

算すると、検出力 80%を確保するためには、ケース、コントロール共に 85 例程度が必要である。本年度の実績から、分担研究者が集積する症例数も合わせれば、十分にこの目的症例数を達成できると考える。

本システムで得た、SJS/TEN の原因被疑薬は、アロプリノール、ロキソプロフェンに若干の集中が認められるものの、非常に多岐にわたっていることが明らかになった。このことより、対照群症例としては、アロプリノール及びロキソプロフェン以外については、特定の薬物の服用非発症者を対応させるのは難しく健常者でもよいと判断され、また、SJS/TEN の発症と関連する遺伝子マーカーの探索を、原因被疑薬毎に行うことは困難であると予測された。従って、本研究においては、原因被疑薬による階層化は行わずに、症例を集積し解析することが適当と判断された。また、本年度は症例を中心に集積したが、来年度からは、対照群についても、分担研究者の小菅を中心に、集積する予定である。

E. 結論

厚生労働省医薬食品局安全対策課及び日本製薬団体連合会の協力を得て、全国で発症する SJS/TEN の症例を把握し、研究へ登録するためのシステムを構築した。本システムで集積した症例が、正しく SJS/TEN である確率は高く、本システムが研究対象を集積するために十分機能していることが

確認できた。また、SJS/TEN の原因被疑薬が非常に多岐にわたることが判明した。

謝辞

本研究に協力頂きました患者様及び担当医の先生に深謝いたします。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

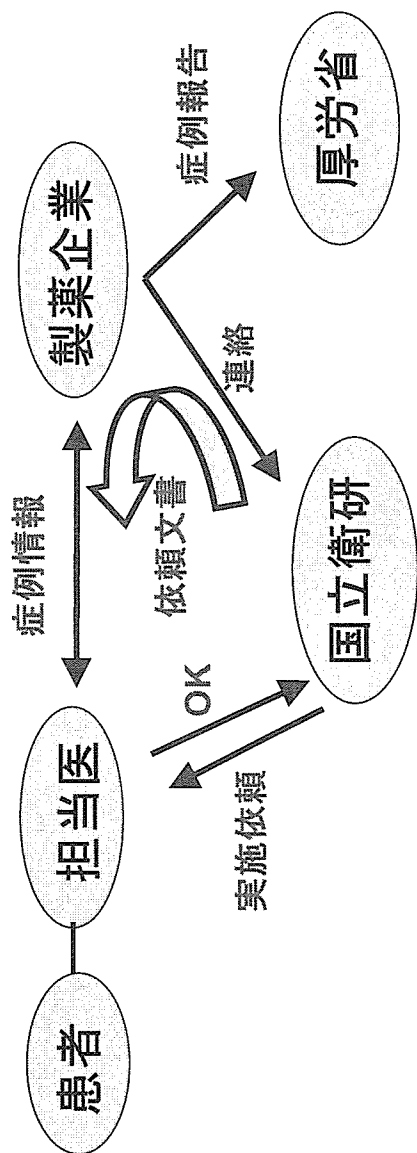


Fig. 1 研究協力依頼システム



National Institute of Health Sciences

Kamigaya 1-18-1
Setagaya, Tokyo 158
Tel. +81-3-3750-1441
Fax. +81-3-3750-1441
Fax. +81-3-3750-9789

「重症薬疹の発症に関連する因子の解析研究」へのご協力依頼

重症薬疹患者の主治医の先生へ

拝啓、時平、ましますご清社のこととお慶び申し上げます。

ステイブーンズ・ジョイントン在任前或後橋脚臨床医事(SJS)及び中重症薬疹皮膚死症候群(ライエル症候群 (TEN))は重症薬疹作用で、重く後遺症が残ることがあるために、なによりもその発症を回避することが望まれ、SJS/TENを発症しやすい体質と関連する因子を抽出する方法を開発することが必要と考えます。

副作用を発症しやすい体質と関連する因子として、近年、遺伝子上の変異(遺伝子マーカー)が注目されています。SJS/TENに関連する遺伝子マーカーに関連する発症の研究結果によって、HLA 抗原型がその発症と強い関連(オッズ比 580 ~ 9500)があること、原因薬物あるいは民族によって関連する HLA 抗原型が異なる可能性があることなどが分かってきました。これらのことは、日本人の SJS/TEN と関連する遺伝子マーカーを探索するために、原因薬物ごとに日本人を対象にした研究が必要であることを示しております。

そこで、私どもでは、日本人患者を対象にして SJS/TEN と関連する遺伝子マーカーを探索する研究を始めました。この研究においては、SJS/TEN を発症した患者から血液を抽出していただき、血清より抽出した DNA を解析します。SJS/TEN 発症を引き出したためには、十分な症例数を集める必要があり、SJS/TEN の発症率が非常に低いことを考慮すると、下病にして SJS/TEN に罹患された患者にだけ研究にご協力いただくことが必要と考えっております。

本研究へご協力いただくための発つ方法をお示ししました。特に現在準備しております方法は(D)は、患者や日當の診察でお忙しい先生にあまりご負担をお掛けしないで済むと思っております。別添に示す方法で本研究へご協力頂ける場合はとより、少しでもご関心がおありの場合は、製薬企業の医薬情報担当者にご連絡下さい。研究について詳細な説明を申し上げると共に、後日、私どもの方から先生へご連絡をさせていただきます。

SJS/TEN 予防の重要性を鑑みてご高額の取上りをお願い申し上げます。

敬具

国立医薬品安全衛生学研究所
医薬安全科学部部長 長谷川 健一
医薬安全科学部部長 船橋 なほ子
(薬研)研究医、研究医を任じたいお知りの方は国立医薬品安全衛生学研究所、
医薬安全科学部の中へご連絡をお願いします。
093-04271



National Institute of Health Sciences

Kamigaya 1-18-1
Setagaya, Tokyo 158
Tel. +81-3-3750-1441
Fax. +81-3-3750-9789

ご協力していただく場合の方法

まず、該当する患者に本研究の目的と意義をご説明下さい。患者の理解に対する協力の意向が確認できた場合には、下記の方法のうち、ご都合のよい方法でご協力いただきます。

(1) ご所属の医療機関で、倫理委員会に申請することなくご協力いただく方法

国立医薬品安全衛生学研究所では、本研究に関して倫理委員会の承認を得ており、患者の個人情報保護のための適切な手順を化自身の科では、国立医薬品安全衛生学研究所の個人情報管理責任者が行います。主治医の先生には、患者からインフォームドコンセント (IC) を取得する部分、及び、採血の部分でご協力をお願いいたします。採取いただいた血液は、個人情報保護法が適用されず、IC を取得するための説明に主治医の先生が対応を断らない場合には、国立医薬品安全衛生学研究所が対応いたします。

新の研究が開始しております。

(2) 最寄りの協力病院へ患者をご紹介いただく方法

当該病院の下院協力の病院へ移管する患者をご紹介いただきます。当該病院は各病院が定めていく予定です。患者へは規定の謝金のみ、謝金以外の交通費が支払われます。

国立医薬品安全衛生学研究所 (新宿市)	養橋 幸祐先生
国立がん研究センター (新宿市)	吉村 博和先生
慶応義塾大学病院 (福岡県福岡市)	松本理恵子先生
慶応義塾大学病院 (東京都品川区)	宮上 晶子先生
慶応義塾大学病院 (東京都品川区)	友野 正道先生
慶応義塾大学病院 (東京都品川区)	池田 善昭先生
慶応義塾大学病院 (東京都品川区)	相原 通子先生
慶応義塾大学病院 (東京都品川区)	小室 尚希先生
慶応義塾大学病院 (東京都品川区)	丸岡 千恵先生
慶応義塾大学病院 (東京都品川区)	上田真由美先生

(3) ご所属の医療機関で、倫理委員会の承認を受けてからご協力頂く方法

1. 国立がん研究センターに研究依頼書と倫理申請に必要な書類と研究費をお送りします。
2. ご所属の医療機関に研究依頼書を送ります。その場合、当該患者の同意はなく、2009 年 9 月までに集まるケースも含め、貴院での重症薬疹の患者について適切な手順の申請をお願いいたします。
3. オンライン登録をするために UMIN の ID を取得していただきます。
4. 患者から同意を取得し、採血を行います。採血は、採血医が採取者が同意した上で。
5. オンライン登録システムを利用し、患者登録を行います。当該患者に関する連絡先が分かる場合は、最新情報更新を行います。

(4) その他の方法

上記以外にも、こちらで対応可能な場合もございますので、お問い合わせ下さい。

(06/09/20)

Fig. 2 重症薬疹の患者の主治医へ研究協力を依頼する文書

Table 1 報告数と協力申し出数(2006.6.16~2007.3.15)

発現事象名	報告件数		医師協力申し出件数
	SJS	TEN	
SJS	93	27	
TEN	31	9	
SJS/TEN合計	124	36 (29%)	
医師協力申し出内訳	件数	全報告数に対する割合 (%)	
連絡OK件数	36	29.0	
協力可能確認件数	29	23.4	
採血終了	14	}	18.6
患者同意待ち・倫理申請中	9		
採血不可 (患者死亡・その他)	6		

Table 2 会社報告によるSJS/TENの被疑薬(重複あり)

薬物又は薬効分類	報告件数	
	SJS	TEN
アロプリノール	15	1
抗生物質	15	17
抗ウイルス剤	4	1
抗真菌剤	1	0
抗ガン剤	6	0
抗てんかん薬	8	2
向精神薬	4	1
ロキソプロフェン	6	0
ロキソプロフェン以外のNSAIDs	6	4
総合感冒薬	10	2
呼吸器系に作用する薬	11	0
循環器系に作用する薬	5	1
消化器系に作用する薬	7	0
その他	7	4
不明又は報告なし	9	3

重症薬疹患者の網羅的遺伝子多型解析

分担研究者 頭金 正博（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長）
分担研究者 黒瀬 光一（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 主任研究官）

研究要旨：8例（軽度を含む）のステイブンス・ジョンソン症候群・中毒性表皮壊死融解症(SJS/TEN)患者のゲノムDNAと対照群被験者（4例）のゲノムDNAを用いて約26万種類の一塩基多型のタイピングを行った。また、得られたデータの品質管理（データクリーニング）を行った。

A. 研究目的

医薬品による重篤な有害事象の一つであるステイブンス・ジョンソン症候群（SJS）および中毒性表皮壊死融解症（TEN）の発症に関連した遺伝子多型マーカーの探索研究が台湾の漢民族を対象に行われ、漢民族では、HLA-B*1502等の遺伝子多型が、カルバマゼピンやアロプリノールによるSJS群発症と強く相関していることが示唆された。一方、日本人でSJSおよびTENの発症頻度については、漢民族と大きく異なるという報告はないものの、HLA-B*1502のアレル頻度は漢民族に比べて異なることが報告されている。従って、漢民族で見いだされた遺伝子多型マーカーは日本人におけるマーカーとはならない可能性が高い。従って、日本人に適用可能な遺伝子多型マーカーを新たに検出することが必要である。また、現状では遺伝子多型マーカーの遺伝子座位は特定されていない。そこで、本研究では領域を限定せずに全ゲノムに渡って網羅的に遺伝子多型解析を行

った。日本人におけるSJS/TENの発症に関連したマーカーを明らかにすることは、医薬品による有害事象を低減するためには極めて重要になる。

GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array は GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array と併せて、約50万個の一塩基遺伝子多型（SNP）を網羅的にタイピングすることが可能なDNAマイクロアレイである。公共データベースおよびPeregenのデータベースに登録されている220万にのぼるSNPsデータをもとに、正確性やCall rate、再現性が最適化されたSNPsが選択されている。また、遺伝的情報量を最大化するために、3種類の人種集団における連鎖不平衡とHapMap情報を基にSNPの優先的選択が行われ、遺伝子領域内にあるSNPsが50万個のうちの37%を、遺伝子の上流域または下流10kbの領域内SNPsが8%を占める。このアレイによるSNPカバー率はヒトゲノムの85%以上の領域において10kbに少なくと

も1つの SNP を検出することが可能である。従って、現時点では、最も詳細なゲノムワイドな遺伝子マッピングが可能なツールである。そこで、この GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array から得られた SNPs データを用いた SJS/TEN のケース・コントロール関連解析を行うことを最終的な目標として、今年度は少数の検体で Human Mapping 250K Nsp Array を用いた DNA マイクロアレイの測定を行い、得られたデータの品質管理（データクリーニング）を試行した。また、試験的に少数の検体のデータを用いて、関連解析を行った。

B. 研究方法

SJS/TEN 発症患者および対照群被験者の DNA の調製と診断情報の収集：国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理審査委員会より実施を許可された研究プロトコルに従って、被験者より文書にて研究への参加を確認した後、EDTA 添加末梢血を 10 mL を各医療機関にて採取した。血液検体は各医療機関で匿名化された後、三菱化学 BCL (株) で DNA を調製し国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部に搬入された。一部の対照群被験者のゲノム DNA については、健常人より樹立された B 細胞株より調製したゲノム DNA をヒューマンサイエンス振興財団より購入した。被験者の診断情報については各医療機関で匿名化された後、国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部に送付された。DNA については国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部にて GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array の測定に用いられた。匿名化された診断情報については分担研究者である横浜

市立大学医学部環境免疫病態皮膚科学教室にて、SJS/TEN の確定診断に用いられた。DNA マイクロアレイ実験：GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array の測定は、全て Affymetrix 社が作成したプロトコルに従った。使用した機器は、GeneChip® Fluidics Station 450、GeneChip® Hybridization Oven 640、GeneChip® Scanner 3000 7G で、測定機器の制御には GeneChip® Operating Software (GCOS) 1.4 client を、遺伝子型の決定には GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE) 4.1 を用いた。

DNA マイクロアレイデータ解析：

GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array から得られた遺伝子多型に関するデータは、統計計算ソフトウェア R を用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

当研究計画は、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理委員会で研究実施の承認を得た。被験者からは研究への参加意志を文書にて確認した。また、被験者の DNA および診療情報はすべて連結可能匿名化されたのち、国立医薬品食品衛生研究所に搬入され研究に用いられた。

C. 研究結果

網羅的 SNPs データの品質管理

SJS/TEN と確定された被験者 5 名、軽度の SJS あるいは SJS/TEN の発症が疑われた被験者 3 名、対照群被験者 4 名、SJS/TEN とは考えにくい被験者 2 名のゲノム DNA を測定に供した (表 1)。

GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array を用いて測定したデータには、各検体について約26万個の SNPs データが含まれることから、実験で測定されたデータについて関連解析を実施することができる品質を保持しているか、あらかじめ検討する必要がある。そこで、これまでに得られた14検体のデータについて、測定の正確性および遺伝継承法則への適合性の点からデータ品質を評価した。

まず、測定の正確性については、測定した26万個の SNPs のなかで実際にタイピングが可能であった SNP の割合を示す Call rate について調べた。一般に Call rate が低い場合は、該当する GeneChip の測定結果の信頼性が低いことを示唆する。検体毎の Call rate を表1に示す。Affymetrix 社の測定マニュアルよれば GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array の場合は93%以上の Call rate が望ましいとしているが、一部の検体についてはこの値を下回った。また、約26万 SNPs 毎の Call rate については、ヒストグラムを図1に示す。さらにデータは示していないが、各染色体上の遺伝子多型についての Call rate の分布はほぼ一様になっていたことから、ほとんどの SNP の測定は均一に行われたと考えられる。測定の正確性についてはマイナーアレル頻度の点からも検討した。1つの SNP につき、出現頻度の低い方のアレルをマイナーアレルと呼び、そのアレルの出現頻度をマイナーアレル頻度(MAF)というが、測定結果のマイナーアレル頻度が極端に低い場合は、本来の遺伝子型に係わらず測定がどちらか一方の遺伝子型に偏っている可能性がある。今回測定した14検体につい

てのデータではアレル頻度が0を示す SNP (即ち14検体全てがホモを示す SNP) が約26万個の SNP のうち69,779個あった。GeneChip® Human Mapping Array に用いられている約50万個の遺伝子多型のうち、日本人の場合は約10万個が monomorphic なマーカーである(即ち全ての日本人がホモを示す遺伝子多型)とされている。この割合に比べて今回のデータからはアレル頻度が0を示す SNP の数が多いが、これは検体数が14検体と少ないことが理由であると考えられ、今後検体数が多くなるに従って5万個程度にまで減少していくと考えられる。

遺伝継承法則への適合性についてはハーディー・ワインベルクの法則に従っているか検定を行った。ケース・コントロール研究の場合、コントロール群のみでハーディー・ワインベルクの検定を行うことが望ましいが、今回はコントロール群が4例のみであったので、全ての検体のデータを用いてハーディー・ワインベルク検定を行った。個人の遺伝子型が集団から独立に2個のアレルを選択したものであれば、ハーディー・ワインベルクの平衡が成立する。この平衡が保たれない原因は近親婚などの特別場合を除いて、ほとんどがデータの誤りと考えられる。今回は検体数が少ないことから正確検定を用いてハーディー・ワインベルクの検定を行った。今回の14検体の SNPs についての P 値のヒストグラムと期待値と実測値の確率分布が等しいかどうかを視覚的に表現した確率点・確率点プロットを示す。図2に示す P 値のヒストグラムにおいては、0.95以上を示す検体が最も多く、図3に示す確率点・確率点プロットで

は SNPs のプロットがほぼ傾き 1 の直線にプロットされたことから、今回測定した SNPs についてはハーディー・ワインベルクの平衡に従っていない SNP はないと考えられた。

SJS/TEN の発症と関連する SNP の探索

SJS/TEN と確定された被験者 5 名 (SJS/TEN 患者群)、軽度の SJS あるいは発症が疑われる被験者 3 名 (SJS/TEN が疑われる患者群)、対照被験者群 4 名の SNPs データを用いて、関連解析をおこなった。関連関係は SJS/TEN 患者群と対照被験者群、SJS/TEN 患者および SJS/TEN が疑われる患者群を併せた群と対照被験者群、SJS/TEN 患者群と SJS/TEN が疑われる患者群について、それぞれ前者をケース、後者をコントロールとした。発症と SNPs の関連は、優性遺伝モード、劣性遺伝モード、遺伝子型モード、遺伝子型ごとに重みを付ける付加モードのそれぞれのモデルを用いた分割表を作成し、優性遺伝モード、劣性遺伝モード、遺伝子型モードについてはフィッシャーの正確検定により、付加モードについてはマン・ホイットニーの検定を用いて解析した。その結果、SJS/TEN 患者群と対照被験者群をケースとコントロールのそれぞれに当てはめ優勢遺伝モードで解析した場合においては今回測定した約 26 万個の SNPs で観察された最小の P 値は 0.079 であった。また、各 SNPs についての期待値と実測値の確率分布をプロットした確率点・確率点プロットについては傾き 1 の直線上からすべての SNP のプロットは乖離していた (図 4)。また、多重検定用の仮説有意性指標である Q 値はすべての SNPs で

0.05 を大きく上回っていた (図 5)。これらの検定での結果は、劣性遺伝モード、遺伝子型モード、付加モードにおいてもほぼ同じ結果であった。これらの結果から、今回用いたデータセットからは SJS/TEN 患者群と関連する SNP は検出することはできなかった。また、SJS/TEN 患者および SJS/TEN が疑われる患者群を併せた群と対照被験者群、SJS/TEN 患者群と SJS/TEN が疑われる患者群について、それぞれケースとコントロールとした場合でもそれぞれのケースと関連する SNP を検出することは今回のデータセットからはできなかった。

D. 考察

今回の GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array から得られたデータの SNPs タイピングに用いたアルゴリズムは Dynamic Model (DM) アルゴリズムであるが、最近 Bayesian Robust Linear Model with Mahlonobis distance classifier (BRLMM) アルゴリズムが開発された。このアルゴリズムは実測データの揺らぎに基づいて SNPs タイプを決定するアルゴリズムであり、一般に Call rate は DM アルゴリズムを使用して SNPs タイプを決定した時に比べて上昇する。今回は 14 検体のみであったことから、BRLMM アルゴリズムを採用するまでの検体数に至らなかったが、今後検体数が増すことによって一部の検体で十分な Call rate が得られなかった点は改善されていくと思われる。その他の測定 of 正確性に関するデータ品質については測定の正確性の指標および遺伝継承法則に適合していたことから、GeneChip® Human

Mapping Array の測定方法に関しては、妥当であると考えられる。

また、今回の測定で得られた少数のデータセットを用いて、SJS/TEN の発症と関連する SNP の探索を試験的に行ったが、SJS/TEN 患者と関連する SNP を検出することはできなかった。今回のように少ない被験者数の場合、期待するオッズ比を 10、対照群でのアレルの頻度を 10%と仮定すると SJS/TEN 患者群と対照被験者群をケースとコントロールにした優勢遺伝モードでの検出力は 2×10^{-6} と非常に低い値になってしまうことが、主な原因であると考えられる (図 6)。従って、今後検体数が集積されていくに従って SJS/TEN 患者と関連する SNP が検出される可能性は高まると考えられる。

謝辞：当研究での遺伝統計学的解析には (株) スタージェン・遺伝統計解析事業部・上辻茂男博士の協力を得た。同博士に感謝いたします。

E. 結論

SJS/TEN と確定された被験者 5 名、軽度の SJS あるいは判定が困難であった被験者 3 名、対照群被験者 4 名、SJS/TEN とは考えにくい被験者 2 名のゲノム DNA を用いて、GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array で遺伝子多型を網羅的に探索した。得られた結果から、測定系については妥当であったが、今回の検体数では SJS/TEN の発症と関連する SNP は検出できなかった。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

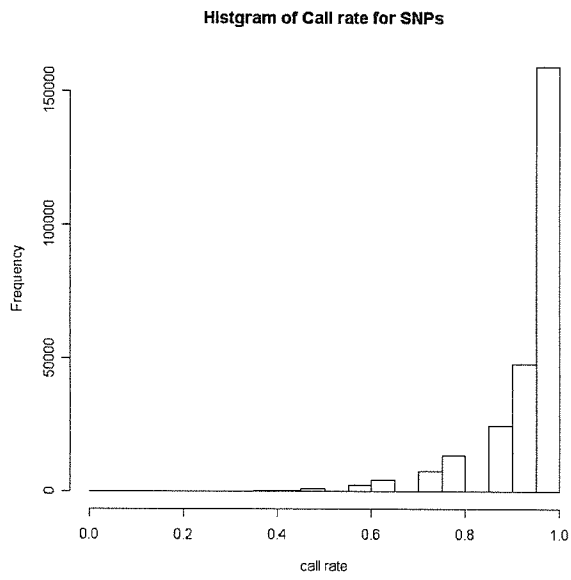


図1 SNP 毎の Call Rate の分布

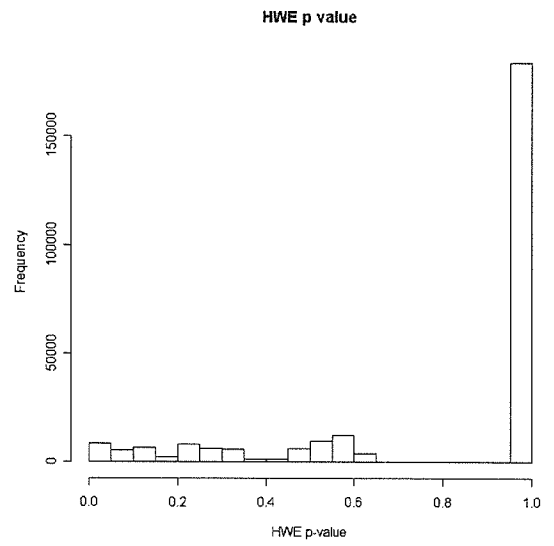


図2 ハーディー・ワインベルクの検定における P 値の分布

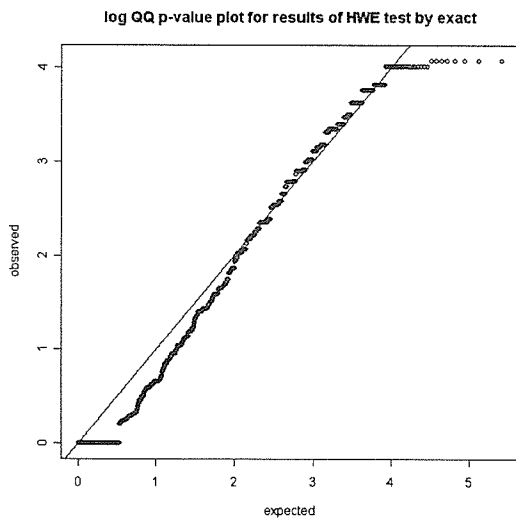


図3 ハーディー・ワインベルクの検定における P 値の確率点・確率点プロット

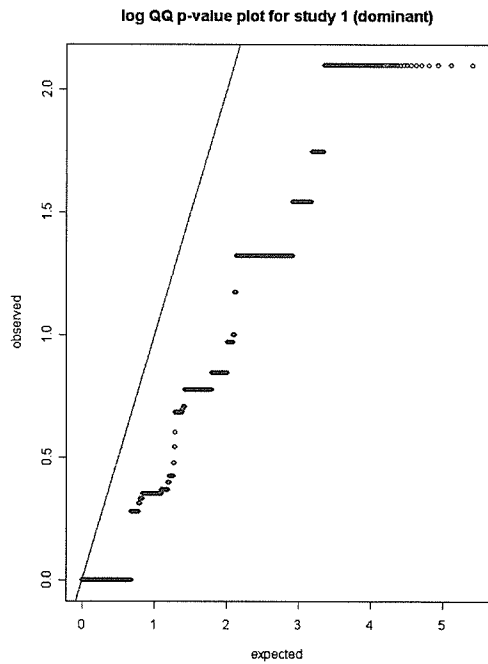


図4 ケース・コントロール研究の優性遺伝モードにおけるフィッシャーの正確検定での P 値の確率点・確率点プロット

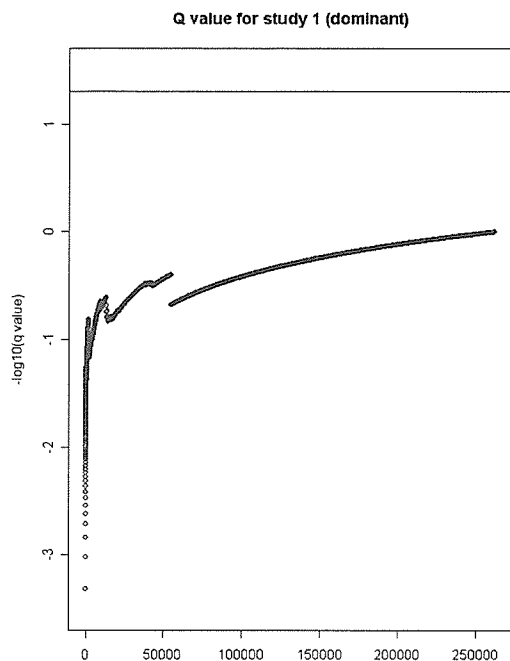


図5 優性遺伝モードを用いて検定を行った場合の各 SNP についての Q 値の分布

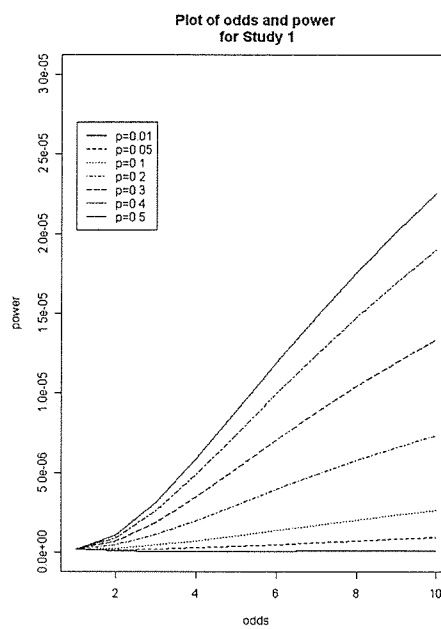


図6 今回用いた検体数でのケース・コントロール研究を行った場合のオッズ比と SNP の頻度による検出力の変動

表1 被験者の診断と SNP Call Rate

被験者番号	診断	Call rate (%)
1	SJS	94.23
2	TEN	91.33
3	SJS	93.54
4	TEN	94.54
5	SJS	92.36
6	sSJS	93.95
7	sSJS	90.23
8	sSJS	96.14
9	Control	94.55
10	Control	91.44
11	Control	95.56
12	Control	92.23
13	not SJS	95.01
14	not SJS	93.55

sSJS; suspicious SJS

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

抗てんかん薬以外の薬剤による重症薬疹の患者の HLA 型解析

分担研究者 齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

研究要旨： 主として抗てんかん薬以外の薬剤を対象に、ステイブンス・ジョンソン症候群及び中毒性表皮壊死を発症された患者（ケース）群 14 検体及びコントロール患者群（含む、健常人）5 検体につき HLA 型の解析を行った。今回の解析検体数は少ないものの、ケース群において、日本人における報告と異なる頻度を示す HLA 型を数種見いだした。

A. 研究目的

薬物による重篤な副作用のひとつに重症薬疹があり、その中でもステイブンス・ジョンソン症候群(SJS)及び中毒性表皮壊死(TEN)は、時に死に至ることが知られている。本研究では、SJS 及び TEN の発症回避のための薬物治療の個別化を目的に、ケース・コントロール研究により、重症薬疹を発症しやすい遺伝子多型を含むバイオマーカーを探索し、有用なマーカーを同定して、その検出方法を開発することを目的としている。

当分担研究では、遺伝子マーカーのうち HLA 型の解析を担当しており、その中でも主として抗てんかん薬以外の薬剤を対象に、SJS 及び TEN を発症された患者群及びコントロール患者群（含む、健常人）につき研究を進めている。今年度は 19 検体につき、高精度で HLA 型の同定が可能なシーケンシング法 (PCR-sequencing based typing; PCR-SBT 法)を用いて検討を行った。

B. 研究方法

検体は、主任研究者である国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・鹿庭なほ子室長を経由して、各分担研究者及び本研究への協力をお申し出いただいた主治医の先生方より供与頂いた、ケース (SJS /TEN) 14 検体、コントロール 5 検体を用いた。なお、SJS /TEN の検体数は、軽症の SJS と考えられる検体も含めたものである。

HLA 型の解析は、Invitrogen (Dyna) 社 (Brown Deer, WI, USA) の SeCore A, B, Cw, DRB1 Locus Sequencing Kit を用いた。このキットは、HLA-A, B, Cw については各 Exon 2, 3, 4, DRB1 については Exon 2 とコドン 86 につきシーケンシング解析を行うものである。即ち、15-30 ng/μl のゲノム DNA を、HLA-A, B, Cw では 5 μl、DRB1 では 2 μl 用いて、まず解析対象エクソンを含む領域の増幅反応を行った。PCR の条件は、95°C で 4 分処理後、95°C で 20 秒、63°C で 20 秒、及び 72°C で 40 秒を 35 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分処理であった。なお

HLA-B については、2種のバッファー中で別々に PCR 反応を行い、反応液を 1% ゲルでアガロース電気泳動し、約 1.3 kB のバンドが認められた反応液のみを、次の処理に供した。PCR 産物に ExoSAP-IT (USB Co., Cleveland, OH, USA) を 1/5 量加えた後、37°C で 40 分処理し、さらに 80°C で 20 分処理することにより酵素を失活させた。その反応液 2 µl (DRB1 は反応液に 1.67 倍量の滅菌精製水を添加後)を用いて、各エクソン特異的にダイターミネーター反応 (DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA) を行った。PCR 反応は、95°C で 20 秒、50°C で 15 秒、及び 60°C で 60 秒を、25 サイクル行った。反応液を DyeEx96 Kit (Qiagen, Hilden, Germany)にて処理し、過剰の塩基等を除いた後、ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems)にて配列を解析した。

HLA 型の解析は、ソフトウェア Assign SBT (version 3.2.7b, Conexio Genomics, Applecross, Western Australia, Australia) を用いて、全ての対象多型部位を確認しながら、判定を行った。なお、HLA-B については、2種のバッファーで共にバンドが認められた検体については、Exon 4 を解析対象に含めなかった。また DRB1 の場合は、コドン 86 の配列解析結果も用いて判定した。ディプロタイプとして複数の組み合わせが判定された場合には、日本人での検出が報告されている型の組み合わせを選択した。なお、日本人における HLA 型のアレル頻度と

しては、Tokunaga K. et al., Immunogenetics, 46, 199-205 (1997); Tanaka H et al., Clin. Transpl. 10, 139-144 (1996); Hashimoto et al., Tissue Antigens, 44, 166-173 (1994)を参照した。

(倫理面への配慮)

本研究は患者検体由来のヒトゲノム DNA を対象に遺伝子多型解析を行うと共に、臨床データを取り扱うものであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、研究倫理審査委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) HLA-A : ケース 14 検体、コントロール 5 検体の解析が終了した。検体数が少ないものの、A*3101 がケース群 5 検体 (アレル頻度 18%) で見いだされた。コントロール群では 1 検体 (アレル頻度 10%) のみであった。なお、本型の日本人におけるアレル頻度は、8-9%と報告されている。また A*2603 はケース群 2 検体 (アレル頻度 7%) で見いだされたが、コントロール群では見いだされなかった。本型の日本人におけるアレル頻度は、1-2%と報告されている。

2) HLA-B : ケース 7 検体、コントロール 4 検体の解析が終了した。検体数が少ないものの、日本人では比較的まれな B*5801 が、ケース群 1 検体 (アレル頻度 7%) より見いだされた。コントロール群からは

見いだされなかった。本型は、日本人でアレル頻度 0.6%と報告されている。なお、当該患者からは、本型とハプロタイプを形成する、A*3303 及び Cw*0302 が検出されている。

3) HLA-Cw: ケース 13 検体、コントロール 5 検体の解析が終了した。ケース群において 3 アレル以上で見いだされた、Cw*0102, *0401, *0801 及び*1202 のアレル頻度は、日本人における報告と同程度であった。なお、日本人ではまれな Cw*0302 がケース群 1 検体 (アレル頻度 4%) より検出された。

4) HLA-DRB1: ケース 12 検体、コントロール 5 検体の解析が終了した。検体数が少ないものの、DRB1*1502 がケース群 4 検体 (アレル頻度 17%) で見いだされた。本型の日本人におけるアレル頻度である 9%よりも高い値であるが、コントロール群でも 2 検体 (アレル頻度 20%) より見いだされた。その他、ケース群において、3 アレル以上で見いだされた、DRB1*0405 及び*0901 のアレル頻度は、日本人における報告とほぼ同じであった。

D. 考察

HLA 型の解析方法としては、従来からの血清学的な方法の他に、より高精度での判定が可能な PCR-SSO (sequence-specific oligonucleotide) 法、PCR-SSP (sequence specific primers) 法、及び PCR-SBT 法などの DNA タイピ

ング法が近年多く用いられるようになった。今回は、最も高精度で HLA 型の解析が可能な PCR-SBT 法を用いて検討を行った。

解析検体数がまだ少なく、ケース群とコントロール群間での差につき、統計的な解析を行っていない。しかし日本人でアレル頻度 0.6%と報告されている B*5801 が、ケース群 1 検体 (アレル頻度 7%) より見いだされた。B*5801 は台湾人 (漢民族) において、高尿酸血症薬アロプリノールによる重症薬疹 (過敏症、SJS、TEN) 発症と、オッズ比 580.3、 $P=4.7 \times 10^{-24}$ で、有意に相関することが報告されている (Hung S.I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 4134-4139 (2005))。

今後はケース群およびコントロール群の検体数を増やして、HLA 型の解析を継続すると共に、薬剤別及び重症度別の解析も行う予定である。また、抗てんかん薬に関して、同様に HLA 型の解析を行っている、分担研究者の東京医科歯科大学・村松正明教授、及び国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター・高橋幸利部長とも協力して相関解析を行いたい。

E. 結論

ケース群 14 検体及びコントロール群 5 検体につき、HLA 型解析を行った。解析検体数は少ないものの、ケース群において、日本人における報告と異なるアレル頻度を示す HLA 型を数種見いだした。また日本人で比較的まれな B*5801 がケース群より見いだされた。

なお、シーケンシング解析のセットア

ップ等に多大なる貢献をいただいた、協力研究者の国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・主任研究官・前川京子博士に感謝する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

抗てんかん薬による重症薬疹の患者及び対照群に係わる HLA 型に関する研究

分担研究者 高橋 幸利

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター臨床研究部長

研究要旨

抗てんかん薬による重症薬疹は多く、そのメカニズムの解明・重症薬疹予防の確立は重要なてんかん治療上のテーマである。21655 例の難治てんかん患者中、薬疹を来たした症例は 166 例 (0.77%) で、抗てんかん薬によると思われる軽症薬疹が 118 例 (0.54%)、抗てんかん薬によると思われる重症薬疹が 21 例 (0.10%) であった。抗てんかん薬-軽症薬疹では 11.9%、重症薬疹では 47.6%が複数の抗てんかん薬による薬疹を経験し、重症薬疹症例では複数の抗てんかん薬にアレルギーを有する症例が多い (χ^2 検定、 $p<0.001$)。軽症薬疹の原因抗てんかん薬としては、CBZ(61 例)、PHT(32 例)、PB(14 例)が多く、重症薬疹症例の原因抗てんかん薬としては、PHT(12 例)、CBZ(11 例)、PB(5 例)が多い。PHT 薬疹症例では重症薬疹の頻度が高い (χ^2 検定、 $p=0.006$)。

研究協力者：池田浩子、山崎悦子、久保田裕子、大谷英之、四家達彦、西村成子、藤原建樹
(国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター)

A. 研究目的

抗てんかん薬は長期に内服することになるため、医療者・患者家族ともにその副作用について感心が高く、より安全な抗てんかん薬が期待され、オーダーメイド医療等が構築されつつある。しかし、製薬メーカー以外からの抗てんかん薬による副作用についての系統だった調査はなく、薬物選択は効果の面から判断されている。

添付文書の副作用情報によると、その頻度はバルプロ酸 (VPA) 14.5%、ガバペンチン (GAB) 20.2%、ゾニサミド (ZNS) 24.7%、

クロナゼパム (CZP) 27.3%、カルバマゼピン (CBZ) 38.1%、クロバザム (CLB) 48.9%、ヘニトイン (PHT) 未調査、フェノバルビタール (PB) 未調査、プリミドン (PRM) 未調査となっていて、その頻度はかなり高頻度である。薬疹の頻度についてはさらに情報が少なく、副作用頻度が報告されている抗てんかん薬の内、CBZ のみが 2.9%と記載がある。これらの抗てんかん薬の添付文書には重症薬疹の注意喚起は記載されているが、頻度はまったく不明である。

今回我々は、てんかん患者における薬疹を主体とした副作用の実態を調査した。

B. 研究方法

当センターのてんかんカルテ番号 1 番～21655 番までの 21655 人について、診療録から薬疹の有無を後方視的に調査した。ほとんど

が難治てんかんで受診した患者である。

薬疹は、皮膚症状のみあるいは発熱までを伴う軽症薬疹と、スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN)、薬剤性過敏症症候群 (DIHS) などの重症薬疹に分類した。

個々の重症薬疹の診断基準は、厚生労働省の重篤副作用疾患別対応マニュアルに従った。SJS は、発熱を伴う口唇、眼結膜、外陰部などの皮膚粘膜移行部における重症の粘膜疹および皮膚の紅斑で、しばしば水疱、表皮剥離などの表皮の壊死性障害を認めるものとした。TEN は、広範囲な紅斑と、全身の 10% 以上の水疱、表皮剥離・びらんなどの顕著な表皮の壊死性障害を認め、高熱と粘膜疹を伴うものである。

(倫理面への配慮)
個人情報管理に注意した。

C. 研究結果

21655 例の難治てんかん患者中、薬疹を来した症例は 166 例 (0.77%) であった。そのうち、抗てんかん薬によると思われる重症薬疹が 21 例 (17.8%) に見られ、20 例は SJS で、1 例が TEN であった。抗てんかん薬によると思われる軽症薬疹のみが 118 例 (71.1%) に、抗てんかん薬以外によると思われる軽症薬疹が 38 例 (22.9%) に見られ、抗てんかん薬以外によると思われる重症薬疹症例はなかった。抗てんかん薬による薬疹症例 139 例中 11 例 (7.9%) は、抗てんかん薬以外によると思われる軽症薬疹の既往があった。難治てんかん患者に見られた抗てんかん薬以外によると思われる軽症薬疹の主な原因薬剤は抗生剤であった。

抗てんかん薬によると思われる軽症薬疹 118 例中、14 例 (11.9%) が複数の抗てんかん薬による薬疹を経験し、7 例 (5.9%) が抗てんかん薬以外の薬剤による薬疹を経験していた。一方、抗てんかん薬によると思われる重症薬疹 21 例中、10 例 (47.6%) が複数の抗てん

かん薬による薬疹を経験し、4 例 (19.0%) が抗てんかん薬以外の薬剤による薬疹を経験していた。抗てんかん薬による重症薬疹を来した症例では、軽症薬疹症例に比べて複数の抗てんかん薬に対する薬疹を経験した症例が多い (χ^2 検定、 $p < 0.001$) が、抗てんかん薬以外の薬疹の既往については有意差がなかった。

軽症薬疹の原因候補抗てんかん薬としては、CBZ(61 例)、PHT(32 例)、PB(14 例)、ZNS(9 例)、VPA(6 例)が多い。重症薬疹症例の原因候補抗てんかん薬としては、PHT(12 例)、CBZ(11 例)、PB(5 例)、VPA(5 例)、ZNS(3 例)が多い。各抗てんかん薬について軽症薬疹における頻度と重症薬疹における頻度を比較すると、CBZ (χ^2 検定、 $p = 0.11$)、PHT (χ^2 検定、 $p = 0.006$)、PB (χ^2 検定、 $p = 0.96$)、ZNS (χ^2 検定、 $p = 0.94$)、VPA (χ^2 検定、 $p = 0.99$) と PHT で重症薬疹の確率が高いと思われる。

てんかん診断は、軽症薬疹群では特発性全般てんかん (IGE) 6 例、症候性全般てんかん (SGE) 21 例、局在関連性てんかん (LRE) 86 例などで、重症薬疹群では、IGE 2 例、SGE 1 例、LRE 16 例などであった。てんかん診断で重症薬疹が起り易いてんかん分類はない。

D. 考察

難治てんかん患者における薬疹の頻度は、0.77%、抗てんかん薬の薬疹頻度は 0.64%、抗てんかん薬による重症薬疹の頻度は 0.10% であった。調査は、診療録の 1 号紙の注意事項記載欄を主体に後方視的に行っており、記載漏れなどで把握できていない症例もあると推測される。実際にはもう少し頻度が高いものと思われる。今後の前方視的な調査が期待される。難治てんかん患者における抗てんかん薬-薬疹頻度が 0.64%、抗てんかん薬以外による頻度が 0.18% であることから、てんかん薬は薬疹が起り易いことが推定される (χ^2 検定、 $p < 0.001$)。

重症薬疹症例の 47.6% が複数の抗てんかん薬で薬疹を来し、軽症薬疹例より複数の抗てんかん薬で薬疹を来す確率が高いが、抗てん

かん薬以外で薬疹を来たす確率は差がないことが分かった。よって、抗てんかん薬による重症薬疹を来たす症例には、抗てんかん薬全般に対するアレルギー反応の起こり易さ=素因が存在する可能性が示唆される。

抗てんかん薬の中では、PHT,CBZ,PBなどが原因として考えられる症例が多いが、PHTでは重症薬疹となり易いことが推定された。よって、抗てんかん薬による薬疹の既往のある症例でPHTを使用するときは、かなり慎重な投与量の選択が必要と思われる。その原因については分子構造等を今後検討する必要がある。

E. 結論

抗てんかん薬による重症薬疹の頻度は0.10%で、PHT、CBZなどによる場合が多い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yukitoshi Takahashi, Infections as causative factors of epilepsy, *Future Neurology*, 2006; 1, No. 3, : 291-302.
2. Yukitoshi Takahashi, Kazumi Matsuda, Yuko Kubota, Jiro Shimomura, Etsuko Yamasaki, Tatsuya Kudo, Katsuyuki Fukushima, Hitoshi Osaka, Noriyuki Akasaka, Atsushi Imamura, Shinji Yamada, Naomi Kondo, Tateki Fujiwara, Vaccination and infection as causative factors in Japanese patients with Rasmussen syndrome: Molecular mimicry and HLA class I, *Clinical & Developmental Immunology*, 2006; 13(2-4): 381-387.
3. 高橋幸利、知っておきたい頻用薬の上手な使い方、抗てんかん薬、医事新報、印刷中。
4. 高橋幸利、西村成子、角替央野、大谷英之、四家達彦、二階堂弘輝、小田望、江川潔、池田浩子、自己免疫反応から見たてんかん予防・治療の可能性、臨床精神薬理、2007; 10: 印刷中。
5. 高橋幸利、てんかんの免疫分子病態、*Medical Science Digest*, 2007; 33: 印刷中。

2. 学会発表

1. Yukitoshi Takahashi, Shigeko Nishimura, Hisano Nishimura, Tateki Fujiwara, Seizure predisposition and epileptogenesis in patients with Rasmussen syndrome. The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Symposium : Seizure predisposition and epileptogenesis, 2006年7月19-21日, Kyoto.
2. 高橋幸利、西村成子、角替央野、ワークショップ 1:「てんかんと免疫」ラスムッセン症候群等のてんかんにおける自己免疫病態の診断、第40回日本てんかん学会、2006年9月28-29日、金沢。

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

抗てんかん薬による重症薬疹の患者に関する研究
症例集積及び短いドデカマーリピート延長で発症する日本人 **Unverricht-Lundborg** 病(ULD)の
CSTB 遺伝子解析

分担研究者 古谷博和 国立病院機構 大牟田病院 神経・筋センター 神経内科 部長

協力研究者 池添浩二¹⁾, 服巻保幸²⁾, 重藤寛史³⁾, 吉良潤一³⁾, 藤井直樹¹⁾

1) 国立病院機構 大牟田病院 神経・筋センター 神経内科

2) 九州大学生体防御医学研究所 遺伝情報実験センターゲノム機能学

3) 九州大学大学院医学研究院附属脳神経病研究施設神経内科学

研究要旨： 重症薬疹に関する研究への応用を目的として、短いドデカマーリピート延長で発症する疾患（**Unverricht-Lundborg** 病（以下 **ULD**））をモデルとして、遺伝子解析診断法を予備的に検討した。この疾患はドデカマーリピート延長部分が激しいメチル化を受けており、しかも複雑な高次構造をとり、500～1500 塩基対のリピート延長であるために、**PCR** 法を診断のための手段として用いることが出来ず、遺伝子診断が行いにくい疾患の一つである。そのため、これまで見逃されてきた症例が多く存在することが予想されている。今回我々は、ミニゲル電気泳動装置 **Mupid-2** を用いた、簡略かつ迅速化した改良サザンブロッティング法（特許出願中）と、**Methylation specific PCR** 法を組み合わせる事で、見逃しを極力少なくするための **ULD** の遺伝子診断プロトコールを開発した。

また、症例集積としては、重症薬疹症例 4、抗てんかん薬服用非発症例 3 を登録した。

A. 研究目的

Unverricht-Lundborg 病(ULD)は、常染色体劣性の幼少時期に初発する難治性のミオクローヌステんかん発作で、**cystatin B** 遺伝子(CSTB)の5'非翻訳領域にある通常2回か3回である12塩基繰り返し配列(CCCCGCCCCGCG)が、30回(360塩基

対)以上、多くは40-125回、サイズで言うと500～1500塩基対の延長で起こること、またこの延長領域は激しくメチル化を受け、複雑な2次構造をとるために、ULD発症者ではこの領域の**PCR**が殆ど不可能であり、遺伝子診断に**PCR**法をうまく用いることが出来ず、これまでサザンブロッティング

法しか診断方法がなかった。しかしリピート延長が短い ULD 患者の場合、400bp 程度のリピート延長をサザンブロッティングでは捉えきれない場合があり、ULD の診断に苦慮することが多かった。

そこで我々は、簡易電気泳動装置である Mupid-Plus を用いてサザンブロッティング法の解像度をあげるとともに、CSTB 遺伝子のメチル化領域を脱アミノ化して PCR を行うことで、短いリピート延長の ULD 患者の遺伝子診断を行った。

B. 研究方法

(1) 症例

44 歳男性。両親がいとこ婚。主訴は手足のふるえ、歩行障害、構音障害。10 歳頃から意識消失を伴わない四肢のミオクローヌスが夜間頻繁に出現するようになり、それに伴い歩行障害、書字障害が出現。14 歳すぎから、日中に起こる四肢のミオクローヌスは全般化し、時に数秒間の意識消失を認めることもあった。15 歳頃より呂律困難が出現。24 歳頃、下肢のミオクローヌス増悪、32 歳頃より四肢に加え体幹にもミオクローヌス出現。44 歳よりミオクローヌスの全般化による意識消失発作が頻繁に認められるようになった。

神経学的所見では、明らかな見当識障害はなく、知能は長谷川式簡易知能評価スケールで 23 点。脳神経系では小脳性の構音障害あり。運動機能では、四肢と体幹に、時に安静時のミオクローヌスを認め、動作時にその増悪を認めました。筋萎縮、筋力低下なく、筋緊張は軽度低下していた。協調運動は、ミオクローヌスのため評価困難で、歩行は開脚歩行。非常に不安定で、継足歩

行は不能。深部腱反射は正常、病的反射もなく、感覚は正常。遺伝子診断により SCA-1, -2, -3, -6, -7, -8, -12, -17, DRPLA, MERRF は否定されている。以上の結果より、遺伝性ミオクローヌスてんかんである ULD を鑑別する必要が出てきた。

(2) 遺伝子解析

A. サザンブロッティング

患者末梢血からゲノム DNA を抽出後、その 5µg を制限酵素 Eco RI, Hin dIII 処理後、ミニゲル電気泳動装置 Mupid-2 で電気泳動後、改良した DNA blotting 法でナイロンメンブレンにトランスファーし(1)、CSTB 遺伝子のエクソン 2, 3 領域をプローブとしてサザンブロッティングを行った。

B. Methylation specific PCR 法

1µg のゲノム DNA を MethylDetector キット(ActiveMotif)を用いてバイサルファイト処理して、非メチル化部分の塩基配列を変えて、12 塩基繰り返し配列リピートの周辺を PCR 法で増幅した。

(倫理面への配慮)

本研究は、著者らが所属する各機関の研究倫理委員会で研究実施の承認を得た。

C. 研究結果

A. サザンブロッティング

本症例のゲノム DNA では、正常コントロールに比べて 200~400 塩基対程度のサイズの延長が認められ、ULD 患者に認められる CSTB 遺伝子プロモーター領域の 12 塩基繰り返し配列の延長が生じていると考えられた。正常バンドは約 5kb の所に出現するが、旧来のサザンブロッティングではバンドがシャープでなく、この程度のバンドのサイズの違いは見逃される可能性が考え