

平成 1 0 年 度

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)

各種薬剤による横紋筋融解症の発生機序解明に関する研究

研 究 報 告 書

主任研究者 埜 中 征 哉

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

各種薬剤による横紋筋融解症の発生機序解明に関する研究

主任研究者 埜中征哉 国立精神・神経センター武蔵病院院長

研究要旨：横紋筋融解症を主症状とする悪性高熱症患者及びその家族の筋生検を行い、筋小胞体異常（CICR法での亢進）をもつもの30例について検討した。病理学的にはコア様構造をもつものを多数認めた。代表的症例5例中1例にリアノジン受容体遺伝子に変異を認めた。近似疾患であるセントラル・マルチコア病6例中1例にも同じ遺伝子に変異を認めた。

A. 研究目的

薬剤投与の副作用として横紋筋融解はまれではない。時には腎不全を来し死に到る。なぜ、どのような機構で横紋筋融解が起こるのかその機構を明らかにし、予防法を確立する。その解明の手段としてまず遺伝子変異（リアノジンレセプター遺伝子変異）が明らかにされている悪性高熱症をターゲットとして分子生物学的手法を用いて研究を進める。

B. 研究方法

1. 全身麻酔中に悪性高熱症を起こした患者及びその家族の上腕二頭筋から筋生検をし、次の検索を行った。
 - ①生検筋より単一筋線維を分離、スキンドファイバーを作成し、筋小胞体の機能をCa-induced Ca-release (CICR)法で検討した。患者及びその家族25名で検討した。
 - ②生検筋に各種組織化学的染色を施し、形態学的に検討した。また変化の強いものでは電子顕微鏡的にも検討した。
 - ③リアノジン受容体 (RYR1) 遺伝子の変異分析
悪性高熱症と診断された30例につきRYR1制限酵素でスクリーニングし、代表例5例について、RYR1遺伝子の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。
2. 国立精神・神経センター筋バンク中にあるセントラルコア病13例、マルチコア病11例についても悪性高熱症患者と同じようにRYR1遺伝子の変異を検討した。

C. 研究結果

1. 悪性高熱症患者について
 - ①CICR法で小胞体機能異常（CICRの亢進）を新たに9名に認めた。
 - ②筋線維の大小不同、タイプ2線維萎縮を高頻度に認めた。特筆すべきことはNADH-TR染色でタイプ1線維に筋原線維間網の乱れを10名で認めたことであった。3名はコア

構造をとっていたが、セントラルコア病のような筋線維タイプの分布異常はなかった。

③検索した典型例中1例にArg2434Hisの点変異を見出した。その他の例では欧米で報告されているのと同じ変異は見出されなかった。

2. セントラルコア、マルチコア病について
セントラルコア病5例、マルチコア病1例につきシーケンスを行い、マルチコア病1例にArg163Cysの点変異を見出した。

D. 考察

悪性高熱症は全身麻酔中にみられるまれな合併症ではあるが、時に致死性である。CICR法は本症の病態を知る上で、また診断に際しきわめて有力な武器である。我々が多くの症例を経験できたのは、長年本症の研究を東邦大学がすでに行ってきたからである。今回東邦大学と国立精神・神経センターとの共同研究を進めたことは、本症の病態解明に大きく役立った。CICR法という生理学的研究と病理、分子生物学的研究がドッキングできたからである。

リアノジン受容体の遺伝子変異は本症患者には高頻度にあると考えられる。事実我々も5例を検索して1例に見出している。ただRYR1遺伝子を全てシーケンスする必要があるため、日本人に多い変異などはまだ見出されていない。今後に残された課題であろう。リアノジン受容体の変異が受容体にどのような機能異常を与え、どのようにして横紋筋融解症を来すのか、今後研究を続けたい。

E. 結論

横紋筋融解症を主症状とする悪性高熱症患者の診断をCICR法、筋病理学的に検討、さらに遺伝子解析を行って病態を明らかにした。患者家族の検索も行ったので本症の予防に大きく役立つことが出来た。先天性ミオパチーとの関連性をも追求した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nonaka I, Murakami N, Suzuki Y, Kawai M: Distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neuromuscul Disord* 8:333-337, 1998
- 2) Nonaka I: Animal models of muscular dystrophies. *Lab Animal Sci* 48:8-17, 1998.
- 3) Kobayashi K, Nakahori Y, Nonaka I, et al: Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Genet* 103:323-327, 1998
- 4) Nishino I, Minami N, Nonaka I, et al: *MTM1* gene mutations in Japanese patients with the severe infantile form of myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord* 8:453-458, 1998
- 5) Kubo S, Tsukahara T, Nonaka I, et al: Presence of emerinopathy in cases of rigid spine syndrome. *Neuromuscul Disord* 8:502-507, 1998
- 6) Makino M, Horai S, Yu-ichi Goto Nonaka I: Confirmation that a T-to-C mutation at 9176 in mitochondrial DNA is an additional candidate mutation for Leigh's syndrome. *Neuromuscul Disord* 8:149-151, 1998
- 7) Kobayashi K, Nakahori Y, Nonaka I, et al: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392, 1998

分担研究報告書

悪性高熱症、セントラルコア病・マルチコア病における 分子生物学的研究

分担研究者 後藤雄一 国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部

研究主旨：悪性高熱症、セントラルコア病およびマルチコア病において、その発症予防、病態解明のため *RYR 1* 遺伝子の解析を行った。わが国では初めて2つの点変異を証明した。ダイレクトシーケンス法により塩基配列を検討したが、今回の検索領域には有意な異常を認めず、日本人のこれら疾患における *RYR 1* 遺伝子の異常は、欧米人とは異なる可能性を示唆した。

A. 研究目的

悪性高熱症は薬剤誘発性の横紋筋融解症のひとつであり、時に死に至る疾患である。その発症前診断と病態解明のため、原因遺伝子であるリアノジン受容体 (*ryanodine receptor 1: RYR 1*) 遺伝子を検索した。さらに高頻度に悪性高熱症を合併するセントラルコア病・マルチコア病も対象に加え、両疾患における *RYR 1* 遺伝子の関連を検討した。

B. 研究方法

- 1) 悪性高熱症が疑われ、東邦大学第一麻醉科学講座にて Ca-induced Ca-release (CICR) の亢進を認めた症例30例、国立精神・神経センター神経研究所筋バンクに登録されているセントラルコア病13例、マルチコア病11例を対象とした。骨格筋あるいは血液から抽出したDNAを用い、既に欧米において報告されている11種の点変異をPCR法/制限酵素切断法にて検索した。
- 2) 上記対象のうち、悪性高熱症5例、セントラルコア病5例、マルチコア病1例について、*RYR 1* 遺伝子の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。なお検索領域は、従来報告されている点変異のホットスポットであるエクソン4~11、13~18とした。

C. 研究結果

- 1) 悪性高熱症の一家系において Arg2434His をもたらす点変異を検出した。また悪性高熱を発症し筋生検にてマルチコア病と診断された1患者より Arg163Cys を検出した。これらは本邦において初めて *RYR 1* 遺伝子異常を証明しえた症例である。
- 2) 上記対象において、調べ得た領域において *RYR 1* 遺伝子の有意な異常は存在しなかった。

D. 考察

悪性高熱症およびセントラルコア病における *RYR 1* 遺伝子の検討は、欧米では散発的

に行われているが本邦では数少ない。致死的疾患である本症を発症前に発見し予防することは重要である。

またセントラルコア病に類似の病理所見を呈するマルチコア病について分子生物学的検討を行った報告は今までになく、今回世界ではじめて *RYR 1* 遺伝子の異常を証明した。マルチコア病もセントラルコア病同様にリアノジン受容体の機能異常が、その病態に何らかの影響をもたらしている可能性があり、今後検討を続けたい。

ダイレクトシーケンス法により今回検索した範囲では有意な異常を認めなかった。このことは、日本人の悪性高熱、セントラルコア病およびマルチコア病における *RYR 1* 遺伝子の異常は欧米人とは異なり、上記以外の部位に遺伝子異常が存在する可能性があり、現在検討中である。

E. 結論

悪性高熱、マルチコア病患者において各々 *RYR 1* 遺伝子の点変異を証明した。ダイレクトシーケンス法により塩基配列を検討したが、今回の検索領域には有意な異常を認めず、日本人のこれら疾患における *RYR 1* 遺伝子の異常は、欧米人とは異なる可能性を示唆した。

F. 研究発表

- 1) 論文発表
- 2) 学会発表
Ozawa M *et al*: Central core and malignant hyperthermia. Segawa neurological clinic for children symposium "Congenital myopathies". 1998.

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

分担研究報告書

悪性高熱症の生理学的研究

分担研究者 菊地博達 東邦大学医学部麻酔学教室

研究主旨： 種々の薬物投与により予期せぬ副作用が生じる。その内、横紋筋融解症は程度の差により死亡に至る重症な状態に陥る場合がある。これは骨格筋の崩壊により骨格筋構成物質が血流に運ばれ、2次性の腎障害に基づくものであろう。種々の薬物に基づく横紋筋融解症の内、揮発性吸入麻酔薬および脱分極性筋弛緩薬で発症する悪性高熱症は非常に予後不良な病態である。本症のほとんどの患者において、骨格筋の筋小胞体からのカルシウム遊離チャンネル（リアノジン受容体）の先天性異常（遺伝子異常）が認められている。この異常機能を解析する手法として骨格筋のスキンドファイバーを用いたカルシウム誘発性カルシウム放出速度の測定がなされている。また、本方法は筋小胞体へのカルシウム取り込み異常あるいは収縮系タンパク質のカルシウム感受性の異常も独立して測定できる系である。

ヒトクロモゾーム 19 における遺伝子異常の検索も研究中であり、特殊染色による光学顕微鏡的な形態学の解析も非常に有効な相補的な研究である。

以上の3種類の解析法を行うことにより、悪性高熱症の特性を多面から解析でき、ひいては横紋筋融解症の発生機序の解明に有効な示唆を与えるものである。

A. 研究目的

薬剤投与の副作用として横紋筋融解症の発生機序の解明と予防法を確立する。この目的のために悪性高熱症について病理学的、分子遺伝学的、生理学的の研究を分担として実施し、結果を総合的に解析する。当該研究者は生理学的研究を分担する。

B. 研究方法

悪性高熱症（臨床診断基準による）の既往歴のある患者およびその血族者、あるいは本症が強く疑われた患者で、筋生検を希望し、十分な説明を受け、納得した上で書面による同意書に署名捺印をした者を対象にした。局所麻酔下に原則として上腕二頭筋より骨格筋の採取を行った。一部は骨格筋の細胞内カルシウム動態に、一部は病理学的研究のために用いた。さらに、遺伝学的研究のために対象者から静脈血の採血を行なった。

採取した骨格筋はEndo等の方法(Endo M., Tanaka M., Ogawa Y. : Nature, 1970)を用い、スキンドファイバーを作成し、細胞内カルシウム動態(a. カルシウム誘発性カルシウム遊離(Calcium-Induced Calcium Release, CICR)速度の測定、b. 筋小胞体へのカルシウム速度、c. 収縮系タンパク質に対するカルシウム感受性)を測定した。

CICR速度亢進の結果(悪性高熱症素因者)が得られた場合は、血液からの遺伝子解析のために他の分担者へ輸送した。

病理学的研究のために採取された骨格筋は他の分担研究者へ持参した。

C. 研究結果

平成10年4月1日より平成11年3月31日までに、合計25名の筋生検を行なった。

悪性高熱症（臨床診断基準による）の既往歴のある患者は10名で、CICR速度亢進者は4名、CICR速度非亢進者は6名であった。これらの血縁者は8名で、CICR速度亢進者は5名、CICR速度非亢進者は3名であった。横紋筋融解を主訴とした患者は1名で、CICR速度は非亢進であった。筋疾患疑いは6名であり、その内2名はCICR速度が亢進しており、4名は非亢進であった。

筋小胞体へのカルシウム取り込みが抑制された症例はいなかった。

収縮系タンパク質に対するカルシウム感受性が亢進していた者は、悪性高熱症の既往のある1名で、悪性高熱症の家族歴を有する1名、筋疾患疑いの1名であった。

D. 考察

悪性高熱症は揮発性吸入麻酔薬および脱分極性筋弛緩薬により誘発される予後不良な遺伝疾患とされている。本症患者から生検された骨格筋において、CICR速度が亢進していることが明らかになり、さらにCICRをつかさどるチャンネルはリアノジン受容体であり、対応する遺伝子の点変異が示されている。

その発症機序としてこれらの異常リアノジン受容体を有する場合、誘発薬物の投与により骨格筋細胞内におけるカルシウム濃度

が異常に高くなり、CICR を発動して発症すると考えられる。この結果は代謝異常亢進を招来し、二酸化炭素の産生過剰、異常な体温上昇、全身のアシドーシスを示す。さらに細胞内カルシウム濃度異常亢進により骨格筋は強直し、筋崩壊をもたらす。悪性高熱症の臨床症状の一つとして知られている横紋筋融解はこのような機序で生じることが示唆されている。

盛生らの臨床診断基準を満たした悪性高熱症発症者の内、CICR 速度の亢進を示さなかった症例がいたが、これは筋小胞体のカルシウム放出チャンネル(リアノジン受容体)の異常以外の機序で悪性高熱症が発症したことが示唆されたものである。さらに、症例数が少ないため、統計学的な解析は不可能であったが、依頼施設から得た臨床症状の記述から、横紋筋融解を示唆するミオグロビン尿を呈する症例が少なかったことは、高度な体温上昇が必ずしも横紋筋融解を生じるとは限らないことを示唆している。

また、横紋筋融解を主訴とした症例で、CICR 速度の亢進を示さなかったことは、これらの症例では筋小胞体におけるリアノジン受容体の異常が原因で無いことを示唆している。これらの結果と病理学および遺伝学的な研究結果との整合性により一層の機序解明がなされると考えられる。

E. 結論

横紋筋融解症を示す病態として、骨格筋における筋小胞体のリアノジン受容体の異常によっても起こることが明らかになった。臨床的に悪性高熱症ではなく、横紋筋融解を示した症例での発症機序が必ずしも筋小胞体におけるリアノジン受容体の機能異常でおくるとは限らないことをも明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿予定

2. 学会発表

(1) Ichihara Y., Sasaki J., Kikuchi H. : Morphology and malignant hyperthermia. The 10th Asian Australian Congress of Anaesthesiologists Taipei, 1998 May

(2) 中島悦子、佐々木順司、佐多謙、市原、前村由美、菊地博達：モルモット骨格筋を用いたスキンドファイバーに及ぼす塩酸オルプリノンとミルリノンの影響 第45回日本麻酔学会 鹿児島 1998 4月

(3) 藤井ひとみ、森本裕二、真弓享久、劔物修、市原靖子、菊地博達：術中心原性ショックを起こしたデスミン関連性神経筋障害によると思われる特発性側湾症の一例 第45回日本麻酔学会 鹿児島 1998 4月

(4) 佐藤裕美、佐々木順司、中島悦子、菊地

博達：4種類の薬剤のモルモット骨格筋スキンドファイバーにおける筋小胞体のCICRにおよぼす影響 第20回日本麻酔・薬理学会総会 東京 1998 6月

(5) 佐々木順司、市原靖子、中島悦子、菊地博達、唐沢富士夫、佐藤哲雄：筋生検にて骨格筋における収縮系蛋白のCa²⁺感受性亢進が認められた一症例 第38回日本麻酔学会関東甲信越地方会 甲府 1998 9月

(6) 市原靖子、佐々木順司、佐多謙、中島悦子、津隈崇志、菊地博達：東邦大学における筋生検依頼の理由の推移 第38回日本麻酔学会関東甲信越地方会 甲府 1998 9月

(7) 中島悦子、長澤実佳、忍田ひろの、前村由美、菊地博達：アムリノン、ミルリノン、塩酸オルプリノンのモルモット骨格筋スキンドファイバーに及ぼす影響 第38回日本麻酔学会関東甲信越地方会 甲府 1998 9月

(8) 佐々木順司、忍田ひろの、市原靖子、菊地博達、唐沢富士夫、佐藤哲雄：骨格筋における収縮系蛋白のCa²⁺感受性亢進および筋形態にコア構造が認められた一症例 第18回日本臨床麻酔学会 松山 1998 10月

(9) 市原靖子、佐々木順司、吉田和正、長澤実佳、菊地博達：悪性高熱症と形態学の関連 第18回日本臨床麻酔学会 松山 1998 10月

(10) 辻藤達也、竹田智雄、柳館富美、糟谷周吾、土肥修司、市原靖子、菊地博達：小児悪性高熱症の一例 第18回日本臨床麻酔学会 松山 1998 10月

(11) 市原靖子、佐々木順司、佐多謙、吉田和正、菊地博達：東邦大学における筋生検依頼の理由の推移 第22回悪性高熱症研究会 東京 1998 11月