

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790468
 研究課題名（和文）薬毒物に起因する横紋筋融解症の新規マーカー遺伝子の同定及び遺伝子診断法の確立
 研究課題名（英文）Identification of genetic markers for rhabdomyolysis induced by drug and the establishment of gene diagnosis

研究代表者
 松末 綾 (MATSUSUE AYA)
 福岡大学・医学部・助教
 研究者番号：70309920

研究成果の概要（和文）：薬毒物摂取後に横紋筋融解症を発症するか否かは、個人の遺伝的背景の違いに由来している可能性がある。本研究では、覚せい剤等の薬毒物を摂取後に横紋筋融解症を発症したと考えられる剖検例について、原因遺伝子の変異を探索した。しかし、今回の研究で認められた遺伝子変異と横紋筋融解症の発症との関連はないものと考えられた。今後、より多くの横紋筋融解症例を集め、他の遺伝子についても調査を進めることにより、横紋筋融解症と遺伝的要因の解明が進むと考えられる。

研究成果の概要（英文）：There is a possibility that rhabdomyolysis related to drug can be caused by genetic background. We analyzed potential rhabdomyolysis-susceptibility genes in autopsy cases of drug poisoning such as methamphetamine. But there was no obvious relationship between the genetic mutations observed in this study and rhabdomyolysis. A lot more autopsy cases of rhabdomyolysis were required and investigation of other rhabdomyolysis-susceptibility genes helps to clear association between rhabdomyolysis and genetic background.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医学

1. 研究開始当初の背景

法医（解剖）鑑定実務において、薬毒物中毒(死)の診断は、困難を伴うものである。摂取した薬毒物の特定、その血中濃度は死因判定の大きな指標となる。しかし、当該薬物の血中濃度が致死量に達していない剖検例に遭遇することは稀ではなく、このような場合

には、中毒死の判断に苦慮することになり、生前の全身状態等を考慮して慎重に死因の判断を下す必要がある。

薬毒物を摂取した剖検例の中に、横紋筋融解症に陥って死亡している症例が含まれている。横紋筋融解症は、多種多様な薬剤によって引き起こされることが報告されているものの、発症のメカニズムは明らかになって

いない。一方、当該薬物摂取後に横紋筋融解症を発症するか否かは、個人の遺伝的背景の違いが関与している可能性がある。申請者は、横紋筋融解症の発症に関与する遺伝子の検索方法を検討し、薬毒物中毒（死）の診断への応用を目指した。

2. 研究の目的

1) 横紋筋融解症のマーカー遺伝子の検索・同定

法医解剖症例の中から、薬毒物中毒関連症例のうち、横紋筋融解症を発症した症例について、骨格筋のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルからの GeneChip 解析を行う。免疫組織化学的に横紋筋融解症を発症していないと推測される同一個人の筋線維と比較し、有意に発現量の変化があった遺伝子を探索する。これらの遺伝子を候補遺伝子とし、遺伝子の機能と横紋筋融解症との関連を考察する。さらに、この候補遺伝子のコードするタンパクが、横紋筋融解症のマーカーとして診断に応用できるかを検討する。

2) 患者側の遺伝的要因

法医解剖症例の中から、薬毒物中毒関連症例のうち、横紋筋融解症の発症が患者側の遺伝的背景に関与する可能性を検討するために、関連する以下の遺伝子について変異の有無を調べる。

- a. 薬物動態関連遺伝子：当該薬物の代謝酵素：CYP2D6
- b. 先天性横紋筋融解症の原因遺伝子：Carnitine Palmitoyltransferase II (CPTII), very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)
- c. 悪性高熱症の原因遺伝子：Ryanodine receptor 1 (RYR1) (横紋筋融解症と症状が類似している)

3. 研究の方法

1) GeneChip 解析の検討

法医解剖症例の中から、ベゲタミン中毒の1剖検例、覚せい剤が検出された18剖検例について、骨格筋のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルから RNA を抽出し、GeneChip 解析が可能か否かを検討した。

2) 横紋筋融解症の検索

上記の薬毒物中毒関連剖検例について、腎臓を試料として、HE 染色、抗ミオグロビン(Mb)抗体、抗 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) 抗体による免疫組織化学的染色を行った。

3) 遺伝子変異の探索

上記の薬毒物中毒関連剖検例及び健常人 10 例から DNA を抽出し、RYR1 遺伝子の hot spot 領域、CPTII 遺伝子、VLCAD 遺伝子、CYP2D6 遺伝子について、ダイレクトシーケンシング法で変異を探索した。

4. 研究成果

今回の研究の対象である、ベゲタミン中毒の1剖検例の血中薬毒物濃度の結果を Table 1、覚せい剤が検出された 18 剖検例の死因、覚せい剤濃度の一覧を Table 2 に示す。

Table 1 The results of the toxicological analysis of blood in an autopsy case of rhabdomyolysis related to vegetamin

(µg/ml)	Blood level	Therapeutic level	Toxic level	Lethal level
Pheno-barbital	38.2	10-40	40-60	>80
Promethazine	2.22	0.1-0.4	1-2	2.4-12
Chlorpromazine	0.96	0.05-0.5	0.5-2	3-35

Table 2 The descriptions of examined cases of methamphetamine poisoning

Case No.	Gender	Cause of death	Concentration of MA (µmol/100ml)	
			Blood	Urine
1	M	Intoxication	53.63	693.2
2	M	Intoxication	NT	11.12
3	M	Drowning	NT	NT
4	F	Hypoglycemia	0.088	8.61
5	M	Heat disorder	0.45	38.91
6	M	Drowning	3.03	577
7	M	Bleeding	0.46	182
8	M	Bleeding	0.36	NT
9	M	Bleeding	0.51	5.1
10	M	Intoxication	2.02	48.4
11	M	Intoxication	0.80	31.1
12	M	Acute circulatory failure	0.20	14.01

13	M	Subarachnoid bleeding	0.59	1.76
14	M	Bleeding	1.33	52.85
15	F	Diabetic ketoacidosis	0.03	0.845
16	M	Posttraumatic shock	6.06	137.1
17	M	Bleeding	0.378	1.848
18	M	Intoxication	0.503	11.3

NT; not tested

1) GeneChip 解析の検討

覚せい剤が検出された 18 剖検例の骨格筋のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルから GeneChip 解析が可能か否かを検討した。しかし、いずれの試料も RNA が高度に分解しており、GeneChip 解析は不可能であった。これは、ホルマリン固定時間が長かったためと考えられた。法医剖検例の場合、死後経過も長くなることから、GeneChip 解析は難しいものと考えた。

2) 横紋筋融解症の検索

覚せい剤が検出された 18 剖検例の免疫組織化学的染色の結果を Table 3 に示す。Mb と 8-OH-dG が両方とも陽性となったものを横紋筋融解症疑い例とし、死因や死亡前の推定される病態から、外傷性の筋組織の傷害や、Methamphetamine (MA)、Mb 以外に酸化障害を来す可能性がある症例を除外した。その結果、横紋筋融解症疑い例はベゲタミン中毒の 1 剖検例と、覚せい剤が検出された症例のうち、Case 1, 3, 7, 9, 11, 12 の 6 例と判断した。ベゲタミン中毒の 1 剖検例は、生化学的検査で尿中から 1,100ng/mL のミオグロビンが検出された。生化学的検査、血中薬毒物濃度及び免疫組織学的検査結果から、ベゲタミン中毒の 1 剖検例は、悪性症候群に陥り、横紋筋融解症を発症したものと考えられた。

Table 3 The results of immunohistochemical staining

Case No	Myoglobin			8-OH-dG		
	G	P	D	G	P	D
V	+	+	+	+	+	+
1	-	+	+	-	+	+
2	-	±	±	-	+	+
3	-	+	+	+	+	+

4	-	-	-	-	+	+
5	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	+	+	+
7	-	+	+	+	+	+
8	-	±	±	-	±	±
9	-	+	+	-	+	+
10	-	+	+	-	-	-
11	-	+	+	-	+	+
12	-	+	+	-	+	+
13	-	+	+	-	-	-
14	-	-	-	-	±	±
15	-	-	-	-	+	+
16	-	-	-	-	+	+
17	-	±	±	-	+	+
18	-	-	-	-	-	-

G; glomerulus, P; proximal tubule, D; distal tubule, +; positive, -; negative V; An autopsy case related to vegetamin

3) 遺伝子変異の探索

遺伝子検査の結果、RYRI 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が認められたのは、Case 2 の A612T と Case 14 の A4295V の 2 例であった。A612T は、過去の報告で健常人コントロールに認められた変異であった。A4295V は、単独では悪性高熱症の報告例はなく、悪性高熱症の家系に R2435H と重複して検出された報告がある。CPT II 遺伝子は、活性変化を伴わない変異である F352C、V368I、M647V が多くの剖検例で認められた。また、Case 13 において、これまでに報告のない新規の変異 E545A が認められた。VLCAD 遺伝子では、活性変化を伴わない変異である G43D が 6 例に認められた他は、アミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。RYRI 遺伝子に認められた変異 A612T 並びに R2435H、CPT II 遺伝子に認められた変異 E545A は、今回調査した健常人には認められなかった。CYP2D6 遺伝子では、活性の低い CYP2D6*10 のホモ接合体が Case 3, 5, 13 の 3 例、未報告の変異が Case 4, 14 の 2 例に認められた。

今回、免疫組織学的検査から横紋筋融解症疑い例と考えられた 6 剖検例およびベゲタミン中毒の 1 剖検例には、RYRI 遺伝子、CPT II 遺伝子、VLCAD 遺伝子において活性変化を伴う遺伝子変異を認めなかった。CYP2D6 遺伝子の多型頻度も、特に有意な差を認めなかった。

覚せい剤による横紋筋融解症発症の原因は未だ解明されていない。本研究で認められた遺伝子変異は、覚せい剤による横紋筋融解症発症に関与していないと考えられた。今回調査した遺伝子以外に、横紋筋融解症の発症に関与する原因遺伝子があるのかもしれない。覚せい剤等の薬毒物が遺伝子の発現量に影響を与えることにより横紋筋融解症を発症した可能性も考えられる。この点は、今回の研究で、RNA が高度に分解しており、GeneChip 解析が不可能であったため解明できなかった。また、覚せい剤等の薬毒物が筋肉に作用し、筋線維の異常攣縮を引き起こし、その感受性が強い人が横紋筋融解症を発症した可能性も考えられる。

今後、さらに横紋筋融解症例を集め、他の遺伝子についても調査を行い、横紋筋融解症と遺伝的要因の関連について解明を進める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Matsusue A, Hara K, Kageura M, Kashiwagi M, Wang L, Ishigami A, Gotohda T, Tokunaga I, Nisimura A, Sugimura T, Kubo S. An autopsy case of rhabdomyolysis related to vegetamin and genetic analysis of the rhabdomyolysis-associated genes. J Forensic Leg Med. 17 (1) 46-9 (2010) 査読有
- ② Matsusue A, Hara K, Kageura M, Kashiwagi M, Wang L, Ishigami A, Gotohda T, Tokunaga I, Nisimura A, Sugimura T, Kubo S. Genetic analysis of ryanodine receptor 1 gene and carnitine palmitoyltransferase II gene: An autopsy case of neuroleptic malignant syndrome related to vegetamin. Leg Med. 11 S570-2 (2009) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Matsusue A, Hara K, Kageura M, Kashiwagi M, Wang L, Ishigami A, Gotohda T, Tokunaga I, Sugimura T, Kubo S. Genetic analysis of *ryanodine receptor 1* gene and *carnitine palmitoyltransferase II* gene : An autopsy case of neuroleptic malignant syndrome related to vegetamin. 7th International Symposium on Advances in Legal Medicine, 2009.5.28, Lisbon.
- ② Matsusue A., Ishigami A., Hara K., Kashiwagi M., Kageura M., Sugimura T., Kubo S. Genetic analysis of rhabdomyolysis-associated genes: an

autopsy case of methamphetamine-related hyperthermia and acidosis. 21st Congress of the International Academy of Legal Medicine, 2008.9.5, Osaka.

- ③ 松末 綾, 原 健二, 影浦光義, 柏木正之, Lu Wang, 石上安希子, 後藤田貴子, 徳永逸夫, 柏村征一, 久保真一. 横紋筋融解症における RYR1 遺伝子変異の検討: ベゲタミン中毒の 1 剖検例. 第 92 次日本法医学会総会, 2008. 4. 24, 長崎.
- ④ 松末 綾, 原 健二, 影浦光義, 柏木正之, 杉村朋子, 久保真一. 横紋筋融解症における遺伝学的背景の検討: ベゲタミン中毒の 1 剖検例(第 3 報). 第 58 回日本法医学会九州地方会, 2008. 10. 25, 大分.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松末 綾 (MATSUSUE AYA)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号: 70309920