

DNA 試料収集の倫理面を含む方法論の確立と薬剤誘起性横紋筋融解症患者診断基準及び検体収集ネットワークの確立と実施

分担研究者 桒中征哉 国立精神・神経センター
武蔵病院 院長

研究要旨： 薬剤性横紋筋融解症と関連する副作用原因遺伝子の同定と SNP の検索を行う目的で、検体採取時の患者への説明とインフォームドコンセントの取り方について検討を行った。また、副作用原因遺伝子および SNP 検索にあたり、標的とする候補遺伝子を決定する一助とする目的で、ミオグロビン尿症 84 例の基礎疾患について検討を行った。

A. 研究目的

横紋筋融解症を惹起する薬剤には HMG-CoA 還元酵素阻害薬をはじめとして各種の薬剤がある。本研究においては、HMG-CoA 還元酵素阻害薬による横紋筋融解症に焦点を絞り、SNP 解析を行う。初年度である本年は、検体収集時および本プロジェクト遂行時に、積極的に患者に情報を公開し、患者の利益を最大限守るために、独自の承諾書および説明書の作製準備を行った。また、薬剤性横紋筋融解症の副作用原因遺伝子および SNP 検索を行うにあたり、標的とする候補遺伝子を決定する一助とする目的で、ミオグロビン尿症例の基礎疾患について、その頻度の検討を行った。

B. 研究方法

国立精神・神経センターにおいて施行されているミレニアムプロジェクトでの患者用説明文書と承諾書を用い、本プロジェクトで利用可能な部分があるかを検討した。HMG-CoA 還元酵素阻害薬による横紋筋融解症は、ATP 産生系の障害など骨格筋内での代謝異常が横紋筋融解の基本的病態と考えられている。一方、横紋筋の融解は、筋ジストロフィーを含む様々な基礎疾患で起こるた

め、臨床的に代謝性疾患を基礎とする横紋筋融解症を分けることは困難である。そこで、横紋筋融解症の中でも、代謝性筋疾患を原因とする頻度が高いミオグロビン尿症の患者について検討を行った。対象は、ミオグロビン尿症との診断にて筋生検を受け、1978年から2001年までに本院にて筋病理診断が行われた84例。これまでに明らかになった基礎疾患について検討を行った。さらに、原因不明群の中で、特に極長鎖脂肪酸アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症に注目し、ポリクローナル抗体を用いた免疫染色による鑑別を加えた。

C. 研究結果

国立精神・神経センターにおいて施行されているミレニアムプロジェクトでの倫理的問題への対応の基本的な精神は、患者への情報公開を最大限行い、患者の利益を最優先するという点で本プロジェクトと同じである。当センターでの説明文書、承諾書を叩き台として利用できることが明らかとなった。

ミオグロビン尿症との診断が下された84名の患者の内訳は、当初はカルニチンバルミチールトランスフェラーゼ欠損症、ミトコンドリア脳筋症、Duchenne 型/Becker 型筋ジ

ストロフィーが何れも一番多く、4例ずつであった。しかし、56例(79%)の患者で原因不明であった。今回、この原因不明例に対して、VLCAD 抗体を用いた免疫染色を行い、2例の完全欠損例と10例の部分欠損例を見出した。従って、ミオグロビン尿症の中では、VLCAD 欠損症が一番多い(14%)という結果になった(表)。

表. ミオグロビン尿症の基礎疾患

基礎疾患	例数	頻度
極長鎖脂肪酸アシル CoA 脱水素酵素欠損症	12	14.3%
カルニチンパルミチルトランスフェラーゼ欠損症	4	4.8%
ミトコンドリア脳筋症	4	4.8%
Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー	4	4.8%
McArdle 病	2	2.4%
フォスフォリラーゼb欠損症	1	1.2%
DRPLA	1	1.2%
Marinesco-Sjögren 症候群	1	1.2%
低カリウム性ミオパチー	1	1.2%
不明	44	64.3%
総数	54	

D. 考察

説明文書、承諾書の実際の作製に関しては、国立精神・神経センターで使用しているものを参考にして、千葉大学上田班員によって行われ、千葉大学倫理委員会に提出された。今後この指針に従って、患者からの血液からDNAを分離し、研究に供する。

本邦での VLCAD 欠損例の報告はこれまでに数例しかなかったが、12例(14%)の患者で VLCAD 欠損症を認めたことは、VLCAD 欠損症の頻度が従来考えられていたよりもはるかに高いことを示している。また、今回我々は、免疫染色によるスクリーニングを行ったが、免疫反応が正常ながら酵素活性が低下し

ている患者が存在する可能性を考慮すると、実際にはもっと患者が多い可能性がある。従って、VLCAD を含む、 β 酸化系酵素異常症はミオグロビン尿症患者のなかで、多数を占める可能性が高い。このような事実から、薬剤性横紋筋融解症の遺伝学的背景として、 β 酸化系酵素遺伝子の SNP が関与している可能性を示唆している。

E. 結論

84名のミオグロビン尿症患者中、12名に VLCAD 欠損症を認めた。薬剤性横紋筋融解症の SNP 検索に際し、 β 酸化系酵素遺伝子は有力な候補である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, Takahashi M, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Colomer J, Inturriaga C, Saitoh S, Byrne E, DiMauro S, Noanka I, Hirano M, Nishino I. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease.

Neurology, in press

Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, Stevenson RE, Iannaccone S, Dalakas MC, Yamada Y.

Structural and functional mutations of the Perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia

Am J Hum Genet, in press

Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tashikawa M, Manya H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H.

Endo T, Yshikawa H, Toda T.
Deficiency of α -dystroglycan in muscle-
eye-brain disease.
Biochem Biophys Res Commun 291:
1283-1286, 2002

Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi
YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T,
Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K,
Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y.
Mutation in the caveolin-3 gene causes a
peculiar form of distal myopathy.
Neurology 58: 323-325, 2002.

Ikemoto-Tsuchiya K, Nishino I, Kawai M,
Morimatsu M, Nonaka I.
A new form of muscular dystrophy with
mitochondrial structural abnormalities.
Muscle Nerve 24: 1710-1711, 2001.

Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A,
Hirano M, Nonaka I, Nishino I.
Infantile autophagic vacuolar myopathy is
distinct from Danon disease.
Neurology 57: 903-905, 2001.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究課題名: Stevens-Johnson 症候群患者の診断基準と DNA 収集ネットワークの確立に関する研究

分担研究者 北村 啓次郎

研究要旨

埼玉医科大学総合医療センター皮膚科にて 1985 年から 1998 年までに診療した スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS) ならびに この発展・重症型と考えられる中毒性表皮壊死融解症 (TEN, Lyell 症候群) の症例を集計すると SJS 16 例, TEN 14 例 計 30 例であった. 性別は男 12 例, 女 18 例, 年齢は 10 歳から 81 歳までに分布し平均は 48.7 歳であった.

このうち死亡例は計 5 例あり, 全例 TEN の症例であった.

全 30 例のうち, 薬物が原因であると確認あるいは推定された例は 28 例 (93%) であり, 不明のものは 2 例であった. 28 例のうち多くの症例で複数の薬剤が用いられ, 原因薬を確定するのは容易ではなかったが, 投与歴, 過去の報告を照らし合わせ, 最も疑わしい薬剤を取り上げると, 中枢神経系の薬剤 (テグレトール, フェノバール, エクセグランなど) が原因と思われる例が最も多く 9 例を数えた. 次いで消炎鎮痛剤およびこれを配合する総合感冒薬で 8 例, 抗生・抗菌剤が 6 例, その他が 5 例であった.

研究協力者 伊崎誠一 埼玉医科大学
総合医療センター皮膚科学教授

床経験例のデータの集積と評価を目的とした.

A. 研究目的

スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS) ならびに この発展・重症型と考えられる中毒性表皮壊死融解症 (TEN, Lyell 症候群) は主として薬疹として発症し, 時に死の転帰をとる.

本研究はこの疾患の遺伝的背景因子を同定するために最終的には原因遺伝子の同定を目的とするものであるが, 初年度である平成 13 年度の研究目的としては, 我々の施設すなわち埼玉医科大学総合医療センター皮膚科における臨

B. 研究方法

われわれの集積する患者ファイルから臨床診断名ならびに病理学的診断名の項目から, スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS) ならびに中毒性表皮壊死融解症 (TEN, Lyell 症候群) をキーワードとして全症例を集め, カルテならびにカラースライドとして保存してある画像ファイルさらには病理標本ファイルを可能な限りすべて集め, 一例ずつ見直しをはかり, 吟味, 再評価した.

又関連する薬疹として固定薬疹な

らびに多形滲出性紅斑についても可能な限り症例の再評価を行った。

また、これらの症例の集積と再吟味のために必要となった皮膚科的診察に満足しうる画像データベースについて開発を進めた。

(倫理面への配慮)

試料採取を開始するために、現在埼玉医科大学倫理委員会に本研究を提出し、現在審査途上にあり、慎重吟味されている。))

C. 研究結果のまとめ

埼玉医科大学総合医療センター皮膚科の診療が開始した 1985 年から最近の 1998 年 8 月まで 13 年間に診療した SJS ならびに TEN の症例を集計すると両者を合わせて全 30 例 (SJS 16 例, TEN 14 例) であった。性別は男 12 例, 女 18 例, 年齢は 10 歳から 81 歳までに分布し平均は 48.7 歳であった。

年別発症数を比較すると、その数は年を追う毎に増加している。このうち死亡例は計 5 例あり、これらは 1985 年, 1988 年, 1991 年, 1994 年, 1997 年に各 1 例, 全例 TEN の症例であった。したがって、われわれが TEN と診断した場合その死亡率は 36%であったことになる。

全 30 例のうち、薬物が原因であると確認あるいは推定された例は 28 例 (93%) であり、不明のものは 2 例であった。28 例のうち多くの症例で複数の薬剤が用いられ、原因薬を確定するのは容易ではなかった。投与歴、過去の報告を照らし合わせ、最も疑わしい薬剤を取り上げると、中枢神経系の薬剤 (テグレトール, フェノバル, エクセグランなど) が原因と思われる例が最も多く 9 例を数えた。次いで消炎鎮痛剤およびこれを配合する総

合感冒薬で 8 例, 抗生・抗菌剤が 6 例, その他が 5 例であった。

原因薬剤を確定するには困難を伴うが、そのためにひつような薬剤投与歴と症状の出現の関係を正確にとらえるために、チャートにした。原因と疑われる薬剤のテストとしてしばしば用いられるパッチテストは遅延型過敏反応を検べる検査法として確立されているが、SJS/TEN にこれを用いると陽性率が低く、そのため偽陰性のことが多いとされている。リンパ球幼弱試験 (DLST) は *in vitro* 試験であるので患者に苦痛を与えない。しかし、この試験が陰性であっても原因薬剤を否定することにはならない。今回検討した全 30 例のうちパッチテストあるいは DLST により原因を決定できたものは 4 例にすぎなかった。

再投与試験は危険が大きく、SJS/TEN ではこれを禁忌とする意見も強い。今回検討した症例で再投与試験を行なった例はあるが、それは被疑薬のうち、安全であることを確認するための試験としてこれを行なったものがほとんどであった。

あらゆる薬疹に対し、不可欠の治療は原因薬の中止である。原因薬が確定できないときは可能性のあるすべての薬剤を中止するべきである。特に SJS/TEN のような重症の疾患に対しては原因薬の中止が速やかになされない限り救命することはできない。次いで、循環、排泄、解毒、栄養に対する治療、主要臓器の機能障害に対する治療、感染の予防が重要である。SJS の侵襲の比較的軽度の段階の症例に対してはそれで充分である。われわれの例でも SJS 16 例のうち 5 例で原因薬の中止と対症療法のみで治癒せしめている。ステロイド治療は有効であるが、早期に大量に投与し、急性期を

過ぎたならなるべく速やかに減量・中止するべきである。メチルプレドニゾン1日量1000mgを3日間連続投与するいわゆるステロイドパルス療法はこの治療原理にかなっている。われわれの例でもSJSの7例でこれを行ない、しかもパルス療法後ステロイド治療を急速に中止して短期間のうちに臨床症状の著明な改善を認め得た。しかしこれをTENの9例に応用すると、臨床症状がより重篤であるため、無効であった例もある。そのうちの3例でこれに血漿交換療法を加えたが、このような例では死亡例が含まれる。血漿交換療法は全部で6例で使われ、有効性については確認したが、治療対象が重症者に限られるため死亡例が多かった。

D. 考察

今回の検討で明らかになった問題点を列記する。

1) 原因の確定に関わる問題点

薬剤の関与が証明できず、最後まで原因不明の例が2例あった。一般に薬剤以外にはウイルス、マイコプラズマなどによる感染症が原因として挙げられるが、薬疹として治療する前に感染症の除外は必須である。

多剤治療中に出現する薬疹の原因薬解明には困難を伴う。今回まとめた症例もそのほとんどが、原因薬剤をひとつにしぼることができず、推定を加えざるを得なかった。パッチテストやDLSTも陽性率が低いため、陰性であったときに信頼性にかける。再投与試験は危険である。そのため常に薬物副作用に関する最新のデータを得ておくべきである。

2) 治療の要点

原因薬剤を中止した後、ステロイドパルス療法は多くの例で有効であり、

また血漿交換療法も有効であった。しかし、TEN発症から時間が経過した例では、あらゆる治療が治療に最適のタイミングを失った。

3) 薬物の排泄と治療期間

症例23(男80歳)はフェノバルによるTENであるが、本剤はTENを発症し、しかも薬物の代謝、体内からの排泄が遅い(95-131hrsすなわち4-5days)。半減期の長い薬剤による重篤な薬疹の場合の治療上の問題を投げかけると同時に、薬物代謝の面からのアプローチの可能性について示唆する症例である。

4) TENの重症度を決定する因子

症例13(女43歳)は原因不明のTENであり、きわめて重症例であったが救命し得た。SJS/TENの重症度を決定する因子としてあるいはSJSからTENに移行する目安として障害皮膚面積(体表面積の何%が侵されたか)が重要視される。本例は、それに加えて、皮膚の侵襲の深さが重症度を決定する因子として受用であることを示した¹⁾。毛包の深部まで障害されるときは潰瘍が深く上皮化が望めないため、メッシュ植皮術を行うことが必要であることを示した。

5) 局所療法

局所療法すなわち失われた皮膚の機能に対する直接の保護療法の重要性については論を待たない。これに充分に対処するためには重症熱傷を治

¹⁾ TENの重症度を決定する因子

- | |
|-----------------------------------|
| 1) 面積 |
| 2) 深さ |
| 3) 粘膜障害の強さ |
| 4) 合併症 (消化管出血, 肝腎循環器障害, DIC, 感染症) |

療できる施設・設備が必要であることが再認識させられた。

6) 合併症の問題

合併症として問題であったのは、DIC、消化管出血、呼吸器感染症、皮膚の感染症、および黄疸を伴う肝障害であった。死因はDIC または感染症であった。

7) 予防の方策

薬剤性の重症の疾患は可能な限りこれを予防するべきである。ましてや再発はあり得べからざる事である。再発防止のためにわれわれは、退院時にかならず常時携帯可能な薬疹カードを渡すように、実行している。

E. 結論

埼玉医科大学総合医療センター皮膚科にて1985年から1998年までに診療したSJS 16例、TEN 14例 計30例を集計・再評価した。さらに2001年度までのデータを追加し、これを院内のデータベースとし、また学外の関連施設の

症例についても集積をはかり、次年度以降試料採集を開始する。本年度の成果は地味ではあるが、基礎的資料を集積するという研究初期段階の最も重要なものであったと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. 皮膚に表れる薬物の副作用. 伊崎誠一, シンポジウム「疾患と医薬品」, 日本薬学会第122年会, 平成14年3月26日, 幕張,

2. 薬疹の統計. シンポジウム「薬疹」伊崎誠一, 日本臨床皮膚科医学会, 東京・北関東・南関東合同支部総会学術大会, 平成14年3月24日, 東京. (日本臨床皮膚科医学会誌, 論文準備中).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

III 研究成果の刊行に関する 一覧表

書籍

CN Adra, X-Q Mao, P-S Gao, Xing Yang, T Shirakawa, J M Hopkin. Chromosome 11q13, Fe ϵ RI β and atopic asthma. Edited by S T Holgate. Karger., 2001

雑誌

Senda C, Yamaura Y, Kobayashi K, Fujii H, Minami H, Sasaki Y, Igarashi T, Chiba K: Influence of CYP2D6*10 allele on the metabolism of mexiletine in human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 52:100-103, 2001

Kubota T, Chiba K: Frequencies of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles (TPMT*2, 3A, 3B and *3C) in 151 Japanese subjects and inheritance of TPMT3C in a family of propositus. *Br J Clin Pharmacol* 51:475-477, 2001

Kobayashi K, Kogo M, Tani M, Shimada N, Ishizaki T, Numazawa S, Yoshida T, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Chiba K. The role of CYP2C19 in stereoselective hydroxylation of mephobarbital by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 29: 36-40, 2001.

Hosokawa M, Suzuki K, Takahashi D, Mori M, Satoh T, Chiba K. Purification, molecular cloning and functional expression of dog liver microsomal acyl-CoA hydrolase: A member of the carboxylesterase multigene family. *Arch Biochem Biophys* 389:245-253, 2001

Taguchi M, Imaoka S, Yoshii K, Kobayashi K, Hosokawa M, Shimada N, Funae Y, Chiba K: Kinetics of testosterone 6 β -hydroxylation in the reconstituted system with the similar ratios of purified CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome b5 to human liver microsomes. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 109:53-63, 2001

Yasui-Furukori N, Kondo T, Kubota T, Otake H, Ohkubo T, Nagasaki T, Sugawara K, Chiba K, Otani K, Kaneko S: No correlations between the urinary ratio of 6-b-hydroxycortisol to free cortisol and pharmacokinetics of alprazolam. *Eur J Clin Pharmacol* 57:285-288, 2001.

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Japanese population among six candidate genes for long QT syndrome. *Journal of Human Genetics*, 46:158-162, 2001.

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Genetic variations in five genes involved in the excitement of cardiomyocytes. *Journal of Human Genetics*, 46:549-552, 2001.

Donato JL, Ko J, Kutok JL, Cheng T, Shirakawa T, Mao XQ, Beach D, Scadden DT, Sayegh MH, Adra CN: Human HTm4 is a hematopoietic cell cycle regulator. *J. Clin. Invest.* 109:51-58, 2002.

Yuko Saitoh Y, Dake Y, Shimazu S, Sakoda T, Shibano A, Sogo S, Fujiki Y, Shirakawa T, Enomoto T: Month of Birth, Atopic Disease and Atopic Sensitisation. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 11:183-187, 2001

Fukunaga K, Asano K, Mao X-Q, Gao P-S, Roberts MH, Iwata M, Oguma T, Shiomi T, Kanazawa M, Adra CN, Shirakawa T, Hopkin JM, Yamaguchi K: Genetic polymorphisms of chemokine receptors CCR3 and CCR5 in Japanese and British asthmatics. *Eur. Respir. J.* 17:59-63, 2001.

Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Many H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T. Deficiency of alpha-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 291:1283-6, 2002

Tateyama M, Aoki M, Nishino I, Hayashi YK, Sekiguchi S, Shiga Y, Takahashi T, Onodera Y, Haginoya K, Kobayashi K, Iinuma K, Nonaka I, Arahata K, Itoyama Y. Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology.* 58:323-5, 2002

Ikemoto-Tsuchiya K, Nishino I, Kawai M, Morimatsu M, Nonaka I. A new form of muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. *Muscle Nerve.* 24:1710-1, 2001.

Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, Murakami N, Hirano M, Nonaka I, Nishino I. Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology.* 57:903-5, 2001

IV 研究成果の刊行物・別刷

20010419

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。