-3)<sup>3)</sup>、筋病理所見を図 4 LS<sup>3243</sup> に示す<sup>4)</sup>。

## 2. MELAS

13 歳で頭痛と発作性嘔吐、右同名半盲、半身けいれんで発症した女兒。検査にて高乳酸ピルビン酸血症が判明し、ミトコンドリア脳筋症が疑われた。CT にて大脳基底核の両側対称性石灰化を認め、MRI の T1 強調で左後頭葉領域に低信号、T2 および Flair 強調で同部位に高信号シグナルを認めた(図 5)。筋生検では、mGT 染色で典型的な RRF を多数認めた。ミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 遺伝子の A 3243 G 変異が筋肉で 65% に認められた。家

系検索を図 3 MELAS<sup>3243</sup> (MELAS<sup>3243</sup> II-2) に、筋病理所見を図 4 MELAS<sup>3243</sup> に示す。

## 3. 進行性外眼筋麻痺 (progressive external ophthalmoplegia : PEO)

26 歳の男性。20 歳ごろより複視に気づき、眼瞼下垂も起こってきたため、大学病院受診。心伝導ブロックはなく、髄液の高蛋白所見もなく、進行性外眼筋麻痺と診断された。末梢血リンパ球検査よりミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 遺伝子の A 3243 G 変異が確認された。家系検索を図 3 PEO<sup>3243</sup> に示す。

## 4. 頑固な片頭痛、視野異常、低身長

12 歳の男児。周産期、および乳幼児期の発育、発達に異常なし。患者の家系図を図 6 に示す。小学校入学以降、身長の伸びが次第に低下し、現在は極端な低身長となっている (-4.2SD)。2 次成長に伴う伸長は 13 歳時で 4.2 cm/年であり、平均値の 42% であった。また、小学校のころから頻回に頭痛、腹痛、嘔吐の症状があり、学校をよく休んだ。筋力が弱く、トイレにしゃ

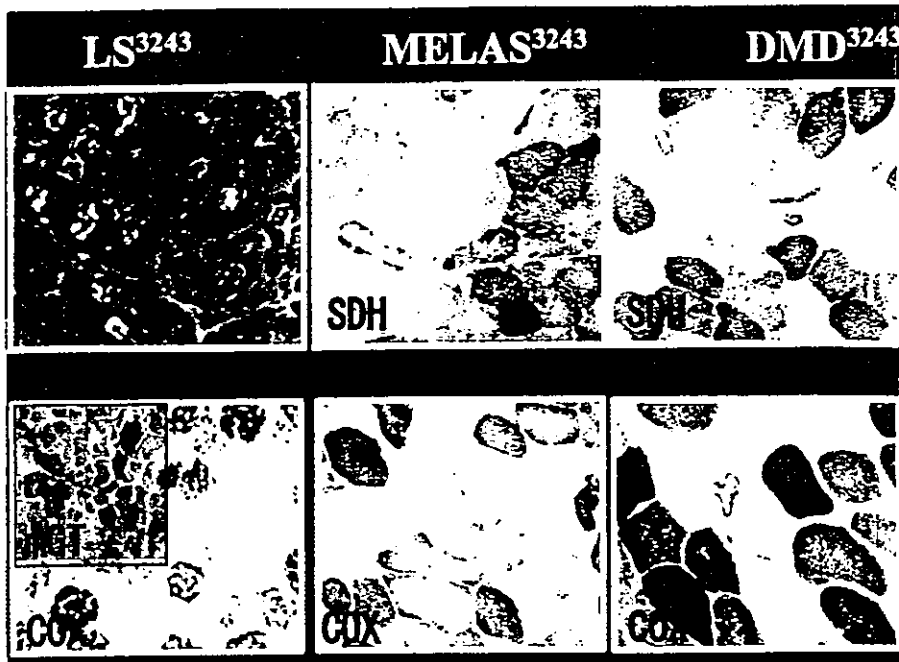


図4 筋病理所見

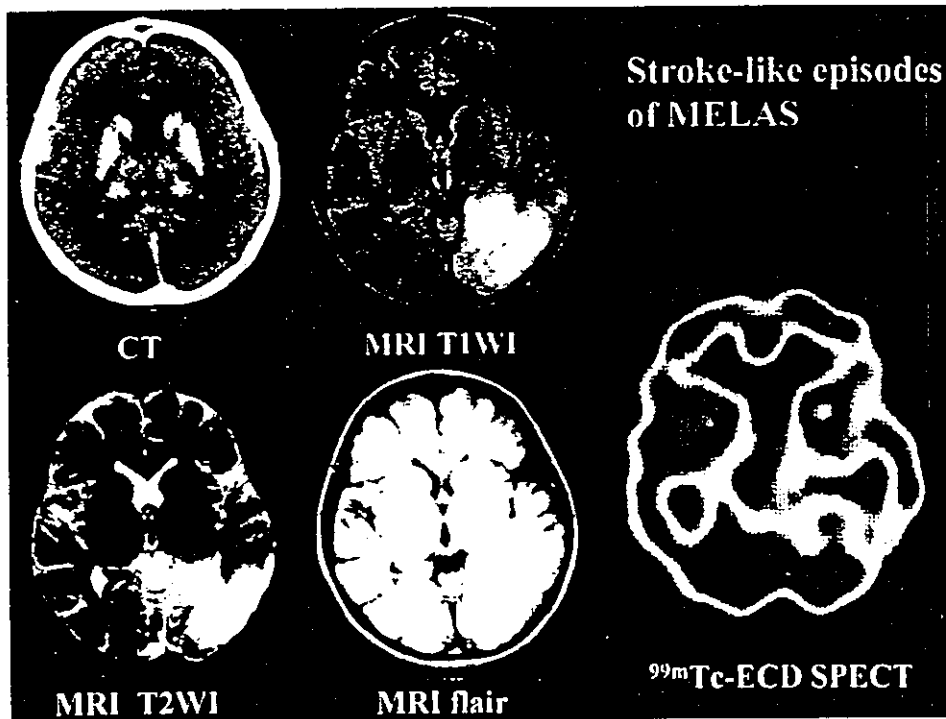


図5 画像所見

がみ込む姿勢がとれなかった。長距離走などで、しばらく走ると、いつも吐き気が出現するため、学校の体育は休みがちであった。

12歳ころから、片頭痛とともにときおり目の

前が真っ白になり何も見えなくなるといった症状が出現していた。14歳5カ月時、中学校で頭部打撲したあと気分不良を訴え、救急外来受診。頭部CTにて大脳基底核の異所性石灰化像を指

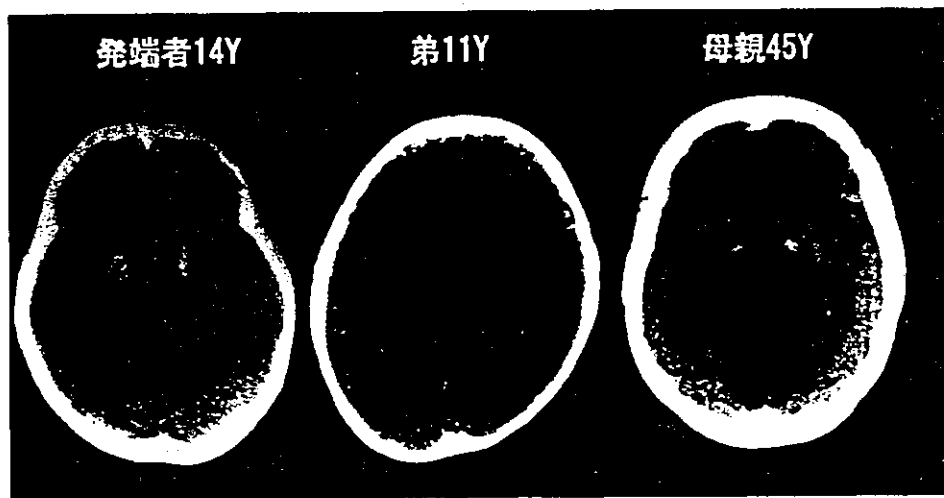
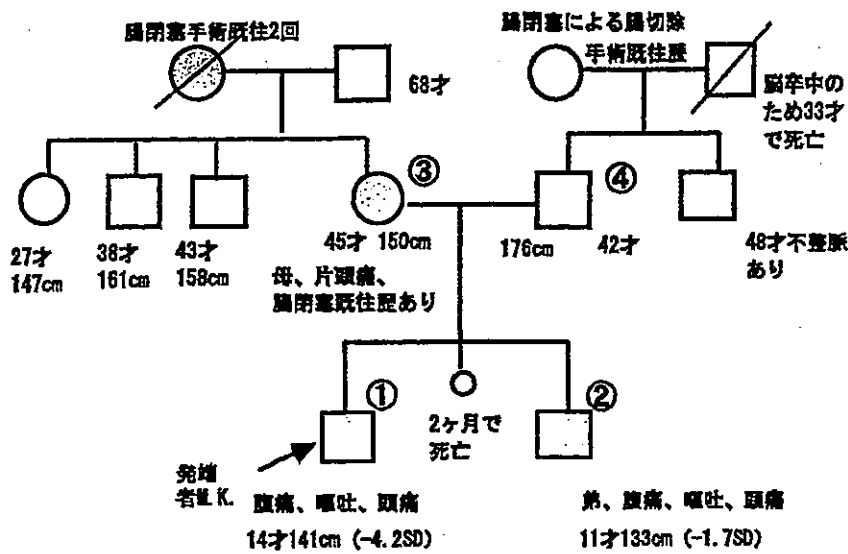


図7 大脳基底核の異所性石灰化

摘された。同年、自宅で急に目が見えなくなると訴えたあと全身性強直性間代性けいれんを起し、救急搬送された。

4歳若い弟にも頑固な頭痛、低身長などの同じ症状があるために、母親と一緒に頭部CT検査を行ったところ、全員に大脳基底核の異所性石灰化像を認めた(図7)。

#### 5. 糖尿病

28歳の男性、II型糖尿病で発症した患者で、末梢血リンパ球検査よりミトコンドリアDNA

の tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 遺伝子の A 3243 G 変異が確認された。筋力低下はなく、他の神経症状は認めない。家系検索を図3 MDM<sup>3243</sup>に示す。

#### 6. まだら痴呆症 (MELAS のターミナルステージ)

23歳の女性、12歳で半身けいれん、一過性失明、半盲などの典型的な脳卒中症状で MELAS と診断された。就学前は、やせ形で吐きやすく、運動音痴に気づかれていた。小学校高学年より、後大脳動脈領域の虚血性病変に起因する閃輝暗

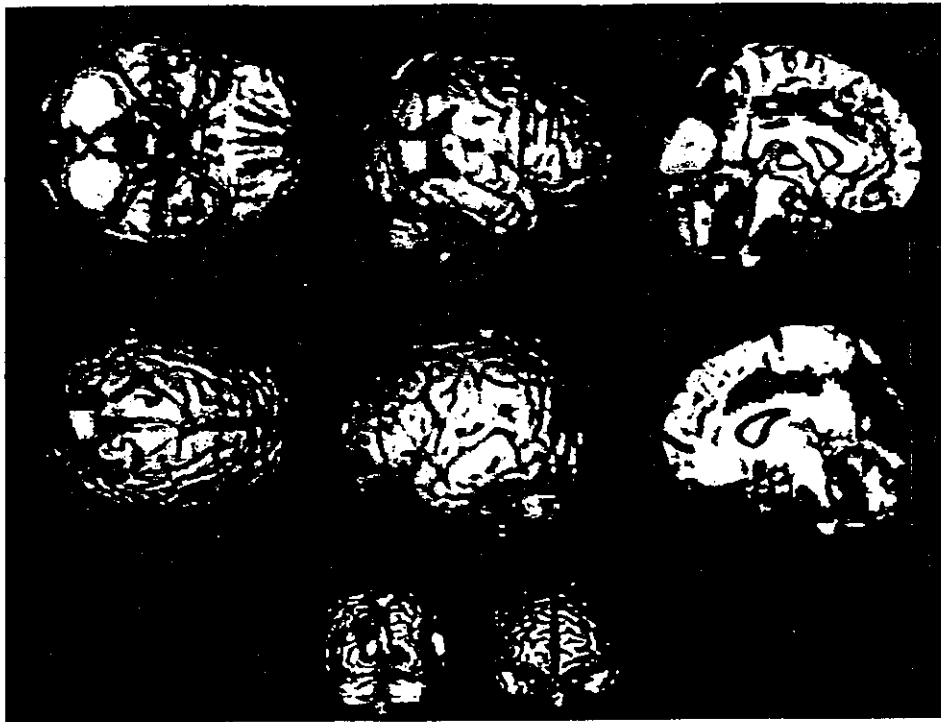


図8 頭部 SPM-SPECT 像

点、もしくは他の部位の脳卒中症状によるけいれんが頻発していた。その後、度重なる脳卒中の後遺障害による不全麻痺、視野異常が進行した。

20歳以後は知的退行が顕著になり、一時は、奇声を発し病棟内徘徊もみられ、精神病院にも紹介入院した。しかし、脳卒中発作時の管理が困難であり、大学病院に転院となった。21歳で完全失明、完全難聴となり、23歳の現在では、チューブ栄養管理で、一日中ベッド上の生活となっている。この症例の頭部 SPM-SPECT 像を示す(図8)。

以上の症例は、いずれもミトコンドリア DNA の tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 遺伝子の A 3243 G 変異をもちながら、異なる臨床症状を呈している。この genotype-phenotype correlation を明確にするために、筋病理上、点変異含量と各病型での筋線維所見との関連を検討した。すなわち、筋線維を SDH(コハク酸脱水素酵素活性染

色：ミトコンドリアの増生を示す染色)と COX (チトクローム C 酸化酵素の活性染色) の染色性により、3群に分けた。RRF で COX 陰性線維、RRF で COX 陽性線維、RRF でなくかつ COX 陽性線維の3群に分け、各々の病型で含有する点変異を検討した。

その結果、Leigh 脳症を呈する症例では、いずれの群でも点変異含量が高度に蓄積しており、他の体細胞でも同様のパターンが確認された。一方、MELAS 症例では、RRF で COX 陰性の筋線維では、点変異の高度の蓄積がみられたものの、他の筋線維ではそのような蓄積はみられず、Leigh 脳症の経過をとる症例と明らかに異なるパターンを示した(図9)⁴)。つまり、すべての体細胞に点変異の高度の蓄積がみられた場合は、Leigh 脳症の病型を取り、変異の蓄積が限定されている場合、MELAS、PEO、もしくはミトコンドリア糖尿病の病型をとることが判明した。

A 3243 G 変異における臨床スペクトルを図

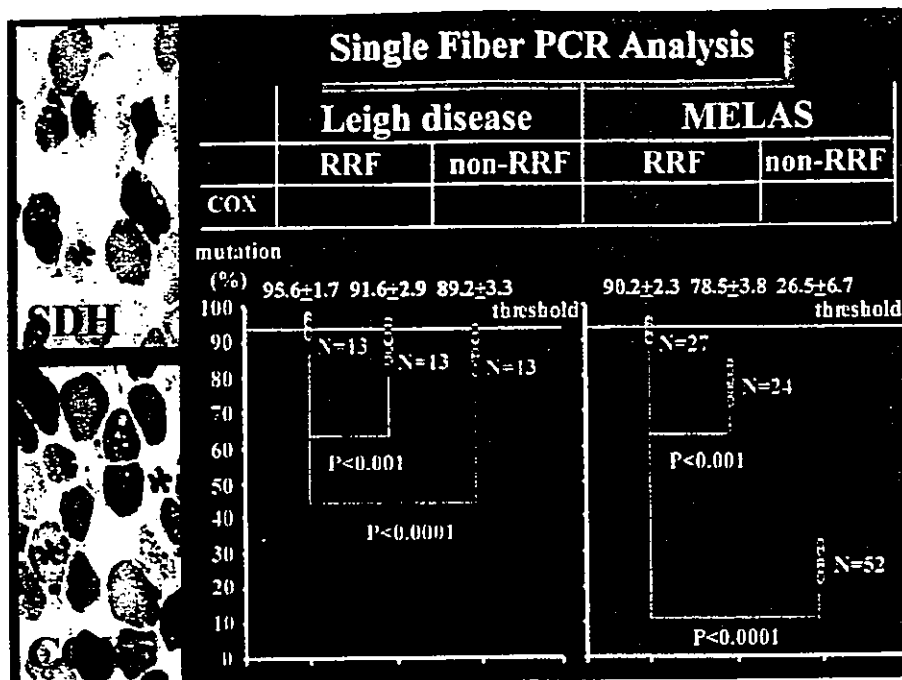


図9 単一筋線維における点変異

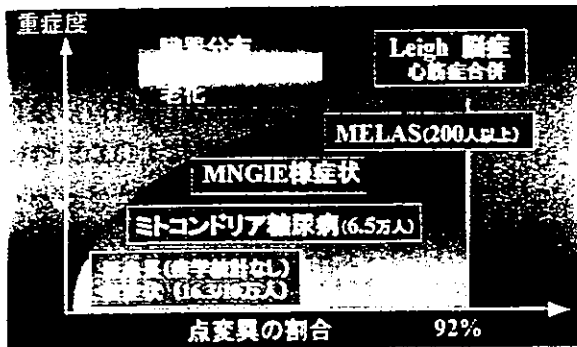


図10 ミトコンドリア A 3243 G 変異の臨床スペクトル

10に示す。図で明らかなように、A 3243 G 変異を有する患者の臨床的多様性と変異含量との関係には、一定の相関があると考えられる。p<sup>0</sup>細胞での研究成果から、A 3243 G 変異が細胞内で96%を超えると細胞の呼吸活性が急速に低下することが証明されており、1個の細胞内での点変異含量96%がミトコンドリア機能不全をきたす絶対的閾値 (threshold) と考えられている。一方、各臓器においては、それぞれのエネルギー需要度 (依存度) が大きく異なることから、依

存度の高い臓器 (神経細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、内分泌腺細胞) においては、それ以下の変異含量であっても、機能不全としての臓器症状が発現すると考えられる。

### III. 急性脳症で発症したミトコンドリア脳筋症

13歳の男児。12歳でてんかんという診断でフォローアップされていた。周産期、生育歴に異常なく、幼少時から小学校高学年までは学業成績も良かった。13歳で初めての閃輝暗点に気づき、頭痛、けいれんで入院となる。入院時の検査で、右下1/4半盲を認め、頭部MRIにて左後頭葉の脳卒中が疑われた (図11)。髄液の高乳酸ピルビン酸血症が存在し、軽度の筋力低下もあり、画像上 MELAS が疑われた。

呼吸器感染を契機として、患児の意識レベルは徐々に低下し、3桁台の意識レベルの低下を認めたため、当初はヘルペス脳炎も疑われ脳炎

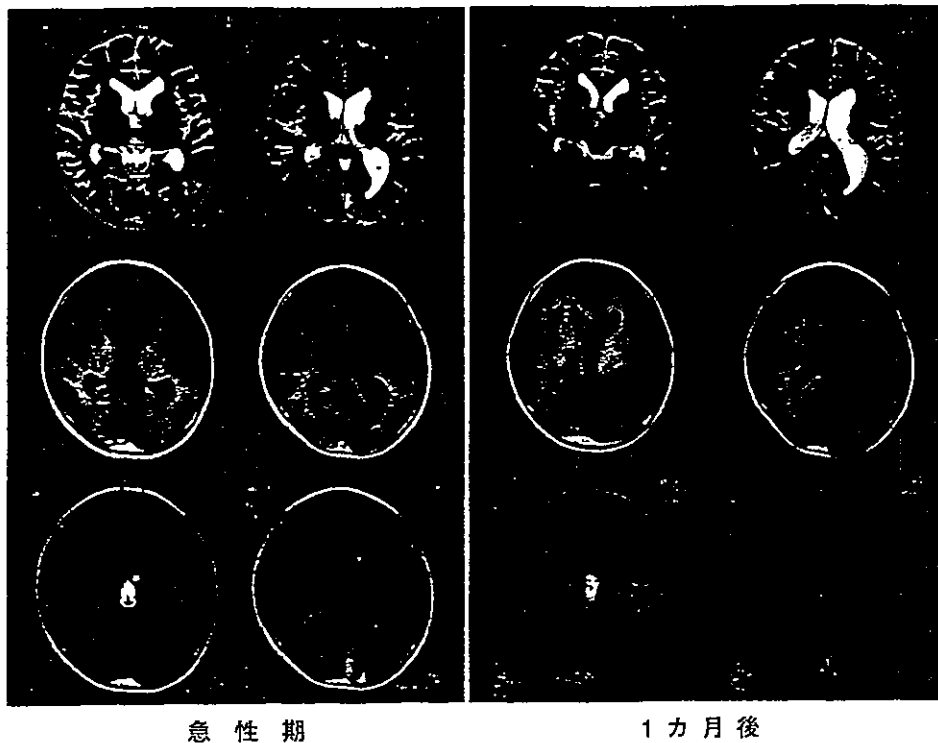


図11 頭部MRI

脳症に準じた治療を行った。しかし、降圧剤、アシクロビル療法にても反応に乏しく、髄液でのヘルペス PCR は陰性で、血清学的にもヘルペス感染症は否定された。アルカリ療法を続けていたが、意識レベルの回復がみられなかったため、ミトコンドリア脳筋症に伴う脳症も否定できず、遷延性の意識障害に対して、TRH 療法を行った。

脳波では、意識障害に特徴的である 1~2 Hz の高振幅徐波が全誘導で確認された。SPM-SPECT 画像では、MRI でははっきりとしなかった大脳基底核領域の血流低下が確認された。この大脳基底核領域の血流低下所見は、意識レベルが回復した 1 カ月後の解析でも残っており、遷延している。本児のミトコンドリア DNA 検索では、MELAS にみられる A 3243 G, T 3271 C 変異は認めず、現在ミトコンドリア DNA の全周塩基配列決定を行っている。

#### IV. Leigh 脳症を呈した Surf-1 遺伝子点変異によるチトクローム C 酸化酵素欠損症

3 歳の女児。病歴：在胎 39 週、3,250 g にて出生。周産期特記すべきことなし。発達歴は、首座り 3 カ月、寝返り 8 カ月、お座り 9 カ月、独歩 18 カ月。2 歳時より、右半身のけいれんが 3 回あり、また、けいれん後に一過性の半身不随麻痺、および視力障害を認めた。

家族歴：両親いとこ婚(母親が姉妹)、第 1 子(長男)が生後 3 日目に死亡。3 歳時、肺炎に罹患し嘔吐下痢を契機として精神運動発達の退行がみられ精査目的で入院となる。

現症：外来受診時、身長 80 cm (-2.7 SD)、体重 10 kg (-3.0 SD) と小柄である。脈拍 80、体温 36.5°C、血圧 109/55。心肺に異常所見なし。体格はやせ型であり、全身の筋萎縮を認める。神経学的には病的反射なく、深部腱反射正常。

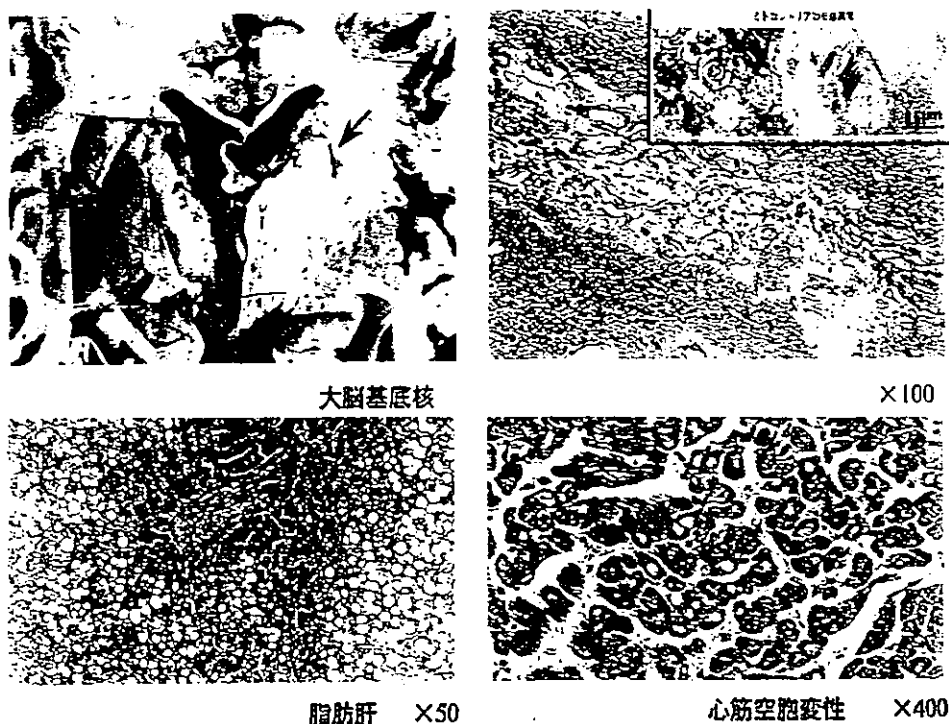


図12 剖検所見

四肢筋力の中等度低下と感音性難聴を認める。発達 は津守・稲毛式でIQ 68。

検査：検血，CRP 正常，GOT 55 単位（正常 40 以下），GPT 45 単位（正常 35 以下），乳酸 80 mg/ml（正常 12 以下），ピルビン酸 2.0 mg/dl（正常 0.7 以下），L/P 比 43。血液ガス pH 7.290，pCO<sub>2</sub>33，pO<sub>2</sub>78.4，HCO<sub>3</sub>15.8，BE -12.3。電解質 Na 136 mEq/l，K 4.1 mEq/l，Cl 105 mEq/l。血清アミノ酸：アラニン 6.7 mg/dl（正常 1.3~4.9）。L/P 比の 20 以上の増加，アニオンギャップ増加を伴う著明な高乳酸ピルビン酸血症と代謝性アシドーシスから，ミトコンドリアの電子伝達系酵素活性の 1 次的異常が疑われた。筋生検では，チトクローム C 酸化酵素活性が低下しており，活性染色でも染色性が著明に低下していた。

あらゆる治療に対して反応なく，患児は，7 歳で多臓器不全にて死亡した。剖検所見を図 12 に示す。大脳基底核は，マクロ所見で肉眼的に壊死像を認め，同部位は顕微鏡で神経細胞の脱落とグリアの増生，毛細血管網の増加を認め，神経

病理学的に Leigh 脳症と診断できた。肝臓には，脂肪変性，心筋細胞には空胞変性を伴う心筋症の所見が得られた。

---

#### V. 精神症状(行動異常)を呈する点変異を伴うミトコンドリア脳筋症

---

13 歳の男児。学校への不適應，対人関係の未熟性，感情の爆発性，頭痛，性格の未熟性，肥満度 25% (高度肥満)，異性に対する異常なまでの興味，学校への放火，愉快犯的な問題行動など，さまざまな異常を呈している男児で，軽度の筋力低下を認めたため筋生検を含めた精密検査を行った。その結果，頭部 MRI にて経過とともに異常領域が変化する所見が確認された (図 13)。ミトコンドリア遺伝子異常の検索を行ったところ，ミトコンドリア tRNA<sup>His</sup> の新しい点変異を確認した。生検筋を用いた電子伝達系酵素活性は複合体 I の活性低下を認めた。その結

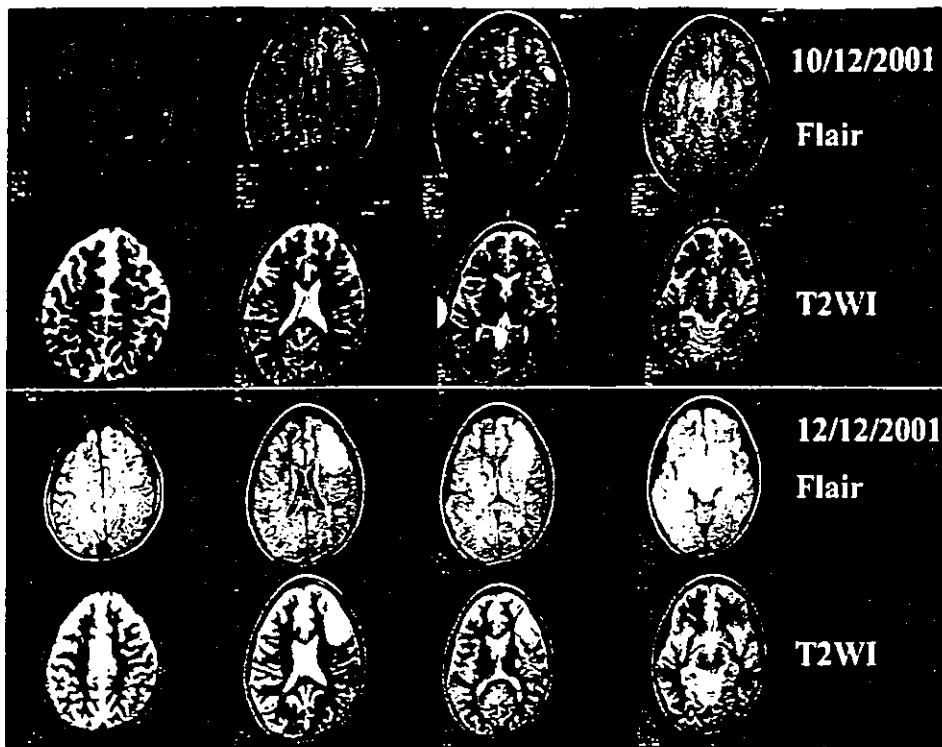


図 13 頭部 MRI

果, ミトコンドリア tRNA 変異による器質的脳障害として外来で経過観察している。

---

## VI. ま と め

---

中枢神経系症状は遺伝子異常が判明したミトコンドリア病の主要な症候である。本稿では、その多岐にわたる神経症状を紹介し、その臨床的多様性に関し報告した。日常診療のなかで、ミトコンドリア病を見出す参考になれば幸いである。

## 文 献

- 1) Goto Y, Nonaka I, Horai S : A mutation in the tRNA<sup>LEU(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348 : 651-653, 1990
- 2) Goto Y, Nonaka I, Horai S : A new mtRNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Acta* 1097 : 238-240, 1991
- 3) Koga Y et al : Heterogeneous presentation in A 3243 G mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene. *Arch Dis Child* 82 : 407-411, 2000
- 4) Koga Y et al : Single-fiber analysis of mitochondrial A 3243 G mutation in four different phenotypes. *Acta Neuropathol (Berl)* 99 : 186-190, 2000



## A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome

Hirofumi Komaki<sup>a</sup>, Jun Akanuma<sup>a</sup>, Hideki Iwata<sup>b</sup>, Takao Takahashi<sup>c</sup>,  
Yukihiko Mashima<sup>d</sup>, Ikuya Nonaka<sup>e</sup>, Yu-ichi Goto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

<sup>b</sup>Department of Pediatrics, Shinshiro City Hospital, 32-1 Kitahata, Shinshiro, Aichi 441-1387, Japan

<sup>c</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>d</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>e</sup>National Center Hospital for Mental, Nervous and Muscular Disorders, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan

Received 27 August 2002; received in revised form 4 December 2002; accepted 17 December 2002

### Abstract

A novel mitochondrial DNA point mutation, a C-to-A mutation at nucleotide position (np) 11,777, was identified in two unrelated patients out of 100 with Leigh syndrome. This mutation converted a highly evolutionary conserved arginine to a serine at codon 340 in ND4 gene. This codon was also converted by a G-to-A mutation at np 11,778, the most common mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), but the amino acid replacement was different (R340S vs. R340H). Cybrid study revealed that the percentage of heteroplasmy was correlated with complex I function and that the novel mutation caused a much more deleterious effect than the np 11,778 LHON mutation in complex I activity.

© 2003 Elsevier Science B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

**Keywords:** Mitochondrial disease; Complex I deficiency; Heteroplasmy; Cybrid; ATP production

### 1. Introduction

Leigh syndrome (LS) is a subacute neurodegenerative disease of infancy and childhood characterized by symmetrical necrotic lesions in the brainstem, basal ganglia and thalamus (Leigh, 1951). The symptoms include psychomotor retardation or deterioration, failure to thrive, vomiting, seizures and respiratory failure. Elevated lactate levels in blood and spinal fluid are consistent laboratory findings. With recent technological advances,

especially in neuroimaging techniques, many patients are being diagnosed with LS while still alive. LS is a mitochondrial but heterogeneous disease. Biochemically, defects in the pyruvate dehydrogenase complex and respiratory chain complexes including complexes I, II, IV and V have been documented. Genetically, defects in both mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA are reportedly involved in the pathogenesis of LS. The defects in mtDNA include T-to-G (Tatuch et al., 1992) and T-to-C (de Vries et al., 1993) at nucleotide position (np) 8993 and T-to-C (Thyagarajan et al., 1995) and T-to-G (Carrozzo et al., 2001) at np 9176 in the subunit 6 gene of adenine-trinucleotide phosphate (ATP) synthase, A-to-G at np

\* Corresponding author. Tel.: +81-42-346-1713; fax: +81-42-346-1743.

E-mail address: goto@ncnp.go.jp (Y. Goto).

3243 (Sue et al., 1999), and A-to-G at np 8344 (Silvestri et al., 1993) in the mitochondrial transfer RNA gene, and G-to-A at np 14,459 in the subunit 6 gene of complex I (Kirby et al., 2000). The defects in nuclear DNA include the E1 alpha subunit gene of pyruvate dehydrogenase complex (Endo et al., 1989), the NDUFS4 (van den Heuvel et al., 1998), NDUF7 (Triepels et al., 1999), NDUFS8 (Loeffen et al., 1998), and NDUFS1 (Benit et al., 2001) genes of complex I, the flavoprotein subunit gene of complex II (Bourgeron et al., 1995), and the SURF (Surfeit locus protein)-1 gene, an assembly factor for cytochrome-*c*-oxidase (COX) (Zhu et al., 1998). Nevertheless, in more than half of LS patients, the pathogenesis cannot be identified.

Complex I is a large multiprotein assembly, which is partly located in the mitochondrial inner membrane and partly protrudes into the matrix. Its main function is transport of electrons from NADH to ubiquinone with simultaneous shunting of protons across the inner mitochondrial membrane to the intermembrane space (Loeffen et al., 2000). Complex I is composed of at least 42 distinct subunits. Seven subunits of human complex I are encoded by mtDNA (DiMauro et al., 1999). Defects of complex I are a major cause of mitochondrial disease, and many pathogenic mutations in the subunits of complex I and transfer RNA of mtDNA and nuclear encoded subunits of complex I have been reported (Shoubridge, 2001).

We herein report a novel mtDNA mutation associated with LS with isolated complex I deficiency in two unrelated patients. This is a C-to-A mutation at np 11,777, which converts a highly evolutionary conserved arginine to a serine at codon 340 in the NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) gene in mtDNA. Interestingly, this codon is also converted by G-to-A mutation at np 11,778, the most common mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) (Wallace et al., 1988).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Patient 1 was a 4-year-old girl, the second child of healthy and unrelated Japanese parents. Her family

history was negative for neurological disease and diabetes. She was born at term in a normal delivery. Her development was mildly retarded. She could hold her head steady at 3 months, sit up at 7 months, walk by herself at 20 months and speak meaningful words at 24 months of age. Clinical examination at 3 years and 5 months of age revealed a short stature (less than 3rd percentile), but no minor anomalies nor arrhythmia. She had exotropia in the right eye, but no abnormalities in ocular movement or eyeground by the fundoscopic examination. She could walk and run without support and speak meaningful words, but she could not speak sentences. Her deep tendon reflexes and muscle power were normal, but muscle tone and bulk were mildly reduced. She had no involuntary movements, cerebellar signs, or autonomic disturbances. She had no signs of psychomotor deterioration. Laboratory examination revealed relatively high lactate compared to pyruvate in both blood (lactate 45.5 mg/dl, pyruvate 1.2 mg/dl; normal 6.5–18.3, 0.71–1.22, respectively) and spinal fluid (lactate 31.5, pyruvate 1.68; normal 11.1–16.3, 0.75–1.29, respectively) which is consistent with respiratory chain defect. Brain magnetic resonance imaging (MRI) showed abnormal high T2-weighted signals in the bilateral midbrain and thalamus.

Patient 2 was a 5-year-old girl, the first and only child of healthy and unrelated parents. She was born at term in a normal delivery. Her family history was negative for neurological disease and diabetes. Her development was mildly retarded. She showed deterioration and dystonia from 3 years old. Clinical examination at 4 years of age showed her to be of short stature (less than three percentile), but revealed no minor anomalies, or arrhythmia. She had exotropia and a disturbance of adduction in her left eye, but no abnormalities in the eyegrounds by fundoscopic examination. Her deep tendon reflexes were hyperactive. Muscle power, tone and bulk were normal. She had dystonia in the upper and lower extremities. Laboratory examination revealed normal to slightly elevated lactate and pyruvate levels in blood (lactate 10.1–19.1 mg/dl, pyruvate 0.51–1.25 mg/dl; normal 6.5–18.3, 0.71–1.22, respectively), and moderately elevated levels in the spinal fluid (lactate 31.7 mg/dl, pyruvate 1.39 mg/dl; normal 11.1–16.3, 0.75–1.29, respectively). Brain and spinal cord MRI revealed

abnormal high T2-weighted signals in the bilateral basal ganglia, substantia nigra and cervical cord.

## 2.2. Histopathological studies

For histochemical examination, muscle specimens were frozen in isopentane chilled in liquid nitrogen. Serial frozen sections, 10  $\mu$ m in thickness, were stained with hematoxylin–eosin, modified Gomori trichrome (mGT), NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR), succinate dehydrogenase (SDH), COX, and a battery of histochemical methods.

## 2.3. Cell culture

Primary muscle cultures were obtained from muscle biopsies. Fibroblast culture was available only in patient 1. To eliminate fibroblast contamination, we used the preplating technique for the preparation of myoblasts (Miranda, 1994; Richler and Yaffee, 1970). Myoblasts and fibroblasts were grown in DMEM/F-12 medium with 20% fetal bovine serum (GIBCO-BRL).

## 2.4. Direct sequence of total mtDNA

DNA extraction, PCR and total mtDNA sequencing were done as described elsewhere (Akanuma et al., 2000). The nuclear DNA carries sequences similar to those of the mtDNA (nuclear pseudogene), and it has several point mutations previously reported to be pathogenic. To minimize the adverse effect of the nuclear pseudogene, we employed the long PCR method in preparing the template of the sequencing reaction.

## 2.5. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of mtDNA mutations

The following sets of primers were used for the detection of the C-to-A mutation at np 11,777. A light-strand primer, corresponding to np 11,666–11,685, and a modified heavy-strand primer, corresponding to np 11,798–11,778 (5'-CTTGAGAGAG-GATTATGAAGC-3'), were used. The underlined position represented a modification from the normal sequence to create an Alu I restriction site (AGCT) when the mutant sequences were amplified. The

amplified 133 base pair fragment was digested with Alu I to produce 112 + 21 base pairs for the wild type sequence, and 93 + 21 + 19 base pairs for the mutant sequence. These fragments were separated electrophoretically through a 4.0% low melting agarose gel after ethidium bromide staining.

## 2.6. Quantification of the np 11,777 mutation using real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification methods

The target sequence of the mtDNA was amplified using a light-strand primer, corresponding to np 11,730–11,757 and a heavy-strand primer, corresponding to np 11,845–11,817, was used to amplify the target sequence in the presence of two fluorogenic TaqMan™ probes. One was a FAM-labeled probe for the detection of the wild type sequence [5'(FAM)-CTCACAGTCGCATCAT-(MGB: minor groove binder)p3'], and the other was a VIC-labeled probe for the mutant type sequence [5'(VIC)-CTCACAG-TAGCATCAT-(MGB)p3']. The underlined position corresponded to np 11,777. The PCR condition was 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 40 cycles with 15 s at 95°C, and 1 min at 60°C. During the PCR, the respective TaqMan™ probe hybridized to the wild type or the mutant template and Taq DNA polymerase synthesizes a new strand and cleaves off each reporter dye simultaneously, increasing the intensity of the fluorescence signal which corresponds to the initial amount of template mtDNA. The level of fluorescence was simultaneously monitored on an ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (PE Applied Biosystem) to determine the threshold cycle (CT), at which the fluorescence exceeds the baseline. The copy number of mtDNA containing each mutant or wild type sequence was determined based on the standard curve created by the reaction of the known amount of plasmid containing mtDNA fragment (np 10,660–12,665) with each wild or mutant sequence made by standard PCR following TA-cloning technique. All PCR assays were carried out in triplicate, and the proportion of the mutation was calculated by the following equation: the copy number of mutant type mtDNA  $\times$  100 / (the copy number of wild type mtDNA + the copy number of mutant type mtDNA).

### 2.7. Spectrophotometric assays of respiratory chain enzyme activity

Skeletal muscle mitochondria from biopsy specimens were isolated and the crude mitochondrial pellet was resuspended, as previously described (Bookelman et al., 1978). The isolated mitochondria were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until biochemical analysis was done. Spectrophotometric determinations of enzyme activity including rotenone-sensitive NADH-cytochrome-*c* reductase (rotenone-sensitive NCCR, complex I + III), succinate-cytochrome-*c* reductase (SCCR, complex II + III) and COX (complex IV) were performed as described elsewhere (Koga et al., 1988). The results of this assay were expressed as nanomoles per minute per milligram of mitochondrial protein.

### 2.8. ATP synthesis

Measurement of ATP synthesis in digitonin-permeabilized primary cultures including myoblasts and fibroblasts was performed with several modifications of the method by Robinson (Robinson, 1996). Briefly, cells were cultured in 6 cm dishes until 100% confluent with DMEM/F-12 medium, 20% fetal bovine serum, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of uridine to support the growth of respiratory deficient cells. Plasma membranes were selectively permeabilized by 0.05 mg/ml of digitonin for 3 min. Cells were then incubated with buffer containing phosphate, adenine dinucleotide phosphate (ADP) and combinations of substrates and inhibitors including (a) 5 mM sodium pyruvate and 1 mM sodium L-malate, (b) 5 mM sodium glutamate and 1 mM sodium L-malate, (c) 1  $\mu\text{M}$  rotenone and 10 mM sodium succinate, and (d) 2 mM antimycin A, 2 mM sodium ascorbate and 0.5 mM tetramethylphenylenediamine (TMPD). After incubation for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , reactions were stopped and total cell proteins were precipitated by adding 2% trichloroacetate. The aliquots of the incubation buffer were diluted by Tris-acetate (pH 7.75) and assayed for ATP by the luciferin/luciferase chemiluminescence according to the manufacturer's instruction (Enliten ATP assay system and TD-20/20 luminometer, Promega). ATP measurements were determined using standard curves calibrated with fixed amounts of ATP. Precipitated proteins were solubil-

ized by 1% of sodium lauryl sulfate (SDS), and the concentrations were measured using the modified Lowry method (DC protein assay kit II, Bio-Rad). The results of this assay were expressed as nanomoles ATP per hour per milligram cell protein.

### 2.9. Cybrids

Transmitochondrial cybrids were prepared by enucleating primary cultures from patients and fusing mitochondria-containing cytoplasts with the osteosarcoma-derived 143B.TK-rho-zero cells (a cell line devoid of mtDNA) by polyethylene glycol fusion, as previously described (King and Attardi, 1989). Cybrids were selected with DMEM medium supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum and were isolated by the cylinder technique. Many clones with variable percentage of mutant mtDNA were obtained.

## 3. Results

### 3.1. Histopathological study

Histopathological study of skeletal muscle showed no ragged-red fibers, strongly SDH-reactive blood vessels, or COX deficient fibers were detected with mGT, SDH, or COX stains in either patient. Both patients had moderate type 2 fiber atrophy. In patient 2, intermyofibrillar networks were disorganized in some fibers in NADH-TR stained specimens (data not shown). Thus, no pathological signs of mitochondrial abnormalities were found in these biopsies.

### 3.2. Respiratory chain function revealed isolated complex I deficiency

Spectrophotometric assays of skeletal muscle mitochondria from both patients showed significantly decreased activities in rotenone-sensitive NCCR with normal activities in SCCR and COX (Table 1). Furthermore, the ATP synthesis of myoblasts was significantly decreased when pyruvate/malate and glutamate/malate were used as substrates (Fig. 1). ATP synthesis was normal when succinate and TMPD/ascorbate were used as substrates. If the patients had pyruvate dehydrogenase complex