

ミトコンドリア遺伝子の欠失を伴う進行性外眼筋麻痺症候群の1例

宗像 紳¹⁾, 山崎 広子¹⁾, 佐藤 猛²⁾

¹⁾国立精神・神経センター国府台病院眼科, ²⁾国立精神・神経センター国府台病院神経内科

要 約

進行性外眼筋麻痺症候群は、ミトコンドリア DNA の欠失が原因といわれている症候群である。進行性外眼筋麻痺症候群の29歳女性例について、網膜電図、視覚誘発脳波を含めた眼科的諸検査およびミトコンドリア DNA の解析を行った。本症例は19歳頃から徐々に両眼の眼瞼下垂が進行し、1990年4月当院眼科を受診した。初診時所見では検眼鏡的に眼底に著変を認めなかったが、蛍光眼底造影検査で window defect と思われる過螢光を、網膜電図で b 波減弱の subnormal pattern を、暗順応検査で桿体最終閾値の上昇をそれぞれ認めた。筋生検で

ragged-red fiber を認め、組織化学的、生化学的に cytochrome c oxidase 活性の低下を認めた。ミトコンドリア DNA の polymerase chain reaction 法による解析で、4,977 塩基対の欠失と、欠失部位断端に13塩基対の繰り返し配列とを認めた。(日眼会誌 98:1036-1042, 1994)

キーワード：進行性外眼筋麻痺症候群、ミトコンドリア DNA 欠失、網膜電図、蛍光眼底造影

Progressive External Ophthalmoplegia with Extensive Mitochondrial DNA Deletion

Shin Munakata¹⁾, Hiroko Yamazaki¹⁾ and Takesi Sato²⁾

¹⁾Departments of Ophthalmology and ²⁾Neurology, National Center of Neurology and Psychiatry Kohnodai Hospital

Abstract

We report extensive deletion of muscle mitochondrial DNA and ophthalmological findings in a patient with progressive external ophthalmoplegia. The patient was a twenty-nine-year-old female who had suffered from slowly progressive external ophthalmoplegia for ten years. No abnormal finding was observed in the funduscopy examination, but fluorescein angiography showed mottled hyperfluorescence. The final rod threshold for the dark adaptation testing was slightly elevated. The flash electroretinogram showed a slightly attenuated b wave. Ragged-red fibers were observed in muscle

biopsies. A biochemical and histochemical study showed that cytochrome c oxidase activity was reduced. The length of deletion of the mitochondrial DNA, determined by polymerase chain reaction, was 4977 base pairs, flanked by a 13-base pair direct repeat. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:1036-1042, 1994)

Key words: Progressive external ophthalmoplegia, Deletion of mitochondrial DNA, Electroretinogram, Fluorescein angiography

I 緒 言

ミトコンドリアミオパチーに伴う進行性外眼筋麻痺症候群 (chronic progressive external ophthalmoplegia, PEO) には、① Kearns-Sayre 症候群、② 外眼筋麻痺に全身ミオパチーを伴うもの、③ 眼筋ミオパチーのみのものなどが存在する¹⁾。いずれの病型においても、骨格筋あ

るいは白血球のミトコンドリア DNA (mt DNA) において、数千塩基対にわたる大きな欠失を有する変異 mt DNA と正常 mt DNA とが混在すること²⁾⁻⁵⁾ (heteroplasm) が、近年大きな話題となっている。Kearns-Sayre 症候群は、外眼筋麻痺、網膜色素変性、心ブロックを3主徴とし、さらに、難聴や小脳失調などの多彩な中枢神経症状を伴う。しかし、3主徴を欠く不全型も多く

別刷請求先：272 千葉県市川市国府台1-7-1 国立精神・神経センター国府台病院眼科 宗像 紳
(平成5年8月12日受付、平成6年6月14日改訂受理)

Reprint requests to: Shin Munakata M.D. Department of Ophthalmology, National Center of Neurology and Psychiatry, Kohnodai Hospital. 1-7-1 Kohnodai, Ichikawa-shi, Chiba-ken 272, Japan

(Received August 12, 1993 and accepted in revised form June 14, 1994)

存在する。一方、外眼筋麻痺のみの眼筋ミオパチーにおいても、四肢筋の筋生検で組織化学的、電子顕微鏡的検索で異常ミトコンドリアが見出されることが多い¹⁰⁾。しかし、眼筋ミオパチーに網膜色素変性を合併したという報告は少ない。眼筋ミオパチーの1例において、検眼鏡的に異常が認められなかったにもかかわらず、網膜電図 (electroretinogram, ERG), 暗順応, 視覚誘発脳波 (visual evoked cortical potential, VECP), 蛍光眼底造影などに異常を認めた。さらに、生検筋の mt DNA 解析により、mt DNA に広汎な欠失を認めたので報告する。

II 症 例

患者：29歳，女性。

主 訴：両眼眼瞼下垂。

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：叔母に眼瞼下垂を認める。

現病歴：1982年6月頃から右眼の眼瞼下垂が徐々に進行し、その後、左眼も眼瞼下垂が出現した。眼球運動障害や複視には気づいておらず、筋力低下も自覚していない。眼瞼下垂が著明になったため、1990年4月当科を受診した。

現 症：眼科的所見；矯正視力は左右とも1.2。眼圧は左右とも17 mmHg, 前眼部, 中間透光体, 眼底ともに異常を認めなかった。両眼に眼瞼下垂を認め、眼瞼挙筋機能は右眼で2 mm, 左眼で3 mmであった。眼球運動は右眼で全方向に強く制限されており、左眼も中等度に障害されていた。対光反応は両眼とも正常であった。Doll's eye 現象は陰性であった。神経学的所見；III, IVおよびVI

番以外の脳神経に異常はなく、筋萎縮、筋力低下、感覚障害、小脳失調、難聴などは認めなかった。テンシロンテストは陰性であった。その後、左眼の眼球運動障害はさらに強くなり、1年後には両眼ともに全方向性の高度の麻痺を来した。

検査成績：眼科的検査；Goldmann 動量的視野は正常であった。Flash ERG では、b波の減弱した subnormal pattern で示した。Pattern VECP では明らかな異常は認めなかった(図1)。暗順応検査で、第二曲線最終閾値は 10^3 (正常範囲 $10^{1.62} \pm 0.2$, $n=5$)と上昇していた。蛍光眼底造影では、後極部を中心とした広い範囲に window defect によるものと思われる過蛍光を認めた(図2)。

脳波は正常であり、心電図においても伝導障害を認めなかった。筋電図では、一部の筋において筋原性変化を認めた。頭部CT検査では、脳萎縮などの異常所見はみられなかった。血算に異常はなく、血液生化学はCKは43 IU(正常値100以下、以下括弧内は正常値)、乳酸6.4 mg/dl (3.3~14.9)は正常であり、ピルビン酸は1.77 mg/dl (0.3~0.94)と軽度上昇していた。尿中ホルモン値は、17KS 1.8 mg/day (2.4~11.0), 17OHCS 1.6 mg/dl (2.2~7.3)とどちらも低値を示した。脳脊髄液検査では、外観、細胞数とも異常はなく、総蛋白量31 mg/dl (40以下)、乳酸13.0 mg/dl (3.3~14.9)、ピルビン酸0.83 mg/dl (0.3~0.94)といずれも正常値であった。

しかし、エルゴメーター15ワット、15分による運動負荷試験を行った結果、血中乳酸および血中ピルビン酸は対照群に比べ、著明な上昇を示した。

これらの所見、検査結果により、ミトコンドリア異常

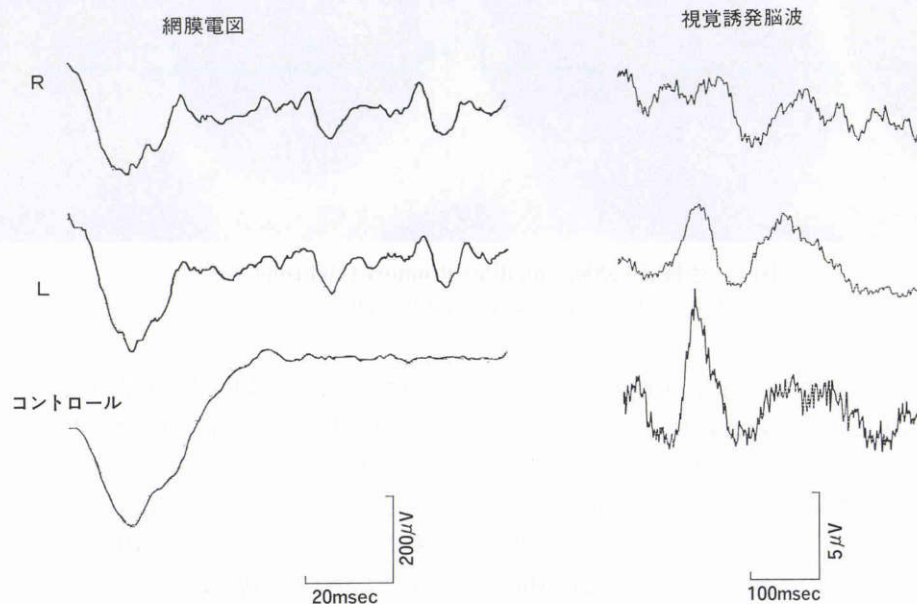


図1 網膜電図検査所見。

20 J キセノン光刺激の single flash 網膜電図 (ERG) では両眼ともに b 波減弱の subnormal pattern を示した。パターン視覚誘発脳波 (VECP) では異常は認められない。

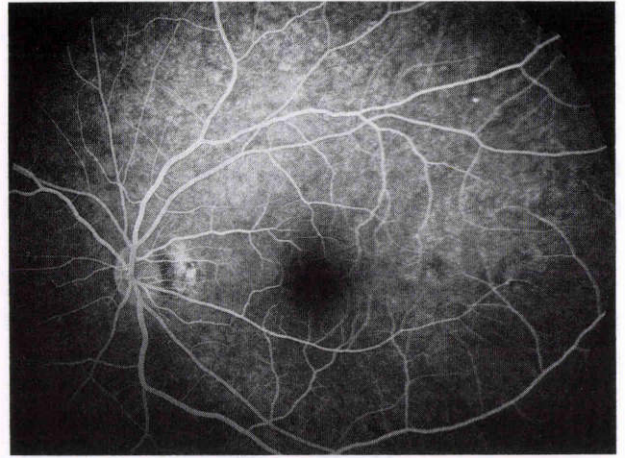
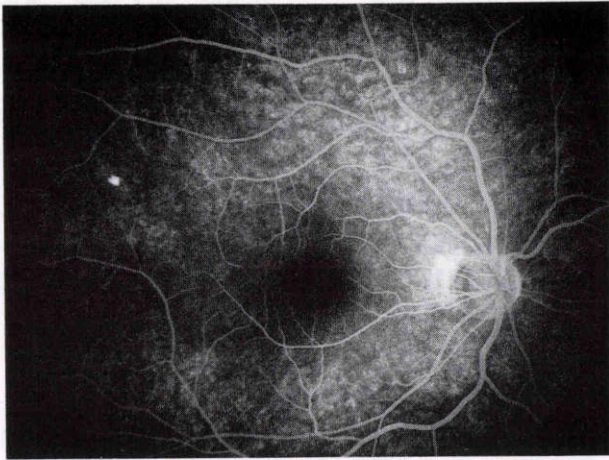


図2 蛍光眼底造影検査所見.

蛍光眼底造影では両眼の後極部に window defect によるものと思われる顆粒状の過蛍光を認める. 右眼 433 秒, 左眼 117 秒

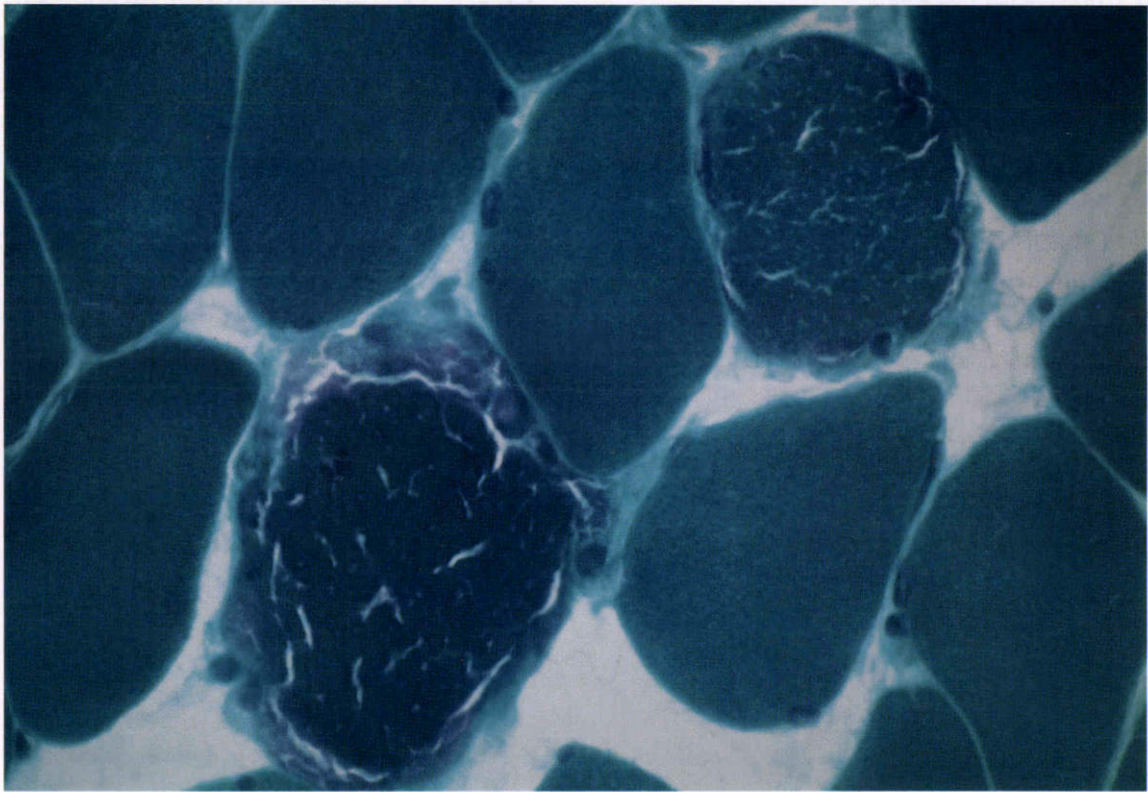


図3 生検筋の所見 (modified Gomori trichrome 染色).
非定型的ではあるが, ragged red fiber を認める.

による進行性外眼筋麻痺が強く疑われ, 大腿直筋の筋生検が施行された. 検体は液体窒素で凍結し, クライオスタットによって凍結切片を作成した. Modified Gomori trichrome 染色では, 赤紫に濃染する粗大な顆粒を有する線維が散見された. しかし, この線維は筋鞘下に赤紫色に染まるミトコンドリアの集積例を示している典型的な ragged red fiber とは異なっていた (図3). Cytochrome c oxidase 染色では, 筋線維のおよそ 8% に陰性線維を認めた (図4). Periodic acid Schiff staining

(PAS) 染色では陽性物質は認めなかった. 電子顕微鏡による検索でも, 結晶状封入体を有する異常ミトコンドリアは見出せなかった.

ミトコンドリア電子伝達系酵素活性の測定は, 液体窒素に保存した生検筋から Bookelman ら⁷⁾の方法でミトコンドリアを分画し, ミトコンドリア電子伝達系酵素のうち, cytochrome c oxidase, succinate cytochrome c reductase, NADH cytochrome c reductase および complex II を測定した. さらに, citrate synthase を測

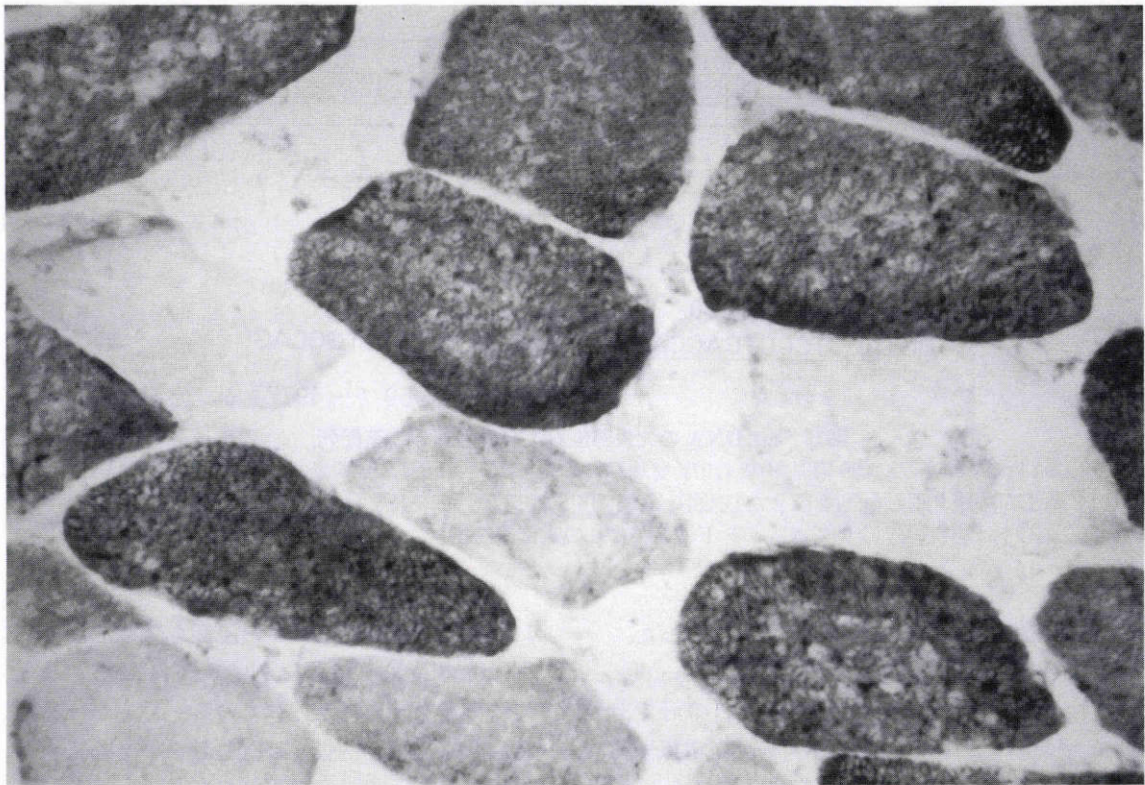


図4 生検筋の所見 (cytochrome c oxidase 染色).
陰性線維を認める.

表1 筋肉内のミトコンドリア酵素活性

ミトコンドリア酵素	活性値	正常値 (n=20)
Cytochrome c oxidase*	0.143 ↓	0.203±0.051
Succinate cytochrome c reductase**	66	81.8±32.5
NADH cytochrome c reductase**	84 ↓	147.4±27.5
Complex II*	25	33.0±11.3
Citrate synthase*	90	131.3±40.5

* : sec⁻¹・mg⁻¹・ml⁻¹

** : n moles/min/mg protein

定した。本酵素はミトコンドリア基質に存在し、アセチル CoA とオキサロ酢酸を結合させ、クエン酸と CoA を生成する反応を触媒する。組織から分画する際のミトコンドリアの保存状態を示す指標として測定した。その結果、NADH cytochrome c reductase と cytochrome c oxidase の活性低下が認められた (表1)。

液体窒素中に凍結保存して置いた生検筋 (約 50 mg) を粉碎後、1% SDS/proteinase K (20 mg/ml) によって 37°C, 4 時間 incubate した後、0.1 M NaCl, フェノール・クロロホルム抽出により除蛋白後、エタノールによって DNA を沈殿させた。得られた DNA 1 mg を Takara Gene Amplifire Kit (宝酒造社製) を用いた polymerase chain reaction (PCR) 法⁸⁾⁹⁾に供した。オリゴヌクレオチドは自動 DNA 合成装置 (ABI, モデル 381 A) で合成した。PCR には次のオリゴヌクレオチドを用いた。Forward primer として 5'-TGGTTTCAAGCCAACC-

C1 P C2 Marker

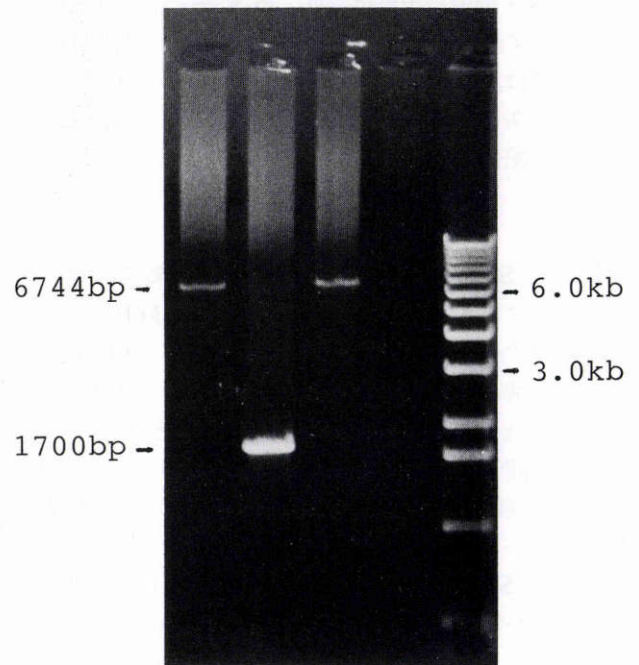


図5 ミトコンドリア DNA.

P は本症例, C は正常対照例を示す. およそ 5,000 塩基対の欠失を認める.

CCAT-3' (塩基番号 7477~7496) および reverse primer として 5'-TTAGTAGTAGTTACTGGTTG-3' (塩基番号 14201~14220) を用いた.

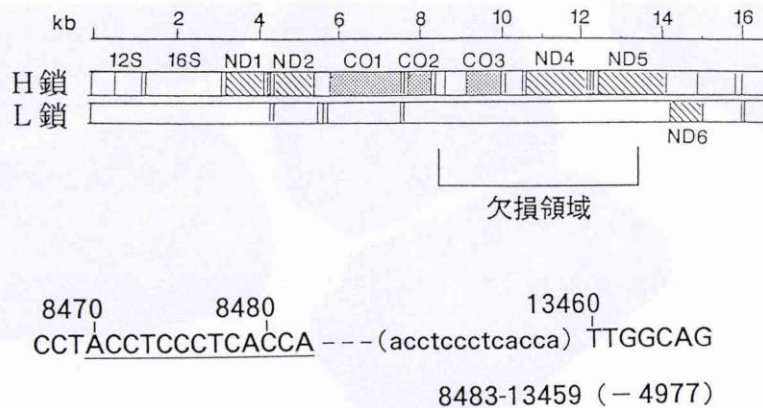


図6 mt DNA の欠失部位および繰り返し塩基配列。

第8,483塩基対から13,459塩基対の4,977塩基対の欠失を認め(上図), 欠失断端には13塩基対ACCTCCCTCACCAの繰り返し配列を認めた(下図). 12S, 16SはリボゾームRNA, ND1は複合体Iのサブユニット1, CO1は複合体IVのサブユニット1のそれぞれの遺伝子を指す。

さらに, PCRは30サイクルを次の条件で行った. Heat-denaturation 94°C, 30秒, プライマーアニーリング 45°C, 30秒, polymerase-extension 72°C, 3分である. 合成した増幅物を, 1%アガロースゲルで電気泳動し, ゲルから得られたバンドを抽出した. これをtemplateとし, これから直接塩基配列を決定した. 塩基配列の決定には, 自動塩基配列解析装置(ABI社製)とTag Dye Deoxy Terminator kit(宝酒造社製)を用いた.

mt DNAの遺伝子解析では, PCR法で約5,000bpの欠失を示す変異mt DNAが認められた(図5). 塩基配列の解析では, 第8,483bpから13,459bpの欠失が確かめられ, 欠失断端には13塩基対ACCTCCCTCACCAの繰り返し配列が認められた(図6).

III 考 按

Kearns-Sayre症候群は, 外眼筋麻痺, 網膜色素変性, 心ブロックを3主徴とする¹⁰⁾¹¹⁾が, 外眼筋麻痺のみの眼筋ミオパチーでも骨格筋のミトコンドリアの形態的, 生化学的異常が認められ, さらに, mt DNAの欠失も存在する¹⁴⁾ことから, Kearns-Sayre症候群と眼筋ミオパチーとは同一の病因に基づく疾患と考えられ, 進行性外眼筋麻痺症候群という一つの疾患単位としてみなされている¹²⁾.

Kearns-Sayre症候群の3主徴の一つとして網膜色素変性がいわれているが, 不全型では網膜色素変性を欠くものが多いとされ, 木下ら¹³⁾によれば, およそ50%にみられるにすぎないという. 小林ら¹⁴⁾は, 進行性外眼筋麻痺に小口病を合併した稀な症例を報告している.

Kearns-Sayre症候群における網膜の障害につき, Eagleら¹⁵⁾はその剖検例において, 障害部位は網膜色素上皮であり, 視細胞の障害は二次的なものであると報告している. McKechnieら¹⁶⁾は, outer retina, つまり網膜色素上皮と視細胞とが障害されており, outer retina

に多数のマクロファージの浸潤を認めたと述べている.

Steindlerら¹⁷⁾は, 17例中6例でERGの異常, 特にb波の減弱を認めたと述べている. さらに, ERGで異常を認めたものは全例蛍光眼底造影で異常を認めている. また逆に, ERGや眼底の正常なものでも蛍光眼底造影で異常の認められたものがあったと報告している. Berdjisら¹⁸⁾も, 8例中3例にsingle flash ERGの異常を認めたとしているが, 網膜色素変性との関連ははっきりしないと報告している. さらに, pattern VECFは8例中2例(いずれも片眼)でP100頂点潜時の延長を認めたと述べている. 星野ら¹⁹⁾の報告でも, flash ERGが消失型でpattern VECFのP100頂点潜時延長を認めた症例がある.

本例でもpattern VECFは正常であったが, ERGはb波減弱のsubnormal patternを示し, 蛍光眼底造影検査でwindow defectを認めており, 報告に一致している. また, 暗順応では桿体閾値の上昇がみられた. これらの結果は進行性外眼筋麻痺症候群においても, 潜在する桿体系の機能障害が存在することを示唆するものと思われる.

さらに, 本例の生検筋では非定型的なragged-red fiberと少数のcytochrome c oxidase陰性線維が認められているが, 電子顕微鏡では結晶状封入体を含む異常ミトコンドリアは見出されなかった. しかしながら, ミトコンドリアの電子伝達系の酵素活性の測定では, NADH cytochrome c reductaseおよびcytochrome c oxidaseの活性値は低下していた. 電子伝達系酵素はミトコンドリア内膜に存在し, 4種の複合体から成る. 複合体I(NADH CoQ oxyreductase)は25種のサブユニットから成り立ち, このうち7種のサブユニットはmt DNAの産物である. 複合体IV(cytochrome c oxidase)は13種のサブユニットから成り立ち, そのうち3種のサブユニットがmt DNA産物である. 本例で認

められた変異 mt DNA の欠失部には、複合体 I のサブユニット 4, 5, 複合体 IV のサブユニット 3 をコードする DNA が含まれていることから、上述の電子伝達系酵素活性の低下は、この欠失 mt DNA に起因すると考えられる。

進行性外眼筋麻痺症候群では、正常 mt DNA と欠失 mt DNA とが混在しているが、欠失 mt DNA の占める割合が 60% を超えると、細胞の酵素活性が低下することが知られている²⁰⁾。本例でも生検筋で酵素活性の低下が認められたことは、欠失 mt DNA の割合が高いことが推測される。Kearns-Sayre 症候群では、内分泌障害を合併することがあり²⁾、本例でも認められたことは、骨格筋や網膜だけでなく、さらに広汎なミトコンドリアサイトパチーがあることが推測される。Yamamoto ら²²⁾は、ミトコンドリア異常のある患者のうち、およそ 1/3 に欠失を認めたと述べており、異常ミトコンドリアの割合が 50% を超える症例では発症年齢が早く、ragged-red fiber を優位に多く認めたと報告している。ミトコンドリアの DNA の欠失については、Kearns-Sayre 症候群を含めた進行性外眼筋麻痺症候群のようなミトコンドリア異常のみられる疾患では、1/2~1/3 の症例でミトコンドリア DNA の欠失のみられることが知られている²²⁾²⁴⁾²⁵⁾。

本例の欠失 mt DNA の塩基配列を決定したが、欠失端をはさみ 13 塩基対の繰り返し配列が認められた。この繰り返し配列は、進行性外眼筋麻痺症候群の 1/3 以上の症例に認められている^{23)~25)}。Holt ら²⁴⁾あるいは Shörn ら²⁵⁾は、このような繰り返し配列のため、mt DNA の増幅の時に配列部の読み間違い (misreading) が生じると説明している。しかし、欠失端には必ずしも繰り返し配列の存在しない症例もみられるので、小欠失をもった mt DNA が母系遺伝により子供に伝わり、欠失が生じると考えられる。また、加齢によるミトコンドリアの変化の報告もあり²⁶⁾、欠失の原因の一つとして考えられる。

このような症例の存在により、検眼鏡的に異常のみられない眼筋ミオパチーと Kearns-Sayre 症候群とが同一病因から成る疾患群、つまり進行性外眼筋麻痺症候群であることが支持される。

文 献

- 1) Rowland LP: Progressive external ophthalmoplegia. Handbook of Clinical Neurology: In: Vinken PJ, et al (Eds): Vol 22. North Holland Amsterdam: 177-202, 1975.
- 2) Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331: 717-719, 1988.
- 3) Holt IJ, Harding AE, Petty KH, Morgan-Hughes JA: A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. Am J Hum Genet 46: 428-433, 1990.
- 4) Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, Schapira AHV, Toscano A, Clark JB, et al: Mitochondrial myopathies: Clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. Annal Neurol 26: 699-708, 1989.
- 5) Moraes CT, Schon EA, DiMauro S, Miranda AF: Heteroplasmy of mitochondrial genomes in clonal cultures from patients with Kearns-Sayre syndrome. Biochem Biophys Res Commun 160: 765-771, 1989.
- 6) DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC: Mitochondrial myopathies. Annal Neurol 17: 521-538, 1985.
- 7) Bookelman H, Trijbels JMF, Sengers RCA, Janssen AJM: Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. Biochem Med 19: 366, 1978.
- 8) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning (2nd edition). Cold Spring Horber Laboratory Press: 1989.
- 9) 関谷剛男: PCR 法による DNA 解析. 蛋白質 核酸 酵素 35: 2977-2991, 1990.
- 10) Kearns TP, Sayre GP: Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block. Arch Ophthalmol 60: 280-289, 1958.
- 11) Kearns TP: External ophthalmoplegia, pigmentary degeneration of the retina, and cardiomyopathy: A newly recognized syndrome. Tr Am Ophthalmol Soc 63: 559-635, 1965.
- 12) 檜澤一夫, 桒中征哉, 小沢鎌二郎: 筋病理学. 文光堂, 第1版: 245-269, 1989.
- 13) 木下真男, 平井敏雄: Kearns-Shy 症候群. 神経内科 8: 313-319, 1978.
- 14) 小林直樹, 清沢源弘, 萩野谷和裕, 野呂 充, 塩野貴, 土井 信: 小口病を合併した慢性進行性外眼筋麻痺の1例. 日眼会誌 96: 1167-1174, 1992.
- 15) Eagle RC Jr, Hedges TR, Yanoff M: The atypical pigmentary retinopathy of Kearns-Sayre syndrome. A light and electron microscopic study. Ophthalmology 89: 1433-1440, 1982.
- 16) McKechnie NM, King M, Lee WR: Retinal pathology in the Kearns-Sayre syndrome. Br J Ophthalmol 69: 63-75, 1985.
- 17) Steindler P, Tormene AP, Micaglio GF, Galan A: Correlation of ERG and pigment epithelium changes in external progressive ophthalmoplegia (EPO). Doc Ophthalmol 60: 421-426, 1985.
- 18) Berdjis H, Heider W, Demisch K: ERG and VECP in chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO). Doc Ophthalmol 60: 427-434, 1985.
- 19) 星野育男, 山本嘉彦, 武田憲夫: Kearns-Shy 症候群における電気生理学的検討. 臨眼 45: 593-596, 1991.
- 20) Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I: Introduction of disease-

- related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10614—10618, 1991.
- 21) 佐藤武夫, 田淵保則, 高橋和郎: 原発性性腺機能低下症. 慢性甲状腺を伴う Kearns-Shy 症候群の 1 症例. *神経内科* 15: 350—357, 1981.
- 22) Yamamoto M, Clemens PR, Engel AG: Mitochondrial DNA deletions in mitochondrial cytopathies. *Neurology* 41: 1822—1828, 1991.
- 23) Mita S, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Fabrizi GM, et al: Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large deletions of human mitochondrial DNA. *Nucl Acid Res* 18: 561—567, 1990.
- 24) Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in mitochondrial myopathies: Sequence analysis and possible mechanisms. *Nucl Acid Res* 17: 4465—4469, 1989.
- 25) Schön EA, Rizzuto R, Moraes C, Nakase H, Zeviani M, DiMauro S: A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 244: 346—349, 1989.
- 26) 田中雅嗣: 加齢とミトコンドリア DNA 異常. *神経進歩* 36: 976—985, 1992.
-