

ート票を送付した。内容：MELAS 患者の有無、ありの場合、過去2年間の発作、タウリン内服の有無。

②二次アンケート調査：対象：一次調査で「過去2年間で2回以上の脳卒中様発作」が「あり」の脳卒中様発作反復83例；内容：過去1年間で2回以上の脳卒中様発作の有無、アルギニン併用の有無、今回のプロトコルの選択基準・除外基準の該当項目。

③三次アンケート調査：対象：二次調査で除外されなかった過去1年間で2回以上の脳卒中様発作があった28例中、以下の事前電話で確認した20施設、23例(院内IRBの有無、院内CRC(治験コーディネーター)の有無、医師の治験協力の意志)。内容：DNA変異、過去1年間の脳卒中様発作の内容(局所神経徴候：片麻痺あるいは単麻痺、感覚消去、皮質盲、失語、失行、失認；その他の徴候：頭痛、嘔気・嘔吐、痙攣、意識障害)と、それぞれの発症時期、MRI検査、アルギニン内服の詳細、施設情報。

(倫理面への配慮)

本治験は、ヒトゲノム遺伝子解析研究・介入研究(侵襲なし)に相当し、2008年版ソウル版ヘルシンキ宣言に基づく”ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”を遵守して施行する。

C. 研究結果

①一次調査：(i)回答率：53.8%(490施設/全911施設)、(ii)全国MELAS患者数：291

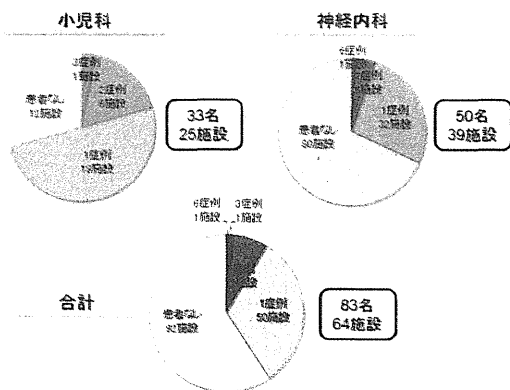


図2. 一次調査・脳卒中様発作反復患者数(2年間2回以上)

名(小児科68名/神経内科223名：図1)、(iii)過去2年間に2回以上の脳卒中様発作のある脳卒中様発作反復患者数=83名(小児科33名/神経内科50名：図2)、(iv)脳卒中様発作反復患者の全MELAS患者に占める割合：図3：いずれも分担研究者後藤の稿参照)。

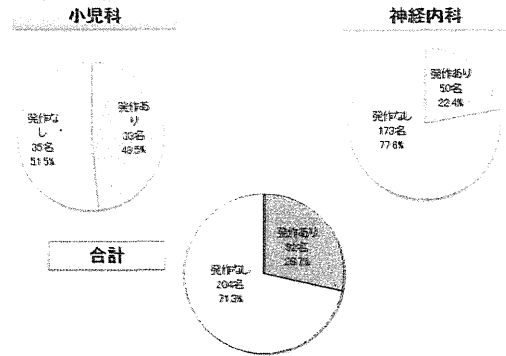


図3. 一次調査・全MELAS患者における脳卒中様発作(2年間2回以上)反復患者の比率

②二次調査：(i)回答率：神経内科95.0%、小児科92.4%、(ii)過去1年間で2回以上の脳卒中様発作があった症例数：28例(神経内科14例/小児科14例)(iii)28例の内訳：アルギニン併用なし：5例、併用あり23例：図4)。

	神経内科			小児科		
	過去1年間で脳卒中様発作2回以上	過去1年間で脳卒中様発作1回未満	計	過去1年間で脳卒中様発作2回以上	過去1年間で脳卒中様発作1回未満	計
アルギニン併用あり	10	7	17	13	9	22
アルギニン併用なし	4	6	10	1	0	1
計	14	13	27	14	9	23
基準外						
既死(10歳、30歳、37歳、46歳)	4			通院中止(年齢不明)	1	
産後(20歳、45歳)	2			ステロイド服用(10歳)	1	
腎不全(26歳)	1			ピルビン酸服用(7歳)	1	
既死(50歳、60歳、71歳、80歳)	4			シクロ酸素服用(14歳)	1	
不明(12歳、123歳、30歳、44歳、51歳)、その他(1歳)	5			死亡(10歳、12歳、13歳)	3	
合計例数	42			合計例数	30	
	回収率95%			回収率92%		

図4. 二次調査・脳卒中様発作反復患者の内訳

③三次調査：過去1年間で2回以上の脳卒中様発作(MELASストローク判定基準)があり、プロトコルの基準をみたす例を登録症例候補とした。内訳はアルギニン非併用：2例；アルギニン併用例：11例、非併用例では、未回答例が1例、アルギニンウォッシュアウト見込み例が1例あり、全て

の候補症例の平均発作回数は 3.08 回であった。

最終的に、本治験のプロトコルを満たし、かつ治験実施体制が整備されている 10 の医療機関で 10 名の患者（タウリン単独投与 9 名、アルギニン併用投与 1 名）を本治験の対象に選定し、登録した。

D. 考察

世界的にも MELAS 患者の疫学・自然歴については、小規模なコホート研究に限られている。今回明らかとなった本邦の MELAS 患者数は、これまでの国内の報告 (Yasuga S, Koga Y, et al. *BBA* 1820:619-624, 2012) と比較して最大数であった。このうち脳卒中様発作反復患者の占める頻度については、小児科患者が神経内科患者を上回り、小児期発症 MELAS が成人発症 MELAS と比較し、より重症という国内外の従来の報告と一致した。この脳卒中様発作反復患者について二次調査によって更に最近 1 年間の発作回数 2 回以上の発作頻発患者に絞り込んだ。これらの患者では先行治験で使用された L-arginine の継続併用例が多数を占めるわが国の MELAS 脳卒中様発作治療の実態が把握できた (分担研究者古賀の稿参照)。以上のアンケート調査を基盤に、患者 10 名を本タウリン治験に登録できた。

E. 結論

日本小児神経学会・日本神経学会専門医所属施設を対象に MELAS と、その脳卒中様発作について一次から三次の全国アンケート調査を実施した。これまで最大の患者が集積し、タウリン治験の基準を満たす 10 例について登録ができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I,

Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno SI, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell* 12(4):487-496, 2013

Kawakami E, Kawai N, Kinouchi N, Mori H, Ohsawa Y, Ishimaru N, Sunada Y, Noji S, Tanaka E. Local Applications of Myostatin-siRNA with Atelocollagen Increase Skeletal Muscle Mass and Recovery of Muscle Function. *PLoS One* 8(5):e64719, 2013

2. 学会発表

<国内学会>

大澤 裕「TGF-beta シグナル制御による筋消耗性疾患治療法の開発」第 54 回日本神経学会学術大会 2013 年 5 月 31 日 東京

大澤 裕「TGF-beta 阻害低分子医薬による筋消耗性疾患とメタボリック症候群の治療戦略」第 31 回日本神経治療学会総会 2013 年 11 月 22 日 東京

<国際学会>

Ohsawa Y, Nishimatsu S, Fujino M, Hagiwara H, Hinohara A, Sunada Y. Inverse regulation of myogenesis and adipogenesis by caveolin-3 through type I TGF-beta type I receptor kinase. EMBO workshop. Molecular mechanisms of muscle growth and wasting in health and disease. Ascona, Switzerland, Sep 15-21, 2013.

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	矢崎義雄 総編集	内科学	朝倉書店	東京	2013	2339-2342
古賀靖敏	ミトコンドリア脳筋症	水澤英洋, 梶 龍兒, 吉良潤一, 齊藤延人, 神田 隆, 鈴木則宏	今日の神経疾患治療指針第2版	医学書院	東京	2013	791-797

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
Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y	MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene.	Brain & Development	36	180-182	2014
古賀靖敏	希少難病：ミトコンドリア病の治療が可能となる時代に巡り合って（アルギニン療法、ピルビン酸ナトリウム療法の開発）	福岡県小児科医報	2013	91-98	2013
古賀靖敏	ミトコンドリア脳筋症治療の現況と展望	日本臨床	72(1)	175-184	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷

でありながら、遺伝子変異が異なったり、生化学異常が異なったりする。

原因・病因

ミトコンドリア内には、エネルギー代謝にかかわる多くの酵素が存在しているが、そのなかでも電子伝達系の機能低下を示す症例が最も多い。電子伝達系酵素複合体は5種類あり、それぞれが複数のサブユニットでできており、その一部はミトコンドリア内に存在するミトコンドリア DNA (mtDNA) 上にコードされている。よって病因としては、核DNA上の遺伝子変異の場合と mtDNA 異常の場合とがある。mtDNA は核DNAと異なり、1細胞に数千コピー存在することから、単にその数が減っても病的状態になる (mtDNA 欠乏症候群)。また、質的には mtDNA の欠失と点変異が知られているが、変異型と野生型が細胞内で任意の比率で存在する (ヘテロプラスミー) 場合があり、核DNA上の遺伝子変異で認めるホモとヘテロという概念とは基本的に異なっている。また精子に存在する mtDNA は受精の際に卵のなかに侵入できないか、侵入しても消失することが知られており、受精卵の mtDNA はすべて卵由来になる。したがってもともと卵のなかに変異 mtDNA が存在する場合にだけ、それが子に伝わってゆく (母系遺伝)。しかし、すべてが母系遺伝ではなく、欠失の場

9) ミトコンドリア病

mitochondrial disease

定義・概念

ミトコンドリアは成熟赤血球以外のあらゆる細胞に存在しており、ミトコンドリア病は、ミトコンドリアの機能低下によって起こる疾患の総称である。その機能低下は細胞機能の低下や細胞死を引き起こす。したがって、症状は多彩であるが、比較的エネルギー依存度の高い細胞が障害を受けやすく、中枢神経や骨格筋の症状が前景に出ることが多いためにミトコンドリア脳筋症とも称される。しかし、単にミトコンドリア病という病名が一般的になりつつある。

分類

ミトコンドリア病の分類は、その診断に用いた方法により、遺伝子変異による分類、生化学的異常による分類、臨床症状による分類がある (表 15-21-7)。これらの分類は、互いに1対1に対応せず、同じ臨床病型

表 15-21-7 ミトコンドリア病の分類

- I. 生化学的分类
 - a. 複合体 I 欠損症
 - b. 複合体 II 欠損症
 - c. 複合体 III 欠損症
 - d. 複合体 IV 欠損症
 - e. 複合体 V 欠損症
 - f. 複数の複合体欠損症
- II. DNA 異常による分類
 1. 核DNA 変異
 2. ミトコンドリアDNA 異常
 - a. 欠失, 重複
 - b. 点変異
 - c. 欠乏状態
 3. 核DNA 変異と mtDNA 異常が同時に存在する場合
- III. 臨床症状による分類
 1. 3 大病型
 - a. 慢性進行性外眼筋麻痺 (Kearns-Sayre 症候群を含む)
 - b. ミオクローヌスを伴うミトコンドリア病: MERRF
 - c. 卒中様症状を伴うミトコンドリア病: MELAS
 2. その他の病型
 - a. Leber 遺伝性視神経萎縮症
 - b. Leigh 脳症
 - c. Pearson 病
 - d. NARP
 - e. MNGIE
 - f. その他 (Wolfram 症候群, Alzheimer 病など)

MERRF: myoclonus epilepsy associated with ragged red fibers, MELAS: mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode, NARP: neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa, MNGIE: mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy.

15-21

筋疾患

合はほとんどが散发例であり遺伝性を認めない。一方、点変異の場合は、母系遺伝であることがほとんどである。注意すべきことは、変異率が高くないと病気を発症しないことであり、母から子に変異mtDNAが伝わったからといって、必ずしも病気になるとは限らないということを十分銘記することが重要である。

電子伝達系以外の酵素欠損は核DNA上に存在する遺伝子変異であり、通常は常染色体劣性遺伝形式である。最近になって、mtDNAの複製にかかわる酵素をコードする遺伝子の変異をもつ例が報告され、これらは二次的にmtDNAの欠乏状態や多重欠失を起こす。この場合の遺伝形式は、母系遺伝ではなく核DNA上の遺伝子変異の遺伝形式に依存する。

臨床症状

代表的な臨床病型としては、慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (chronic progressive external ophthalmoplegia: CPEO)、赤色ぼろ線維・ミオクローヌステんかん症候群 (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: MERRF)、ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群 (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode: MELAS) がある。これら3病型は主症状である中枢神経症状によって分類されている。

1) 慢性進行性外眼筋麻痺症候群: 慢性進行性外眼筋麻痺症候群は眼瞼下垂・眼球運動制限 (もしくは麻痺) を特徴とする。眼筋症状のみの症例は少なく、骨格筋症状 (筋力低下, 筋萎縮), 中枢神経症状 (網膜色素変性, 知能低下, 感音性難聴, 下垂体障害など), 心症状 (伝導障害など), 腎症状 (Bartter 症候群や Fanconi 症候群など), 内分泌症状 (低身長, 糖尿病,

副甲状腺障害など), 皮膚症状 (多毛症, 無汗症など) などを合併し, 全身の多臓器が障害されることが多い。特に若年者で網膜色素変性と心伝導障害を伴う慢性進行性外眼筋麻痺症候群を Kearns-Sayre 症候群 (KSS) とよんでいる。KSS は慢性進行性外眼筋麻痺症候群のなかでも, 症状が多臓器に及ぶ傾向があり, 若年発症が多いことなどから慢性進行性外眼筋麻痺症候群の重症型と考えられる。慢性進行性外眼筋麻痺症候群は, 大きな欠失をもつ変異mtDNAを正常mtDNAと合わせもつ例が多く, このような変異DNAと正常DNAが共存する状態をヘテロプラスミーとよんでいる。このヘテロプラスミーは KSS を除く慢性進行性外眼筋麻痺症候群では 40 ~ 65%, KSS では 90% 以上の症例で認められ, 両者の病因は同一のものと予想されている。

2) MERRF: MERRF は通常 10 歳前後に発症し, ミオクローヌスもしくはミオクローヌステんかんと小脳失調を特徴とし, 多くの例で精神運動発達障害を伴う。病名に含まれる赤色ぼろ線維 (ragged-red fiber: RRF) とは, ミトコンドリア病患者の骨格筋で特徴的に出現するミトコンドリアの形態異常 (図 15-21-13A) のことである。この病理変化は 3 大病型のいずれにも認められるものであり, MERRF だけの特異的所見ではない。生化学的に検出される異常のほとんどは, 複合体IV活性低下である。mtDNA のリジン tRNA 内の 8344 変異が MERRF 患者の 80% に存在する。

3) MELAS: MELAS は脳卒中様症状を主徴とするミトコンドリア病であり, 比較的若年で発症する (80% が 20 歳以前)。臨床症状はきわめて多彩である (表 15-21-8)。卒中様症状を示すときの脳画像検査では血管の支配領域とは必ずしも一致しない梗塞に似た像を認め, また症状の回復とともに画像所見も正常化する

15

神経系の疾患

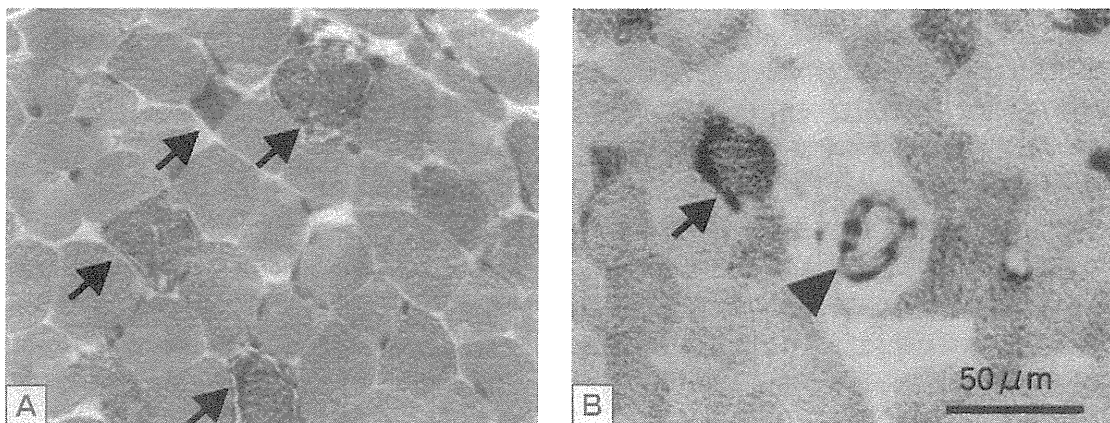


図 15-21-13 ミトコンドリア病で認める病理所見

A: Gomori-トリクロム染色でミトコンドリアは赤く染まる。赤色ぼろ線維 (ragged-red fiber: RRF) は特に筋鞘膜直下にミトコンドリアの集積が著明で赤みが強い (矢印)。

B: コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase: SDH) 染色でも, RRF は高い活性を示す (矢印)。また, MELAS では小動脈の血管平滑筋細胞内のミトコンドリアが増加した高SDH反応性血管 (strongly SDH-reactive blood vessel: SSV) を認めることが多い (矢頭)。

のが普通である。生化学的には複合体I欠損が最も多く、複合体IVやI+IV欠損も認められ一定していない。

この疾患の病理所見として特徴的なことは、全身の小動脈、特に血管平滑筋細胞が強く侵されていることである。この所見は、生検筋のコハク酸脱水素酵素(succinate dehydrogenase: SDH)染色で容易に検出できることから、高SDH反応性血管(strongly SDH-reactive blood vessel: SSV)とよばれ、RRFとともにミトコンドリア形態異常を示す重要な所見である(図15-21-13B)。また MELAS においては、ミトコンドリア転移RNAの1つ、tRNA-Leu(UUR)内の1塩基置換が次々に明らかにされた。そのなかでも塩基番号3243のAがGに変異している症例が80%の患者で認められる。

4) Leber 遺伝性視神経萎縮症(Leber病): Leber病は、思春期から成人期にかけて急性あるいは亜急性に視力低下で発症する遺伝性の視神経萎縮症である。視神経以外でもWPW症候群などの心症状やジストニアなどの神経症状を伴うことがある。日本人のLeber病患者の90%に11778変異を認める。

5) 糖尿病/難聴: 中枢神経症状はなく糖尿病と難聴だけが存在している患者が報告された。それらには、MELASと同じ3243変異が認められた。糖尿病患者の約1%がミトコンドリア異常によることが、日本を含め諸外国から報告されている。

6) アミノグリコシド感受性難聴: ストレプトマイシンやゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗菌薬の投

与により難聴をきたす家系で、mtDNAの1555変異が発見された。1回の投与で遅発性進行性に難聴を起こす例も報告されており、臨床の現場でもアミノグリコシド系抗菌薬の投与前にこの変異を調べておくことが必要になるであろう。平成24年度から保険収載された難聴遺伝子検査のなかに、3243変異とともに含まれている。

検査成績・診断

検査は、障害がどの臓器に、どの程度及んでいるかを調べる検査と、ミトコンドリア異常の有無を確認する検査とに分けられる。前者の検査は、各臓器特有の検査法に従うことになり、状況に応じて各専門医の協力を得る必要がある。後者の検査は、ミトコンドリア病の確定診断に不可欠な検査であり、血液のpHや乳酸・ピルビン酸値、中枢神経症状がある場合は髄液の乳酸・ピルビン酸値の測定が重要である。確定診断に至るうえで最も情報量が多いのが筋生検である。Gomori-トリクローム染色でのRRF、コハク酸脱水素酵素染色でのRRFやSSV、チトクロームc酸化酵素染色での欠損像が診断に有用である。生検筋や線維芽細胞で酵素活性を測定することができる。

診断は生化学的検査、形態学的検査(筋生検)、分子遺伝学的検査(mtDNAや核DNA)などを行い、総合的に診断する。ミトコンドリア病はミオパチーばかりでなく、中枢神経や心臓の症状など多彩な症状を示すことが特徴であり、多彩な臓器症状をもつ患者を診たときは本症を疑うことが診断の端緒になる。

表 15-21-8 MELASの臨床症状

症状	%
脳卒中様症状	100
痙攣	87
意識障害(一過性)	82
視野・視力障害	62
運動麻痺(一過性)	33
頭痛・嘔吐発作	79
進行性知能障害	62
筋力低下	61
低身長	60
感音性難聴	44
心筋症	22
高クレアチンキナーゼ血症	20
ミオクロームス	17
腎障害	17
心伝導障害	17
糖尿病	13
小脳失調	13
眼瞼下垂	12
視神経萎縮	10

経過・予後

臨床経過は進行性のことが多いものの、症状の進行度やほかの臓器症状の出現の予想はまったく不可能である。定期的な検診による経過観察が重要である。

治療・予防・リハビリテーション

ミトコンドリア異常そのものに対する治療に、現在のところ特效薬はない。エネルギー代謝に影響を与える薬物、たとえば、コエンザイムQ10、補酵素である各種ビタミン類などを使用するが、その効果は明らかではない。しかし、MELASに対するアルギニン治療が発作症状を軽減させ、発作を予防する場合がある。またミトコンドリア内の代謝に悪影響を与える薬剤などを避けるべきであり、抗痙攣薬のバルプロ酸は、カルニチン代謝を通じてミトコンドリア内エネルギー産生を阻害する。また、乳酸の入った輸液を大量に行うことは避ける。アルコールはそもそもエネルギー代謝を抑制するので、患者では禁忌である。〔後藤雄一〕

15-21
筋疾患

■文献

- 後藤雄一：ミトコンドリア病（広義）の概念と分類，ミトコンドリアとミトコンドリア病，日本臨牀 60 巻増刊号，213-217，2002.
- 岡 芳知，後藤雄一：ミトコンドリア糖尿病，pp1-86，診断と治療社，東京，1997.
- Zeviani M, DiDonato S: Mitochondrial disorders. *Brain*, 127: 2153-2172, 2004.

ミトコンドリア脳筋症

mitochondrial encephalomyopathy

古賀靖敏 久留米大学教授・小児科

疾患概念

病態

ミトコンドリア脳筋症はヒトのエネルギー代謝の中核として働く細胞内小器官ミトコンドリアの機能不全により、神経、筋、心臓、腎臓など全身臓器に種々の症状を呈する遺伝性進行性変性疾患である。原因は、エネルギー産生に関与する種々の遺伝子の異常であり、ミトコンドリア DNA もしくは核 DNA が関与する。

経過・予後

エネルギー産生系の残存活性が低いほど、低齢かつ重症型(多臓器不全)で発症し、軽症であれば成人期に臓器障害で発症すると考えられるが、加齢とともに多臓器症状は進行し、慢性進行性変性疾患の経過をとる。

症候

2002年の厚生労働科学研究班の疫学調査により明らかにされた疾患頻度による3大病型を示す。

メラス(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes ; MELAS)

40歳以前に、頭痛、嘔吐、痙攣、視野異常、四肢の運動麻痺、意識障害などで発症する脳卒中様発作を特徴とする。急性期の頭部画像では、脳卒中と類似した異常所見を呈するが、主な脳動脈の血管支配領域に一致せず、また、異常領域が経過とともに拡大したり消失したりする。病初期は、脳卒中様発作に伴う上記症状も可逆的であるが、発作を繰り返すうちに、明らかな後遺症として残り、最終的には梗塞様領域の脳は萎縮する。合併症に、片頭痛、易疲労性、筋力低下、るい瘦、感音性難聴、外斜視、眼瞼下垂、神経症、肥大型心筋症、WPW症候群などの心伝導異常、デ=ト=ニ=ド=ウ=ブ=レ=フ=ァ=ン=コ=ニ

症候群 deToni-Debré-Fanconi syndrome, 糖尿病, 低身長, 甲状腺機能低下症などの多内分泌疾患を伴うことも多い。患者の80%でミトコンドリア DNA の A3243G 変異を認める。時間的・空間的にこのような脳卒中様発作を繰り返し, 最終的には脳血管性認知症類似の経過で寝たきりもしくは多臓器不全で死亡する。日本の MELAS コホート研究では, 平均死亡年齢は, 小児型で15歳2か月, 成人型で40歳である。

㊦ カーンズ・セイヤー症候群(Kearns-Sayre syndrome ; KSS)/慢性進行性外眼筋麻痺(chronic progressive external ophthalmoplegia ; PEO)

20歳以前の発症, 網膜色素変性症, 外眼筋麻痺の3徴に加えて, 心伝導ブロックや100 mg/dL 以上の高蛋白髄液症, 小脳失調のうち少なくとも1つが診られればカーンズ・セイヤー症候群と診断できる。慢性進行性外眼筋麻痺(PEO)とは, 臨床スペクトルが重複する。常染色体性優性もしくは劣性遺伝を示す, ミトコンドリア内核酸プールの異常をきたす核遺伝子異常が報告されている。一方, ミトコンドリア DNA の異常では, ミトコンドリア DNA の単一大欠失, 多重欠失, 重複, 枯渇や A3243G 点変異が報告されている。慢性進行性退行性経過を示す。

㊧ リー脳症(Leigh encephalomyelopathy)

幼少期(多くは2歳未満)から発症する精神運動発達遅滞, 退行, 食事摂取障害, 痙攣, 呼吸の異常, 眼運動異常などを特徴とし, 心, 筋, 腎, 肝などの多臓器の症状を示す重症型である。神経細胞の脱落, グリア増生を含む壊死・軟化病変があり, 大脳基底核を中心に両側対称性に観察する。ミトコンドリア DNA 異常では, T8993C/G 変異や, すでにほかの病型で報告された点変異でも, それが高度に蓄積した場合には本症を発症する。核 DNA の異常では, 電子伝達系酵素蛋白の核サブユニット, 分子集合に影響を与える

assembly 遺伝子の異常などの報告がある。リー脳症の多くは小児期に死亡する重症な疾患である。

㊨ 検査

頭部単純 CT, 頭部 MRI(T1, T2, FLAIR, DWI, ADC, MRA などのシーケンス), SPECT, MRS, 血中・脳脊髄液の乳酸・ピルビン酸, アミノ酸, 血中・尿中 GCMS, 血液ガス, L/P 比, ケトン体比, アニオンギャップ, 筋生検による筋病理, 尿沈渣によるミトコンドリア DNA の遺伝子解析, 血液による核 DNA 遺伝子解析, 培養皮膚線維芽細胞・生検筋を用いた電子伝達系酵素活性など。

㊩ 診断

診断のために図1に示すフローチャートに沿って進める。血液の乳酸, ピルビン酸は常に高値とは限らず, 血液では正常でも, 脳脊髄液では高値をとる場合も多い。高アラニン血症は高乳酸血症の存在を推測できる。アニオンギャップで20以上の開大があれば, 代謝性アシドーシスの存在を疑う。L/P(比)が15以上(正常では10), ケトン体比(3-β-ヒドロキシ酪酸/アセト酢酸:正常3)が増加していれば, 1次的な欠損が, 電子伝達系酵素の異常と推測できる。高乳酸血症は存在するが, L/P 比が正常であれば, 1次的異常は, ミトコンドリアマトリックス外と推測でき, ピルビン酸脱水素酵素欠損などを疑う。MELAS の急性期では, 頭部 MRI で T1 低信号, T2 および FLAIR で高信号が後頭葉視放射線領域もしくは側頭葉・頭頂葉の白質領域に島状に観察され, 血管支配領域とは一致しない。SPECT は, 多くの報告で異常部位に高灌流領域を認め, MRS では乳酸の蓄積と N-アセチルアスパラギン酸の低下が観察される。KSS では, 頭部 MRI で脳の全般的萎縮が進む。リー脳症では, 頭部 MRI で T1 低信号, T2 および FLAIR で高信号領域が大脳基底核および小脳, 橋, 延髄に両側対称性に出現する。両大脳半球も皮質・灰白質と

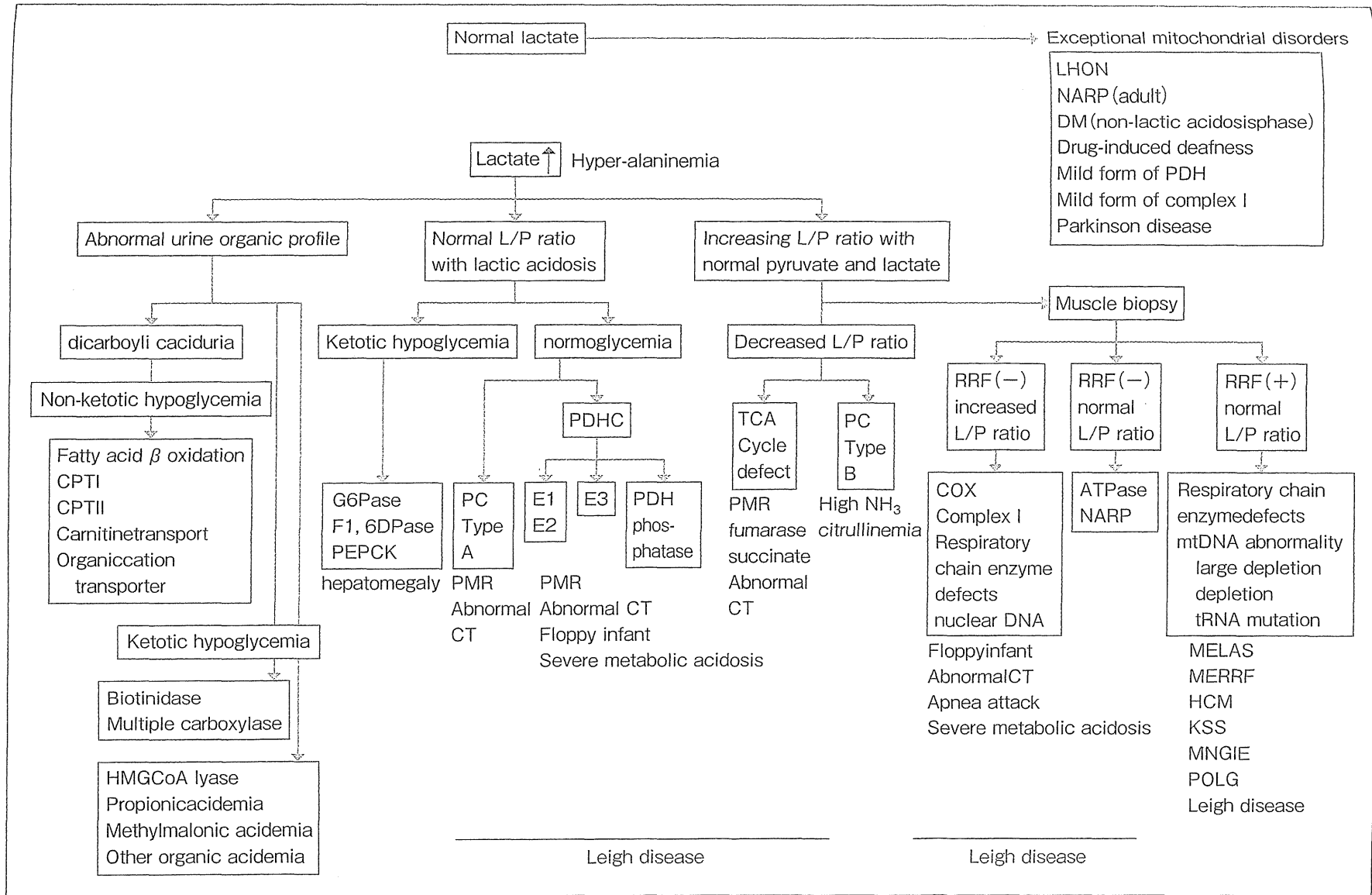


図1 ミトコンドリア病診断のアルゴリズム



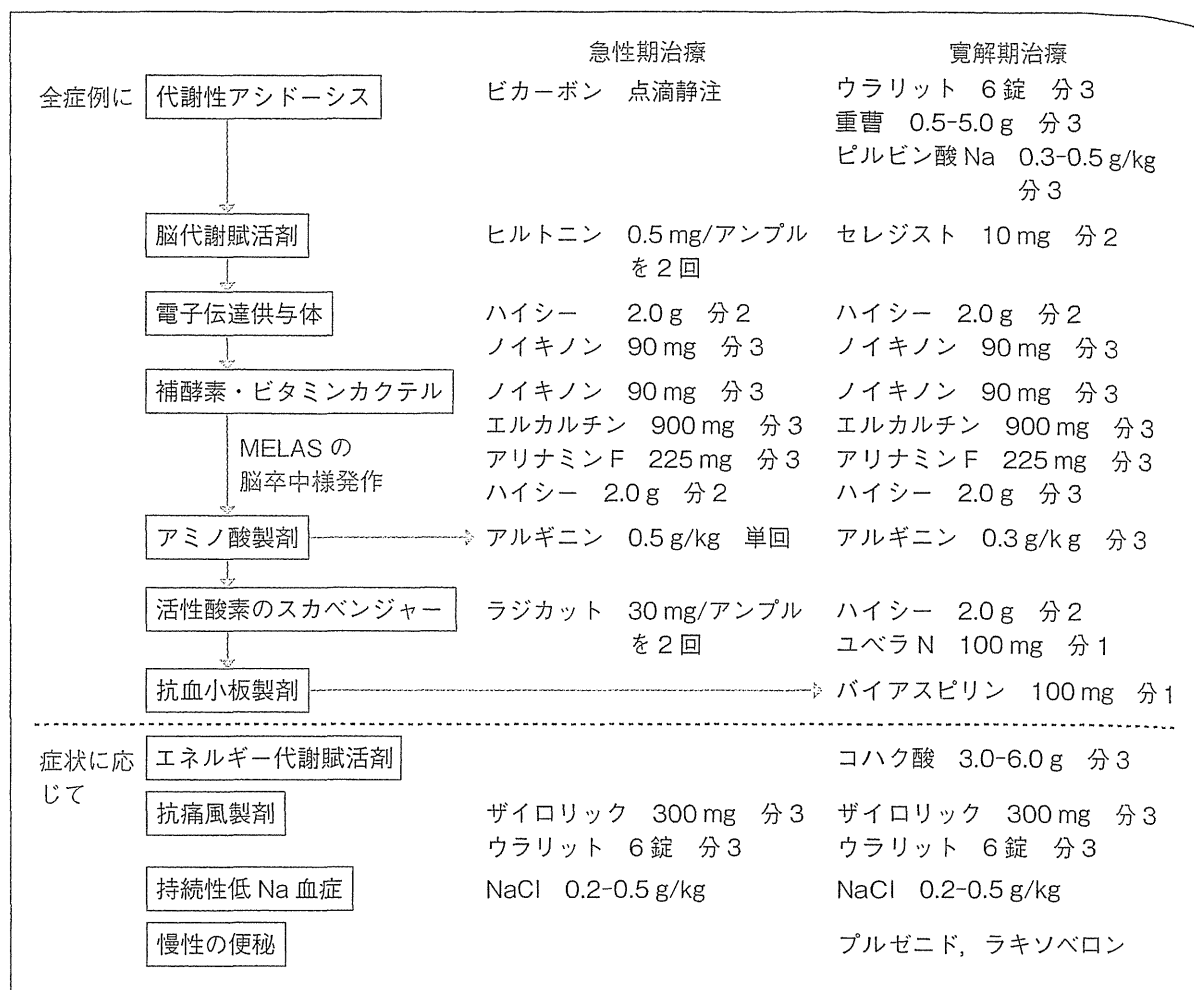


図2 ミトコンドリア異常症に対する治療法選択のフローチャート

もに進行性に萎縮し、時に代謝性ストローク様の画像所見を呈する。筋生検では、病理学的、生化学的、分子遺伝学的解析が可能であり、多くの病因の遺伝子解析方針を決めるうえで非常に有用な情報が得られる。

治療方針

対症療法

基本的には原因を補う治療がない病気なので、各臓器症状に応じて適切に行われる対症療法が患者の全身状態を改善させるためにきわめて重要である。症状に応じて担当専門医への相談が必要になる。

原因療法

この項では、主に電子伝達系機能障害に起因する種々の症状に対する処方例について図2を中心に以下に解説する。

1. 急性増悪期治療

常時、高乳酸、ピルビン酸血症が存在するため、感染や嘔吐・下痢などの発熱性炎症性疾患を契機として、急性期には重症な代謝性アシドーシスをきたす。そのため、それらに対する救急対応が必要になる。同時に合併する腎尿細管性アシドーシス(I型およびII型)が存在する場合、腹膜透析、血液透析を併用する場合もある。ミトコンドリア異常症の急性期にしばしば合併するNa 130 mEq/L以下の低ナトリウム血症は、腎尿細管におけるエネルギー不全のためのNa再吸収障害がメインと考えられ、ADH分泌が高値でないにもかかわらず、尿中Na排泄は100 mEq/L以上になることが多い。MELASの脳卒中様発作の場合、脳圧亢進に対する治療も並行して

行われる。

a. 内服薬

処方例 下記の薬剤を症状に応じて適宜用いる。

- 1) ギイロリック錠(100 mg) 300 mg 分3
食後

高乳酸血症(血漿中乳酸値が40 mg/dL 以上の場合)では、腎尿細管での尿酸排泄が競合阻害を受けるため、高尿酸血症の合併が多い。

- 2) ウラリット配合錠 6錠 分3 食後

尿をアルカリ化し尿酸排泄を促す。

- 3) ハイシー顆粒(25%・250 mg/包) 2,000 mg 分2

フリーラジカルのスカベンジャー。

- 4) ノイキノン錠(10 mg) 90 mg 分3 食後

電子伝達系供与体。リンパ管を経て吸収され、細胞内ミトコンドリアに取り込まれる。抗酸化作用を有し、酸素利用率を改善する。日常生活動作の改善、血中乳酸・ピルビン酸値の低下を認める報告がある。中枢神経系の乳酸・ピルビン酸も低下させるが、外因性 CoQ₁₀ は脳の血液脳関門を通過しないので、外因性 CoQ₁₀ は中枢神経系に対して間接的に関与していると考えられている。副作用に発疹、胃部不快感、食欲減退などがある。イデベノンは、CoQ₁₀ と似た化学構造をしているがイソプレノイド残基が少なく、血液脳関門を通過する。細胞内ミトコンドリア内で抗酸化作用を有する。

- 5) アリナミンF錠(25 mg) 225 mg 分3
食後

ピルビン酸脱水素酵素の補酵素としての賦活作用。生体内でATPからピロリン酸の転移を受けコカルボキシラーゼとなってピルビン酸、あるいは α -ケトグルタル酸などの脱炭酸反応の補酵素として作用する。

- 6) エルカルチン錠(300 mg) 900 mg 分3
食後

炭素数8以上の中鎖および長鎖脂肪酸の膜透過を助長し、エネルギー産生系を活性化。

b. 注射剤

処方例 下記の薬剤を症状に応じて適宜用いる。

- 1) ビカーボン注(500 mL) 1回500-1,000 mL
静注

心不全、腎不全がない場合、重炭酸リンゲル液500 mLに50%ブドウ糖液20 mL1アンプルを混ぜ点滴静注する。重炭酸リンゲル液は、Na 135 mEq/L、HCO₃⁻ 25 mEq/Lと、細胞外液の組成に近く、代謝性アシドーシス発作時に合併しやすい低ナトリウム血症の補正と代謝性アシドーシスの補正に、ミトコンドリア異常症の救急治療で最も有用な輸液製剤と考えている。輸液スピードは、10 mL/kg/時以下とし、血清Naおよび血液ガスを参考に3-5日連日投与する。

- 2) アルギU注(200 mL) 1回5 mL/kg 静注

MELASの脳卒中様発作であれば、脳卒中様発作発現から12時間以内に、L-アルギニン1回5 mL/kgの急性期治療が有効と思われる。この治療は、日本医師会治験促進センターの医師主導治験として2年間の治験が終了し、現在PMDAに申請準備中である。L-アルギニンの急性期効果は、MELASに合併する血管内皮機能不全に対する効果と考えられている。

- 3) ラジカット注(30 mg) 1回1アンプル 1日2回 静注

脳梗塞急性期治療薬であり、フリーラジカルを消去し過酸化脂質産生を抑制し、脳細胞の酸化障害を抑制するといわれている。

- 4) ヒルトニン注(0.5 mg) 1回1アンプル 1日2回 静注

遷延性の意識障害が続く場合は脳代謝賦活剤として使用する。

- 5) ソル・メドロール注(500 mg) 1回30 mg/kg 1日1回 3日連続 静注

種々の治療に効果がみられない場合、ステロイドパルス療法を行うが、効果に関しては不明である。

15

2. 寛解期の維持療法

現在行われているミトコンドリア異常症に対する治療法は、少数の症例報告を参考にした治療法であり、治験研究を経た十分なエビデンスに基づいた治療法はない。ミトコンドリア異常症に対し、実際に使用されている薬剤が、患者の病状経過および生命予後にどれだけ効果があるかは不明である。根本的なミトコンドリアの機能障害を取り除くことができればよいが、現状ではきわめて難しい。工業用化合物であるジクロロ酢酸が、高乳酸血症治療薬として使用されていたが、当初から指摘されている、肝、腎毒性に加えて、末梢神経障害が報告され、現在では使用されていない。これに代わり、ピルビン酸ナトリウム治療が注目されており、2011年8月1日付けで、難治疾患研究事業としてピルビン酸ナトリウムによる治療法開発の研究班が組織された(班長：古賀靖敏)。

a. 内服薬

処方例 下記の薬剤を症状に応じて適宜用いる。

- 1) アルギン配合顆粒 0.3-0.5 g/kg 分3 食後

MELASでの脳卒中様発作の予防目的で血管内皮機能改善薬として使用する。MELAS患者の脳卒中様発作寛解期にL-アルギニンを投与することで、発作の予防および重症度の軽減にも有効であり、医師主導治験を経て、承認申請準備中である(2011年6月治験終了)。

- 2) ザイロリック錠(100 mg) 300 mg 分3 食後

高乳酸血症(血漿中乳酸値が40 mg/dL以上の場合)では、腎尿細管での尿酸排泄が競合阻害を受けるため、高尿酸血症の合併が多い。

- 3) ウラリット配合錠 6錠 分3 食後

尿をアルカリ化し尿酸排泄を促す。

- 4) ハイシー顆粒(25%, 250 mg/包) 2,000 mg 分2

フリーラジカルのスカベンジャー。生体内で酸化還元反応に関与し他酵素を活性化させる。ストレスに対する抵抗力を増加させる。血管内皮機能の改善としての効果あり。副作用に悪心、嘔吐などがある。

- 5) ノイキノン錠(10 mg) 90 mg 分3 食後

用量

電子伝達系供与体。

- 6) アリナミンF錠(25 mg) 225 mg 分3 食後

ピルビン酸脱水素酵素の補酵素としての賦活作用。

- 7) エルカルチン錠(300 mg) 900 mg 分3 食後

炭素数8以上の中鎖および長鎖脂肪酸の膜透過を助長し、エネルギー産生系を活性化。

- 8) ユベラNカプセル(100 mg) 100 mg 分1 朝食後

フリーラジカルのスカベンジャー。ミトコンドリアなどの生体膜を安定化させ、血管壁の透過性や抵抗性を改善する。また末梢血行を促すとともに、血小板粘着・凝集能を抑制して微小循環系の動態を改善する。体内で強力な抗酸化作用を示し、過酸化脂質の精製を抑制する。

- 9) バイアスピリン錠(100 mg) 100 mg 分1 食後

血小板に作用して抗凝固作用を期待する。

- 10) ピルビン酸ナトリウム 0.5-1.0 g/kg 分3

ミトコンドリア異常症の細胞障害(cytopathy)を予防する唯一の化合物。ミトコンドリア異常症では、ATP産生不足により細胞のアポトーシスが進行し、最終的にはリー脳症に代表される重要細胞の脱落変性が生じる。高乳酸血症が重度で、L/P比が25.6以上になる患者では、解糖系のATP合成もストップするため、このアポトーシスが急速に進行すると考えられる。この化合物は、DCA同様、ピルビン酸脱水素酵素複合体(PDHC)を最大限に活性化させる働きのほかに、レドックスステートを25以下に温存し、

解糖系の ATP 合成をレストアする働きがあり、アポトーシスを予防することが考えられる。

患者・家族への説明

- ・ミトコンドリア脳筋症は、エネルギー代謝の中核として働く細胞内小器官ミトコンドリアの機能不全により、神経、筋、心臓、腎臓など全身臓器に種々の症状を呈する遺伝性進行性変性疾患である。あらゆる年齢層に発症し、発症すれば症状の寛解増悪を繰り返しながら、加齢に伴い進行性退行性病変をきたす疾患であり、ミトコンドリアもしくは核 DNA の異常を伴う遺伝病である。
- ・遺伝子異常が判明した場合、病名告知と疾患の説明は時間をかけて継続的に行い、病気について十分な知識と経験をもつ医師のもとで遺伝カウンセリングを行うことが好ましい。
- ・患者は、感染、ストレス、高温・多湿環境、脱水、嘔吐・下痢、寒冷曝露、過度の運動などで、症状の悪化をきたすことがあり、環境整備が重要である。また、学校や職場環境の理解・整備が必要であり、関連する行政機関との連携も含めて、総合的な対応が必要になる。
- ・医療支援については、低年齢では乳幼児医療費助成制度を活用し、その後、20歳未満では、小児慢性特定疾患医療給付制度、その後は、成人特定疾患医療助成制度に申請を行う。また、状況に応じて身体障害者手帳(肢体不自由、心疾患、聴力障害、視力障害)の申請も行う。
- ・ミトコンドリア病のフォローアップを行ううえでは、本症があらゆる臓器の障害をきたしうることから、それぞれの専門医と密接な連携を取りながら全人的医療を行うことが基本であり、主治医をキーパーソンとしながらも、グループ診療が望ましい。
- ・社会的コミュニティとして、ミトコンドリア病患者・家族の会(<http://www.mito->

[chon.org/pc/](http://www.mito-chon.org/pc/))、日本ミトコンドリア学会が行っているドクター相談室(<http://j-mit.org/sub7-soudan.html>)も紹介する。

参考文献

- 1) Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, et al: MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820: 619-624.
- 2) Koga Y, Akita Y, Nishioka J, et al: L-arginine improves the symptoms of strokelike episodes in MELAS. *Neurology*. 2005; 64: 710-712.
- 3) Koga Y, Akita Y, Nishioka J, et al: Endothelial dysfunction in MELAS improved by L-arginine supplementation. *Neurology*. 2006; 66: 1766-1769.

Case report

MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene

Masahide Goto^a, Hirofumi Komaki^{a,*}, Takashi Saito^a, Yoshiaki Saito^a,
Eiji Nakagawa^a, Kenji Sugai^a, Masayuki Sasaki^a, Ichizo Nishino^b, Yu-ichi Goto^c

^a Department of Child Neurology, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan

^b Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan

^c Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan

Received 26 March 2012; received in revised form 31 January 2013; accepted 13 March 2013

Abstract

The m.3302A>G mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene has been identified in only 12 patients from 6 families, all manifesting adult-onset slowly progressive myopathy with minor central nervous system involvement. An 11-year-old boy presented with progressive proximal-dominant muscle weakness from age 7 years. At age 10, he developed recurrent stroke-like episodes. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, plus stroke-like episodes (MELAS) was diagnosed by clinical symptoms and muscle biopsy findings. Mitochondrial gene analysis revealed a heteroplasmic m.3302A>G mutation. Histological examination showed strongly SDH reactive blood vessels (SSVs), not present in previous cases with myopathies due to the m.3302A>G mutation. These findings broaden the phenotypic spectrum of this mutation.

© 2013 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: MELAS; Myopathy; m.3302A>G mutation

1. Introduction

The m.3302A>G mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene was identified in 6 families including 12 patients with adult-onset slowly progressive myopathy and minor central nervous system complications including hearing disabilities and oculomotor symptoms [1–4]. In contrast, we experienced a child harboring the same mutation who showed the mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, plus stroke-like episodes (MELAS) phenotype. Approximately 80% of MELAS

cases are caused by an A-to-G transition mutation at position 3243 in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} (MTTL1) gene [5]. The relationship of this mutation to the MELAS phenotype is noteworthy.

2. Case report

A 7-year-old boy presented with gait disturbance and progressive proximal-dominant muscle weakness. He had normal psychomotor development until the development of the symptoms. His maternal members including his mother did not have symptoms associated with mitochondrial diseases such as short stature, diabetes mellitus, hearing loss, mental retardation, and cardiac complication. Generalized seizures emerged at age 10 years, subsequently occurring 8 times within one year. Electroencephalography revealed sporadic sharp

* Corresponding author. Address: Department of Child Neurology, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), 4-1-1 Ogawahigashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan. Tel.: +81 42 341 2711; fax: +81 42 344 6745.

E-mail address: komakih@ncnp.go.jp (H. Komaki).

Table 1
Laboratory data.

Serum		(Normal range)	
Creatine kinase	716	(57–197)	IU/L
Lactate	68.4	(3.0–17.0)	mg/dL
Pyruvate	1.60	(0.3–0.94)	mg/dL
Cerebrospinal fluid			
Lactate	44.0	(8.4–16.6)	mg/dL
Pyruvate	1.92	(0.63–1.27)	mg/dL

waves at mid-frontal areas. On physical examination at age 11 years, he showed winged scapulas and proximal muscle weakness necessitated Gowers' maneuver to stand. His deep tendon reflexes were decreased. Cranial nerve findings were unremarkable. IQ testing (WISC-III) revealed borderline mental retardation (full IQ 76). Serum creatine kinase, lactate and pyruvate, as well as cerebrospinal lactate and pyruvate, were elevated (Table 1).

Histological examination of biopsied muscle showed 30% of muscle to be ragged-red fibers (RRFs) by modified Gomori-trichrome staining. Succinate dehydrogenase (SDH) staining revealed strongly SDH reactive blood vessels (SSVs). Cytochrome c oxidase (COX) staining demonstrated variable enzyme activities from strongly positive to negative. Both RRFs and SSVs showed variable COX activities.

Respiratory chain enzyme activities in biopsied tissues were measured using previously reported methods [6]. The ratio of muscle complex I/II activities was markedly reduced to 12% of control values. Those of complex III/II and IV/II activities were 43% and 40%, respectively. In myoblasts and fibroblasts, these ratios were all within control ranges (Table 2).

Mitochondrial gene analysis was conducted as described elsewhere [7], and identified the m.3302A>G mutation located within the coding sequence of tRNA^{Leu(UUR)}. The heteroplasmy proportion of the m.3302A>G mutation was determined for each tissue by real-time PCR method using Taq-Man[®] probe on ABI 7700 according to the manufacturer. Mutation loads were 89.5 ± 0.3% in biopsied muscle, 85.8 ±

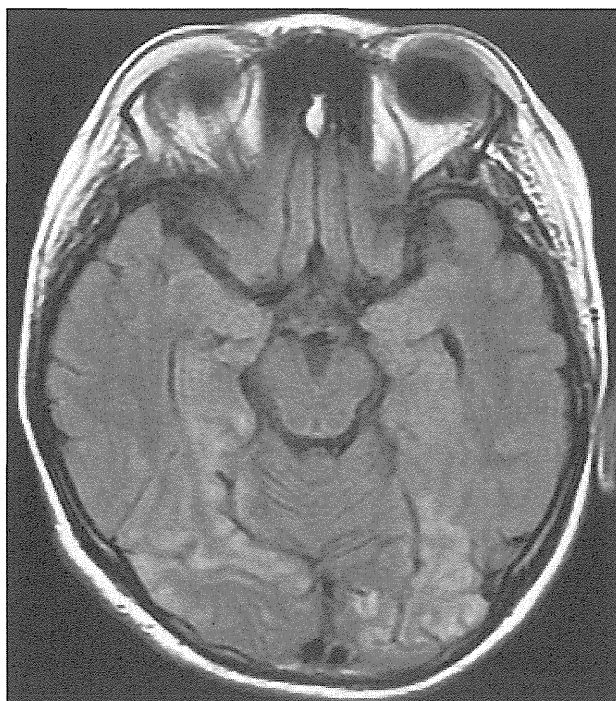


Fig. 1. Brain magnetic resonance imaging of the patient (fluid-attenuated inversion recovery imaging). Bilateral occipital lesions with high signal intensity are noted, whose distribution is not conforming to that of vascular territories.

0.7% in myoblasts, 86.9 ± 0.8% in fibroblasts and 36.1 ± 2.3% in white blood cells.

After MELAS was diagnosed, the patient experienced stroke-like episodes with headache, vomiting, and occasionally cortical blindness. Brain magnetic resonance imaging (MRI) showed bilateral occipital lesions, confined to the cortical ribbon and not conforming to the distribution of vascular territories, with high signal intensity on fluid-attenuated inversion recovery images (Fig. 1). During the follow-up period, repeated MRI examinations never had basal ganglia lesions. At age 12 years, he became wheelchair-bound, and was nocturnal mask-medicated ventilator dependent due to chronic respiratory insufficiency.

Table 2
Respiratory chain enzyme activities.

Complex	Skeletal muscle		Myoblasts		Fibroblasts	
	Patient	Control (n = 5)	Patient	Control (n = 5)	Patient	Control (n = 4)
I/II	0.09	0.26–1.2	3.2	1.3–5.6	2	1.6–3.4
	12%	(0.76 ± 0.39)		(3.0 ± 1.7)		(2.0 ± 0.9)
III/II	0.39	0.72–1.8	3.4	3.2–7.4	5.3	1.9–5.6
	43%	(0.91 ± 0.41)		(4.2 ± 1.6)		(3.5 ± 1.8)
IV/II	0.35	0.42–1.3	3.7	2.1–9.1	2.8	2.2–5.0
	40%	(0.88 ± 0.36)		(4.7 ± 3.1)		(3.3 ± 1.2)

Complex I, III and IV activities are shown as proportions to that of complex II. Control values are expressed as mean ± standard deviation.

3. Discussion

Our patient initially manifested muscle weakness, developing epilepsy and stroke-like episodes years later. Elevated cerebrospinal lactate and pyruvate and bilateral occipital lesions with high signal intensity on MRI characterize the MELAS phenotype, and an m.3302A>G mutation was identified for the first time. The mutation was in a heteroplasmic state, a common feature of pathogenic mtDNA mutations. The significant tissue-to-tissue variability and inability to quantify the tissue specific mutational burden for the brain make it difficult to determine a prognosis for individuals harboring this mutation. Although the percentage of mutation load in differ little from those of in myoblast and fibroblast, the degree of the enzymatic deficiency in muscle, myoblasts, and fibroblasts are diverse in our patient. The threshold effects of this mutation might be different between muscle, fibroblasts and myoblasts.

However, the proportion of mutated mtDNA was highest in leptomeningeal and cortical blood vessel walls in all brain regions in a patient with severe COX deficiency [8]. Since mitochondrial dysfunction in vessels is assumed to be essential in the pathogenesis of stroke-like episodes in MELAS, such heteroplasmy may have been present in our patient. Moreover, although some cases with adult-onset slowly progressive mitochondrial myopathy with m.3302A>G mutations had hearing loss, recurrent headaches, ptosis, progressive external ophthalmoplegia, and depression [3], muscle biopsy revealed RRFs but no SSVs in these cases. Since SSVs represent an increased proportion of mutant mtDNA in vessel walls and are characteristic of MELAS [9,10], the SSVs in muscle tissue might be linked to the brain lesions through abundant mutated mtDNA in blood vessels in the central nervous system in our patient.

His maternal members including his mother did not have symptoms associated with mitochondrial diseases. It would have been useful that we analyze their heteroplasmic conditions, however, we could not obtain the samples of his maternal members because of the disapproval of providing the samples.

In conclusion, our case suggested the m.3302A>G mutation to cause the clinical MELAS phenotype. We should pay attention to headache, convulsion and other symptoms suggesting MELAS in patients with mitochondrial myopathies, particularly those with SSVs on muscle pathology.

Acknowledgments

This work was partly supported by Research Grant (21A-6) for Nervous and Mental Disorders (YG and EN) and Grants-in-Aid for Research on Intractable Diseases (Mitochondrial Disease) (YG and HK) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. We thank Dr. Yutaka Nonoda, and Dr. Hideyuki Hatakeyama, Dr. Chika Sakai, Ms. Mayuko Kato and Ms. Yoshie Sawano for technical assistance.

References

- [1] Bindoff LA, Howell N, Poulton J, McCullough DA, Morten KJ, Lightowlers RN, et al. Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutation in mitochondrial DNA. A potential disease mechanism. *J Biol Chem* 1993;268:19559–64.
- [2] van den Bosch BJ, de Coo IF, Hendrickx AT, Busch HF, de Jong G, Scholte HR, et al. Increased risk for cardiorespiratory failure associated with the A3302G mutation in the mitochondrial DNA encoded tRNA^{Leu(UUR)} gene. *Neuromuscul Disord* 2004;14:683–8.
- [3] Hutchison WM, Thyagarajan D, Poulton J, Marchington DR, Kirby DM, Manji SS, et al. Clinical and molecular features of encephalomyopathy due to the A3302G mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene. *Arch Neurol* 2005;62:1920–3.
- [4] Ballhausen D, Guerry F, Hahn D, Schaller A, Nuoffer JM, Bonafé L, et al. Mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation m.3302A>G presenting as childhood-onset severe myopathy: threshold determination through segregation study. *J Inher Metab Dis*, in press. doi:10.1007/s10545-010-9098-2.
- [5] Schaefer AM, McFarland R, Blakely EI, He L, Whittaker RG, Taylor RW, et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* 2008;63:35–9.
- [6] Trounce LA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. In: Attardi GM, Chomyn A, editors. *Methods in enzymology*, vol. 264. San Diego, USA: Academic Press; 1996. p. 484–509.
- [7] Akanuma J, Muraki K, Komaki H, Nonaka I, Goto Y. Two pathogenic point mutations exist in the authentic mitochondrial genome, not in the nuclear pseudogene. *J Hum Genet* 2000;45:337–41.
- [8] Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-Ail Z, et al. Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurons and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:359–73.
- [9] Hasegawa H, Matusoka T, Goto Y, Nonaka I. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Ann Neurol* 1991;29:601–5.
- [10] Goto Y. Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle Nerve* 1995;3:S107–12.