Clinical and Experimental Studies on Myopathy in Cushing's Syndrome and Steroid Myopathy

Report 1. Clinical Studies

Report 2. Experimental Studies

Seiya SAIKI, M.D.

2nd Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

(Director : Professor Tatsuo Abe, M.D.)

Muscular weakness in Cushing's syndrome has been frequently observed, though adequate study on myopathy has only recently been made by Müller and his colleagues. Myopathies due to steroid administration such as cortisone, prednisolone, triamcinolone and dexamethasone in various diseases have been reported infrequently since clinical use of steroids has become prevalent in the past decade.

Four cases of myopathy in Cushing's syndrome and a case of steroid myopathy were studied clinically, histologically, biochemically and electromyographically. All these cases were characterized by weakness and atrophy of gluteal muscles and of lower limbs in moderate degrees. Occasionally, proximal muscle weakness of upper limbs with atrophy, and in a few instances, with distal muscle involvement was observed. Histological studies on biopsied specimens revealed edema, degeneration of various grades, atrophy of muscle fibers, increased sarcolemmal nuclei, increased connective tissue in interstitial tissue and some cell infiltration all of which suggest myopathic changes. Electromyographic studies demonstrated myogenic abnormality mostly in lower limbs and rarely in upper limbs. Biochemical studies in biopsied muscles revealed minimal changes on inorganic phosphorus, creatine phosphate, adenosine phosphate and creatine phosphokinase, though aldolase activity decreased significantly.

Experimental steroid myopathy was produced in rabbits by cortisone administration (10 mg per kilogram of body weight) for the purpose of pathogenetical study.

Marked loss of weight, increased excretion of creatine and striking degeneration of muscles were confirmed after administration of cortisone for a week or more. Creatine content in muscles of cortisone treated rabbits decreased by 16 per cent, though creatine phosphate did not fall significantly. However adenosine triphosphate and creatine phosphokinase activity decreased significantly by about 50 per cent and 37 per cent, respectively.

Occurrence of myopathy due to cortisone administration was not prevented by potassium chloride. However marked decrease in urinary creatine excretion occurred after potassium chloride ingestion. These data suggest the effect of potassium upon steroid myopathy in clinical treatment.

Biochemical analysis of muscles in experimental cortisone myopathy indicates that marked decrease of adenosine triphosphate and creatine phosphokinase may play an important role in the occurrence of myopathy.

(pp. 774~787)

Cushing 症候群及び steroid myopathy に関する 臨床並びに実験的研究

第2編 動物実験編

東邦大学医学部内科学第二講座 (主任 阿部達夫教授)
(指導 里吉宮二郎助教授)

佐 伯 誠 也

(昭和41年1月19日受付)

1 緒 言

Cushing 症候群にみられる種々の臨床像が, glucocorticoid の多量分泌によつて起ることは, 既によく知られているが, 本症にみられる myopathy も同様の原因によるものであろう. 事実本症の治療によつて myopathy も改善を示していることは第1編に述べた如くであり, glucocorticoid の大量投与によつて類似の steroid myopathy の発生がみられている.

臨床例について諸種の面より検討した成績は既に第1編に述べたが, 一般に Cushing 症候群や steroid myopathy は稀な疾患で, 多数例について myopathy の発生機序を詳しく検討することは極めて困難である. したがつて人工的に steroid を大量投与して実験的な steroid myopathy を作成し, 種々の検討を加えることは, 本症の研究上極めて重要である.

動物に大量の glucocorticoid を与えると種々の筋変性を起すことは2, 3の人々により既に報告されており^{16~18)}, Ellis¹⁷⁾ は家兎の実験的 cortisone myopathy について2, 3の検討を加えている. 著者も家兎で cortisone myopathy を作り, 病理学的及び生化学的な検討を加え, steroid myopathy の発生機序に関して2, 3の知見を得たのでその成績を報告する.

2 実験方法

第1回実験: 体重2 kg 前後の18羽の雄家兎を1羽づつ採尿器付の飼育籠に入れ, 約1週間オリエンタル兎用固形飼料により飼育し, 体重及び尿量を連続測定した上, 1側四肢筋より, biopsy を行い, 筋病理学的所見及び筋中無機磷, クレアチン磷酸, ATP, aldolase 及びクレアチンフォスフォキナーゼ (CPK) の定量を行つた. その後約1週間経過をみた上, cortisone acetate 10mg/kg/day (日本メルク万有) を連日3週間皮下注射により投与し, 体重及び尿量の連日測定を行つた後, 再び対側の筋を biopsy し, 病理学的所見及び生化学的分析を行つた. 次いで6羽に対しては, cortisone acetate (以下 cortisone と略す) を更に2週間投与すると同時に塩化カリウム (KCl) 500mg/day を経口投与し, 他の6羽に対しては KCl を投与せずに cortisone を同量2週間投与した. その後脱血死を起させて筋の病理学的及び生化学的検討を行つた. 対照群3羽では蒸留水を同様に注射し同様に測定を行つた (Fig. 1).

第2回実験: 第1回実験と同様体重2 kg 前後の雄家兎12羽を1週間飼育の後, これを2群に分け, 実験群7羽に対して cortisone 10mg/kg/day を2週間投与し, その間連日採尿し, 尿中クレアチン及びクレアチニンの変動を観察し, 対照群5羽における変動と比較検討した. また2週間後に筋 biopsy を行い, 筋病理

学的検索と同時に、筋クレアチンの定量を行った。

第3回実験：前回同様体重2kg前後の雄家兎10羽に同量の cortisone を2週間投与し尿中クレアチン及びクレアチニンの変動を観察した後、KCl 500mg/day 経口投与と同時に cortisone 10mg/kg/day を更に2週間投与し、尿中クレアチン及びクレアチニンの変動を観察した。また家兎10羽をK欠乏食で飼育し、尿中クレアチンの変動を4週間観察して cortisone 投与時のクレアチンの変動と比較検討した。

測定方法：尿量は各飼育籠の採尿管に排泄された24時間尿を毎日メスシリンダーで計測し、尿中クレアチンは Abelin の方法¹⁹⁾ クレアチニンはFolin の方法²⁰⁾、無機磷は Martin-Doty の方法¹¹⁾、クレアチン磷酸及び ATP は Allen の方法¹²⁾によつて測定した、aldolase は Sibley-Lehninger 法¹³⁾、CPK は沖中らの方法¹⁴⁾により測定した。病理組織学的所見は biopsy 筋を直ちにアルコール及びホルマリンで固定した後、ヘマトキシリンエオシン及び PAS 染色を行い検討した。

Fig. 1. Changes in body weight of rabbit treated with cortisone or cortisone with KCl

3 実験成績

1) 体重、筋萎縮及び尿量

第1回の実験における cortisone 投与による体重の変動は Fig. 1 にみられる如く、投与後4乃至7日後には減少傾向を示し、2乃至3週後にはいずれも cortisone 投与前の体重以下に減少する傾向を示した。更に投与を続けると6乃至7週後に著しいいそうと筋力低下がおこり (Fig. 2)、一部のもの (7羽) は4乃至7週間で死亡するが、4週間以後ではその死亡率が極めて高くなる傾向があつた。対照群では biopsy による一時的な体重減少をみる他は漸次体重は増加し、実験開始4乃至5日目で3~3.2kgに達している。cortisone 投与4週後に KCl を更に加えた症例では体重減少が止まるもの、時には上昇するものも散見されたが、大多数は体重減少の傾向を示している。尿量の変化は Fig. 3 に示す如くで対照群では1日100~300ccの尿量を排泄しているのに対し、cortisone 投与群では投与開始後、著しい尿量の排泄増加を示し、時には500cc以上の排泄と摂取飲量の増加がみられた。多飲及び尿量増加の傾向は投与開始後1週間が最も著しかった。KCl 投与群と cortisone 単独投与群との間に差異はみられなかつた。

第2回及び第3回実験における体重の変動は何れも第1回実験と同様の体重変動を示した。K欠乏家兎における尿量は対照群と差異がないが、体重は実験開始後約1週間で減少しはじめ、外見上明らかに筋の萎縮

Fig. 2. Weakness of muscles of a rabbits treated with cortisone for 6 to 7 weeks

が認められ、一部の動物は7乃至1日目に死亡し、残りも実験途次下痢を伴って死亡するものが多く実験を完了しえたのは3羽にすぎなかった。

2) 生化学的検討

a) クレアチン代謝

尿中クレアチン及びクレアチニンの変動は Fig. 4, 5, 6 に示す如くで cortisone 投与開始後2日目より著しい増加を示し、投与前には20~30 mg/day の尿中クレアチンは時に

Fig. 3. Changes in urinary excretion

Fig. 4. Changes in urinary excretion of creatine and creatinine

Fig. 6. Changes in urinary excretion of creatine in rabbits treated with cortisone or potassium-deficient diet

Fig. 5. Change in urinary excretion of creatine and creatinine (mean of 7 rabbits)

200mg/dayの大量に及んでいる。尿中クレアチニンの排泄は投与開始前後に著しい変動はないが軽度の減少がみられ、第1回実験は Fig. 4 の如くで、cortisone 投与開始後1日100~170mg と実験開始前の約7倍に増加し、KCl 添加により約1週後に50mg/day前後の減少を示している。尿中クレアチニンは実験開始後軽度の減少傾向を示しているが、特に有意の変動はみられていない。第2回実験における各群1羽平均の値を示したものは Fig. 5 の如くで、cortisone 投与開始後も第1回実験同様の変動を示している。

Cortisone 投与時とK欠乏家兎の尿クレアチン排泄とを比較検討した成績は Fig. 6 に示す如くで、K欠乏によつても実験開始後漸次尿中クレアチンの排泄が増加し、約2週間後にピークに達するが、その後はやや下降し50~70mg/dayの排泄量を示しており、cortisone投与群よりも2週間後は低値を示していた。生検筋のクレアチン量は Table 1 に示す如くで、対照に比べ cortisone 投与群は明らかに低下を示し、平均約16%の有意の減少が認められる。

b) 磷酸代謝

磷酸代謝の変動は Table 2, Fig. 7 に示す如くで、

Table 1. Creatine content in muscles(mg/100g wet tissue)

Control	Cortisone treated group
390	376
435	392
415	425
485	314
385	330
	290
	330
421.0±41.7	351.7±46.8

Table 2. Content of phosphorus and enzyme activity in muscles

		Control group (18 rabbits)	Cortisone treated group (11 rabbits)
Inorganic P	mg/100g	12.1±3.1	16.9±3.1
Creatine P	mg/100g	43.6±15.3	35.4±8.9
ATP	mg/100g	* 51.8±10.0	* 24.4±6.4
Cretine-phosphokinase	u/g/hr.	** 142.1±24.3	** 89.2±41.4
Aldolase	× 10 ³ u/g/hr.	56.5±18.7	46.4±24.3

* P<0.001

** P<0.01

Fig. 7. Inorganic phosphorus creatine phosphate and ATP in muscles

Fig. 8. Activities of aldolase and creatine phosphokinase (CPK) in muscles

対照群即ち投与前の無機磷に比べて投与後の筋中無機磷は差異が認められず、またクレアチン磷酸

は対照群に比べて軽度の低下を示すが、有意差は認められない。これに対して筋中 ATP は対照に比較して著しい低下がみられ、約50%の有意の減少が認められた。

c) 筋酵素活性

CPK 活性は対照群 142.1 ± 24.3 unit/g/hr 湿重量に対して cortisone 投与群では 89.2 ± 41.4 unit/g/hr の値を示し、推計学的には 1% 以下の危険率で有意差が認められた。解糖系酵素の一つである aldolase は対照群 $56.5 \times 10^3 \pm 18.7 \times 10^3$ に対して cortisone 投与群は 46.4×10^3 と有意差が認められなかった (Fig. 8)

3) 病理組織学的所見

cortisone 投与の影響を組織学的にしらべた成績は Table 3 の如くで、対照に比べて cortisone 投与 2 週目及び 3 週目に何れも筋の浮腫、膨化及び均質化或は筋の萎縮が著しく認められる。また筋再生も約 50% に

Table 3. Histological changes in cortisone treated rabbits
—frequency of histological abnormality (%)—

Histological abnormality	Control		After treatment for 2 weeks.		After Treatment for 3 weeks	
Grade of abnormality	+	++	+	++	+	++
Edema of Fibers	0	0	64	30	64	35
Swelling of fibers	1.5	1.5	60	30	30	37
Homogenization	0	0	52	14	50	26
Atrophy of muscles	4.5	0	50	28	64	30
Regenerative changes	0	0	48	12	48	22
Increase in sarcolemmal nuclei	1.5	0	62	21	62	38
Decrease in glycogen	0.5	0	84	0	87	0
Loss of cross striation	0	0	84	0	92	0
Increase of interstitial Tissue	0	0	47	0	49	0

認められ、顆粒状変性或は筋鞘核の増加も 60% 以上に認められている (Fig. 9)。また glycogen の減少も対照群に比して何れも著明である。結合組織の増生及び横紋の消失は高度に認められ、2 週では 84%, 3 週 92% に認められ、何れも筋原性の著しい変化が認められている。一方 cortisone 投与群を cortisone 投与と同時に KCl を投与した群と比較したところ、これらの組織学的変化は cortisone 単独投与に比べてやや変性が軽度にとどまり余り有意の改善はなかつた。

4 考 案

steroid myopathy の報告は 1958 年 Dubois⁴⁾ が 29 例の Systemic Lupus Erythematosus の患者に Triamcinolone を 1 週乃至 8 カ月投与し 6 例の myopathy の発現をみたのが最初で、次いで McLean⁵⁾ も同様の経験をしている。また Williams⁶⁾ は triamcinolone によつて起つた myopathy を、Kendall⁷⁾ は triamcinolone を投与した 47 例中 24 例に myopathy が出現したことを報告している。Perkoff⁸⁾ は cortisone 投与又は prednisolone 投与によつて、血清クレアチンの上昇、クレアチン尿の出現、下肢の脱力を報告しており、Golding⁹⁾ Byers¹⁰⁾ は dexamethasone により生じた myopathy を報告している。本症の発現機序については未だ確実な成績は得られていないが、蛋白質の破壊促進を考えるものや、合成減

Fig. 9. Marked atrophy with increased sarcolemmal nuclei in muscles of rabbits treated with cortisone (H. E. Staining).

少を推定するものがある²²⁻²⁴⁾。

最近清水ら²¹⁾は副腎摘出ラットで glycyl Cl¹⁴ の筋蛋白への取込みが cortisone で抑制されることを証明し、骨格筋の蛋白合成を抑制したために myopathy の出現しうることを推定している。しかしながらこれらの変化が myopathy の原因か結果かは容易に断定することは出来ない。

実験的な steroid myopathy は最初 Germuth ら¹⁶⁾によつて報告されたが、Ellis¹⁷⁾は cortisone 投与家兎の筋を生化学的に測定し、詳細な研究を行つている。Ellis¹⁷⁾の成績では筋肉中の窒素が減少しないこと、また脂肪、Na 及び水分は cortisone 投与家兎で増加し、Kが減少することを確めている。Ellis¹⁷⁾は更に cortisone 投与家兎のK減少が myopathy 発生の原因と考え、K欠乏動物を作り、全身の骨格筋、心筋の変化を steroid myopathy における変化と比較検討している。K欠乏家兎においては骨格筋のみならず心筋の変性もみられるのに反し、cortisone 家兎では心筋変性のないことを認めており、更に cortisone 家兎にKを添加しても変性を予防しえないことを認めている。一方近年 Smith ら²⁵⁾は triamcinolone 家兎で筋フォスホリラーゼ活性の減少することを認めており、同様の成績は上村ら²⁶⁾によつても認められている。著者の実験では cortisone 投与 2～3 週以後に著明な体重減少、筋萎縮、筋力低下が認められ、また病理組織学的にも筋変性がみられることを確めた。KCl 投与は cortisone 投与による体重減少を防ぎえず、また病理組織学的の変化を改善しなかつたが、尿中クレアチンの変動をみると、cortisone 投与によつて起る著しいクレアチン尿が一過性に KCl 投与によつて抑制されることが認められている。この点からみると、cortisone myopathy の予防にはあまり効果がないが、KCl 投与は治療には少くとも有効であることが推定できよう。KCl の影響は cortisone により生じた筋変性にともなう筋中Kの減少¹⁷⁾を防ぐために有効であるとも考えられるので、K欠乏が cortisone myopathy の一次的原因とする Ellis の結論からも KCl の有効性は支持されるものであろう。

筋中の酵素活性に対する変動も myopathy の原因として関係しているものか、或は結果としてみるべきかは極めて難しい問題であろう。解糖系の酵素であるフォスホリラーゼの減少は既に報告されているが、著者らの測定した解糖系酵素 aldolase の変動は明らかでなかつた。従来報告された組織化学的な検討では、その酵素の絶対的増減を云々することは困難で、単に質的な比較にとどめるのが妥当であろう。Steroid myopathy が主として糖代謝に関係する glucocorticoid によつて起ることは臨床的経験からも明らかであるが、如何なる糖代謝の異常を介して myopathy を起すかは未だ明らかでない。一般的に myopathy では血清 CPK 活性の上昇、また筋中 CPK 活性の減少することがよく知られているが、cortisone 投与家兎における筋中 CPK の特異な減少は myopathy の脱力及び筋萎縮と直接関係しているものと考えられる。この成績は第1編に認められた患者の成績とは異つてゐるが、動物と人間では酵素活性の強さ、分布が異つており、患者の筋にみられる成績と動物における成績が一致しないことは当然考えられる。一方 CPK の関与しているクレアチン磷酸及び ATP の変動は極めて明らかで、ATP は筋肉中で明らかに減少しており、また筋肉中クレアチン量も減少している。

筋肉中クレアチンの減少は尿中クレアチン増加に対応して生じた結果と思われるが、甲状腺中毒症などにみられる程著明ではない。cortisone myopathy では ATP の著しい減少によるエネルギー代謝の低下がおそらく myopathy の発生に重要な役割を果しているものと考えられる。glucocorticoid が如何なる代謝を介してこれらの高エネルギー磷酸代謝系に作用しているかは未だ明らかでないが、糖代謝を介して間接的に作用しているものであろう。

結 論

家兎に cortisone を投与し病理組織学的変化、尿中クレアチン、筋中無機燐、クレアチン磷酸、ATP 及び aldolase、CPK の変動を観察し、また KCl 投与によるクレアチン代謝に対する影響を観察し次の結果を得た。

1. cortisone 投与開始後 7 乃至 24 日後には体重減少、著明なクレアチン尿及び筋の変性が起ることを生

化学的及び病理組織学的に確めた。

2. cortisone 投与家兎では筋中クレアチンは対照群に比べ16%の減少，筋中クレアチン磷酸は軽度の低下を，ATP は約50%の低下を認めた。筋中 aldolase は減少が認められないが，筋中 CPK の活性は37%の有意の減少がみられた。

3. cortisone myopathy の発生は KCl 投与により予防できないが，尿中クレアチンの排泄は一時的に抑制されることが認められ，この点から KCl 投与が有効に作用することが推定される。

4. cortisone myopathy の発生に関し考察を加え，殊に ATP の著しい減少，クレアチンフォスフォキナーゼの低下から，エネルギー系代謝の低下が本症発現に関係が深いことを述べた。

稿を終るに臨み，御懇篤なる御指導，御校閲を賜った恩師阿部達夫教授に厚く感謝の意を表すると共に，親しく御教示を頂いた里吉宮二郎助教授及び川崎市立病院臨床検査科長西山保一先生に衷心より感謝いたします。また生化学的検索に御協力いただいた教室の古和久幸博士及び木下真男博士に深謝いたします。

文 献

- 1) CUSHING, H. : Bull. Johns Hopkins Hosp., 50 : 137, (1932).
- 2) PLOTZ, C.M., KNOWLTON, A.I., and RAGAN, C. : Amer. J. Med. 13 : 597, (1952).
- 3) MÜLLER, R. and KUGELBERG, E. : J. Neurol. Neurosurg. & Psychiat. 22 : 314, (1959).
- 4) DUBOIS, E.L. : J.A.M.A. 167 : 1590, (1958).
- 5) MACLEAN, K. and SCHURR, P.H. : Lancet, 1 : 701, (1959).
- 6) WILLIAMS, R.S. : Lancet, 1 : 698, (1959).
- 7) KENDALL, P.H. and HART, M.F. : Brit. Med. J., 1 : 682, (1959).
- 8) PERKOFF, G.T., SILBER, R., TYLER, F.H., CARTWRIGHT, G.E. and WINTROBE, M.M. : Amer. J. Med., 26 : 891, (1959).
- 9) GOLDING, D.N. and BEGG, T.B. : Brit. Med. J., 1 : 1129, (1960).
- 10) BYERS, R.K., BERGMAN, A.B. and JOSEPH, M.C. : Pediatrics, 29 : 26, (1962).
- 11) MARTIN, J.D. and DOTY, D.H. : Anal. Chem., 21 : 965, (1949).
- 12) ALLEN, R.J. L. : Biochem. J., 34 : 858, (1940).
- 13) SIBLEY, J.A. and LEHNINGER, A. : J. Biol. Chem., 177 : 859, (1949).
- 14) OKINAKA, S., KUMAGAYA, H. and ASSOCIATES. : Arch. Neurol., 4 : 520, (1961).
- 15) SATOYOSHI, E., MURAKAMI, K. and ASSOCIATES. : Neurology, 13 : 645, (1963).
- 16) GERMUTH, F.G. JR., NADZEL, G.A., OTTINGER, B. and OYAMA, J. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 76 : 177, (1951).
- 17) ELLIS, J.T. : Amer. J. Path., 32 : 993, (1956).
- 18) TUNCBAY, T.O., KETEL, W.B. and BOSHES, B. : Neurology, 15 : 314, (1965).
- 19) ABELIN, I. and RAAFLAUB, J. : Biochem. Ztschr., 323 : 382, (1952).
- 20) FOLIN, O. and WU, H. : J. Biol. Chem. 38 : 81, (1919).
- 21) SHIMIZU, C.S.N. and KAPLAN, S.A. : Endocrinology, 74 : 709, (1964).
- 22) 西川, 植田他 : 日本臨床, 22 : 2517, (1964).
- 23) SOFFER, L.J. : Diseases of The Endocrine Glands. Lea & Febiger, Philadelphia (1956).
- 24) LUKENS, F.D.W. : Medical Uses of Cortisone. Blakiston, New York, (1954).
- 25) SMITH, B. : Neurology, 14 : 857, (1964).
- 26) 上村, 加藤, 永田, 祖父江 : 脳と神経, 17 : 694, (1965).