

- ⑦ 専用の遠心機ホルダーにカードを挿入し、バランスが合うようにホルダーを遠心機のポケットにおさめる (図3②)

この際、This side out という表示が外側になるようにする。カードは最大で12枚まで一度に遠心可能。われわれが使っている特注ローターの場合には、リザーバーを中心側にして直接水平にカードを装着し、ストッパーで固定する。一度に最大2枚まで装着可能。

- ⑧ 331 × g, 室温にて1分間遠心する

- ⑨ 一度気泡が入っていないか確認し、もう一度331 × g, 室温にて1分間遠心する

- ⑩ Array Cards専用のシーラーを実験台の上に準備し、スタートポジション (PULL TO RETURNと書いてある側) を手前側に来るように置き、Carriage をスタートポジションにセットする

- ⑪ カードをホイールが上になるようにシーラーにセットする (図3③)

この際、Fill ポートが向こう側になるようにして、シーラーのビンの位置に合わせて優しく押して固定する。

- ⑫ Carriage を向こう側 (図4では右方向) に止まるまでゆっくり押して、シーラー上をスライドさせる

この際、土台に手を置くと Carriage に挟まれて大変危険なので注意すること。

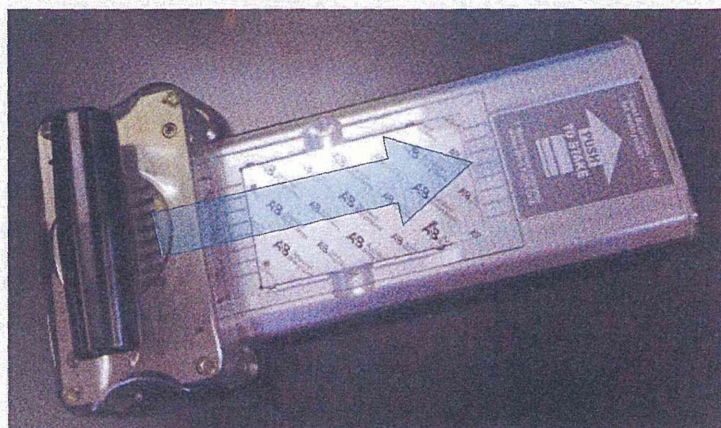


図4 シールの実際

- ⑬ カードに8本のくぼみができ、シールされるので、カードを取り出す

- ⑭ Fill リザーバーの部分をはさみで切り取る。これで、準備完了

以上の工程は、5～10分程度で完結する (384プレートに分注することと比較すると格段に操作が楽であることを実感でき、この点がこの手法の最も優れた所であると言える)。

- ⑮ カードを、専用トレイを装備した7900リアルタイムPCR装置にセットし、付属のSDSソフトウェアにて、以下の反応条件でランを行う (図3④)

〈リアルタイムPCR反応条件〉			TOTAL 90分
AmpErase UNG 活性化	50°C	2分	
↓			
AmpliTaq Gold DNA Polymerase 活性化	94.5°C	10分	
↓			
解離	97°C	30秒	
アニーリング/伸長反応	59.7°C	60秒	
			40サイクル

#### 4. データ解析

付属のSDSソフトウェアを用いて、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて解析を行う。この際、規定の内蔵性コントロール遺伝子をソフトウェア上で指定し、この遺伝子のCt値に対する差 ( $\Delta Ct$ 値) を計算させ、比較したいサンプルの $\Delta Ct$ 値との比較 ( $\Delta\Delta Ct$ ) により、相対定量が各遺伝子に対してなされる。なお、遺伝子情報はカードと一緒に提供されるファイルを読み込むことにより自動的に入力される。

#### トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	解決のための処置
ウェルに泡が入る	サンプル注入時に泡が入った	サンプル量は余裕が取ってあるので、全量を入れず少し残して泡を入れない。小さな泡であれば、ウェルに入ってもほとんど問題ない。
サンプルがウェル全体に入らない	遠心が不十分	遠心操作を追加する
内蔵性コントロールがばらつく	遺伝子が不適切	コントロール遺伝子を追加 (変更) する。グローバルノーマライゼーション法を採用する
増幅が悪い	RNA サンプルが分解している	可能であればRNAの再抽出
	cDNA量が少ない	cDNAサンプル量を増やす
	遺伝子の発現量が低い	別のプローブを試す 35サイクルを超えて増幅するような場合にはデータの信頼性が低いので注意する
増幅が途中で頭打ちになる	ウェルの中に泡が入った	あらかじめ予見された場合には、場所を記録しておきそのデータは排除する。ただし、Ct値としては使える場合もある
	スポットされたプローブ量が少ない	可能性としては考えられるが、確認は難しい
Array Cardsが入っていない (密閉されているので外からはわからない)	製造工程ミス	返品、交換

## 実験例

Array Cardsを使った実験結果の例を図4に示す。この実験では、Affymetrix社のGeneChip解析に用いたサンプルを使って、データの相関性を検証した。一部のデータのみ示したが、全体としてGeneChip解析のデータとArray Cardsのデータは非常によく一致しており、両者のデータの信頼性が確認できた。

また、Array Cardsデータの再現性について検討するため、異なるカード間での同一サンプルのCt値の比較を行ったところ、図5に示すように、両者は非常によく一致した。通常リアルタイムPCRの実験では複数のリプリケート（同一条件のウェル）を設定することが要求されるが、このデータの再現性から、あまり多くは必要なさそうであることが示唆された。

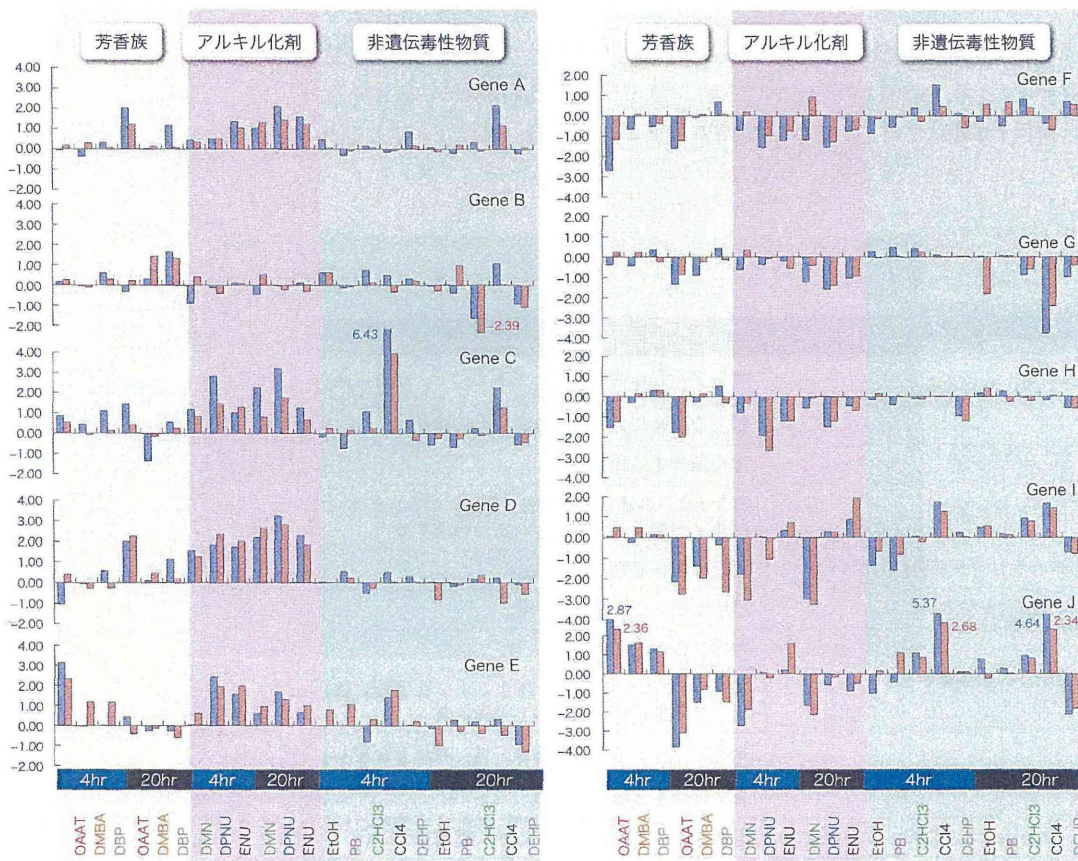


図4 Array CardsとGeneChipデータの相関性

■ Array Cards ■ GeneChip

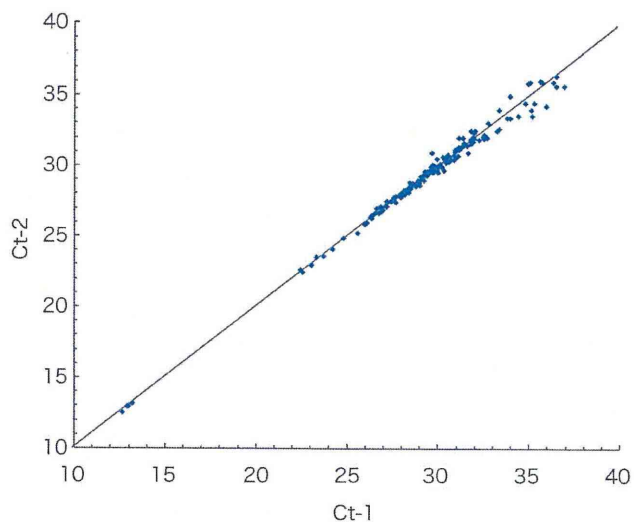


図5 同一ウェル間でのデータの再現性

## おわりに

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、新しい診断ツールとして注目されており、乳がんの予後予測用のMammaPrint (Agendia社)やOncotypeDX (Genomic Health社)のように海外ではすでに臨床応用されている例もある。一方、リアルタイムPCRを用いた例として、心臓移植後の拒絶反応を予測するAlloMap (XDx社)もFDAに承認されて使用されている。遺伝子数が一定の数(100程度)以下になれば、迅速性、簡便性の面から次世代型アレイとしてのArray CardsやOpenArray<sup>®</sup>は注目されるはずである。これらはマイクロRNAの発現解析やSNP解析への利用も期待され、基礎研究とともに今後診断ツールとしても普及していくと期待される。

### ◆ 参考文献

- 1) Cai, J. H. et al. : BioTechniques, 42 : 503-512, 2007
- 2) Yang, Y. et al. : Pharmacogenomics, 7 : 177-186, 2006
- 3) Goulter, A. B. et al. BMC Genomics 7 : 34, 2006
- 4) Abruzzo, L. V. et al. : Biotechniques, 38 : 785-792, 2005
- 5) Tuschl, G. & Mueller, S. O. : Toxicology, 218 : 205-215, 2006
- 6) Liu, R. et al. : N. Engl. J. Med., 356 : 217-226, 2007

### ◆ 参考図書

- 1) ラボマニュアルDNAチップとリアルタイムPCR (野島博/編), 講談社, 2006

## タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化に向けて

斎藤嘉朗<sup>#</sup>, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌

## Toward acceleration of drug development with proteomic and metabolomic biomarkers

Yoshiro Saito<sup>#</sup>, Keiko Maekawa, Kosuke Saito, Yoji Sato, Takayoshi Suzuki

Biomarkers, reflecting disease states or predicting/assessing drug efficacy or adverse reactions, are expected to play pivotal roles in effective drug development and promoting proper usage of drugs. To accelerate biomarker identification and usage, administrative guidance can direct to design appropriate exploration, validation and utilization studies and show examination procedures. However, very limited number of guidance or its draft were released from Japanese, US and European regulatory authorities so far. From 2012, we have been conducting proteomic and metabolomic studies using blood and urine samples from human and rat, in order to establish draft guidance for sampling/storage of these biofluid and for extrapolation of biomarker candidates from animals in the non-clinical to humans in the clinical studies. The results are still partial and the rest of the analysis is ongoing. However, we developed sensitive proteomic system for urine and found large inter-sex differences in the proteomic profiles of rat. In addition, matrix-, sex- and generation-differences were also observed in the metabolite levels in human blood, some of which showed over 2-fold differences. We continue this regulatory science studies for contribution to accelerated novel biomarker findings and its usage by generation of the draft guidance.

Keywords: Biomarker, Biofluid, Drug development, Metabolomics, Proteomics

## はじめに

バイオマーカーは、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療的処置に対する薬理学的反応の指標」と米国のバイオマーカー定義ワーキンググループにて定義されている<sup>1)</sup>。臨床的な最終評価指標を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。疾患の状態や医薬品の有効性確保および安全性向上のための指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数は急増している<sup>2)</sup>。さらに医薬品の市販後においても、各患者における有効性を最大限に確保し、副作用を最小限に抑え

るために、その利用が期待されている。重篤な副作用は死亡や重い後遺症につながることもあり、バイオマーカーの診断費用を含めても医療経済学的に有用との研究結果もある<sup>3)</sup>。

バイオマーカー自体は、新しい概念ではなく、例えば肝障害におけるアラニンアミノトランフェラーゼ (ALT) や腎障害におけるクレアチニンなど、古くから用いられているものも多い。しかし臓器障害がある程度重篤になってからしか上昇が見られない、または臓器特異性が低いなど、問題が多いマーカーも使われており、臨床現場では問題となっている。そのため、より早期に軽症の段階で検出しうる新規バイオマーカーの探索が活発に行われている。

バイオマーカーとしては、遺伝子多型やmRNAレベル等のゲノムバイオマーカーに関する検討が多くなされており、近年ではマイクロRNAも注目されている。しかし、遺伝子多型に関しては、ヒトに固有であり、一部の代謝酵素等を除いて非臨床試験段階で検討することは難しく、臨床試験段階で初めて十分なデータが得られる

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Yoshiro Saito; Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9528; Fax: +81-3-3700-9788; E-mail: yoshiro@nihs.go.jp

ため、医薬品開発の初期から利用することは難しい。一方で、血液や尿などの体液に含まれるタンパク質<sup>4)</sup>や内在性代謝物<sup>5)</sup>は、種差が報告されている分子が一部存在するものの、非臨床で用いられる動物から、臨床におけるヒトへの外挿は、多くの場合、理論的に可能と考えられる。

## 1. バイオマーカーとしての要件

医薬品開発において有用なバイオマーカーは、

- 1) 種差なく共通して変化し、非臨床から臨床への外挿が可能、
- 2) 疾病や医薬品の有効性および安全性と、その早期段階から感度・特異度高く相関、
- 3) 食事や運動等の環境要因を含め、目的とする要因以外による影響を受けにくい、

ものと考えられる。さらにバイオマーカーを適切に評価するためには、正確度および精度高く測定することが必要であり、これには

- 4) 生体試料を測定する機器や方法（バイオアナリシス）の要件
- 5) 測定する試料の品質に関する要件

も重要となる。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、各製薬会社はその利用方法を模索している状態である。

## 2. 行政的な動向

各国の規制当局である日本の厚生労働省/医薬品医療機器総合機構、米国・食品医薬品庁（FDA）、欧州・医薬品庁（EMA）もバイオマーカーについては注目しており、その積極的な利用を促進するため、いくつかのガイダンス等が公開されている。しかし、そのほとんどはゲノムバイオマーカーを対象にしており、タンパク質や内在性代謝物は対象外となっているものが多い。また、手続きに関する記載が多く、評価要件など技術的なものは少ない。

ゲノムバイオマーカーに関しては、その定義を「正常な生物学的過程、発病過程、及び/または治療的介入等への反応を示す指標となる、DNAもしくはRNAの測定可能な特性」としたゲノム薬理学における用語集について（ICH E15）<sup>6)</sup>を始め、ゲノムデータの申請方法（FDA）<sup>7)</sup>、バイオマーカーと診断法の同時開発（EMA）<sup>8)</sup>、臨床試験の研究デザインやデータ解析方法（EMA, FDA）<sup>9, 10)</sup>、薬物動態解析におけるゲノムバイオマーカー利用のスキーム（EMA）<sup>11)</sup>、医薬品の製造販売後監視におけるゲノムバイオマーカー利用の課題（EMA）<sup>12)</sup>、試料採取や保管・測定法・データ処理（EMA, FDA）<sup>13, 14)</sup>、に関するガイダンス（または案、コンセプトペーパーやリフレク

ションペーパーを含む）が公開されている。

一方、タンパク質や内在性代謝物に関してのガイダンスは、ほとんど無い。適格性確認のための資料における用法の記載要領、構成及び様式を定めた「医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー（ICH E16）」<sup>15)</sup>はゲノム以外のバイオマーカーを明示的には適用範囲としていないが、この文書に記載される原則は、タンパク質等の他のバイオマーカーについても適用可能としている。これ以外には、組織学的知見を陽性対照としたFDAの概要的ガイダンス案<sup>16)</sup>しかなく、実データを反映した明確な評価要件がないため、その探索・検証・利用は個別に模索している状態である。

このようにバイオマーカーの有用性を担保するための評価要件が確立していない状況では、不適切な試料の利用や不的確なバイオマーカーの利用により、かえって医薬品開発の遅延や混乱を招く可能性がある。今後は、ゲノム同様、タンパク質や内在性代謝物に関しても、測定試料の品質要件を始めとする多くのガイダンスを策定する必要がある。しかし、その策定の基礎となるデータは非常に乏しいのが現状である。

## 3. 体液中のタンパク質および内在性代謝物をバイオマーカーとする場合の、ガイダンス案策定に向けて

### 3-1. 研究班の目的、構成と期待される成果

平成24年度より厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究（研究代表者：斎藤嘉朗，研究分担者：熊谷雄治（北里大学），鈴木孝昌，前川京子）」が開始された。本研究は、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成の一環として、特に問題となる測定用試料の採取条件、および非臨床動物で見出されたバイオマーカーのヒトへの外挿性に関する評価要件案の作成を最終目標として、1) バイオマーカーの開発動向調査、2) 測定用血液・尿の採取等に関する要件の明確化、3) 動物モデルおよびヒト試料を用いた外挿性に関する実践的検討と、注意すべき評価要件の明確化、等を行うものである（図）。本研究の遂行により、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験への外挿に関する評価要件案が作成され、ガイダンス等として発出されると、本邦におけるバイオマーカーの開発および利用推進につながり、医薬品開発を効率化して新薬創出の増加に結びつくと期待される。またこれら試料採取に関する要件案および非臨床から臨床への外挿に関する評価要件案は、世界的にも例がなく、国際的にも

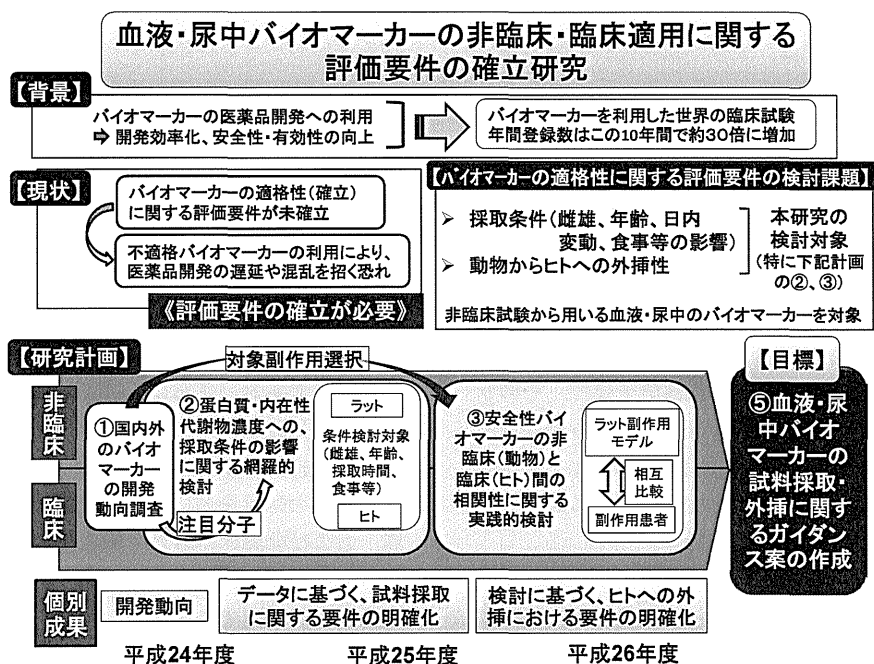


図 研究の背景、目的と計画

貢献できる研究である。

### 3-2. 研究の進捗状況

現在、三年計画の一年目が終了した段階であるが、下記の成果を挙げている。

#### 3-2-1. バイオマーカーの開発動向調査

開発動向としては、腎障害マーカーとして尿中Kim-1等の新規バイオマーカーが有用であることが報告されている<sup>17)</sup>。さらにタンパク質マーカーとしては、抗がん剤ゲムシタピンによる重篤な血液毒性(好中球減少および血小板減少)の発症と血中のハプトグロビンのレベルが有意に相関すること<sup>18)</sup>、血清中のアポリポ蛋白タンパク質Eのレベルが89%の正確性で薬物性肝障害患者と健康人を区別しうること<sup>19)</sup>等が報告されている。代謝物マーカーとしては、薬物性肝障害に関して、血中ALT+γ-グルタミルシトルリンのレベルがマーカーとなりうること<sup>20)</sup>、急性腎障害患者の血清を対象とした研究でアシルカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加、リゾホスファチジルコリンの減少<sup>21)</sup>が報告されている。

#### 3-2-2. プロテオミクス解析による尿中タンパク質に関する検討

ショットガンプロテオミクス法では、トリプシン消化後にタンパク質およびペプチド混合試料を、液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)で分析するが、尿中に

は高発現量のタンパク質があり、そのため微量のタンパク質は検出できない<sup>22)</sup>。そこで、雄ラット尿を用いて、有機溶媒による簡便な高発現タンパク質の除去に関する前処理条件の検討を行った。収率は低くなるものの高発現のタンパク質を効率的に除去し、低濃度のタンパク質を中心に一回の分析で700種以上を同定しうる系を構築した。これを用いて、ラット尿中のプロテオーム解析を行った。雌雄間の比較では、予想されたように差が認められ、特に雌雄のいずれかのみで発現が認められるタンパク質が、同定タンパク質数の約1/3程度を占めた。食事影響については、比較的小さいものであった。従って、非臨床試験に用いるラットの尿を対象としたタンパク質バイオマーカーの探索と候補の選択に当たっては、性差を十分考慮に入れる必要があると示唆された。一方、食事影響については、重要でないと考えられた。

さらに平成25年度の解析としては、高齢群の一部の個体において、ばらつきの原因となる高発現量のタンパク質の存在が明らかとなり、注意が必要であることが示唆されている。

#### 3-3. メタボロミクス解析による血中内在性代謝物に関する検討

内在性代謝物は親水性の高いもの(糖リン酸や核酸等)から低いもの(リン脂質やトリアシルグリセロール等)まで、その分子論的な性質は多様である。このため、現在の技術では一つの方法で全ての種類の内在性代謝物を

測定することは不可能であり、複数の方法を組み合わせる必要がある。本研究では、大きく親水性代謝物と疎水性代謝物に分類し、前者はLC/MSとガスクロマトグラフィー質量分析計にて、後者はLC/MSにて、カラム等の条件を変えて測定を行った。

まず絶食後のヒト血液試料に関し、内在性代謝物濃度への採取・背景条件（性別、年齢、血漿・血清）および保管条件（凍結融解）の影響を、網羅的に明らかにした。測定可能であった代謝物数は、約550種である。血漿と血清間の比較では、親水性および疎水性代謝物共に、血液凝固に関係する代謝物群などの一部分子種で、そのレベルが血漿・血清間で大きく異なることが明らかになった。2倍以上のレベル差を示した代謝物数は、若年男性、老年男性、若年女性、老年女性のいずれの群でも30種程度で、親水性代謝物が多かった。

男女差に関しては、有意なレベル差のある代謝物が、老年よりも若年で多く認められた。若年ではアミノ酸類が男性において、脂肪酸類が女性において有意に高いレベルを示した。また年齢にかかわらず、女性でスフィンゴミエリンレベルが有意に高い傾向を示した。男女間で2倍以上の差があった代謝物は、若年血漿、老年血漿、若年血清、老年血清で、それぞれ数種であった。

年齢（30歳程度と60歳程度）に関しては、レベルに有意な差のある代謝物は、男性よりも女性で多く認められた。女性では、黄体ホルモン代謝物等が若年において、胆汁酸代謝物やトリアシルグリセロール等が老年において有意に高いレベルを示した。若年・老年間で2倍以上の差があった代謝物は、男性血漿、男性血清、女性血漿、女性血清で、それぞれ10種程度であった。

さらに若年男性の血漿と血清に関し、凍結融解回数（2回と10回）による相違について検討を行った。凍結融解を繰り返した場合、親水性代謝物では、血清と比べ血漿で大きなレベルの変化が認められる分子種が多かった。一方、疎水性代謝物では、血漿・血清ともに、ほぼすべてのリン脂質分子種等で、20-30%程度のレベル減少が認められた。

以上の結果、健常人というバックグラウンドレベルで、各条件につき2倍以上の差が認められた代謝物は、バイオマーカーの探索・診断の際に十分注意すべきであると考えられた。また、臨床におけるバイオマーカー診断に際しては、検体を選択することは不可能であり、検体間において普遍的なバイオマーカーが求められる。したがって、内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する際には、1) 血液試料として、血漿・血清のいずれでも利用可能だが、親水性代謝物の場合は凍結融解の影響を考慮すると血清が望ましく、疎水性代謝物の場合は、血液凝固過程の影響を受けにくい血漿が望ましいこと、

2) 検出率が高く、試料背景間および各試料背景内における差異の小さい代謝物をバイオマーカーとして選択すること、3) 以上を満たせない場合には、これら背景的差异に対して、病気や薬剤反応性などによる差異が相対的に大きい代謝物（程度については、今後、検討予定）を選択すべきであること、が示唆された。

#### 4. 研究の将来展望

今後は、健常ラットと健常人におけるタンパク質および内在性代謝物レベルの相違（外挿性）について検討を行う予定である。さらに、特定の副作用に関し、ラットのモデル系と副作用患者の試料を比較して、副作用マーカーの外挿性を検討する。

これらの知見を基に、バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験へのバイオマーカーの外挿に関する血液・尿中バイオマーカーの評価要件案を作成する予定である。

#### 5. おわりに

総合科学技術会議は平成25年4月17日の会議で、「個別化医療の世界的研究開発競争における日本の出遅れ、および創薬力の低下」を指摘している。本邦におけるバイオマーカー探索・同定とその医薬品開発への応用の早期実現は、まさに待ったなしの状況である。本研究の遂行によるガイダンス案の作成は、バイオマーカー評価の一部ではあるが、国としての基準を示すものとなり、本邦におけるバイオマーカー開発とその利用を通じた医薬品開発の活性化につながると期待される。今後とも医薬品の品質、有効性および安全性を確保するための研究機関として、医薬品の開発と適正使用の推進に向けた適切な規制のための研究という社会的な役割を十分に果たしていきたい。

謝辞：本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究」（H24-医薬-指定-028）によるものである。

#### 引用文献

- 1) Biomarkers Definitions Working Group.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95 (2001).
- 2) Phillips, K.A., Van Bebbber, S. and Issa, A.M.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 463-9 (2006).
- 3) Dong, D., Sung, C., Finkelstein, E.A.: *Neurology.* 79, 1259-67 (2012).
- 4) Feng, Z., Prentice, R. and Srivastava, S.: *Pharma-*



- cogenomics*. 5, 709-19 (2004).
- 5) Kell, D.B.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7, 329-33 (2007).
  - 6) ゲノム薬理学における用語集. 薬食審査発第0109013号, 薬食安発第0109002号, 平成20年1月9日
  - 7) Pharmacogenomic Data Submission. FDA, March 2005.
  - 8) Reflection paper on co-development of pharmacogenomic biomarkers and Assays in the context of drug development (Draft). EMA/CHMP/641298/2008, 24 June 2010.
  - 9) Reflection paper on methodological issues associated with pharmacogenomic biomarkers in relation to clinical development and patient selection (Draft). EMA/446337/2011, 9 June 2011.
  - 10) Clinical Pharmacogenomics: Premarket Evaluation in Early-Phase Clinical Studies and Recommendations for Labeling. FDA, January 2013.
  - 11) Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/37646/2009, 12 December 2011.
  - 12) Concept paper on key aspects for the use of pharmacogenomic methodologies in the pharmacovigilance evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/917570/2011, 15 December 2011.
  - 13) Reflection paper on pharmacogenomic samples, testing and data handling. EMEA/CHMP/Pgx-WP/201914/2006, 15 November 2007.
  - 14) Pharmacogenomic Data Submission-Companion Guidance (Draft). FDA, August 2007.
  - 15) 医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発における バイオマーカー: 適格性確認のための資料における用法の記載 要領, 資料の構成及び様式. 薬食審査発0120第1号, 薬食安発0120第1号, 平成23年1月20日.
  - 16) Use of histology in biomarker qualification studies (Draft). FDA, December 2011.
  - 17) Fuchs, T.C. and Hewitt, P.: *AAPS J.* 13, 615-31 (2011).
  - 18) Matsubara, J., Ono, M., Negishi, A., Ueno, H., Okusaka, T., Furuse, J., Furuta, K., Sugiyama, E., Saito, Y., Kaniwa, N., Sawada, J., Honda, K., Sakuma, T., Chiba, T., Saijo, N., Hirohashi, S. and Yamada, T.: *J. Clin. Oncol.* 27, 2261-8 (2009).
  - 19) Bell, L.N., Vuppalachchi, R., Watkins, P.B., Bonkovsky, H.L., Serrano, J., Fontana, R.J., Wang, M., Rochon, J., Chalasani, N.; US Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) Research Group: *Aliment Pharmacol. Ther.* 35, 600-12 (2012).
  - 20) Soga, T., Sugimoto, M., Honma, M., Mori, M., Igarashi, K., Kashikura, K., Ikeda, S., Hirayama, A., Yamamoto, T., Yoshida, H., Otsuka, M., Tsuji, S., Yatomi, Y., Sakuragawa, T., Watanabe, H., Nihei, K., Saito, T., Kawata, S., Suzuki, H., Tomita, M. and Suematsu, M.: *J Hepatol.* 55, 896-905 (2011).
  - 21) Sun, J., Shannon, M., Ando, Y., Schnackenberg, L.K., Khan, N.A., Portilla, D., Beger, R.D.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-4, 107-113 (2012).
  - 22) Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J.L. and Schanstra, J.P.: *Mol. Cell. Proteomics.* 7, 1850-62 (2008).

## ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦と その原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析

中村里香, 酒井信夫, 藪島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子<sup>#</sup>

### Comprehensive analyses of hydrolyzed wheat protein using shotgun proteomics

Rika Nakamura, Shinobu Sakai, Yuji Haishima, Chie Fukui, Takayoshi Suzuki, Ryosuke Nakamura, Akiko Hachisuka, Reiko Adachi, Reiko Teshima<sup>#</sup>

Hydrolyzed wheat protein (HWP; hydrolyzed gluten) is used in various types of products worldwide. Several cases of wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis following exposure to HWP (Glupearl 19S) in cosmetics have been reported. Glupearl 19S was produced from the gluten after partial hydrolysis with hydrogen chloride, and its allergenicity is larger than that of gluten (Adachi R., *Allergy* 2012;67:1392-9). It is considered that provocation of allergic manifestations is caused by deamidated gluten in food and/or non-food products. Moreover, an increasing number of studies have shown that HWP can induce IgE-mediated hypersensitivity by skin contact and/or food ingestion. However, the essential molecular properties and profiles of HWP are still unknown. In this study, bioinformatic and multivariate analyses using shotgun proteomics have revealed that 27 proteins significantly decreased in Glupearl 19S compared with intact gluten as shown by the ratio of ion signal intensity of tryptic peptides. In contrast, a single protein significantly increased in HWP compared with intact gluten as shown by the ratio of ion signal intensity of tryptic peptides. Furthermore, we have identified six Glupearl 19S-specific peptides using shotgun proteomics, database searches on Mascot Sequence Query, and *de novo* sequencing. The six peptides were identified as the specific markers of Glupearl 19S.

Keywords: hydrolyzed wheat protein, shotgun proteomics, mass spectrometry, deamidation

#### 緒言

近年、加水分解小麦 (hydrolyzed wheat protein, HWP) を含有する洗顔用石鹸の長期使用において、小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (Wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis; WDEIA) を発症した事例が数多く報告され、本邦にて大きな社会問題となっている<sup>1-2)</sup>。このアレルギー病態の特徴は、当該石鹸の使用前には小麦アレルギーの既往症の無かった人が、石鹸中に含まれるHWP (グルパール19S<sup>®</sup>, Glupearl 19S) によって経皮・経粘膜的に感作され、その後の小麦の摂食

によりWDEIAを発症することにある。

小麦タンパク質の主成分であるグルテンは、可溶性小麦タンパク質であるグロブリンを水で洗い流した後の残渣に含まれるエタノール可溶性画分に分画される。これを加水分解すると、タンパク質が部分的に切断されて可溶性が増大するため、起泡性や手触りを良くする目的で、シャンプー等の化粧品・医薬部外品にHWPが使用されている。グルパール19Sは、小麦グルテンを部分的に酸加水分解して製造された化粧品原料で、比較的分子量の大きなペプチド断片が残存している<sup>1)</sup>。一般的にタンパク質を加水分解、低分子化することによりその抗原性は減弱すると考えられているが、HWPにおいては、酸加水分解によってグルテンよりも抗原性が増強することが明らかになっている<sup>1-3)</sup>。酸加水分解によりグルテンの抗原性が増強する理由としては、可溶性の増大により生体内に侵入しやすくなっていること、更に酸によりタンパク質の一次構造に物理化学的変化が生じ、新たな

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Reiko Teshima; Division of Novel Foods and Immunology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1349; Fax: +81-3-3700-7438; E-mail: rteshima@nihs.go.jp

エピトープが生じている可能性等が考えられている。グルテンタンパク質の物理化学的変化としては、セリアック病でグルタミン残基の脱アミド化が抗原性に寄与していることが報告されている<sup>4)</sup>。我々は、グルタミン酸残基及びアスパラギン酸残基を特異的に切断する酵素であるV8プロテアーゼを用いて、グルパール19Sのタンパク質に含まれるグルタミン残基及びアスパラギン残基が脱アミド化修飾されていることを明らかにしているが<sup>5)</sup>、ペプチドレベルでの研究は未だ行われていない。また我々は、グルテンを原料として酸加水分解を行ったHWPは、30分から1時間程度の部分的な分解によって抗原性が顕著に増強し、更に長時間分解を進めることにより、分子量の減少と共に抗原性が減弱することを明らかにしている<sup>6)</sup>。これらの知見から、ある特定の加水分解条件によって生成されたHWPのみが抗原性を有することが示唆されているが、分子量以外に抗原性の指標となるファクターは明らかにされていない。

そこで本研究は、強い抗原性を有するグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索を目的とし、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いた網羅的解析を行った。同時に、グルテンとHWPのペプチドプロファイリングを比較するショットガンプロテオミクスにより、酸加水分解によるHWPの一次構造の物理化学的変化を推察した。

## 実験方法

### 1. 試料

グルパール19S<sup>®</sup>は、株式会社片山化学工業研究所より入手した。グルテン(Sigma社)及びグルパール19S粉末に乾燥重量で100 mg/mLとなるよう1M Tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane, pH 11.4]を加え、終夜室温で静置しストック懸濁液を調製した。また、抗原性が減弱したHWPとして、酸加水分解を24時間行った低分子化HWP(HWP24h)を調製した。酸加水分解は、0.1N塩酸中にグルテンストック懸濁液を終濃度1 mg/mLとなるよう加え、100°Cのヒートブロック上で所定の時間(0-24h)加熱して行った。その後、経時的に0.1M水酸化ナトリウム水溶液で中和して酸加水分解反応を停止した。グルテン、グルパール19S、及び経時的な酸加水分解により調製した8種HWPのSDS電気泳動パターンをFig. 1に示す。

LC-MSサンプルの調製は、以下に示す方法で行った。グルテン及びグルパール19Sのストック懸濁液に細胞溶解液[7M urea, 2M thiourea, 30 mM Tris, 4% (w/w) CHAPS; pH 8.5]を加えてタンパク質を溶解させた後、2-D Quant Kit (GE Healthcare社)を用いてタンパク質量を定量し、その20 µgをトリプシン消化に供し

た。Dithiothreitolで還元、IodoacetamideでSH基のカルボキシメチル化を行った後、Trypsin Gold, Protease MAX (Promega社)を加えて37°Cで終夜インキュベートした。10% Trifluoroacetic acid (TFA)を終濃度0.5%となるよう加えて酵素反応を停止し、得られたペプチドをバリアン社製OMIX Tip (C18, 100 µL)にて脱塩し、0.1% TFA含有2%アセトニトリルに再溶解した。

## 2. 装置

### ・質量分析計

Thermo Scientific社製リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計LTQ Orbitrap XL  
測定前にTyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.)を用いてチューニング及び質量校正を行った。

### ・Nano-LC

HTC-PALオートサンプラー (CTC Analytics) を装備したADVANCE nano UPLC (AMR)

### ・トラップカートリッジ

CERI社製L-Trap (0.3×5 mm, L-C18, 5 µm, 12 nm)

### ・分析用逆相カラム

CERI社製L-column Micro (L-C18, 0.1×150 mm, 3 µm, 12 nm)

### LC-MS/MS条件

イオン源にはCaptive Ion Sprayシステムを使用し、試料のイオン化はESI positive ion mode (スプレー電圧1.6 kV)により行った。MSスペクトルはFT analyser (分解能30,000, 測定質量範囲m/z 300-1,400, Lock mass = フタル酸ジエチルヘキシル及びシロキサン, Profile mode)により取得し、XCalibur data dependent modeにより、スキャンにおけるイオン強度の高い3種のピークを順次選択してイオントラップによりMS/MSスペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。測定時間は150分間とし、価数判別機能を利用して1価イオンのMS/MSスペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LCの移動相には、A溶媒 (0.1%ギ酸含有2%アセトニトリル) とB溶媒 (100%アセトニトリル) を使用した。流速は300 nL/minとし、サンプル注入 (1.0 µg) はオートサンプラーを使用して行った。1分析あたりの溶出時間は150分とし、サンプル注入後、0-40% B/125 min → 40-55% B/130 min → 55-100% B/135 min → 100% B/145 min → 0% B/160 minのグラジエントプログラムで溶出した。

### 3. 試験操作

#### 3.1. ショットガンプロテオミクスによる網羅的な構成タンパク質変動比較

グルテン及びグルパール19SのMSデータは各2回ずつ取得し、全データをi-RUBYソフトウェア (メディカルプロテオスコープ) にアップロードし、Mascot/UniProt/NCBI nr (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、MS/MSスペクトル相同性に基づくピークマッチングと保持時間補正を行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

#### 3.2. グルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の検討

ペプチド結合の開裂解析には、Proteome Discovererソフトウェア上でのMascot検索条件の消化酵素設定を“None”とし、同定されたペプチド配列のうち末端がトリプシン切断部位でない酸加水分解によるペプチド結合の切断の割合を算出した。

脱アミド化の分析には、Mascot検索条件のvariable modification設定に“deamidation (NQ)”を追加し、脱アミド化修飾されたペプチドを同定した。

#### 3.3. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

グルテン、グルパール19S及びHWP24hのMSデータをプロテオーム定量解析ソフトウェアProgenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics社) にアップロードし、Swiss-Prot (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、イメージ解析によるピークマッチングと保持時間補正を行い、3サンプル間各ペプチドピークのシグナル強度を比較した。タンパク質の同定はProteome Discovererソフトウェア (Thermo Scientific社) を使用したMascot検索 (NCBI nrデータベース, Taxonomy; Green plants) を並行して行った。

#### 3.4. *de novo* sequencingによるペプチド配列の推定

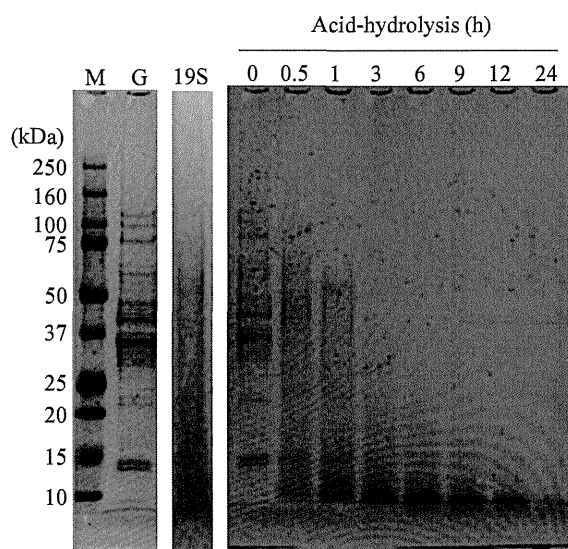
*de novo* sequencingにはPEAKS Studio v6.0 (インフォコム社) を使用した。消化酵素設定を“None”としてアミノ酸配列の推定を行った。TLC (Total Local Confidence) が60%以上のスコア値を示したアミノ酸配列を信頼度の高いデータと判断し、その配列をNCBI protein-protein BLAST (blastp) 検索 (Taxonomy; Green plants) に供した。

## 結果

### 1. SDS電気泳動による分子量の比較

グルテン、グルパール19S、及び経時的な酸加水分解

により調製した8種HWPのSDS電気泳動パターンをFig. 1に示す。グルテンでは構成タンパク質が明確なバンド状に現れるのに対し (lane G), グルパール19Sでは明確なバンドは認められず100 kDa以下にラダー状のパターンが認められた (lane 19S)。経時的な酸加水分解により調製したHWPでは、0.5h加水分解物がグルパール19Sと同様に高分子領域にラダー状のバンドを呈していた。加水分解の時間経過と共にラダーが低分子領域にシフトし、24h経過後には15 kDa以上の明瞭なバンドが完全に消失した。



**Fig. 1 SDS-PAGE pattern of gluten, Glupearl 19S and HWP**

Gluten, Glupearl 19S, and HWP (2.5 µg protein/lane) were separated in a 10-20% acrylamide gel (D.R.C. Co., Ltd.) and the gel was stained with coomassie brilliant blue. Lane M, molecular weight marker; lane 19S, Glupearl 19S; lane G, native gluten

### 2. ショットガンプロテオミクスによるグルパール19Sとグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

グルパール19Sとグルテンとの比較において、酸加水分解の過程でどのような構成タンパク質に変化が生じているかを明らかにするため、ショットガンプロテオーム解析を行った。グルテン及びグルパール19Sのトリプシン消化物より取得したMS/MSデータを、i-RUBYソフトウェアにてGreen plantsのタンパク質データベース内で検索したところ、発現比較の対象となるタンパク質の総数は5,074であった。そのうち変動比較の候補タンパク質をイネ科コムギ属 (*Triticum*) としたところ、954のタンパク質を絞り込むに至った。これら候補タンパク質のうち、グルテンとグルパール19Sとの間の発現比が5倍以上または1/5以下であるタンパク質は268 (28.1%)

であった。更に対象をコムギ (*Triticum aestivum*, common wheat) とし、候補タンパク質中の重複を除いた28タンパク質の発現比をTable 1に示した。

グルテンと比較して、グルパール19Sにおけるシグナル比が1/5以下に減少しているタンパク質数は27であり、 $\gamma$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン等の主要な小麦アレルゲンタンパク質が含まれていた。一方、グルテンと比較して、グルパール19Sにおけるシグナル比が5倍以上に増加したタンパク質数はわずか1であり、そのタンパク質はHistone H4であった。

### 3. グルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の分析

前項に示したショットガンプロテオーム解析では、グルテンにおいて検出されたトリプシン消化ペプチドの多くがグルパール19Sにおいては検出されなかった。この原因として、HWPはグルテンの酸加水分解過程において、ペプチド結合の非酵素的な開裂やグルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化が生じている可能性が考えられた。そこでペプチド結合の開裂とグルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化を分析するため、ト

リプシン消化ペプチドのMS/MS検索条件の消化酵素設定を“None”とし、NCBI nrおよびSwiss-Protデータベース (Taxonomy; Green plants) 内でのデータベース検索を行った。その結果、グルパール19Sでは全911ペプチドがヒットし、そのうちペプチドの末端がトリプシン特異的残基 (Arginine, R; Lysine, K) 以外のアミノ酸残基、つまり非酵素的に切断されていたペプチドの総数は353 (38.7%) であった。一方、HWP 24hでは全496ペプチドがヒットし、そのうち299ペプチド (60.3%) の末端が非酵素的に切断されていることが明らかになった (データ示さず)。

また、グルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化修飾を評価する目的で、データベース検索条件のvariable modification設定に“deamidation (NQ)”を追加し、グルタミンとアスパラギンの脱アミド化の解析を行った。その結果、Table 1に挙げられた小麦の主要アレルゲン (High molecular weight glutenin subunit, Gamma-gliadin, LMW-m glutenin subunit, alpha gliadin, Alpha/beta-gliadin) において、数種の脱アミド化修飾のバリエーションをもつ同一のペプチド配列が同定された (Table 2)。脱アミド化修飾部位をもたないペプチド

Table 1 Differences in the protein expression between gluten and Glupearl 19S

	Hit Title	Description	Glupearl 19S/Gluten Ratio	Peptide Count	Max Protein Score
1	gi 32400748	seed storage protein [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.002	3	104.74
2	gi 147883548	alpha-gliadin [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.008	3	91.80
3	GDA9_WHEAT	Alpha/beta-gliadin MM1 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=1 SV=1	0.010	2	94.08
4	NLT2G_WHEAT	Non-specific lipid-transfer protein 2G OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=1 SV=1	0.017	2	29.09
5	GDA7_WHEAT	Alpha/beta-gliadin clone PW8142 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=1	0.024	5	130.97
6	gi 94315065	1Bx high molecular weight glutenin subunit [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.040	5	154.19
7	gi 32400762	AmiB [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.050	5	138.05
8	GDA2_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-II OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=1	0.053	3	103.12
9	GDA0_WHEAT	Alpha/beta-gliadin OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=2	0.077	2	93.49
10	GDB0_WHEAT	Gamma-gliadin (Fragment) OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=1	0.087	2	61.19
11	gi 209971843	gamma-gliadin [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.096	11	316.23
12	gi 110341796	Y-type HMW glutenin [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.098	8	136.29
13	gi 162415987	high molecular weight glutenin subunit [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.107	7	180.66
14	gi 21749	unnamed protein product [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.107	7	180.66
15	gi 4007846	beta purothionin [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.114	2	71.28
16	gi 170743	HMW glutenin subunit Ax2* [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.114	11	179.43
17	gi 133741924	gamma gliadin [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.136	6	348.99
18	gi 21743	high molecular weight glutenin subunit 1Ax1 [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.141	9	129.82
19	gi 32400760	unknown [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.141	2	66.43
20	gi 663263	15kDa grain softness protein [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.157	3	139.48
21	gi 238800252	low molecular weight glutenin [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.159	8	411.25
22	gi 164470672	LMW-m glutenin subunit 0877L13-M [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.162	7	390.57
23	GDBB_WHEAT	Gamma-gliadin B OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=1	0.162	5	254.97
24	gi 169788569	putative puroindoline-like protein [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.180	2	58.79
25	gi 221855615	gamma-gliadin [ <i>Triticum aestivum</i> subsp. macha]	0.182	3	110.61
26	gi 148508784	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [ <i>Triticum aestivum</i> ]	0.195	3	129.82
27	GLT0_WHEAT	Glutenin, high molecular weight subunit DY10 OS= <i>Triticum aestivum</i> GN=GLU-D1-2B PE=3 SV=1	0.198	18	391.19
28	H41_WHEAT	Histone H4 variant TH011 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=2	5.700	5	100.12

はその90%以上がグルテンにおいて検出されたのに対し、脱アミド化修飾数が1つ以上のペプチドは主としてグルパール19Sにおいて検出された。

#### 4. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

次に、グルパール19Sのように強い抗原性を有するHWPに特徴的なペプチドを同定することを目的として、グルテン、グルパール19S、及び抗原性を示さないHWP24hから得られたペプチドのMSデータを多変量解析により比較し、グルパール19Sにのみ特徴的に発現するペプチドの探索を行った。

Progenesis LC-MSソフトウェアを用いて3サンプル間のMS<sup>1</sup>のピーク強度を比較した。観測された32,749本の総ピークより、グルテン及びHWP24hのピーク強度がグルパール19Sのピーク強度の1%未満である179本のピークを抽出し、更にタンパク質消化物に由来すると考えられる10本のピークをグルパール19Sに特徴的なペプチドとして絞り込んだ (Table 3)。

Progenesis LC-MS上でMascot検索 (データベース: Swiss-Prot, Taxonomy: Green plants) を行ったところ、

2本のペプチドピークをPuroindoline A (#6) 及び $\alpha$ / $\beta$ -gliadin clone PW1215 (#8) と同定した (Table 4)。

また、Proteome Discovererソフトウェアを用いたMascot検索 (データベース: NCBI nr, Taxonomy: Green plants) を行ったところ、更に2本のペプチドピークをHMW glutenin subunit (#1及び#5) と同定するに至った。これら4本のペプチド配列には、脱アミド化修飾が認められた。

残り6本の候補ピークについては、それらのMS/MSデータをPEAKS Studioソフトウェアにアップロードして*de novo* sequencingを試みた。TLCスコア60%以上を信頼度の高いデータと判断し、2本のペプチド配列 (#3及び#9) を予測するに至った (Fig. 2)。この予測配列をprotein-protein BLAST (blastp) 検索に供することにより、イネ科コムギ属 (*Triticum*) のタンパク質の部分配列であるNADP-dependent malic enzyme 1 (#3) 及びWIR1 (#9) がヒットした (Table 4)。残りの4本のピーク (#2, #4, #7, 及び#10) はMS/MSの取得情報が少なく、TLCスコア60%以上の信頼度において、それらのペプチド配列を予測することができなかった。

Table 2 List of representative deamidated peptides in the major wheat allergens

Peptide ID	Peptide sequence	Compositional ratio (%)		Count	Charge	m/z	Peak retention time
		Gluparl 19S	Gluten				
High molecular weight glutenin subunit							
2426	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGPALLR.R	3	97	33	3	1056.208	104.5
4225	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGPALLR.R + 1Deamidated (NQ)	91	9	33	3	1056.537	106.9
1055	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGPALLR.R + 2 Deamidated (NQ)	95	5	33	3	1056.863	107.5
50	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGPALLR.R + 3 Deamidated (NQ)	99	1	33	3	1057.192	111.3
3535	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGPALLR.R + 4 Deamidated (NQ)	99	1	33	3	1057.522	114.3
Gamma-gliadin							
3671	R.RPLFQLVQGGQHQPQPAQLEVIR.S	2	98	14	3	952.8804	70.6
4406	R.RPLFQLVQGGQHQPQPAQLEVIR.S + 1Deamidated (NQ)	87	13	14	3	953.2072	71.3
1397	R.RPLFQLVQGGQHQPQPAQLEVIR.S + 2 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	953.5348	72.6
36	R.RPLFQLVQGGQHQPQPAQLEVIR.S + 3 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	953.8628	73.8
6220	R.RPLFQLVQGGQHQPQPAQLEVIR.S + 4 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	954.1912	74.4
194	R.RPLFQLVQGGQHQPQPAQLEVIR.S + 5 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	954.5197	75.3
3200	R.RPLFQLVQGGQHQPQPAQLEVIR.S + 6 Deamidated (NQ)	83	17	14	3	954.8472	76.8
LMW-m glutenin subunit 0877L13-M							
1665	K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S	9	91	81	3	687.3517	58.0
273	K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S + 1Deamidated (NQ)	98	2	81	3	687.6814	63.2
1456	K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S + 3 Deamidated (NQ)	100	0	81	3	688.3355	62.2
345	K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S + 4 Deamidated (NQ)	100	0	81	3	688.6638	63.6
Alpha gliadin							
3707	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.L	0	100	4	4	1045.279	75.1
8911	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.L + 2 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1045.765	73.7
5960	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.L + 3 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1046.014	80.3
7138	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.L + 4 Deamidated (NQ)	87	13	4	4	1046.260	82.9
2715	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.L + 5 Deamidated (NQ)	37	63	4	4	1046.505	84.1
3776	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.Q	0	100	4	4	1045.279	75.1
13628	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.Q + 2 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1045.765	73.7
10675	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.Q + 3 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1046.014	80.3
7256	R.DVIVLQQHNI AHESQV LQSSYQV LQLCCQQLR.Q + 5 Deamidated (NQ)	37	63	4	4	1046.505	84.1
Alpha/beta-gliadin							
2402	R.NLALQTL PAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.-	0	100	3	3	1119.559	100.9
3825	R.NLALQTL PAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 1Deamidated (NQ)	90	10	3	3	1119.884	102.1
1257	R.NLALQTL PAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 2 Deamidated (NQ)	97	3	3	3	1120.213	103.4
6282	R.NLALQTL PAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 3 Deamidated (NQ)	99	1	3	3	1120.543	104.6

Table 3 The specific peptides in Glupearl 19S

peptide No.	m/z [Da]	charge	Retention time [min]	Normalized abundance		
				Glupearl 19S	HWP24h	Gluten
1	652.821	2	32.59	50890	297	191
2	652.821	2	34.24	45905	220	285
3	500.759	2	56.88	37989	309	9
4	324.121	2	50.77	32961	97	275
5	486.297	2	45.97	32003	134	176
6	763.804	2	40.89	27374	194	120
7	566.723	2	32.95	8217	30	17
8	513.800	2	53.25	5804	0	2
9	518.250	2	53.16	5119	0	50
10	446.245	2	88.20	2964	0	0

Table 4 Sequences of the specific peptides in Glupearl 19S identified by bioinformatics

peptide No.	method	Sequence	Ion Score	$\Delta M$ [ppm]	Accession	Description
1	MS/MS ion search	<b>Q</b> *YEQQPVVPSK	32	-1.70	gi: 162415987	high molecular weight glutenin subunit [Triticum aestivum]
2	-	not identified	-	-	-	-
3	de novo sequencing	TMYKPVVY	65	-	ABY25986.1	NADP-dependent malic enzyme 1 [Triticum aestivum] 638 MYTPV 642 192 PVVY 195
4	-	not identified	-	-	-	-
5	MS/MS ion search	LVAVS <b>Q</b> VVVR	33	-1.16	gi: 14329763	high molecular weight glutenin subunit y [Triticum aestivum]
6	MS/MS ion search	GG <b>C</b> QELLG <b>E</b> CCSR	47	-1.75	P33432	Puroindoline-A OS=Triticum aestivum GN=PINA PE=1 SV=2 - [PUIA_WHEAT]
7	-	not identified	-	-	-	-
8	MS/MS ion search	NLAL <b>Q</b> TLPR	41	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
		NLAL <b>Q</b> TLPR	25	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
9	de novo sequencing	YR <b>C</b> YAFR	70	-	CAA61018.1	WIR1 [Triticum aestivum] 70 YRCY 73 126 RCYAFR 131
10	-	not identified	-	-	-	-

\* Modified residues are represented in Bold (**Q**, **N**: deamidation, **C**: carbamidomethylation).

## 考察

### 1. SDS電気泳動による分子量の比較

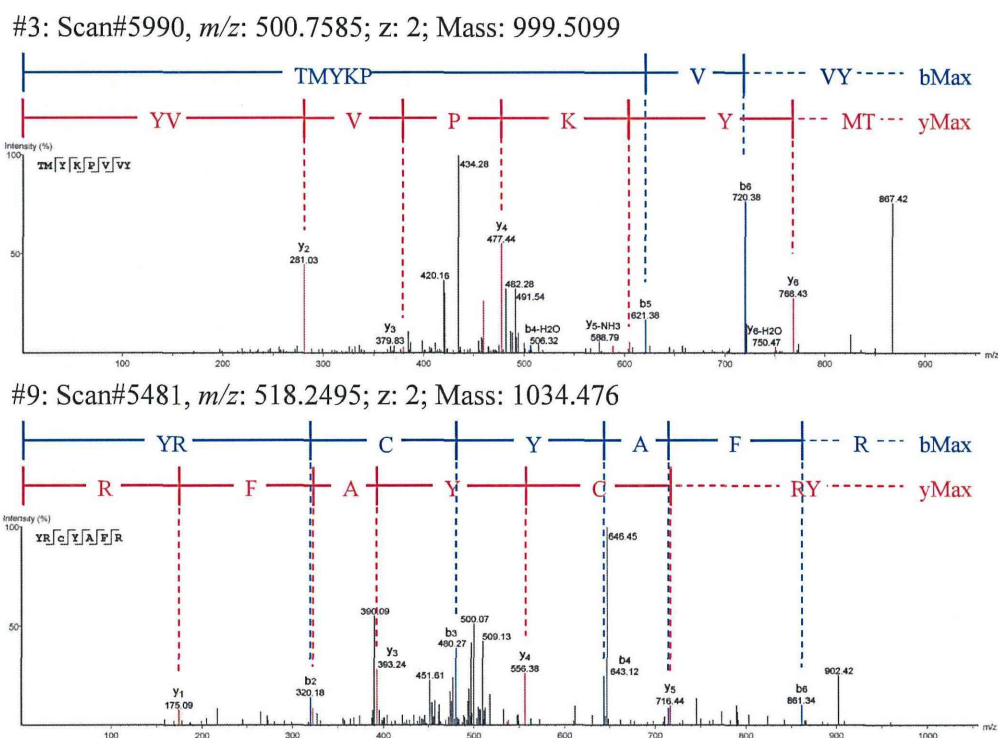
グルテンを酸加水分解して製造したグルパール19Sは、SDS電気泳動パターンがラダー状であった (Fig. 1)。これは、酸加水分解によりグルテン構成タンパク質のペプチド結合がランダムに切断されていることに加え、本来の小麦構成タンパク質よりも大きい分子量の重合体を形成していることに起因するものと考えられた。

グルテンを酸加水分解することにより調製したHWPは経時的に低分子領域にラダーがシフトし、加水分解時

間が長くなるに従いランダムなペプチド結合の切断が進んでいることが示唆された。また、HWP24hにおいては15 kDa以上の明瞭なバンドが完全に消失していたことから、分子量が抗原性を予測するファクターであるとの既報<sup>6-8)</sup>の結果を裏付ける結果となった。

### 2. ショットガンプロテオミクスによるグルパール19Sとグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

グルテンの酸加水分解では、ランダムなペプチド結合の開裂と共に、タンパク質のグルタミン残基またはアス



**Fig. 2** Collision induced dissociation spectra of two *de novo* sequenced peptides from Glupearl 19S

The results of *de novo* sequencing of the peptides #3 and #9 using PEAKS software are shown.

The upper panel (#3) showing the fragmentation of TMYKPVVYamide and the lower panel (#9) showing the fragmentation of YRCYAFamide. The b- and y-type fragment ions and the theoretical fragment ion masses found in the spectra are indicated in the spectra.

パラギン残基に脱アミド化を生じるものと考えられる。そのためグルパール19Sにおけるショットガンプロテオミクスでは、グルテンのトリプシン切断によって生じるペプチドピークが消失していることが予想された。グルパール19Sとグルテンの構成タンパク質の差異を比較解析した結果、実際に、データベースに収載されているペプチドのシグナル比はグルテンよりもグルパール19Sで減少し (Table 1), トリプシン消化によって生じるペプチドが非酵素的に切断され、脱アミド化修飾している可能性が考えられた。グルパール19Sでシグナルが减弱していたタンパク質として同定された $\gamma$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニンは主要な小麦アレルゲンとして知られている。本研究の結果は、グルテンの酸加水分解が主要な小麦アレルゲンタンパク質の一次構造に影響を及ぼしていることを示唆しており、HWPアレルギーが従来的小麦アレルギーとは異なるアレルゲンが原因であると主張した既報の結果<sup>1-2)</sup>を強く支持している。一方、グルテンと比較して5倍以上のシグナル比が得られたHistone H4に関しては、当該タンパク質が酸性条件下において抽出されやすく、グルパール19Sの製造過程で酸性溶液中に溶出してきた、または酸加水分

解によるペプチド結合の開裂に伴いトリプシンがアクセスしやすくなることに起因し、ペプチドピークが特異的に生じたものと考えられた。

### 3. データベース検索によるグルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の分析

酸加水分解によるグルテンの物理化学的変化について、MS/MSデータからペプチド結合の切断とグルタミン残基及びアスパラギン残基の脱アミド化を検討したところ、抗原性の強いグルパール19Sではランダムにペプチド結合が切断されたペプチドや、脱アミド化修飾のバリエーションをもったペプチドが多く検出された (Table 2)。更に、HWP24hにおいては、ペプチド結合が非酵素的に切断されているものが多く検出されていた。グルテンのトリプシン消化では、グルタミン残基の多い繰り返し配列部分は切断されず、ペプチドが得られなかったが、HWP24hでは繰り返し配列部分が非酵素的に切断されていたため、部分的なペプチド配列を検出することができた (データ示さず)。

これらの結果より、グルパール19Sにおいてはグルテン構成タンパク質のランダムなペプチド結合の切断と共



に、アミノ酸残基の脱アミド化修飾が生じ、これらタンパク質の物理化学的な構造変化は酸加水分解が進行することにより更に起こりやすくなることが示唆された。

#### 4. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

強い抗原性を有するグルパール19Sに特徴的に発現するペプチドを探索することを目的として、(1)グルテンを加水分解することにより新たに生じたペプチドであり、かつ(2)長時間の酸加水分解によって抗原性が消失したHWP24hにおいては発現していないペプチドを対象として多変量解析を行った。Table 3に示した10本のペプチドピークは、いずれもグルパール19Sにのみ十分なピーク強度が得られた。これら候補ペプチドピークのMS/MS相同性検索の結果、HMW-グルテニンや $\alpha/\beta$ -グリアジンといった小麦アレルゲンに由来する脱アミド化修飾されたペプチドが同定された (Table 4)。一方HWP24hでは、加水分解の進行に伴い脱アミド化修飾及びペプチド結合の開裂が進んだために、グルパール19Sにのみ特徴的に発現するペプチド由来のピークが消失したと考えられた。*de novo* sequencingはデータベースに因らずMS/MS取得データのみにより配列を予測するため、コムギ (*T. aestivum*) のようにプロテインデータベースが完全に整備されていないものや、グルパール19Sのように酸加水分解によるペプチドへの非酵素的な修飾が考えられる場合には、有用な情報を与えうる。本研究では、MS/MS取得データから断片的なペプチド配列を予測し、その配列をデータベース検索することで、タンパク質を予測するボトムアッププロテオミクスが有用であった。他方、*de novo* sequencingを用いても配列が予測できなかった4本のペプチドに関しては、MS<sup>1</sup>ピーク強度としては十分なものもあったことから、ペプチドの特性により得られたMS/MSシグナルが少なかったものと考えられた。

本研究において、グルパール19Sに特徴的なペプチドとして10本の候補ペプチドを抽出した。これらのペプチドが抗原性を示すHWPのマーカーとなることを確認するためには、*in vivo*による皮膚感作性試験等との整合性を十分に検討した上で、加水分解条件(処理方法や時間)の異なるHWPを用いた確認試験を行う必要があると考えられた。

#### まとめ

グルテンのトリプシン消化ペプチド由来ピークの多くが、グルパール19Sでは減弱していた。グルパール19Sにおいては、グルテンのトリプシン消化ペプチドがランダムに切断されたものや、グルタミン残基の一部が脱ア

ミド化修飾されたペプチドが多く検出された。

強い抗原性を有するHWPに特徴的なペプチドの候補として10本のペプチドピークを抽出し、そのうち4本の配列をデータベース検索にて、2本の配列を*de novo* sequencingにて同定した。

#### 引用文献

- 1) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K: *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:531-533.e 1-3.
- 2) Chinuki Y, Morita E: *Allergol Int.* 2012;61:529-37.
- 3) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Fukutomi Y, Teshima R: *Allergy* 2012;67:1392-9.
- 4) Mothes T: *Adv Clin Chem.* 2007;44:35-63.
- 5) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R: *J. Allergy Clin. Immunol., in press*
- 6) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R: *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;160:259-64.
- 7) 手島玲子: *ファルマシア* 2013;49:116-20.
- 8) Chinuki Y, Takahashi H, Dekio I, Kaneko S, Tokuda R, Nagao M, Fujisawa T, Morita E: *Contact Dermatitis* 2012;68:86-93

## バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けて

齋藤嘉朗,<sup>\*,a</sup> 佐井君江,<sup>a</sup> 鹿庭なほ子,<sup>a</sup> 田島陽子,<sup>a</sup>  
石川将己,<sup>a</sup> 最上(西巻)知子,<sup>b</sup> 前川京子<sup>a</sup>

## Biomarker Exploration and Its Clinical Use

Yoshiro Saito,<sup>\*,a</sup> Kimie Sai,<sup>a</sup> Nahoko Kaniwa,<sup>a</sup> Yoko Tajima,<sup>a</sup>Masaki Ishikawa,<sup>a</sup> Tomoko Nishimaki-Mogami,<sup>b</sup> and Keiko Maekawa<sup>a</sup><sup>a</sup>Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences; <sup>b</sup>Division of Novel Foods and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

(Received August 30, 2013)

Biomarkers are useful tools as indicators/predictors of disease severity and drug responsiveness, and thus, are expected to make drug development more efficient and to accelerate proper use of approved drugs. Many academic achievements on biomarkers have been reported, but only several biomarkers are used in drug development and clinical settings. We first show our results on the pharmacogenomic analysis of the anti-cancer drug irinotecan and of Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN). *UGT1A1*\*6 and \*28 were significantly associated with altered pharmacokinetics of an irinotecan metabolite, SN-38, and with increased frequency of severe neutropenia. *HLA*\*58:01 and *HLA-B*\*15:11/*HLA-A*\*31:01 were associated with SJS/TEN by allopurinol and carbamazepine, respectively. Our papers have been cited in the package inserts of irinotecan and allopurinol. In addition to these genomic biomarkers, metabolomic biomarkers, which can reflect the disease phenotype and drug responsiveness, have been exploring for 12 major diseases in Japan, as a part of a multi-omics team with multi-national centers. In animal models of dilated cardiomyopathy and Alzheimer's disease, we found several changes in lipid metabolite levels in the diseased tissues. Moreover, two oxidized fatty acids were correlatively changed in the brain and plasma from Alzheimer's model mice before its onset, and thus, could be candidates for predictive biomarkers. Finally, we propose/discuss several key issues for academic researches on biomarker discovery and development, especially for newly coming researchers in the field of pharmaceutical sciences. We hope that this review would help novel biomarker identification and qualification in Japan.

**Key words**—biomarker; pharmacogenomics; metabolomics; adverse drug reaction; human leukocyte antigen

## 1. はじめに

医薬品の開発効率の低下が指摘されている。実際、米国の統計では、単位研究開発費あたりの承認医薬品数は、1960年代頃から低下の一途をたどり、2010年では約1/20に落ち込んだとの報告がある。<sup>1)</sup> 臨床開発中止原因の約56%は有効性欠如、約28%は安全性懸念とされており、<sup>2)</sup> これらを非臨床又は臨床試験初期の段階で捕捉可能となれば、より効率的な医薬品開発が可能となる。また、医薬品の臨床

試験段階では、投与される患者数が限定されているため、発生率が低い副作用は検出されない場合が多く、市販後に明らかになるケースは多い。1994年には米国で、222万人の入院患者(約6-7%)が薬の重篤な副作用を経験し、このうち10万人が死亡したとされる。<sup>3)</sup> さらに日本では2004年において、入院患者3459人のうち、272人(7.9%)に重篤な副作用が発現し、46人が命の危険にさらされ、14人が死亡した。<sup>4)</sup> 製造販売後における医薬品のより適正な使用も、今日の医薬政策にとって非常に重要な問題である。

## 2. バイオマーカー

近年、医薬品開発の効率化及び医薬品の適正使用に、「バイオマーカー」が有用であるとして注目されている。バイオマーカーは、米国の定義ワーキン

The authors declare no conflict of interest.

<sup>a</sup>国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部, <sup>b</sup>国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

\*e-mail: yoshiro@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第133年会シンポジウム S30-106 で発表した内容を中心に記述したものである。

グループにより、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、又は治療的処置に対する薬理学的反応の指標」と定義されている。<sup>5)</sup> ゲノムバイオマーカーはバイオマーカーの一種であるが、国際的な医薬品開発のハーモナイゼーション会議 ICH (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) の E15 ガイドライン (ゲノム薬理学における用語集) では、「正常な生物学的過程、発病過程、及び/又は治療的介入等への反応を示す指標となる、DNA 若しくは RNA の測定可能な特性」であり、DNA 及び/又は RNA の 1 つ又は複数の特性から構成され得る、と定義されている。<sup>6)</sup> 具体的には、ゲノム配列上に約 1000 塩基に 1 ヶ所の割合で存在する遺伝子多型 (塩基の置換・挿入・欠失) などがあり、このような塩基配列の変化の中には、遺伝子の発現量 (mRNA 量) やタンパク質機能 (受容体であればリガンド結合能) に影響を及ぼすものがあり、個人差発現の原因となり得る。これまでに疾患発症や薬効・副作用発現と関連する遺伝子多型が多数報告されてきた。一方、薬物応答性に対する影響は、併用薬 (薬物相互作用)、飲食物、喫煙等にも認められるが、これらは後天的因子であるため、ゲノム情報では捕捉不可能である。しかし、その形質を表すタンパク質 (プロテオーム) や内在性代謝物 (メタボローム) の変化として捕捉することが可能である。本稿では、筆者らの具体的な解析事例を述べた後、今後、バイオマーカーをテーマとする薬学研究者が留意すべき事項に関し、私見を述べる。

### 3. 副作用発症と関連するゲノムバイオマーカー

#### 3-1. 抗がん剤イリノテカンによる骨髄抑制のゲノムバイオマーカー

抗がん剤イリノテカンは、1994年に販売が開始され、現在では胃がん、大腸がん、肺がん、卵巣がん等に広く使われている。一方で、用量制限毒性として、重篤な骨髄抑制と下痢が知られている。イリノテカンはプロドラッグであり、体内でカルボキシエステラーゼによる切断を受けて、活性体 SN-38 に変換される。<sup>7)</sup> SN-38 の解毒代謝には、グルクロン酸転移酵素、特に UGT1A1 が関与している。UGT1A1 は高ビリルビン血症の原因遺伝子であり、日本人においても UGT1A1\*6 (211G>A, Gly71Arg) や\*28 (-54\_-39A(TA)<sub>n</sub>TAA>A(TA)<sub>n</sub>TAA) などの比較的頻度の高い遺伝子多

型が知られている。<sup>8)</sup>

われわれは国立がん研究センターと共同で、イリノテカンの新規適用患者 177 名の解析を行い、\*6 と\*28 が同等程度、体内の SN-38 抱合活性 (SN-38 に対する SN-38 グルクロニドの血中濃度-時間曲線下面積値 (area under the blood concentration time curve; AUC 値) の比) を低下させること、イリノテカンの投薬量と SN-38 の AUC 値をグラフ化すると、\*6 又は\*28 を有しない場合に比して、\*6 又は\*28 のいずれかのホモ接合又は複合ヘテロ結合の場合は、傾きが約 2 倍となること、が示された。<sup>9)</sup> さらに、イリノテカン単剤又はシスプラチンとの併用療法のいずれの場合でも、\*6 又は\*28 が野生型、ヘテロ接合、ホモ接合又は複合ヘテロ接合となるにつれて、重篤な好中球減少 (グレード 3 以上) の有意な頻度増加が認められた。他の 2 研究者の論文とともに、筆者らの論文は、イリノテカンの添付文書に引用され、また UGT1A1\*6 及び\*28 多型タイプニングの体外診断薬の添付文書にも記載された。

#### 3-2. 重症薬疹のゲノムバイオマーカー

わが国では、重篤な副作用の発生に関し、薬事法第 77 条の 4 の 2 第 1 項に基づき、副作用症例報告が義務づけられている。重篤副作用疾患別対応マニュアルでは、各副作用の報告件数が年度毎に掲載されている。2004 年度と 2005 年度の平均数では、重症薬疹であるスティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome; SJS) は 381 件、中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis; TEN) は 198.5 件である。<sup>10,11)</sup> これらに薬剤性過敏症症候群 (DIHS, 過敏症症候群 (HSS) は同義語) 等を合わせた重症薬疹は、医薬品による健康被害救済制度において、救済副作用の最上位であり、医薬品の適正使用上、最も重要な副作用と言える。

SJS と TEN は、皮膚・粘膜移行部の重篤な粘膜病変 (特に SJS の場合)、水疱、びらん等の表皮壊死、発熱等を主症状とし、わが国では表皮壊死の面積が 10% 未満の場合を SJS、10% 以上の場合を TEN と分類される。<sup>10,11)</sup> 致死率は SJS で約 5%、TEN で約 30% と比較的高く、入院による集中治療が必要で、失明等の重い後遺症が残ることがある。SJS/TEN は、医薬品本来の薬理作用に基づかない、免疫学的な副作用であると考えられており、被疑薬として 100 種類以上の医薬品が報告されている。近

年、発症患者数が比較的多い医薬品に関し、その発症とヒト白血球抗原（HLA）遺伝子型との間に強い関連が明らかとなっており、その関連性は一部では民族特異的ではあるものの、発症予測バイオマーカーとなり得るとして注目されている。<sup>12)</sup>

SJS/TEN は発症患者数が少ないため、また発症予測が困難であるため、十分な数の発症患者症例を収集することは困難である。本研究は厚生労働省の研究として、症例収集に際して厚生労働省医薬食品局安全対策課より日本製薬団体連合会宛に、研究への協力を依頼する課長通知が発出された。薬事法に基づき、製造販売業者より、重篤な有害事象症例が医薬品医療機器総合機構（Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; PMDA）に報告されると、当該副作用が SJS/TEN の場合、一症例毎に当所への報告を依頼する FAX が PMDA 安全第二部より送付されている。製造販売業者が任意で当所宛に連絡を行うと、当所より簡単な研究内容及び協力方法に関する文書を折り返し送付し、製造販売業者より担当医に研究協力を依頼頂いている。当該研究につき、担当医の関心が得られた場合に、担当医の連絡先が当所に伝えられ、その後は当所が担当医と直接連絡をとり、詳しい研究内容及び協力方法を説明している。担当医と患者の了解が得られると、インフォームドコンセントの取得、採血、ケースカードへの副作用情報等の記載を担当医に依頼している。さらにケースカードの記載に基づいて、共同研究者である専門医が確定診断している。<sup>13)</sup>

高尿酸血症（痛風）薬アロプリノールでは、日本人の SJS/TEN 症例を対象にしたわれわれの解析で、18 症例中 10 例から *HLA-B\*58:01* が見い出され、その頻度は日本人健常人の頻度に比して有意に高く、オッズ比は 62.8 であった。<sup>14)</sup> 漢民族、韓国人、タイ人、白人でも同様の報告がなされている。<sup>12,13)</sup> 現在、台湾では、当該民族における非常に強い関連

性から、投薬前の *HLA-B\*58:01* 検査が義務づけられており、日本（われわれの論文を引用）や韓国でも添付文書において注意喚起がなされている。

てんかんと三叉神経痛に適用されるカルバマゼピンでは、日本人を対象にしたわれわれの解析で、*HLA-B\*15:02* と同じ血清型 HLA-B75 に属する *HLA-B\*15:11* が、発症 14 人中 4 人から見い出され、オッズ比 16.3 で関連は有意であった（Table 1）。<sup>15)</sup> 併行して、理研や島根大のグループより、*HLA-A\*31:01* との相関が薬疹のタイプに依存せずに認められたとの報告があり、<sup>16,17)</sup> われわれの SJS/TEN 症例でも 14 人中 5 人（*HLA-B\*15:11* を有する症例とは別人）が *HLA-A\*31:01* を有することを確認した（Table 1）。<sup>18)</sup> 一方、台湾の漢民族、タイ人、マレー人、インド人等の東南・南アジア系の民族では、*HLA-B\*15:11* と同じ HLA-B75 に属する *HLA-B\*15:02* と SJS/TEN 発症との強い関連が、白人では *HLA-A\*31:01* との関連が報告されている。<sup>12)</sup>

台湾では、カルバマゼピン投薬開始前に *HLA-B\*15:02* 保有の有無を診断し、非保有者 4120 人へのみ同薬を投与した場合、SJS/TEN の発症は認められなかったと報告された。遺伝子検査を行わなかった過去の同薬投与患者における発症頻度（0.23%）から計算される発症予想人数 9.5 人と比較し、有意に発症頻度は低く、事前診断の発症回避への有用性が実証された。<sup>19)</sup> 本結果に基づき、台湾では同薬投与前の *HLA-B\*15:02* 検査が義務づけられており、現在では保険償還もなされている。また米国やカナダでも *HLA-B\*15:02* 頻度が高い民族を祖先に持つ患者は、投薬開始前の診断が添付文書で強く推奨又は推奨されている。わが国では、*HLA-B\*15:02* 及び *HLA-A\*31:01* に関する注意喚起が添付文書でなされている。

#### 4. メタボローム解析によるバイオマーカー探索 メタボロームは、生体内の内因性代謝物の総体で

Table 1. Associations of *HLA* Alleles with SJS/TEN in Japanese Patients Administered Carbamazepine

HLA type	Patient number*	Number of carrier patients	Allele frequency in case patients (%)	Population allele frequency (%)	Odds ratio	<i>p</i> -value
<i>B*15:02</i>		0	0	rare		
<i>B*15:11</i>	14	4	14.3	1	16.3	<0.0004
<i>A*31:01</i>		5	17.9	7-12		

\* contained typical and probable cases.