

本システムで報告された症例では、SJS/TENの原因被疑薬は、アロプリノール、が突出しており、また、5FU系抗がん剤が多いという特徴があった。一方、医薬品医療機器総合機構のホームページに公表されている2003年10月～2005年9月までの集計に基づく原因被疑薬としては、カルバマゼピンとアロプリノールが他の薬物よりも若干多いことが示されている（医薬品・医療機器等安全性情報 No.218（独立行政法人医薬品医療機器総合機構））。両集計においてSJS/TEN被疑薬プロファイルが異なるのは、NIHS症例集積システムへの協力体制が、製薬企業によって差があるため、必ずしも日本人のSJS/TENの被疑薬プロファイルを反映していないものと考えられた。一方、実際に登録が行われた症例では、抗てんかん薬、アロプリノール、ロキソプロフェン、クラリスロマイシン等がある程度的人数に達しており、これらの薬物では、来年度の症例も合わせれば、個別に解析を行うことが可能であることが示唆された。

#### E. 結論

NIHS症例集積システム及び分担研究者を通じて、2008年2月10日までに、解析対象症例61例を集積した。来年度には、目標症例数100に達する見込である。

#### 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

- 1) 鹿庭 なほ子、スティーブンス・ジョンソン症候群／中毒性表皮壊死融解症と遺伝子多型。ファルマシア, 43, 1075-1079 (2007).
- 2) Nahoko Kaniwa, Yoshiro Saito, Michiko Aihara, Kayoko Matsunaga, Masahiro Tohkin, Kouichi Kurose, Hirokazu Furuya, Yukitoshi Takahashi, Masaaki Muramatsu, Shigeru Kinoshita, Zenro Ikezawa and Ryuichi Hasegawa. HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptic drugs and allopurinol-associated Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. (submitted).

##### 2. 学会発表

- 1) 鹿庭なほ子、第4回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム, 2007.10, 大阪
- 2) Muramatsu M, Aihara M, Takahashi Y, Kaniwa N, Ikezawa Z. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2007.11, 横浜
- 3) 鹿庭なほ子、頭金正博、黒瀬光一、斎藤嘉朗、長谷川隆一、高橋幸利、古谷博和、松永佳世子、村松正明、小菅治彦、木下茂、池田浩子、安部正通、柏木麻理子、宋イシュアン、外園千恵、上田真由美、相原道子、池澤善郎、日本薬学会第128年会, 2008.3, 横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

Table 1 NIHS 症例集積システムへの報告件数

副作用名	件数
SJS	193
TEN	76
合計	271
報告会社数	54

Table 2 NIHS 症例集積システムによる症例集積状況

国立衛研への医師個人情報報告件数	91 (34%)
内訳	
1. 連絡時に終診・死亡等で協力が不可能	14
2. 登録に至らないケース	19
患者側要因（非同意・死亡等）	9
その他の要因	10
3. 協力方法検討中	2
4. 協力件数（登録又は倫理申請開始）	56* (17)**
採血済み	45
倫理申請中・患者来院待ち	7
採血中止（死亡・非同意）	7

\* 1件の報告で複数の症例を登録する担当医もあり、1~4の合計は報告件数よりも多い

\*\* 倫理申請を行った医療機関数

Table 3 研究班全体の症例集積状況

Source	症例数
NIHS 症例集積システム	45
分担研究者	37
協力症例集積者*	8
計	90
副作用名の確定状況	
SJS/TEN	61
SJS/TEN 以外又は判定不能	14
判定待ち	15

\*主任・分担研究者の紹介者、担当医からの直接連絡による協力

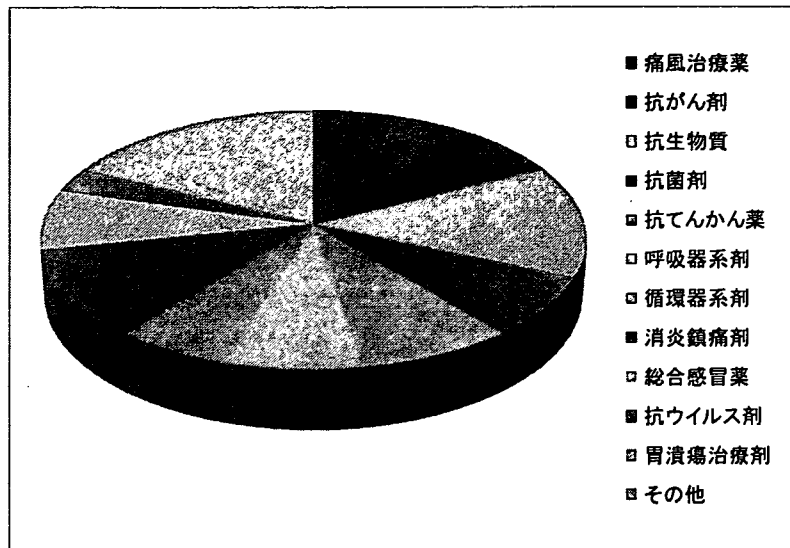


Fig. 1 NIHS 症例集積システムに報告された症例における薬効分類別報告数

Table 4 NIHS 症例集積システムに報告された症例において報告数の多かった医薬品

医薬品名	報告数
アロプリノール	30
5FU 及びテガフル	15
クラリスロマイシン	9
ゾニサミド	8
カルボシステイン	8
カルバマゼピン	6
ロキソプロフェン	6
サラゾスルファピリジン	6
アスピリン	5
セフェム系抗生物質	14

Table 5 登録症例において多く処方されていた医薬品\*

医薬品名	症例数
芳香族系抗てんかん薬 (内カルバマゼピン服用例数)	14 (5)
アロプリノール	9
消炎鎮痛剤 (内ロキソプロフェン服用例数)	22 (11)
クラリスロマイシン	7
セフェム系抗生物質	6
テガフル	4

\* 重複例あり

重篤な皮膚有害事象の診断・治療と遺伝子マーカーに関する研究

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：35例のステーブンス・ジョンソン症候群・中毒性表皮壊死融解症（SJS/TEN）患者と対照群被験者（25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。得られた網羅的遺伝子多型データを測定の正確性および遺伝継承法則への適合性からデータクリーニングした後、遺伝子多型とSJS/TEN発症との関連解析をおこなった。

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ーブンス・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して行われ、漢民族では、HLA-B\*1502やHLA-B\*5801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/TEN発症と強く相関していることが示唆された。一方、ヨーロッパ系人種では漢民族で見いだされたこれらの遺伝子多型がSJS/TENの発症と関連していないと報告されている。日本人におけるSJS/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と異なることが報告されており、漢民族で見いだされた遺伝子多型マーカーが日本人におけるマーカーと異なっている

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。従って、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い、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 500K Array Set（NspおよびSty array）は、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 については全体の 37%、遺伝子の上流域または下流 10kb の領域内 SNPs については全体の 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の一つである。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 SJS/TEN を発症した患者の 35 検体と健常者の 25 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評価と選択(データクリーニング)をした。また、SJS/TEN の発症との関連解析を試行した。

## 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ールに従って、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、三菱化学メディエンス(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。対照群被験者のゲノム DNA について

は、国立病院機構大牟田病院および国立静岡岡てんかん・神経医療センターにてカルバマゼピンあるいは抗けいれん剤を服用しているが SJS/TEN を発症していない患者および東京女子医大にて健常人より調製したゲノム DNA を用いた。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あるいは藤田保健衛生大学医学部皮膚科教室にて、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ールに従った。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 および関連解析ソフト GQuest ((株) スタージェン) 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 データの品質評価とデータクリーニング

SJS/TEN と確定された被験者 35 名、軽度の SJS あるいは SJS/TEN の発症が疑われた被験者 13 名、対照群としての健常者 25 名のゲノム DNA を測定に供した。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 データが含まれるが、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、合計 73 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。今回は検体数が 20 検体以上集積したことから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る Bayesian Robust Linear Model with Mahlonobis distance classifier (BRLMM) 法を用いて

遺伝子型の決定を行った。その結果、検体毎の Call rate は多くの検体で 98% 以上を示し、最低でも 93.35% であった。また、約 26 万個の SNPs 毎の Call rate が、90% 以下を示した SNPs については測定系が安定していないと判断し、解析対象から除外した。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。そこで、全ての検体でホモを示す SNP については、解析対象から除外した。以上の2種類のフィルターによって、関連解析の対象 SNPs 数は 26 万個から約 20 万個に減少した。GeneChip® Human Mapping Array に用いられている約 26 万個の遺伝子多型のうち、日本人の場合は約 5 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）とされていることから、今回測定対象として 20 万個が選択されたことは、測定法に問題があるのではなく、日本人検体との特性を反映しており、妥当な結果であると考えられる。

また、遺伝継承法則への適合性についてはコントロール群のみを用いてハーディー・ワインベルクの法則に従っているか検定を行った。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。今回は正確検定を用いてハーディー・ワインベルクの検定を行い p 値が 0.05 以下の SNPs を解析対象から除外したところ、約 600 個の SNPs が削除対象となった。その他の 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ると考えられた。以上のすべてのフィルターによって最終的には 200,400 種類の SNPs 多型データが関連解析の解析対象となった。

#### 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 35 名 (SJS/TEN 患者群) と対照被験者群 25 名の SNPs データを用いて、SJS/TEN 発症と SNPs との関連解析をおこなった。また、SJS/TEN 患者群中のアロプリノール服用者、ロキソプロフェン服用者、抗菌剤服用者、抗けいれん剤 (バルプロ酸を除く) 服用者、NSAID (ロキソプロフェンを含む) 服用者のそれぞれをケースとし、対照群被験者をコントロールとする解析も行った。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、アレルモードのそれぞれのモデルを用いた分割表を作成し、カイ 2 乗検定法およびフィッシャーの正確検定法で解析した。また、遺伝子型の違いが表現型に及ぼす影響の傾向性の違いを検討するためのコ克蘭・アーミテージ検定法を用いた検討も行った。各検定法でのタイプ I の誤りの多重性については、検体数が少ないことからボンフェローニの不等式による有意水準の補正や FDR のコントロールによる有意水準の設定を今回の検定では採用せず、logQQ-p value plot から設定した。その結果、有意水準の p 値

については例えば SJS/TEN 患者群データでのアレルモードでは  $3.93e^{-5}$  と見積もられ、NSAID のアレルモードでは  $1.76e^{-5}$  と見積もることができた。それ以外のケース群グループでは検体数が不足し、p 値を見積もることができなかった。そこで、SJS/TEN 患者群あるいは NSAID 群と対照被験者群の関連性の有無について各モードと検定法を用いて検定し、logQQ-p value plot から設定された p 値以下の SNPs を表 1 に示した。表 1 にはオッズ比および日本人および漢民族における頻度を合わせて記載した。また、今回の検定から計算された各 SNP でのオッズ比と健常人での母比率およびサンプル数と有意水準から、今回の検定法での検出力を推定したところ、その検出力はもっとも高い場合でも 10% 程度であった。

#### D. 考察

今年度に集積された検体のうち GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array を用いた網羅的 SNPs 解析が終了した検体は、SJS/TEN 発症群 (48 名) および対照群 (25 名) である。この中で対照群には健常人 20 名とカルバマゼピンを服用しているが SJS/TEN を発症しなかった患者 (5 名) が含まれている。また、SJS/TEN 発症群では確定診断された患者は 35 名である (鹿庭の分担研究報告を参照)。今後とも検体の集積と GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array を用いた測定データは集積されて行く予定であるので、今年度のデータ解析については最終的な SJS/TEN 発症と関連する SNP を特定することより、途中経過として、検体の集



積方法や GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array の測定方法に問題がないのか検討することを主な目的とした。

今回の GeneChip から得られた網羅的 SNPs データの被験者毎あるいは SNP の種類毎の call rate の算出は、BRLMMN アルゴリズムによって行った。その結果、ほぼ全ての検体で DM アルゴリズムを用いたデータと比べて上昇し、BRLMMN アルゴリズムの優位性が確認できた。従って今後も BRLMMN アルゴリズムで遺伝子タイピングを行うことにしたい。また、MRF については全ての検体でホモを示す SNPs は今回のデータでは約 6 万個あった。GeneChip® Human Mapping Array では日本人データの約 20% の SNPs の頻度が 100% となることが知られている。従って、今回 MRF と判断された SNPs は妥当な数であり、測定方法に不具合があるとは考えられなかった。さらに遺伝継承法則に適合していない SNPs 数は約 600 個であった。以上のデータの品質評価結果から、検体の集積方法および GeneChip の測定方法に関しては、妥当であると考えられる。

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ところ、SJS/TEN の発症と関連すると推定される SNP が 11 種類見いだされた。今回のように少ない被験者数の場合、オッズ比や対照群の母比率によっては検出力が非常に低い値になってしまうことがある。そこで、対照群は 200 検体を既に集積していることから、対照群を 200 個として、対象群での母比率を 0.05、0.2、0.5 としてオッズ比を 2 ~ 20 まで変動させた時のケース群の個数

と検出力との関係をシミュレーションした (図 1~3)。例えば、母比率が 0.05 でオッズ比が 8 の場合、検出力 0.8 を目標としたとき、ケースは 60 例程度必要になる。今回検出された SNPs については、図 1~3 に示したように検体数が集積されていくに従って検出力は変動することが予想されることから、各 SNPs については生理学的な意義を検討することは必要であるが、今回推定された SNPs 以外にも SJS/TEN 患者と関連する SNP が今後検出される可能性は高いと考えられる。

ところで、多種類のデータを用いた関連解析において、タイプ I の誤りの多重性についてはボンフェローニの不等式による有意水準の補正が行われることが多い。今回は約 20 万種類の SNP についてのデータを解析したので、ボンフェローニの補正を行うには、有意水準を SNP の種類で除して補正を行うことになる。一方、今回測定したデータをみると連鎖不平衡していると思われる SNP が複数あった。HapMap に使用されている日本人 45 人分のデータを使用して計算したところ GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array で測定される SNP のうち絶対連鎖不平衡にならない SNP の数としては 165,977 種類となる。したがって、ボンフェローニの補正を行うには、有意水準を 165,977 で除して補正を行うことになると考えられる。

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 35 名、軽度の SJS あるいは判定が困難であった被験者 13 名、対照群被験者 25 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。得られた結果について、データの品質評価をおこなったところ、測定系については妥当であった。SJS/TEN の発症と関連する SNPs の候補が複数個見いだされたが、今回の検体数では検出力は低かった。今後、検体数が増加するに従って

SJS/TEN の発症と関連する SNP が検出できるものと期待される。

#### 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

表1 有意と判断された p 値以下の SNP とオッズ比および日本人および漢民族における頻度

SJS/TEN 群

SNP	Chr	p value	Odds ratio	Frequency*
SNP_A	X	2.51E-07	8.41	0.50 (0.45)
SNP_B	X	1.38E-06	12.44	0.76 (0.68)
SNP_C	21	3.51E-06	Inf	0.055 (0.022)
SNP_D	11	1.51E-05	0.00	0.11 (0.068)
SNP_E	18	1.64E-05	0.18	0.52 (0.48)
SNP_F	8	2.10E-05	0.13	0.29 (0.25)
SNP_G	2	2.25E-05	5.50	0.53 (0.49)

NSAID 群

SNP_D	11	8.28E-06	0.00	0.11 (0.068)
SNP_H	4	1.21E-05	0.04	0.12 (0.13)
SNP_I	13	1.23E-05	18.78	0.33 (0.34)
SNP_J	5	1.76E-05	0.08	0.36 (0.58)
SNP_K	5	1.76E-05	0.08	0.35 (0.57)

\*Frequency は日本人での頻度。() 内は漢民族での頻度

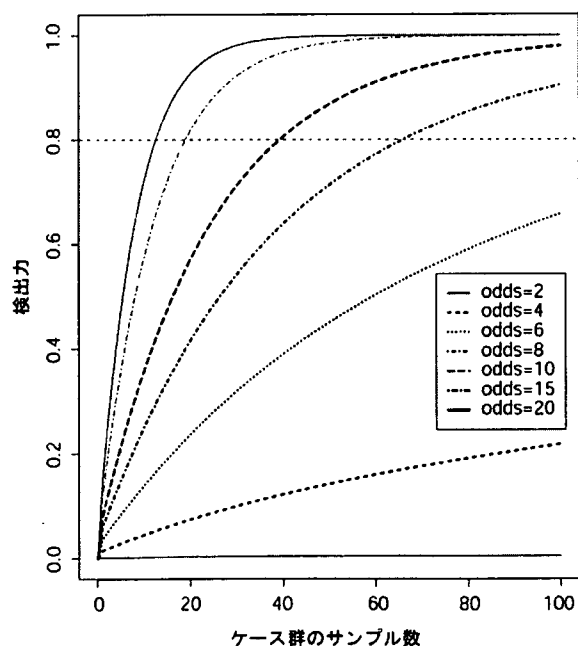


図1 オッズ比に対応したケース群のサンプル数と検出力との関係

リスクアレルを持ったコントロール群の個体頻度を 0.05 とした場合。コントロール群のサンプル数を 200 名, 検定における有意水準を  $10^{-5}$  とした。

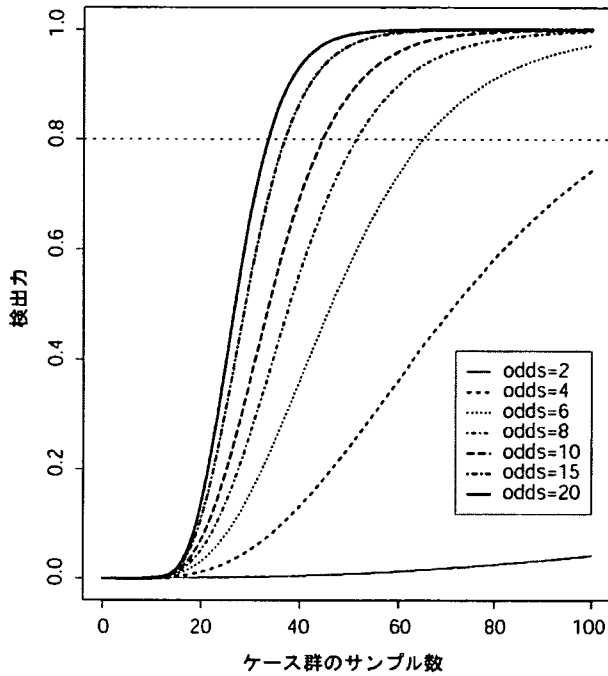


図2 オッズ比に対応したケース群のサンプル数と検出力との関係

リスクアレルを持ったコントロール群の個体頻度を 0.2 とした場合。コントロール群のサンプル数を 200 名, 検定における有意水準を  $10^{-5}$  とした。

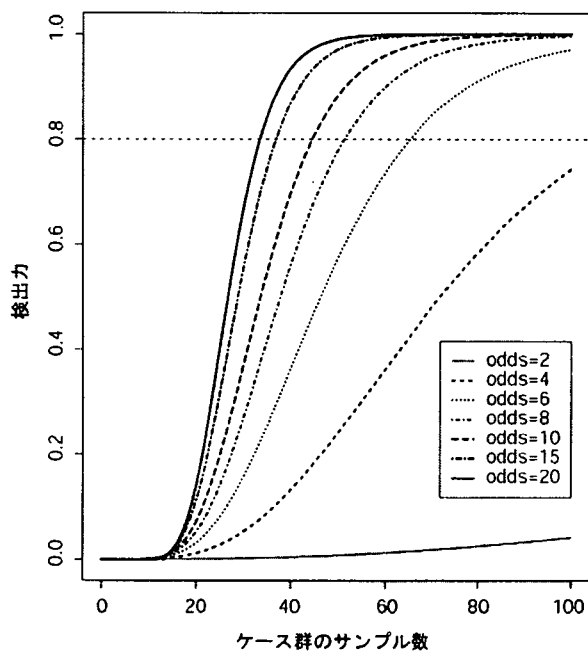


図3 オッズ比に対応したケース群のサンプル数と検出力との関係

リスクアレルを持ったコントロール群の個体頻度を 0.5 とした場合。コントロール群のサンプル数を 200 名, 検定における有意水準を  $10^{-5}$  とした。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

重篤な皮膚有害事象の診断・治療と遺伝子マーカーに関する研究

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 斎藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長  
協力研究者 澤田純一 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 部長  
協力研究者 前川京子 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 主任研究官

研究要旨： 主として抗てんかん薬以外の薬剤を対象に、スティーブンス・ジョンソン症候群及び中毒性表皮壊死症を発症された患者（ケース）群 43 検体を含む 66 検体につき HLA 型の解析をシーケンシングにて行った。昨年度解析分の検体を含めて、ケース群における頻度と日本人健常人における頻度の予備的な比較を行った。

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、その中でもスティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)及び中毒性表皮壊死症(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、SJS/TEN 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、SJS 及び TEN を発症された患者群、コントロール患者群（含む、健常人）及び SJS/TEN 以外と診断された患者群（以下、非 SJS/TEN 薬疹群）につき解析を進めている。昨年度の 19 検体に引き続き、今年度は SJS/TEN 群 43 検体、非 SJS/TEN 薬疹群 18 検体、コントロール群 5 検体に関して、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）群 43 検体、非 SJS/TEN 薬疹群 18 検体、コントロール群 5 検体のゲノム DNA 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 周辺につきシーケンシング解析を行うものである。即ち、50 ng/ $\mu$ l のゲノム DNA を、HLA-A, B, Cw では 5  $\mu$ l、DRB1 では 1  $\mu$ l 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 40 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 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA) を 1/5 量加えた後、37°C で 45 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  $\mu$ l (DRB1 は反応液に 2 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.) 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 において、2 種のバッファ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 周辺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、日本人健常者における HLA 型のアليل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。統計学的な解析は Fisher の正確確率検定にて行い、多重性の補正は、Bonferroni 法により行った。

#### (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

主として検体数が多いケース群に関して、日本人健常者における HLA 型のアليل頻度との比較を行った。なお、原因薬剤の種類が多岐にわたっているため、本年度は薬剤毎に分類せず解析を行った。なお、特許出願等のため、具体的な HLA 型名は伏せて記載する。

1) HLA-A : 昨年度分を含め、ケース 57 検体、非 SJS/TEN 薬疹 18 検体、コントロール 10 検体の解析が終了した。ケース群では表 1 に示す 14 種を検出した。出現頻度に関して、日本人健常者における文献値と比較を行ったところ、HLA-A\*U については、 $p=0.025$ 、HLA-A\*V については  $p=0.044$  で頻度差が認められたが、いずれも多重性の補正後は、有意な差は認められなかった。

2) HLA-B : 昨年度分を含め、ケース 56 検体、非 SJS/TEN 薬疹 17 検体、コントロール 9 検体の解析が終了した。ケース群では表 1 に示す 25 種を検出した。出現頻度に関して、日本人健常者における文献値と比較を行ったところ、HLA-B\*W について、オッズ比 7.63、 $p=0.0028$  で頻度差が認められたが、多重性の補正を行ったところ、 $p=0.07$  と有意な差は認められなくなった。

3) HLA-Cw : 昨年度分を含め、ケース 57 検体、非 SJS/TEN 薬疹 18 検体、コントロール 10 検体の解析が終了した。ケース群では表 1 に示す 14 種を検出した。出現頻度に関して、日本人健常者における文献値と比較を行ったところ、HLA-Cw\*X については、 $p=0.016$  でオッズ比は 10.69、HLA-Cw\*Y については  $p=0.025$  で頻度差が認められたものの、多重性の補正を行ったところ、有意な差は認められなくなった。なお、本 HLA-Cw\*X は HLA-B\*W と連鎖しているものであった。

4) HLA-DRB1 : 昨年度分を含め、ケース 56 検体、非 SJS/TEN 薬疹 18 検体、コントロール 10 検体の解析が終了した。ケース群では表 1 に示す 21 種を検出した。出現頻度に関して、日本人健常者における文献値と比較を行ったところ、HLA-DRB1\*Z について、 $p=0.025$  で頻度差が認められたものの、多重性の補正を行ったところ、有意な差は認められなくなった。

#### 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。

解析検体数がまだ比較的少なく薬剤別の解析は難しいと考えられたため、本年度はアリル頻度に関して、ケース (SJS/TEN) 群と日本人健常者を対象に解析した文献値を用いて、統計学的な比較解析を行った。HLA-A 及び HLA-Cw でそれぞれ 2 種類、HLA-B 及び DRB1 ではそれぞれ 1 種類の、有意に頻度差を示す HLA 型が同定されたが、多重性の補正後は、有意な差は消失した。これまでの漢民族における解析で、抗てんかん薬カルバマゼピンによる SJS 発症と HLA-B\*1502 (Chung W.H. et al., Nature 2004 428: 486 (2004)) 及び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 HLA-B\*5801 (Hung S.I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 4134-4139 (2005)) との非常に強い相関が報告されている。従って、薬剤毎に相関する HLA 型は異なる可能性が大いに考えられるため、今後は特に薬剤別の解析を行う予定である。

#### E. 結論

今年度追加分として、ケース (SJS/TEN) 43 検体、非 SJS/TEN 薬疹 18 検体、コントロール 5 検体につき、HLA 型解析を行った。昨年度分を含め、ケース 57 検体、軽症薬疹等の 18 検体、コントロール 10 検体の解析が終了した。ケース (SJS/TEN) 群と日本人健常者を対象に解析した文献値について、統計学的な比較解析を行ったところ、数種の頻度差を示す HLA 型が見いだ

されたが、多重性の補正後に有意差は消失した。

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

1) 澤田純一、斎藤嘉朗「ゲノム情報に基づ

いた副作用予測」日本臨床 65 (Supple 8)  
16-21 (2007)

##### 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



表1 ケース (SJS/TEN) 群より検出された各 HLA の型

A	B	Cw	DRB1
0101	0702	0102	0101
0201	1301	0302	0301
0203	1501	0303	0401
0206	1511	0304	0403
0207	1518	0401	0405
0210	2704	0602	0406
1101	3501	0702	0410
1102	3701	0704	0802
2402	3802	0801	0803
2420	3901	0803	0901
2601	3904	1202	1101
2603	4001	1402	1201
3101	4002	1403	1202
3303	4006	1502	1301
	4403		1302
	4601		1401
	4801		1405
	5101		1406
	5102		1407
	5201		1501
	5401		1502
	5502		
	5601		
	5801		
	5901		

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

重篤な皮膚有害事象の診断・治療と遺伝子マーカーに関する研究

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

-カルバマゼピン-

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

日本人における、カルバマゼピン（CBZ）による薬疹の発病マーカーを明らかにする目的で、HLA-class Iを検索した。対象は、CBZによると思われる軽症薬疹症例10症例、重症薬疹症例（SJS）5例で、アレル頻度を日本人のデータと比較し、相対危険度を検討した。

軽症薬疹症例で相対危険度が高いのは、A\*2603=4.35、B\*4601=3.18のみであった。一方、日本人での発現頻度が高いのに軽症薬疹症例で見られないものはA\*0201、A\*2601、B\*4403であった。重症薬疹症例で相対危険度が高いのは、B\*1518=11.00、B\*5901=9.70、C\*0704=10.74、C\*1502=5.18であった。一方、日本人での発現頻度が高いのに重症薬疹症例で見られないものは、A\*1101、A\*3303、B\*5201、B\*5101、B\*1501、B\*4403、C\*0702、C\*1202であった。軽症薬疹と重症薬疹で比較すると、発病因子としてのHLA-class Iは、HLA-A、B、Cともまったく異なり、相対危険度は重症薬疹で高値であった。

CBZによる重症薬疹では、B\*1518、C\*0704、B\*5901、C\*1502が発病因子となっている可能性が示唆され、A\*1101、A\*3303、B\*5201、B\*5101、B\*1501、B\*4403、C\*0702、C\*1202(10.4%)はCBZ重症薬疹の抑制因子の可能性がある。

研究協力者：池田浩子、山崎悦子、久保田裕子、高橋宏佳、美根潤、大谷早苗、今井克美、大谷英之、四家達彦（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

抗てんかん薬による薬疹の頻度は他の薬剤に比べて高いとされ、2006年度の我々の21655例の難治てんかん患者調査では、軽症薬疹が0.54%、スティーブンス・ジョンソン症候群（SJS）などの重症薬疹が0.10%の頻度であった。

米国では台湾漢民族でのデータをもとに、新規CBZ投与中国人症例では、全例HLA-B\*1502を検査する方向に向かっており、日本においても同様のガイドラインを策定できれば、多くの重症薬疹患者が救われる。

今回我々は、日本人CBZ薬疹症例を対象に、

その発病マーカーを明らかにする目的で、HLA-class Iを検索した。

B. 研究方法

臨床症状から薬疹は、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。対象としたCBZによると思われる軽

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

症薬疹症例は10症例、重症薬疹症例はSJSが5例である。

HLA-class Iは遺伝子タイピングにより決定した。

（倫理面への配慮）

個人情報の管理に注意した。

### C. 研究結果

#### 1. HLA-A

10症例の軽症薬疹症例を解析した。相対危険度で見ると、A\*2603=4.35>A\*0207=2.52の順であり、これらのHLA-A座位が軽症薬疹の発病因子となっている可能性が示唆された。一方、A\*0201>A\*2601は日本人で頻度の高いアレルであるにもかかわらず軽症薬疹症例でまったく認めず、軽症薬疹の抑制因子である可能性がある。

重症薬疹症例の5例では、相対危険度が高いHLA-Aは見られなかった。一方、A\*1101>A\*3303は日本人で頻度の高いアレルであるにもかかわらず重症薬疹症例でまったく認めず、重症薬疹の抑制因子である可能性がある。

#### 2. HLA-B

10症例の軽症薬疹症例を解析した。相対危険度で見ると、B\*4601=3.18が軽症薬疹の発病因子となっている可能性が示唆された。一方、B\*4403は日本人で頻度の高いアレルであるにもかかわらず軽症薬疹症例でまったく認めず、軽症薬疹の抑制因子である可能性がある。

重症薬疹症例の5例では、相対危険度で見るとB\*1518=11.0>B\*5901=9.70が重症薬疹の発病因子となっている可能性が示唆された。一方、B\*5201>B\*5101>B\*1501>B\*4403は日本人で頻度の高いアレルであるにもかかわらず、重症薬疹症例でまったく認めず、重症薬疹の抑制因子である可能性がある。

#### 3. HLA-C

9症例の軽症薬疹症例を解析した。相対危険度で見ると、有意に高い座位は認めなかった。

重症薬疹症例の5例では、相対危険度で見るとC\*0704=10.44>C\*1502=5.18が重症薬疹の

発病因子となっている可能性が示唆された。一方、C\*0702>C\*1202は日本人で頻度の高いアレルであるにもかかわらず重症薬疹症例でまったく認めず、重症薬疹の抑制因子である可能性がある。

### D. 考察

当センターの抗てんかん薬による重症薬疹では、PHT, CBZ, PBなどが原因として多い。今回我々はCBZによる軽症薬疹10例と重症薬疹5例のHLA-class Iを検索した。その結果を相対危険度で判断すると、B\*1518（相対危険度=11.0）>C\*0704（10.44）>B\*5901（9.70）>C\*1502（5.18）の危険度が高く、重症薬疹の発病因子となっている可能性が示唆された。疾患関連HLAとして報告があるのは、ankylosing spondylitis（B27, 相対危険度=87）、Goddpasture syndrome（DR2, 相対危険度=16）、Pemphigus vulgaris（DR4, 相対危険度=14）、Acute anterior uveitis（B27, 相対危険度=10）、SLE（DR3, 相対危険度=6）等である。これらの報告と比較して、B\*1518やC\*0704の重症薬疹の相対危険度は決して低いとはいえないが、今後さらなる症例の蓄積が必要と考えている。CBZによる重症薬疹については、台湾漢民族ではB\*1502が発病因子として重要であることが分かったが、日本人やコーカサス人ではB\*1502は有意な関連を見出せていない。日本人固有の発病因子の早期の解明が望まれる。

一方、A\*1101（日本人アレル頻度=8.1%）、A\*3303（7.9%）、B\*5201（13.7%）、B\*5101（7.9%）、B\*1501（7.2%）、B\*4403（6.9%）、C\*0702（11.3%）、C\*1202（10.4%）は日本人で頻度の高いアレルであるにもかかわらず重症薬疹症例でまったく認めず、重症薬疹の抑制因子である可能性がある。

軽症薬疹と重症薬疹で比較すると、発病因子としてのHLA-class Iは、HLA-A、B、Cともまったく異なり、発病因子と推定される座位の相対危険度は重症薬疹で高値であった。このことから、軽症薬疹と重症薬疹はそれぞれ固有の疾患感受性HLAを有している、あるいは軽症薬疹で

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

は発病因子としてのHLAの役割は弱い可能性が考えられる。

E. 結論

CBZによる重症薬疹では、B\*1518、C\*0704、B\*5901、C\*1502が発病因子となっている可能性が示唆された。一方、A\*1101、A\*3303、B\*5201、B\*5101、B\*1501、B\*4403、C\*0702、C\*1202（10.4%）はCBZ重症薬疹の抑制因子の可能性が

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高橋幸利、久保田裕子、大谷英之、山崎悦子、池田浩子、難治てんかん：West症候群、乳児重症ミオクロニーてんかん、脳炎後てんかん、阿部康二編集、「神経難病のすべて」、新興医学出版社、p 131-139。2007年6月1日発行。
2. 大谷早苗、高橋幸利、突発性異常波、アトラス てんかんの発作間欠期・発作時脳波を読む、p 15-19、2007年10月25日発行。
3. 高橋幸利、光刺激で誘発される脳波異常、アトラス てんかんの発作間欠期・発作時脳波を読む、p 24-27、2007年10月25日発行。
4. 高橋幸利、特集：薬物と神経筋障害：診断と治療の進歩、抗てんかん薬の副作用、日本内科学会雑誌、2007；96(8)：1608-1613。
5. 高橋幸利、抗てんかん薬、知っておきたい頻用薬の上手な使い方、日本医事新報社、印刷中。
6. 高橋幸利、高橋宏佳、美根潤、病気と薬

パーフェクトガイド：てんかん、薬局  
2008年3月増刊号、印刷中。

2. 学会発表

1. 高橋幸利、久保田裕子、大谷英之、江川潔、池田浩子、藤原建樹、木戸博、小児神経領域における新しい遺伝子診断の現状と問題点—遺伝子多型診断—、第110回日本小児科学会学術集会、2007年4月20日～22日、京都。
2. 四家達彦、藤原建樹、下村次郎、久保田裕子、高橋幸利、井上有史、山川和弘、電位依存性NaチャンネルSCN1A異常をもつ部分てんかんに関する研究、第49回日本小児神経学会、2007年7月5-7日、大阪。
3. 池田浩子、高橋幸利、村松正明、柏木麻理子、山崎悦子、久保田祐子、大谷英之、江川潔、藤原建樹、抗てんかん薬による薬疹発生患者における日本人のHLA検討（第一報）、第49回日本小児神経学会、2007年7月5-7日、大阪。
4. 大谷英之 田中正樹 高橋幸利 井上有史 藤原建樹、荻原郁夫 真崎恵美 山川和弘、ナトリウムチャンネル $\alpha$ サブユニット1型(SCN1A)遺伝子変異マウスの発作解析、第41回日本てんかん学会、2007年11月1-2日、福岡。

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