ミトコンドリア脳筋症におけるヘテロプラスミー (heteroplasmy)と臨床症状, 病理所見の関連性の研究

新潟大学脳研究所神経科学分野神経内科学部門
(主任：辻　省次教授)
丹　野　芳　範

The Correlation of the Heteroplasmy of mtDNA and Clinicopathological Findings in the Patients with Mitochondrial Encephalomyopathies

Yoshinori TANNO

Department of Neurology
Yoshida Prefectural Hospital of Niigata
(Director: Prof. Shoji TSUJI)

Abstract

In most cases of the mitochondrial encephalomyopathies, the mutations of mtDNA usually appear in heteroplasmic states. The degree of mtDNA heteroplasmy has been suggested to play an important role in determining the clinical phenotypes and the organ-specific defects. We devised a novel method for quantitative analysis of heteroplasmy using PCR-SSCP, which is useful to accurately quantitate heteroplasmy of very small amount of samples. Using this method, we analyzed the heteroplasmy of skeletal muscles or leucocytes from 12 cases of MERRF, 5 cases of MELAS, and 1 case of MERRF/MELAS overlap syndrome associated with 3243 $tRNA^{Leu\,(UUR)}$ mutation.

We furthermore analyzed 5 autopsied cases (2 MERRF and 2 MELAS, 1 MERRF/MELAS overlap syndrome patients), and the cellular or organellar distributions of heteroplasmy of CNS in MERRF patients. Though there is a tendency that patients with high percentages of mutant mtDNAs in their skeletal muscles show severer clinical symptoms and earlier onset than those with low percentages, no obvious correlation was observed between the phenotype and genotype of leukocyte in MERRF and MELAS

Reprint requests to: Yoshinori TANNO
Department of Neurology Niigata Prefectural Yoshida Hospital of Niigata
32-14 Daibo-cho, Yoshida Town
Nishikanbara County
Niigata 959-0242 Japan

別刷請求先：
〒959-0242　新潟県西蒲原郡吉田町大保町32-14
新潟県立吉田病院　神経内科　　丹野芳範

patients. And the percentages of mutant mtDNA were similarly high in both clinically affected and unaffected tissues in 2 MERRF, 2 MELAS, and 1 MERRF/MELAS overlap syndrome patients. Single muscle fiber analysis, however, revealed that the proportion of mutant mtDNA was significantly higher in ragged-red fibers than in non-ragged-red fibers.

Key words: MERRF, MELAS, heteroplasmy, SSCP, autopsied tissues

はじめに

ミトコンドリア病は，ミトコンドリアの一次的な機能異常に基づく疾患の総称である．本症の筋病理所見の記載としては，1966年のShyらの報告が最初であるが，その後1972年にOlson & Engelによりゴモリ・トリクローム変法染色が導入され，Leber遺伝性視神経萎縮症など一部の病型を除き，ミトコンドリア病の多くでは，生検骨格筋標本でragged-red fiber（RRV）という赤紫に濃染する筋繊維が認められることが明らかになった．

一方，遺伝子レベルの研究は，Andersonらによるmtdnaの全塩基配列の決定[1]やWallaceらによるLeber遺伝性視神経萎縮症の病因の解明[2]，Shoffnerら[3]，米田ら[4]によるMERRF（myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers）の病因の解明をきっかけに急速に進歩し，多彩な病型が報告されている．こうしたミトコンドリア病の患者では，何れの病型においても，変異型mtDNAと野生型mtDNAがヘテロプラスミー（heteroplasmy）と呼ばれる混在した状態で存在していることが明らかにされた[3)5)6)]．

このため，heteroplasmyと臨床症状との関連性について，幾つかの仮説が提唱されてきた．第1に，ミトコンドリア病患者の発症時期や重症度とheteroplasmy（変異型mtDNAの割合）との相関性の有無，第2には，各々のmtDNA変異が特有な表現型をとりやすい原因として，疾患毎に各臓器のheteroplasmyの程度が異なるためではないかという仮説である．第3には，tRNA$^{Leu\ (UUR)}$の3243変異（A→G）など同一の塩基変異を持つ患者の中にも，MELAS（mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes）の典型的な臨床症状を呈する症例だけではなく，時に糖尿病や難聴のみの症例[7]，進行性外眼筋麻痺のみの症例[6)8)]，MERRF様の臨床症状を呈する症例[9)10)]，MERRF/MELAS overlap症状を呈する症例[11)-13)]など多彩な病型が存在する事が報告され，その原因として症例毎の臓器間のheteroplasmyの差が関連しているのではないかと言う仮説である．

そこで本著では，これらの問題に対する研究をおこなった．

ヘテロプラスミーの定量法の問題点

通常，塩基変異の有無の診断法としては，ゲノムDNAをPCR（polymerase chain reaction）にて増幅後に制限酵素で消化し，断片長の変化をみるPCR-RFLP（restriction fragment length polymorphism）法が用いられる．しかし，ミトコンドリア病のように複数の塩基配列がheteroplasmyの状態で存在する疾患では，PCR法でDNAを増幅する際に，熱変性とアニリングを繰り返す過程でヘテロデュプレックス（heteroduplex）と呼ばれる野生型DNAと変異型DNAがミスアニリングしたPCR産物が出現する．このheteroduplexは制限酵素では消化されないため，通常のPCR-RFLP法で定量をおこなった場合，実際の割合に比較し，見かけ上制限酵素で消化されないDNAの比率が高くなるという欠点があり，正確な定量は困難である[3)14)]．

一方，Southern法では，MERRFのように通常の制限酵素の認識部位の変化を伴わない塩基変異では分析が不可能である．更に，制限酵素を用いるため部分消化の可能性やトランスファーやハイブリダイゼーションの効率による誤差などの問題点がある．またサンプル量が多く必要なため，微細な組織におけるheteroplasmyの定量は困難である．

これらの問題点を解決する方法として，我々は

表1　MERRF 患者の骨格筋，末梢血における heteroplasmy と臨床症状

患者	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case10	Case11	Case12
年齢/性別	53/F	25/M	20/M	55/F	21/F	67/F	25/M	16/F	15/F	30/F	30/F	58/M
続柄	母 子 従 兄 弟			母	娘	母	子	姉	妹			
発症年齢	未	16	14	未	18	55	C	11	9	25	C	45
死亡年齢			22			69	29				30	
ミオクローヌス	−	+	++	−	++	+	++	++	++	−	+++	+
てんかん	−	+	+++	−	−	+	++	++	++	−	+++	+
小脳失調	−	±	++	−	+	+	++	+	+	−	+++	++
ミオパチー	−	+	++	−	+	+	++	+	+	+	++	++
痴呆	−	+	++	−	−	±	+	+	++	±	++	++
足変形	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+
難聴	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	+	+
視神経萎縮	−	−	+	−	−	−	−	±	±	−	−	−
Ragged-red fibers	未検	+	+	未検	+	+	+	+	+	+	+	−
電子伝達系酵素低下	正常	未検	正常	未検	未検	正常	I 13% IV 33%	IV 49%	IV 42%	未検	IV 42%	未検
検体 変異型 mtDNA（%）	血 12%	血 23%	筋 94%	血 36%	血 45%	血 59% 筋 83%	血 66% 筋 94%	筋 87%	筋 92%	筋 87%	筋 94%	血 60%

（C: childfood）

PCR の最後の1サイクルに 5'-末端をエンド・ラベリングしたプライマーを反応系に加える事により，正確な比率を定量できるような方法を開発した[14]．しかし，この方法では，微量な組織の分析が困難であることから，我々は，PCR-SSCP 法を用いた分析方法を確立すると共に，この方法を用いて MERRF および MELAS 患者のヘテロプラスミーと臨床症状，組織所見との関連性について検討をおこなった．

分析対象と研究方法

1．分析対象

分析対象は，7家系12症例の MERRF 患者及び5家系5症例の MELAS 患者の生検骨格筋もしくは末梢血である．（**表1**）及び（**表2**）にその臨床症状の概略を示す．

また，MERRF 患者のうち症例7[15]及び症例12[16]，MELAS 患者のうち症例1[17]，症例2[18]および症例6[13]（$tRNA^{Leu(UUR)}$ の塩基番号3243変異を伴い，臨床的に MELAS/MERRF overlap 症候群を呈した症例）について，剖検組織の凍結組織を用いて分析をおこなった．

また更に，微細な組織での変性の有無を調べるため，中枢神経系では，厚さ10μm の凍結切片より実体顕微鏡下で一辺が約20μm 四方の切片を切離（プルキンエ細胞は single cell），骨格筋は20μm の厚さの凍結切片より single fiber を切離し分析をおこなった．

2．分析方法

変異型および野生型 mtDNA の subcloning

MELAS（塩基番号3,243変異）及び MERRF（塩基番号8,344変異）患者の PCR 産物より得られた DNA 断片を，pUC19ベクターを用いてサブクローニングした．クローニング部位は，MELAS は塩基番号2,436～4,121[17]，MERRF は塩基番号8,191～8,730[19]の範囲である．

オリゴプライマーの作成

MELAS については，塩基変異の存在する $tRNA^{Leu(UUR)}$（塩基番号3230-3304）をはさんだ位置にオリゴプライマーを作成した．なお，MERRF については，塩基変異の存在する $tRNA^{Lys}$（塩基番号8295-8360）の直前の5プライム側（塩基番号8,272～8,289）に9塩基の繰り返し配列があり，この部位で正常人の約16%に9塩基の欠失がある

表2　3243変異を有する患者の骨格筋，末梢血における heteroplasmy と臨床症状

患者	MELAS					overlap
	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
年齢/性別	10/F	14/M	44/F	34/F	57/M	44/M
発症年齢	4	2	41	32	55	28
死亡年齢	11	14				44
脳卒中様症状						
嘔吐・頭痛	+++	+++	+	+	−	+++
巣症状	+++	+++	++	+	+	+++
意識障害	++	+++	+++	+++	−	+++
てんかん	+++	+++	++	+++	−	+++
ミオクローヌス	−	−	−	−	−	++
小脳失調	−	−	−	−	−	++
ミオパチー	++	++	+	+	+	−
知能低下	++	+++	++	−	±	±
難聴	−	+	−	+	+	+
視神経萎縮	+	+	−	−	−	−
外眼筋麻痺	+	−	−	−	−	+
心疾患	++	++	−	−	−	+++
低身長	++	+	+	−	−	+
糖尿病	−	−		+++		+
乳酸アシドーシス	+	+	+	+	+	+
Ragged-red fibers	+	+	+	+	+	+
電子伝達系酵素低下	I 49%	I 16& III 47% IV 18% V 26%	正常	N. E.	N. E.	N. E.
検体			血 8%	血 31%	血 82%	
変異型 mtDNA（%）	筋 81%	筋 84%	筋 62%			筋 45%

（overlap: MERRF/MELAS overlap syndrome）

ことが知られている[20]ため，欠失部位を避けてプライマーを作成した．

プライマーの標識法および PCR

20p モルのオリゴプライマーを，γ-^{32}P-ATP を用いて 5'-末端を標識し，5 分間煮沸して T4-Polynucleotide kinase を失活させた後，もう一方のオリゴプライマーを 20p モル，dNTP を各々 25n モル，10×reaction buffer を 40μl 加えて，総量を 320μl とし，使用時まで凍結保存した．次に上記の溶液80μl 毎に，Taq DNA polymerase を 0.5μl 加え，各 PCR チューブに 8μl づつ分注する．クローン化した mtDNA（0.25ng/μl）を，各々のチューブに 2μl づつ加えて，20サイクルの PCR をおこなった．PCR 終了後，95%ホルムアルデヒド色素溶液を加え10倍に希釈した後，5 分間煮沸後に，氷冷し直ちに泳動した．

SSCP の条件の検討

次に目的の tRNA をはさんだ位置に数種類のオリゴプライマーを作成し，片側のプライマーの 5'-末端を^{32}P でラベルし，前述のクローンを用い

てPCRを行った．得られたPCR産物を，0.5×MDE（Mutation Detection Enhancement gel, AT Biochem）ゲル上で泳動した．泳動は，Atto社製のSSCP装置（AE-6160）を用い，Taitec社製のcoolnitbathでゲルの温度を一定に保ちながら泳動を行った．この際，PCR産物のサイズ，ゲルに添加するグリセロール濃度やゲルの温度，ワット数などの泳動条件やを工夫し，最もよく分離できる条件を検討した．

定量性の検討

次に，変異型のクローンと野生型のクローンを種々の割合でミックス後にPCRをおこなった．PCR産物を 上記の分離の条件の下で泳動して，得られた結果をFujiのイメージアナライザー（BAS 2000）を用いて分析して，従来の分析方法との比較をおこなった．

PCR-SSCP法による定量法の検討

PCR-SSCP法[21]による疾患の診断や遺伝子変異の有無の検索を行う場合には変異型DNAと野生型DNAの泳動度に若干の差が見られれば十分である．しかし 変異型DNAの定量を行う場合には，互いのバンドの影響を受けないように，変異型DNAと野生型DNAが非変性ゲル上で十分に分離される必要がある．また，本法を用いた分析法がどの程度定量性を持っているかを検討する必要がある．

そこで，我々はMELAS及びMERRF患者の野生型と変異型のmtDNAを含むプラスミドを種々の割合で混合してPCR-SSCPを行い，最も良い分離条件を決定すると共に，定量性についての検討を行った．

結　　果

MELAS及びMERRFの分析条件

MELASについては，プライマー（5'-GAGGTTGGCCATGGGTATGT：塩基番号3305←3324）を標識した後，プライマー（5'-CCCACCCAAGAACAGGGTTT：塩基番号3210→3229）を加えてPCRを行い，グリセロール濃度10%添加の0.5×MDEゲル上で4℃，12ワットで18時間泳動することにより，最も良い分離が得られた[17]．

一方，MERRFについてはプライマー（5'-CCCACTGTAAAGCTAACTTA：塩基番号8293→8312）を標識後，プライマー（5'-ATGGTGGGCCATACGGTAGT：塩基番号8381←8400）を加えてグリセロール濃度10%添加の0.5×MDEゲル上で37℃，12ワットで18時間泳動することにより，最も良い分離が得られた[18]．

定量性の検討

次に，変異型のクローンと野生型のクローンを種々の割合でミックス後にPCRをおこなった．PCR産物を上記の分離の条件の下で泳動して，得られた結果をFujiのイメージアナライザー（BAS 2000）を用いて分析して，従来の分析方法との比較をおこなった．

本法では，テンプレートとして最初に加えた変異型mtDNAの割合に良く相関した分析結果が得られ，本法が定量性に優れた方法である事がわかった[17]．MERRFにおいても同様に定量性に優れていることが確認された．

本法は，制限酵素の認識部位の変化をもたらさない塩基変異に対しても有用であり，制限酵素やミスマッチ・プライマー[5]を必要としないため，より正確な分析が可能である．またPCRの最初のサイクルから標識プライマーを使用しているために 得られるPCR産物の放射活性が高く，感度が優れていることから従来の方法[8]に比べより微細なサンプルの定量が可能である．また，ミトコンドリア病以外においても変異型遺伝子と野生型遺伝子が混在しているような組織を用いた定量的分析に有用であると考えられた．

生検骨格筋および末梢血のheteroplasmyと臨床症状

次に，我々は，前記の方法を用いて，7家系12症例のMERRF患者及び5家系5症例のMELAS患者の生検骨格筋もしくは末梢血より抽出したgenomic DNAを用いて，変異型 mtDNAの定量をおこない，臨床症状との関連性を検討した（**表1**）（**表2**）．

MERRF患者の生検骨格筋では，83%～94%と高率に変異型mtDNAが認められた．また，MELAS患者の生検骨格筋でも，62%～84%と比

較的高い割合で変異型mtDNAが認められた．全体的に臨床症状の重症度とheteroplasmyの程度にある程度の相関性が認められ，一般に変異型mtDNAの割合の高い症例ほど臨床症状が重い傾向が認められたが，MERRF患者では生検骨格筋での変異型mtDNAの割合が同程度にもかかわらず臨床症状に差の見られる例（Case 6, 8, 10）も認められた．

一方，末梢血では，MERRF患者では12%～66%，MELAS患者では8%～82%に変異型mtDNAが認められた．全体的に変異型mtDNAの割合が骨格筋に比べて低い傾向が認められ，また症例によって，変異型mtDNAの割合に大きなばらつきが見られ，末梢血のheteroplasmyの程度だけから臨床の重症度や予後を予想するのは困難であると考えられた[8]．

臓器毎のheteroplasmyと臨床症状

次に我々は，臓器毎のheteroplasmyと臨床症状との関連性について検討をおこなった（**表3**）．我々の分析した2例のMERRF患者（表1の症例7及び症例12）の剖検組織における変異型mtDNAの割合は，全ての臓器において93%～99%と極めて高率に認められ，肝臓，腎臓など臨床・病理学的にほとんど無症状の部位においても高率に存在している事が確認された[15]．

一方，MELASの剖検組織における変異型mtDNAの割合は，症例1では82～95%，症例2では89～91%とほぼ均一な分布が認められた．MELASにおいても，臨床症状の見られる臓器と肝臓など無症状の臓器間でheteroplasmyの程度に明らかな差は認められなかった[17]．また，MERRF/MELAS overlap症候群を呈した症例6では，16～88%と臓器毎に変異型mtDNAの割合に大きな変化が認められた．

中枢神経系では変異型mtDNAが高率に認められたが，臨床症状，病理学的な変化の強い小脳では，変異型mtDNAの割合は52%と他の中枢神経系に比べて低く，明らかな小脳症状を呈さなかった症例1（93%）に比べても低率であった．また本例では，糖尿病の合併が見られたにもかかわらず膵臓では変異型mtDNAの割合は46%と他の内臓に比べheteroplasmyの程度が低いことが確認された．

微細組織におけるheteroplasmyと臨床症状

これまで，剖検臓器毎のheteroplasmyと臨床症状との関連性について述べてきた．しかし次の問題点として，例えば中枢神経系などの場合には，臨床症状の強い部位ではグリオーシスやneuronal lossが強いため，臓器毎の分析では，得られた分析結果が必ずしも神経細胞自体のheteroplasmyの状態を反映していない可能性が考えられ，分析結果と臨床症状の乖離の原因の一因と考えられる．このような問題点を解決する為には臓器全体のheteroplasmyを考えるのみではなく，より微細な組織間，さらには神経細胞やアストロサイトなどの個々の細胞毎の違いに伴う細胞間のheteroplasmyの分析が重要であると考えられる．

我々はPCR-SSCP法を用いて，MERRF患者の中枢神経系における微細組織内のheteroplasmyの定量について検討をおこなった．対象として，MERRF剖検例2例の凍結標本を用いた．まず，厚さ10μmの凍結切片を作成し，実体顕微鏡下で1辺が約20μm四方の切片を剥離して分析に用いた．但し，Purkinje細胞については，周囲の組織よりsingle cellを剥離して分析に用いた[22]．剥離したサンプルを，Moraesらがsingle muscle fiberの分析で用いた方法[23]に準じて処理をおこなったのち，10μlの系でPCRをおこなった．

（**表4**）に，分析結果を示す．病理学的変化が中程度に見られたPurkinje細胞，視床，黒質と変化がごく軽微な側頭葉皮質などの間で，変異型mtDNAの占める割合に明らかな差は認められなかった．また脊髄においても，病理学的変化の高度な薄束やクラーク柱と，変化の軽微な前角や側索との間に明らかなheteroplasmyの差は認められなかった[23]．一方，症例7の骨格筋における変異型mtDNAはRRF（ragged-red fibers）では91±6%，non RRFでは，50±35%と筋病理所見と対応が認められた．

MELAS患者の骨格筋におけるsingle fiber法による変異型mtDNAの定量でも，症例1），症例

表3　MERRF及びMELAS患者の剖検臓器における heteroplasmy
（数字は，変異型 mtDNA の割合を示す）

組織	8344変異		3243変異		
	MERRF		MELAS		overlap
	Case 7	Case11	Case 1	Case 2	Case 6
中枢神経系					
前頭葉	98%	96%	92%	90%	81%
側頭葉	98%				
皮質					72%
白質					80%
後頭葉					74%
頭頂葉			91%		75%
小脳	97%	97%	93%		52%
脊髄	95%				82%
後根神経節	95%				
筋肉					
上腕二頭筋	99%				62%
腸腰筋			82%		58%
大腿四頭筋				90%	
前脛骨筋	97%				
腓腹筋		97%			45%
横隔膜	96%				50%
側頭筋					66%
肋間筋					56%
心筋	96%	97%	93%	90%	79%
内臓					
肝臓	94%	94%	95%	91%	
腎臓	95%	97%	95%	89%	77%
副腎	93%				73%
膵臓					46%
脾臓					16%
肺					45%
甲状腺					88%
消化管	未検	未検	未検	未検	
舌					50%
食道					66%
胃					61%
小腸					46%
直腸					50%

（overlap: MERRF/MELAS overlap syndrome）

表 4　MERRF 患者の中枢神経系組織における変異型 mtDNA の定量

組織	変異型 mtDNA（%）	病理学的変化
症例 7		
側頭葉皮質	91± 7（n= 8）	（±）
小脳		
分子層	82± 8（n= 6）	（±）
プルキンエ細胞	72±26（n= 6）	（＋＋）
顆粒球層	82±10（n= 7）	（＋）
視床	88± 7（n= 6）	（＋＋）
黒質	81± 7（n= 9）	（＋＋）
脊髄		
前角	82±11（n=14）	（＋）
側索	63, 92（n= 2）	（＋）
後角	72± 3（n= 4）	（＋＋）
後索（薄束）	65±11（n= 3）	（＋＋＋）
後索（楔状束）	77±11（n= 4）	（＋）
クラーク柱	96, 97（n= 2）	（＋＋）
症例11		
側頭葉皮質	94± 5（n= 5）	（±）
小脳		
プルキンエ細胞	95±12（n= 6）	（＋＋＋）
顆粒球層	96± 2（n= 4）	（＋＋）

（n; 分析箇所を示す）

表 5　single fiber 法による変異型 mtDNA の定量結果

症例		ragged-red fibers	non RRF 筋線維
MERRF	（Case 7）	91± 6%（n= 6）	50±35%（n= 7）
MELAS	（Case 1）	79±21%（n=17）	70±22%（n=17）
	（Case 2）	73±29%（n= 5）	44±36%（n= 6）

（RRF: ragged-red fibers）

2）共に，RRF（ragged-red fibers）の方が，変異型 mtDNA の割合が大きい傾向が見られた．

考　　察

ミトコンドリア脳筋症における heteroplasmy と臨床症状との関連性については，これまで多くの精力的な研究がなされている．末梢血を用いた研究では，heteroplasmy の程度と臨床症状との関連性は低いと考えられているが，生検骨格筋と臨床症状との関連性についてはヘテロプラスミーの程度と発症時期に相関性が見られるという報告[24)-27)]と同時に相関性に否定的な報告[28)29)]も見られる．我々の研究では，骨格筋では，一般に変異型 mtDNA の割合の高い症例ほど臨床症状の重い傾向が認められたが，生検骨格筋での変異型 mtDNA の割合がほぼ同程度にもかかわらず，臨

床症状に差の見られる症例もあり，heteroplasmyの程度以外にも症状の出現に関与している因子が存在している可能性が考えられた．

一方，剖検組織におけるheteroplasmyに関しても幾つかの報告がされている[25)29)-32)]が，病変の強い部位とheteroplasmyの程度については必ずしも明かな相関関係は得られていない[29)31)32)]．我々の研究でも，臨床症状を呈した臓器や病理学的変化の強かった臓器と，臓器毎のheteroplasmyの程度との間には明らかな相関は認められなかった．また，MERRF患者とMELAS患者の間で明らかな変異型mtDNAの局在の違いは認められなかった．

一方，培養細胞レベルの研究では，MERRF患者のmtDNAをρ^0細胞（mtDNAを持たないHeLa細胞）にハイブリッドさせたクローンを用いた研究では，MERRFの場合 約10%程度の正常mtDNAが存在すれば呼吸活性の低下を防げることが報告されている[33)]．MELASにおいても，細胞レベルでは6%程度の正常mtDNAが存在すれば，呼吸活性の低下を防げることが報告され，発病の閾値と考えられている[34)]．

しかし臓器レベルでは，これらの閾値よりも低いheteroplasmyの状態で症状が出現する反面，臨床的に無症状の臓器にも変異型mtDNAが高率に認められ，ミトコンドリア病における臓器毎の症状の出現頻度の違いには，疾患毎のheteroplasmyの違い以外にも，臓器特異性や核の関与，細胞間でのheteroplasmyの問題など種々の原因が関与している可能性が示唆される．

こうした剖検臓器毎のheteroplasmyの分析結果と臨床症状の乖離の一因として，中枢神経系などの場合には，臨床症状の強い部位ではグリオーシスやneuronal lossが強いため，臓器毎の分析では，得られた分析結果が必ずしも神経細胞自体のheteroplasmyの状態を反映していない可能性が考えられる．このような問題点を解決する為には臓器全体のheteroplasmyを分析するだけでなく，より微細な組織，さらには神経細胞やアストロサイトなどの個々の細胞毎の違いに伴う細胞間heteroplasmyの分析が重要であると考えられる．また，糖尿病を伴った症例などの場合には，膵臓のβ細胞レベルでの変化を見る必要があると考えられる．

本法を用いた分析では，厚さ10μmの凍結標本より1個のPurkinje細胞のheteroplasmyの分析が可能であることが確認された．また中枢神経系では，標本部位毎のheteroplasmyの違いは小さい傾向が見られたが，Purkinje細胞の分析では比較的バリエーションに富んだ結果が見られ，個々の神経細胞のレベルでは比較的バリエーションに富んでいる可能性があると考えられた．

一方，個々の筋繊維レベルでは，ragged-red fiber（RRF）では，RRFを呈さない筋繊維に比べ，変異型mtDNAの割合が高いことが確認された．SSV（strongly SDH-reactive blood vessel）などでも，変異型mtDNAの割合が高いことが報告されており，少なくても微小な組織レベルでは，変異型mtDNAの割合と 表現型に関連性が存在することが示唆される[28)35)]．

今後，光顕標本と組み合わせて分析をおこなうことによって，神経細胞の変性・脱落の影響を考慮に入れた分析をおこなうことが必要と考えられる．また，特定の臨床症状しか示さないような症例において，変異型mtDNAがどのようなheteroplasmyを呈しているのかを調べる必要があると考えられる．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました辻省次教授に心から感謝の意を表します．また，御指導・御助言を頂きました福井医科大学第二内科 米田　誠講師（元新潟大学脳研究所神経内科），新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 田中恵子助教授に深謝致します．更に，貴重な患者資料を御提供頂きました新潟大学脳研究所　生田房弘名誉教授，同脳研究所病態神経科学部門病理学分野 高橋均教授，国立精神・神経センター・武蔵病院　埜中征哉院長，同・神経研究所疾病研究第二部　後藤雄一部長，国立療養所犀潟病院　福原信義副院長，元佐渡総合病院副院長　本間義章先生，新潟市民病院神経内科部長　大西洋司先生に深謝致します．

参考文献

1) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R and Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457-465 1981

2) Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, Elsas LJ II and Nikoskelainen EK: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 242: 1427-1430 1988

3) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW and Wallace DC: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA $tRNA^{Lys}$ mutation. Cell 61: 931-937 1990

4) Yoneda M, Tanno Y, Horai S, Ozawa T, Miyatake T and Tsuji S: A common mitochondrial DNA mutation in the t-RNA^{Lys} of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. Biochem Int 21: 789-796 1990

5) Yoneda M, Tanno Y, Nonaka I, Miyatake T and Tsuji S: Simple detection of $tRNA^{Lys}$ mutation in myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) by polymerase chain reaction with a mismatched primer. Neurology 41: 1838-1840 1991

6) Goto Y, Nonaka I and Horai S: A mutation in the $tRNA^{Leu(UUR)}$ gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature 348: 651-653 1990

7) van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PAA, van de Kamp JJP and Maassen JA: Mutation in mitochondrial $tRNA^{Leu(UUR)}$ gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. Nature Genet 1: 368-371 1992

8) Mariotti C, Savarese N, Suomalainen A, Rimoldi M, Comi G, Prelle A, Antozzi C, Servidei S, Jarre L, DiDonato S and Zeviani M: Genotype to phenotype correlations in mitochondrial encephalomyopathies associated with A3243G mutation of mitochondrial DNA. J Neurol 242: 304-312 1995

9) Folgero T, Torbergsen T and Oian P: The 3243 MELAS mutation in a pedigree with MERRF. Eur Neurol 35: 168-171 1995

10) Fabrizi GM, Cardaioli E, Grieco GS, Cavallaro T, Malandrini A, Manneschi L, Dotti MT, Federico A and Guazzi G: The A to G transition at nt 3243 of the mitochondrial $tRNA^{Leu(UUR)}$ may cause an MERRF syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry 61: 47-51 1996

11) Chen R-S, Huang C-C, Lee C-C, Wai Y-Y, Hsi M-S, Pang C-Y and Wei Y-H: Overlapping syndrome of MERRF and MELAS: molecular and neuroradiological studies. Acta Neurol Scand 87: 494-498 1993

12) Campos Y, Martin MA, Lorenzo G, Aparicio M, Cabello A and Arenas J: Sporadic MERRF/MELAS overlap syndrome associated with the 3243 $tRNA^{Leu(UUR)}$ mutation of mitochondrial DNA. Muscle Nerve 19: 187-190 1996

13) Onishi Y, Yamazaki M, Shibuya H, Tanno Y and Tsuji S: MERRF/MELAS overlap syndrome associated with 3243 $tRNA^{Leu(UUR)}$ mutation of mitochondrial DNA. Neuropathology 18: 321-327 1998

14) Tanno Y, Yoneda M, Nonaka I, Tanaka K, Miyatake T and Tsuji S: Quantitation of mitochondrial DNA carrying $tRNA^{Lys}$ mutation in MERRF patients. Biochem Biophys Res Commun 179: 880-885 1991

15) Tanno Y, Yoneda M, Tanaka K, Kondo R, Hozumi I, Wakabayashi K, Yamada M, Fukuhara N, Ikuta F and Tsuji S: Uniform tissue distribution of $tRNA^{Lys}$ mutation in mitochondrial DNA in MERRF patients. Neurology 43: 1198-1200 1993

16) Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K and

Tsubaki T: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. J Neurol Sci 47:117-133 1980

17) Tanno Y, Yoneda M, Tanaka K, Tanaka H, Yamazaki M, Nishizawa M, Wakabayashi K, Ohama E and Tsuji S: Quantitation of heteroplasmy of mitochondrial tRNA$^{Leu\,(UUR)}$ gene using PCR-SSCP.Muscle Nerve 18: 1390-1397 1995

18) Yoneda M, Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Tanaka K, Nishizawa M, Atsumi T, Ohama E, Horai S, Ikuta F, Miyatake T and Ozawa T: Pleiotropic molecular defects in energy-transducing complexes in mitochondrial encephalomyopathy (MELAS). J Neurol Sci 92: 143-158 1989

19) Yoneda M, Tanno Y, Tsuji S and Attardi G: Detection and quantitation of point mutations in mitochondrial DNA by PCR. Methods Enzymol 264: 432-441 1996

20) Horai S: Molecular phylogeny and evolution of human mitochondrial DNA: new aspects of the genetics of molecular evolution. In: Kimura M, Takehata N, eds. Berlin: Springer -Verlag/ Tokyo: Japan Sci Soc Press 135-152 1990

21) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 86: 2766-2770 1989

22) 丹野芳範，田中恵子，辻　省次：ミトコンドリアミオパチーにおけるヘテロプラスミー（heteroplasmy）と臨床症状，筋病理所見の関連性．日本臨床 12: 3270-3276 1997

23) Moraes CT, Ricci E, Bonilla E, DiMauro S and Schon EA: The mitochondrial tRNA$^{Leu\,(UUR)}$ mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. Am J Hum Genet 50: 934-949 1992

24) Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, Moraes CT, Silvestri G, Hirano M, Simonetti S, Angelini C, Donati MA, Garcia C, Martinuzzi A, Mosewich R, Servidei S, Zammarchi E, Bonilla E, DeVivo DC, Rowland LP, Schon EA and DiMauro S: MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics. Ann Neurol 31: 391-398 1992

25) Macmillan C, Lach B and Shoubridge EA: Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNALeu [3243]) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: The role of mitotic segregation. Neurology 43: 1586-1590 1993

26) Mariotti C, Savarese N, Suomalainen A, Rimoldi M, Comi G, Prelle A, Antozzi C, Servidei S, Jarre L, DiDonato S and Zeviani M: Genotype to phenotype correlatios in mitochondrial encephalopathies associated with the A3243G mutation of mitochondrial DNA. J Neurol 242: 304-312 1995

27) Ozawa M, Goto Y, Sakuta R, Tanno Y, Tsuji S and Nonaka I: The 8,344 mutation in mitochondrial DNA: A comparison between the proportion of mutant DNA and clinico-pathologic findings. Neuromuscular Disorders 5: 483-488 1995

28) Goto Y, Horai S, Matsuoka T, Koga Y, Nihei K, Kobayashi M and Nonaka I: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): A correlative study of the clinical features and mitochondrial DNA mutation. Neurology 42: 545-550 1992

29) Ciafaloni E, Ricci E, Servidei S, Shanske S, Silvestri G, Manfredi G, Schon EA and DiMauro S: Widespread tissue distribution of a tRNA$^{Leu\,(UUR)}$ mutation in the mitochondrial DNA of a patient with MELAS syndrome. Neurology 41:1663-1665 1991

30) Obermaier-Kusser B, Paetzke-Brunner I, Enter C, Mller-Hcker J, Zierz S, Ruitenbeek W and Gerbitz KD:Respiratory chain activity

in tissues from patients (MELAS) with a point mutation of the mitochondrial genome [$tRNA^{Leu(UUR)}$]. FEBS Lett 286: 67-70 1991

31) Kobayashi Y, Ichihashi K, Ohta S, Nihei K, Kagawa Y, Yanagisawa M and Momoi MY: The mutant mitochondrial genes in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) were selectively amplified through generations. J Inher Metab Dis 15: 803-808 1992

32) Shiraiwa N, Ishii A, Iwamoto H, Mizusawa H, Kagawa Y and Ohta S: Content of mutant mitochondrial DNA and organ dysfunction in a patient with MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. J Neurol Sci 1993; 120: 174-179 1993

33) Yoneda M, Miyatake T, Attardi G: Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. Mol Cell Biol 14: 2699-2712 1994

34) Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C and Attardi G: In vitro transfer of protein synthesis and espiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy patient mitochondria. Mol Cell Biol 11: 2236-2244 1991

35) Tokunaga M, Mita S, Murakami T, Kumamoto T, Uchino M, Nonaka I and Ando M: Single muscle fiber analysis of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and Stroke-like episodes (MELAS). Ann Neurol 35: 413-419 1994

（平成14年3月4日受付）