

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390218

研究課題名（和文）薬毒物関連死の剖検診断の新たな展開に向けて：遺伝学的背景の検討

研究課題名（英文）Aiming at a new development of the postmortem diagnosis of the drug-related cadaver: Investigation of genetic background

研究代表者

久保 真一（KUBO SHIN-ICHI）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10205122

研究成果の概要（和文）：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。その結果、いくつかの変異が確認された。横紋筋融解症と関連があるとされる既報告の変異は認められなかったが、アルゴリズム解析で、横紋筋融解症の発症を疑わせる変異が認められた。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. Some mutations were found, then, using algorithms analysis, several mutation were considered potentially to impact on protein function. These results reveal the possibility that the onset of rhabdomyolysis is associated with both the mutation in the rhabdomyolysis-susceptibility gene and the concentration of methamphetamine or the hyperthermia induced by methamphetamine. 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
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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、覚醒剤、死因、横紋筋融解症、遺伝子、変異

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、摂取した薬毒物の特定、その血中濃度の定量等、分析を要することから

難しいことが多い。特に、薬物の血中濃度は死因判定の大きな指標となる。しかし、原因となる薬物の血中濃度が致死量に達していない場合には、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。

このように薬毒物を摂取した剖検例を詳細に検討していくと、横紋筋融解症に陥って死亡している症例が少なくないことが分かってきた。また、横紋筋融解症は、従来、原因薬剤と知られているものばかりでなく、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きている。さらに、そ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。申請者らは、薬毒物関連死の剖検診断の新たな展開を目指し、横紋筋融解症の発症に関与する遺伝子の検討を行った。

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

法医学解剖症例の中から、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

法医学解剖症例の中から、薬毒物中毒関連症例のうち、横紋筋融解症の発症に患者側の遺伝的背景が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。

- ① 薬物動態関連遺伝子：当該薬物の代謝酵素：*CYP2D6*
- ② 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)*
- ③ 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

法医学解剖症例の中から、ベグタミン中毒の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、*CPT II* 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、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 1 に示す。

Table 1 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剖検例並びにベグタミン中毒の1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。法医学解剖例の場合、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 剖検例並びにベ
ゲタミン中毒の 1 剖検例の免疫組織化学的染色
の結果を Table 2 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 2 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、*RYR1* 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。*CPTII* 遺伝子は、活性変化を伴わない変異であると報告がある 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と報告されている 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。*RYR1* 遺伝子に認められた変異 A612T 並びに A4295V、*CPTII* 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、*RYR1* 遺伝子、*CPTII* 遺伝子、*VLCAD* 遺伝子において活性変化を伴うと報告されている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。

そこで、PolyPhen-2 と SIFT アルゴリズムを用いて、各変異がタンパク機能に影響を及ぼすか否かを検討した。解析結果を Table 3 に示す。アルゴリズム解析の結果、*RYR1* 遺伝子において検出された A612T 変異と *CPTII* 遺伝子に検出した F352C 変異が、それぞれのタンパク質の機能障害を来す可能性が明らかとなった。A612T 変異は、横紋筋融解症未発症の覚せい剤乱用者であった。F352C は、覚せい剤乱用者で横紋筋融解症発症例 2 例、未発症例 4 例、また健常者 4 例から検出されていた。

Table 3 SIFT and Polyphen-2 results for amino acid substitutions identified in MA abusers

Gene	SNP	AA subst.	SIFT score	SIFT prediction	Polyphen-2 score	Polyphen-2 prediction
<i>RYR1</i>	1964G>A	A612T	0.00	AF	1.000	PRB
	12891C>T	A4295V	0.50	T	0.792	POS
<i>CPTII</i>	1055T>G	F352C	0.00	AF	0.999	PRB
	1102G>A	V368I	1.00	T	0.000	B
	1634A>C	E545A	0.08	T	1.000	PRB
	1939A>G	M647V	0.04	AF	0.001	B
<i>VLCAD</i>	128G>A	G43D	0.63	T	0.002	B
<i>CYP2D6</i>	232C>T	H48Y	1.00	T	0.001	B
	1121G>A	R344Q	0.68	T	0.017	B

Abbreviations: AA, amino acid; AF, affect protein function; T, tolerant; PRB, probably damaging; POS, possibly damaging; B, benign.

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、既に報告がある横紋筋融解症に関連する変異とは確認できなかった。

そこで、各変異と既報告の横紋筋融解症関連遺伝子とを照合するだけでなく、PolyPhen-2 と SIFT アルゴリズムを用いて、各変異がタンパク機能に影響を及ぼすか否

かを検討した。その結果、*RYR1* 遺伝子に検出した A612T 変異と *CPT1B* 遺伝子に検出した F352C 変異が、それぞれのタンパク質の機能障害を来す可能性が明らかとなった。

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 3 件)

- ① Matsusue A, Hara K, Kashiwagi M, Kageura M, Sugimura T, Kubo S. Genetic analysis of the rhabdomyolysis-associated genes in forensic autopsy cases of methamphetamine abusers. *Leg Med.* 13(1) 7-11 (2011) 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. 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
- ③ 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 Kubo S. Investigation of amphetamines induced rhabdomyolysis and its genetic background. 8th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2011.9.27, Frankfurt am Main, Germany.
- ② Matsusue A, Hara K, Kashiwagi M, Waters B, Sugimura T, Kubo S. Genetic analysis of

the four rhabdomyolysis-associated genes in 18 forensic autopsy cases of methamphetamine abusers. 8th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2011.9.27, Frankfurt am Main, Germany.

- ③ Matsusue A, Hara K, Kashiwagi M, Kageura M, Sugimura T, Kubo S. Genetic analysis of the rhabdomyolysis-associated genes and immunohistochemical study of myoglobin in the kidney in autopsy cases of methamphetamine abusers. 48th TIAFT, 2010. 9.1, Bonn.
- ④ 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.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 真一 (KUBO SHIN-ICHI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：10205122

(2) 研究分担者

原 健二 (HARA KENJI)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：00090738

研究分担者

柏木 正之 (KASHIWAGI MASAYUKI)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：70301687

研究分担者

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

研究分担者

ウォータース ブライアン (WATERS BRIAN)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：00609480

(3) 連携研究者：なし