

11. 10.

- 37) 上田真由美、外園千恵、稲富勉、羽室淳爾、木下茂： Stevens-Johnson 症候群における IL13/IL4R シグナル遺伝子多型の関与、第 32 回角膜カンファレンス、千葉、2008、2、 28.
- 38) 足立紘子、稲富勉、外園千恵、上田真由美、木下茂： 重症 MRSA 感染と両眼性角膜穿孔をきたした急性期 Stevens-Johnson 症候群の一例、第 32 回角膜カンファレンス、千葉、2008、2、 29.
- 39) 上田真由美、外園千恵、稲富勉、木下茂： Stevens-Johnson 症候群における FasL 型の関与、第 11 回京都免疫ワークショップ、京都、2008、 3.22
- 40) 上田真由美、外園千恵、稲富勉、木下茂。 Stevens-Johnson 症候群の遺伝子発現解析ならびに遺伝子多型解析。 第 62 回日本臨床眼科学会、眼科 DNA チップ研究会、東京、2008. 10. 23.
- 41) 上田真由美、外園千恵、稲富勉、木下茂。 候補遺伝子アプローチによる Stevens-Johnson 症候群の遺伝子多型解析。 第 62 回日本臨床眼科学会、東京、2008. 10. 25.

#### 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	292
TEN	121
合計	413
報告会社数	70

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	131 (32%)
内訳	
1. 連絡時に終診・死亡等で協力が不可能	20
2. 登録に至らないケース	17
患者側要因（非同意・死亡等）	10
その他の要因	7
3. 協力方法検討中	3
4. 協力件数（登録又は倫理申請開始）	95* (27)**
採血済み	81
倫理申請中・患者来院待ち	3
採血中止（死亡・非同意等による）	11

\* 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	81
分担研究者	63
協力症例集積者*	12
計	156
副作用名の確定状況	
SJS/TEN	93 (14)**
SJS/TEN 以外又は判定不能	26
判定待ち	23

\*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

\*\*括弧内の数値は、SJS/TEN を否定できない症例、非典型症例

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	症例数 (括弧内は非典型症例を含む症例数)
芳香族系抗てんかん薬	28 (33)
カルバマゼピン	12 (15)
アロプリノール	15
消炎鎮痛剤	22 (11)
ロキソプロフェン	14 (16)
イブプロフェン	5
アセトアミノフェン	9 (11)
マクロライド系抗生物質	7
セフェム系抗生物質	10 (12)
キノロン系合成抗菌剤	9 (10)
オメプラゾール	5
テガフルール	7 (3)

(重複例あり)

II. 分担研究報告

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  
症例集積状況

研究代表者	鹿庭 なほ子	国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長
研究分担者	小菅 治彦	練馬総合病院皮膚科医長
研究協力者	長谷川 隆一	国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部部長
	古江 増隆	九州大学医学部皮膚科学教室教授
	高原 正和	九州大学医学部皮膚科学教室助教授・病棟医長
	鎌谷 直之	独立行政法人・理化学研究所・ゲノム医学センター チームリーダー

研究要旨 昨年度に引き続き、SJS/TEN の症例を3つのルート、すなわち、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、国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部が運営する、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症例集積システム（NIHS 症例集積システム）、研究分担者が所属する医療機関、及び、個別に依頼した症例集積協力機関を通じて、集積した。症例は順調に集積され、2009年1月末までに156例のケース群の登録があり、そのうち NIHS 症例集積システムによる集積数は81例で寄与率は約50%であった。本システムは、SJS/TEN のように発生頻度の少ない疾病や副作用の症例集積システムとして、ある程度機能することが示された。研究班に登録された全症例の内、133症例については、専門医による確定診断が終了した。SJS/TEN と確定診断された症例は93例、SJS/TEN の疑いがある症例が14例、SJS/TEN 以外又は判定不能とされた症例が26例であった。本年度で、ケース・コントロール研究のために研究当初に設定した目標症例数100例をほぼ達成できた。また、カルバマゼピン等数種の薬物では10例以上の症例が集まり、十分ではないものの、予備的な薬剤別関連解析が可能と考えられた。

A. 研究目的

平成18年度より、薬物による重篤な副作用であるスティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)及び中毒性表皮壊死症(TEN)の発症と関連する遺伝子マーカーの探索研究を行っている。ケース・コントロール研究に

よる遺伝子マーカー探索では、十分な症例を確保して、検出力の高い研究を行うことが研究の成否の重要な鍵となる。しかしながら、SJS/TEN は発症率が非常に低いため、十分な症例を確保することが困難である。本研究班では、研究の開始にあたり、

全国で散発する新規の SJS/TEN の症例を把握し、研究へ登録するための症例集積システム (NIHS 症例集積システム) を構築した。本報告では、3年間における、NIHS 症例集積システムによる症例集積状況及び研究分担者による症例集積状況を報告すると共に、被疑薬に関して集計結果を報告する。

## B. 研究方法

2009年2月2日までに HLA 解析を終了した 104 例の SJS/TEN 確定診断症例及び SJS/TEN の疑いがある症例について、投与されている薬剤に関する集計を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立衛研の倫理委員会より承認を得て、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて実施された。生体試料及び個人情報、連結可能匿名化して研究者に提供されたので、本研究から個人情報が遺漏する恐れはなかった。

## C. 研究結果

### (1) NIHS 症例集積システムによる症例集積状況

システムの稼働開始日 (2006年6月15日) より 2009年1月31日までの 31ヶ月あまりの間に、担当医が SJS または TEN と判定した症例が、NIHS 症例集積システムのルートを通じて製薬企業から国立衛研へ報告された件数は 413 件であり、内訳は SJS 292 件、TEN 121 件であった (Table 1)。これは、1年間の報告数として約 160 件に相当する。SJS/TEN の年間発症数は、400~500 例であるので、製薬会社が任意で国立衛研へ報告する件数は、発症数の 30~

40%程度と考えられた。この中から、医師が本研究へ協力を申し出た件数は、報告数の約 32%、131 件であった (Table 2)。筆者らが、協力を申し出た担当医に状況を確認した段階で、申し出を取り消す例、既に SJS/TEN に関する治療を終え患者が来院していない例、既にあるいは協力方法を検討中に患者がお亡くなりになる例、非同意を表明される例などで、登録に至らなかった件数が 37 例存在し、登録に至った件数、及び、倫理申請を開始した件数は合わせて 95 件であった。これは、報告数の約 23% に相当する。この中で、倫理委員会の承認が必要な医療機関は 27 機関あった。2009年1月31日までに、本システムを通じて採血が終了した症例数は 81 症例である。その内、78 例については副作用名の診断が確定しており、SJS/TEN と診断された症例は 59 例であった。本システムによって集積した症例の 76% が本研究班の解析対象である SJS/TEN と確定診断され、昨年度の水準を引き続きほぼ維持していることが確認された。

### (2) 研究班全体における症例集積状況

Table 3 に、2009年1月31日までの研究班全体の症例集積状況を示した。研究分担者が所属する医療機関の症例が 63 例登録され、また、症例集積協力者による症例が 12 例登録された。後者には、研究分担者による紹介、研究分担又は代表者が個別に依頼した医師、医師からの直接の通報などが含まれる。集積した症例は、担当医が記入した診療情報を基に、研究分担者である池澤善郎先生の研究協力者である相原道子横浜市立大学医学部皮膚科教授及び研究分

担者の松永佳世子先生に副作用名を診断頂いた。2009年1月末現在、156例中93例がJS又はTENと確定診断され診断され、また、14例がSJS/TENの疑いありと診断された。一方、SJS/TEN以外と確定診断された症例及びケースカードへの記載が不十分なために判定不能とされた症例が合わせて26例あった。

#### (3) コントロール群の集積について

本年は、コントロール群として、主として、カルバマゼピンを含む抗てんかん薬を長期に服用しても、重症薬疹を発症しなかった症例を集積した。2009年1月末までに、抗てんかん薬服用コントロールを22例、又、クラリスロマイシン服用コントロールを7例集積した。

#### (4) 被疑薬に関する集計

本研究班の皮膚科の専門医によってSJS/TENと確定診断された症例及び非典型ではあるがSJS/TENの疑いがあると診断された症例、合わせて104例について、服用されていた薬物について集計を行った (Table 4)。服用されている薬物としては、アロプリノールが最も多く、続いてロキソプロフェン、カルバマゼピンなどが多かった。この他、5症例以上で服用されていた医薬品として、イブプロフェン、アセトアミノフェン、マクロライド系及びセファム系抗生物質、キノロン系合成抗菌剤、オメプラゾール、テガフルがあげられる。また、芳香族系抗てんかん薬及び消炎鎮痛剤を服用している症例は20例以上存在した。

本年度は、Table 4に示した医薬品のうち、オメプラゾール、テガフル、イブプロ

フェンを除く医薬品について、分担研究者の斎藤博士、頭金博士及び黒瀬博士に、HLA及びゲノムワイド多型との関連解析を依頼した。

#### D. 考察

本研究班では、NIHS症例集積システム、研究分担者が所属する医療機関、及び、研究代表・分担者が個別に依頼した症例集積協力医療機関の3つのルートを通じて症例を集積した。検出力を考慮して、本研究班のケース群の目標症例数を100例としたが、今年度中にほぼ達成できた。

NIHS症例集積システムは、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、国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部で運営されている。本システムを通じての症例集積は、順調に進んでおり、また、解析対象であるSJS/TENと診断される割合も約75%を維持している。本研究班における症例集積に対するNIHS症例集積システムの寄与率及びSJS/TEN確定診断率を考慮すると、本システムは発症頻度の少ない重篤副作用の症例集積システムとして、有効に機能していると考えられた。しかし、本システムで集積できた症例は、日本で発生しているSJS/TENの5~10%程度と考えられる。本システムを運営する医薬安全科学部の研究者達は、本システムを通じて協力を申し出られた担当医に対して、研究に関する説明、各医療機関における倫理申請の手伝い、検体回収の業者委託等、可能な限り担当医の負担を軽くするように努力しており、協力申し出後の登録率をこれ以上上げることは困難と考える。筆者は、医療従事者の多忙

さが軽減されれば、本システムへの症例報告数や、担当医の協力申し出率が上がり、集積の効率をあげることができる。と考える。

今年度中に、カルバマゼピン及びアロプリノールを服用している症例について、HLA-B のタイプとの関連解析した結果を論文として公表し、日本人では、HLA-B\*1502 とカルバマゼピン誘因性のSJS/TEN との関連が認められないこと、一方、アロプリノールでは、日本人においても、漢民族や白人と同様、HLA-B\*5801保有が SJS/TEN 発症の原因のひとつであることを示すことができた。今後、さらに症例数を増やして、被疑薬別に多型とSJS/TEN 発症との関連解析を継続していくことは、大変に意義のあることと考える。

#### E. 結論

NIHS 症例集積システム及び研究分担者等を通じて、2009年1月31日までに、解析対象症例93例を集積し、本年3月末までには目標症例数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) Nahoko Kaniwa, Yoshiro Saito, Michiko Aihara, Kayoko Matsunaga, Masahiro Tohkin, Kouichi Kurose, Jun-ichi Sawada, Hirokazu Furuya,

Yukitoshi Takahashi, Masaaki Muramatsu, Shigeru Kinoshita, Masamichi Abe, Hiroko Ikeda, Mariko Kashiwagi, Yixuan Song, Mayumi Ueta, Chie Sotozono, Zenro Ikezawa and Ryuichi Hasegawa: HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-associated Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Pharmacogenomics* 9(11), 1617-1622 (2008).

- 2) 鹿庭 なほ子：重篤副作用のバイオマーカー探索の最新の動向. *Pharm Stage*, 8(7), 1-3 (2008).
- 3) 鹿庭 なほ子：重症薬疹の発症に関連する遺伝子マーカーの探索研究. 月刊薬事、50 (13), 147-151, (2008).

##### 2. 学会発表

- 1) 鹿庭なほ子：ゲノム情報を利用した安全性評価への取組 - SJS/TEN の例. 第11回日本医薬品情報学会、2008.7、東京
- 2) Muramatsu M, Aihara M, Takahashi Y, Kashiwagi M, Takahashi Y, Ikezawa Z and Kaniwa N: HLA genotypes in carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug response: difference between Japanese and Han-Chinese. 第13回国際ヒトゲノム学会. 2008.9, ハイダラバード
- 3) 鹿庭なほ子：重篤副作用関連のバイオマーカー探索-Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis



を例として、第三回医薬品評価フォーラム、2008.9、東京

- 4) 斎藤嘉朗、頭金正博、黒瀬光一、澤田純一、長谷川隆一、外園千恵、木下茂、高橋幸利、古谷博和、村松正明、松永佳世子、相原道子、池澤善郎、鹿庭なほ子：日本人におけるスティーブンス・ジョンソン症候群及び中毒性表皮壊死症と相関する HLA タイプの探索（第一報）、日本免疫毒学会第 15 回学術大会、2008.9、東京
- 5) 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, and for the JSAR research group: An exploratory study of genetic biomarkers associated with Japanese SJS/TEN patients: a nation-wide multi-center study in Japan. 15<sup>th</sup> Annual ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) North American Regional Meeting, 2008.10, San Diego
- 6) Kouichi Kurose, Yoshiro Saito, Masahiro Tohkin, Nahoko Kaniwa, Michiko Aihara, Kayoko Matsunaga, Yukitoshi Takahashi, Hirokazu Furuya, Masaaki Muramatsu, Shigeru Kinoshita, Jun-ichi Sawada, Zenro Ikezawa, Ryuichi Hasegawa, and for the JSAR research group: Association between

HLA alleles and carbamazepine and allopurinol-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. 15<sup>th</sup> Annual ISSX North American Regional Meeting, 2008.10, San Diego

- 7) 斎藤嘉朗、鹿庭なほ子、頭金正博、黒瀬光一、長谷川隆一、SJS/TEN 遺伝子多型研究班：重症薬疹（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）の薬理ゲノム学。第 29 回日本臨床薬理学会年会、2008.12、東京
- 8) 鹿庭なほ子、斎藤嘉朗、頭金正博、黒瀬光一、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：日本人における重症薬疹発症に関連するバイオマーカーの探索。日本薬学会第 129 年会、2009.3、京都
- 9) 頭金正博、鹿庭なほ子、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：スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症の発症と関連する遺伝子多型の網羅的探索。日本薬学会第 129 年会、2009.3、京都

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

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

研究分担者 頭金 正博 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部長

研究分担者 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:82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(183例)のゲノムDNAを用いて約26万種類の一塩基多型(SNP)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、SJS/TEN発症との関連解析を行った。その結果、コ克蘭・アーミテージ検定では、多重性の補正後も有意に関連性のあるSNPが、カルバマゼピンが起因薬と思われる発症群で4個、ロキソプロフェンが起因薬と思われる発症群で3個見いだされた。また、遺伝子型を基にした検定(フィッシャーの正確検定)では、ロキソプロフェンが起因薬と思われる発症群で多重性の補正後も有意に関連性のあるSNPが1個見いだされた。

#### 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 Perlegen Sciences 社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り、研究開始時点では、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った。そこで、本研究では、この GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array から得た SNPs データを用いて SJS/TEN のケース・コントロール関連解析を行い、SJS/TEN の発症機構の解明とバイオマーカーの確立を目指した。

## 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康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 から得た遺伝子多型に関するデータを用いた SJS/TEN 発症との関連解析は、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あるいは共同研究医療機関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（ケース群）82名と SJS/TEN を発症していない対照群（コントロール群）183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 262,217 種類の SNPs についての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 265 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 262,217 種類の SNPs の 1 チップ当たり Call rate（実際にタイピングが可能であった SNPs の割合）が 94%以上で、男性の検体においては X 染色体におけるヘテロ接合体の頻度が 0.1 以下の検体を関連解析に用いることにした。その結果、ケース群およびコントロール群ともに全ての検体が上記の条件に適合した。また、1 SNP 当たりの評価については、SNP 毎の Call rate が

95%以上、またマイナーアレル頻度(MAF)は 0.01 以上の SNP を関連解析の対象とした。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への適合性について Fisher の正確検定を行い、p 値が 0.001 以下の SNPs は解析対象から除外した。このようなデータクリーニングを被疑薬毎に検体を分類して行ったところ、測定した 262,217 種類の SNPs のうち、関連解析の対象となる SNPs は 70.9%・74.6% (185,956 - 195,589 SNPs) が残った。

集団の構造化については、被疑薬毎に検体を分類して  $\lambda$  値を計算したところ、全ての場合で 1.1 以下となり、集団は均質化されていると判断した。

#### 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 82 名（ケース群）と SJS/TEN を発症していない対照群（コントロール群）183名の SNPs データを用いて、ケース・コントロール研究を行い SJS/TEN 発症と SNPs との関連性を解析した（解析①）。また、ケース群については、被疑薬がカルバマゼピン（解析②）、芳香族系抗てんかん薬（解析③）、ロキソプロフェン（解析④）、非ステロイド系抗炎症薬（解析⑤）と考えられる被験者を対象にした関連解析も行った。発症と SNPs の関連解析は、遺伝子型による分割表を作成し、カイ 2 乗検定法およびフィッシャーの正確検定法で検討を行った（遺伝子型モード）。また、リスクアレルの増減と発症割合との間での線形傾向の有無をコクラン・アーミテージ検定法で検討した（傾向検定）。各検定法でのタイプ 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

有意水準の補正や False Discovery Rate (FDR)のコントロールによる有意水準の設定を行った。まず、SJS/TEN と確定された被験者（ケース群）82名と対照群（コントロール群）183名を用いた関連解析では（解析①）、遺伝子型モード検定（カイ2乗検定法およびフィッシャーの正確検定法）および傾向検定を行い、得られた各 SNP についての p 値の分布を染色体毎に示した（図 1-1、図 1-2、図 1-3）。このとき、有意水準を FDR で設定すると、有意に関連があると判断される SNPs が複数あった。しかし、有意水準をボン・フェローニの不等式で設定した場合は、有意な関連性のある SNP は検出されなかった。また、被疑薬がカルバマゼピンと考えられる被験者をケース群（10名）とし、コントロール群（157名）を用いた関連解析では（解析②）、傾向検定および遺伝子型モード（カイ2乗検定法）では、有意水準をボン・フェローニの不等式で設定した場合でも有意な SNPs が複数見いだされた（図 2-1、図 2-2、図 2-3）。被疑薬が芳香族系抗てんかん薬と考えられる被験者をケース群（24名）とした解析では、服用患者がてんかん患者であるため、健常者をコントロール群とした場合、てんかんに関連する遺伝子多型を検出する可能性があることから、抗てんかん薬を服用しているが SJS/TEN を発症していない被験者をコントロール群（17名）とした（解析③）。その結果、有意水準を FDR で設定したとき、遺伝子型モード検定（カイ2乗検定法およびフィッシャーの正確検定法）および傾向検定のいずれの検定方法でも有意に関連があると判断される SNPs が複数あったが（図 3-1、図 3-2、図 3-3）、有意水

準をボン・フェローニの不等式で設定した場合は、有意な関連性のある SNP は検出されなかった。解析④では被疑薬がロキソプロフェンと考えられる被験者をケース群（13名）とし、コントロール群（157名）を用いて関連解析を行った。その結果、有意水準をボン・フェローニの不等式で設定したとき、遺伝子型モード検定（カイ2乗検定法およびフィッシャーの正確検定法）および傾向検定のいずれの検定方法でも有意に関連があると判断される SNPs があった（図 4-1、図 4-2、図 4-3）。被疑薬が非ステロイド性抗炎症薬と考えられる被験者をケース群（32名）とし、コントロール群（157名）を用いた関連解析では（解析⑤）、傾向検定および遺伝子型モード（カイ2乗検定法）では、ボン・フェローニの不等式で設定した有意水準と同程度の p 値を示す SNPs が見いだされたが、遺伝子型モード（フィッシャーの正確検定法）では、ボン・フェローニの不等式で設定した有意水準以下の SNPs はなかった（図 5-1、図 5-2、図 5-3）。

#### SJS/TEN の発症バイオマーカー候補 SNP の検証研究に必要な症例数に関する検討

網羅的遺伝子多型データを用いた関連解析研究においては、p 値を基に選択した SNPs について、新たな発症被験者グループを用いた第 2 段階の検証研究を行うことで、発症と関連するバイオマーカーとしての SNP の評価が定まる。そこで、今回のケース群を用いた網羅的遺伝子多型データから発症と関連性があると考えられた SNPs について、第 2 段階の検証研究に必要な症例数を見積もるための試算を行った。具体

的には、SJS/TENと確定した被験者（ケース群）82名と対照群（コントロール群）183名を用いた関連解析（傾向検定）（解析①）でFDRから求めた有意水準を下回るp値を示したSNPsを対象にして検出力を計算した。試算の条件は、選択するSNPsを、有意差が認められたもの（8種類）あるいはp値の昇順に50種類あるいは100種類とし、症例数についてはケース群とコントロール群のそれぞれで、50症例、100症例、150症例とした。その結果、表1に示すように、検出するSNPs数を50種類、検体数をケース群・コントロール群ともに50症例としたときSNP\_Cは、66.7%の検出力を示した。また、それ以上のSNPs数や症例数を用いても検出力は、ほとんど増加しなかった。

#### D. 考察

平成20年11月までに国立医薬品食品衛生研究所にゲノムDNAとして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と確定診断されたケース発症群が82名、およびコントロール群が183名である。ケース群82名には、カルバマゼピンを含む芳香族系抗てんかん薬が被偽薬と考えられた患者とロキソプロフェンを含む非ステロイド性抗炎症薬が被偽薬と考えられた患者が比較的多く含まれていた。そこで、被偽薬にかかわらずSJS/TENと確定診断された患者全てをケース群とした場合と、ケース群を被疑薬（カルバマゼピン、カルバマゼピンを含む芳香族系抗てんかん薬、ロキソプロフェン、

ロキソプロフェンを含む非ステロイド性抗炎症薬）で分類した場合の、それぞれでケース・コントロール研究を行った。コントロール群の183名には健常人157名と芳香族系抗てんかん薬を服用しているがSJS/TENを発症しなかった患者（17名）が含まれている。そこで、芳香族系抗てんかん薬が被偽薬と考えられたケース群では、健常人をコントロール群とした場合、てんかんに関するSNPsが選択される可能性があることから、この場合は芳香族系抗てんかん薬を服用したが、SJS/TENを発症しなかった患者をコントロール群とした。以上の条件で、全ゲノムにわたる網羅的遺伝子多型データセットとSJS/TENの発症と関連解析を行い、各解析法でのp値の分布を染色体毎に表示した。その結果、FDRによる有意水準の設定をおこなったとき、全ての解析方法でSJS/TENの発症と有意に関連するSNPsが検出された。また、有意水準をボン・フェローニの不等式で設定した場合でも、コ克蘭・アーミテージ検定では、カルバマゼピンが起因薬と思われる発症群で4個、ロキソプロフェンが起因薬と思われる発症群で3個見いだされた。また、遺伝子型を基にした検定（フィッシャーの正確検定）では、ロキソプロフェンが起因薬と思われる発症群で多重性の補正後も有意に関連性のあるSNPが1個見いだされた。ところで、各解析法でのp値の分布を詳細に観察すると、カルバマゼピンあるいはロキソプロフェンが被疑薬と考えられる患者でのp値は、全発症患者をケースとした時のp値、あるいは芳香族系抗てんかん薬が被疑薬の患者群や抗炎症薬が被疑薬の患者群でのp値に比べて、全般に小さい傾向を

示した。このことは、被疑薬を絞り込んだ場合の方が SNPs と SJS/TEN 発症との関連性が全般に高いことを示しており、被疑薬毎に関連する SNP が異なっている可能性を示唆している。

網羅的遺伝子多型データを用いた関連解析研究においては、新たな発症被験者グループを用いて第 2 段階の検証研究を行うことで、発症と関連する SNP の評価が定まる。そこで、第 2 段階の検証研究で十分な検出力が得られる検体数を、今回の網羅的測定データから得られたオッズ比や母比率をもとに試算したところ、測定する SNPs 数を 50 とした場合、ケース群・コントロール群とも 50 症例で 50 %以上の検出力で p 値が計算される SNP があることがわかった。また、この条件では症例数を 100 以上増しても検出力はそれほど増加しないことから、第 2 段階で集積する症例数の目標はケース群・コントロール群とも 100 症例が適当であると考えられた。

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

網羅的遺伝子多型データを用いて、SJS/TEN 発症との関連解析を行ったところ、コクラン・アーミテージ検定では、有意に関連性のある SNP が、カルバマゼピン

が起因薬と思われる発症群で 4 個、ロキソプロフェンが起因薬と思われる発症群で 3 個見いだされた。また、遺伝子型を基にしたフィッシャーの正確検定では、ロキソプロフェンが起因薬と思われる発症群で多重性の補正後も有意に関連性のある SNP が 1 個見いだされた。今後は、当研究で明らかになった SNPs と SJS/TEN 発症の関連性を検証するため、新たなケース群を用いて p 値が小さい SNPs のみを対象にした研究が必要になる。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

学会発表

頭金正博、鹿庭なほ子、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、宋イシユアン、外園千恵、上田真由美、相原道子、池澤善郎 スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症の発症と関連する遺伝子多型の網羅的探索 日本薬学会第 129 年会 京都 2009 年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し



P-value (Cochrane-Armitage test) plot

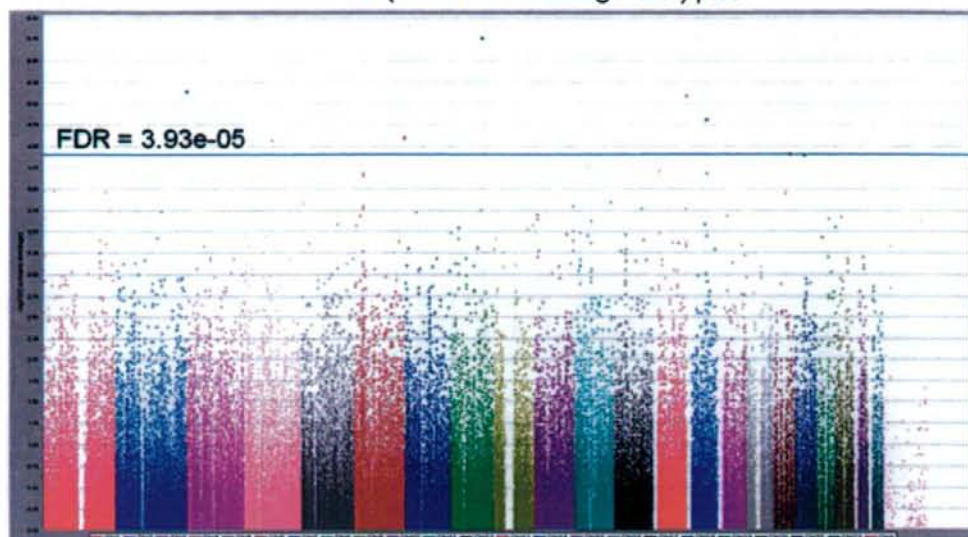


図 1-1 SJS/TEN と確定された被験者（ケース群）82 名と対照群（コントロール群）183 名を用いた関連解析での p 値の分布（傾向検定）

P-value (Genotype mode, Chi-square test) plot

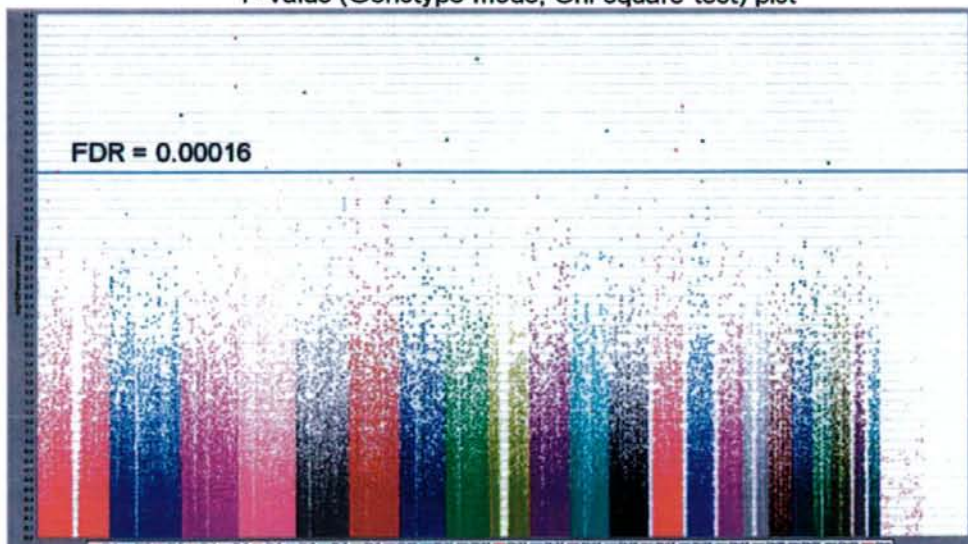


図 1-2 SJS/TEN と確定された被験者（ケース群）82 名と対照群（コントロール群）183 名を用いた関連解析での p 値の分布（遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法）

P-value (Genotype mode, Fisher's exact test) plot

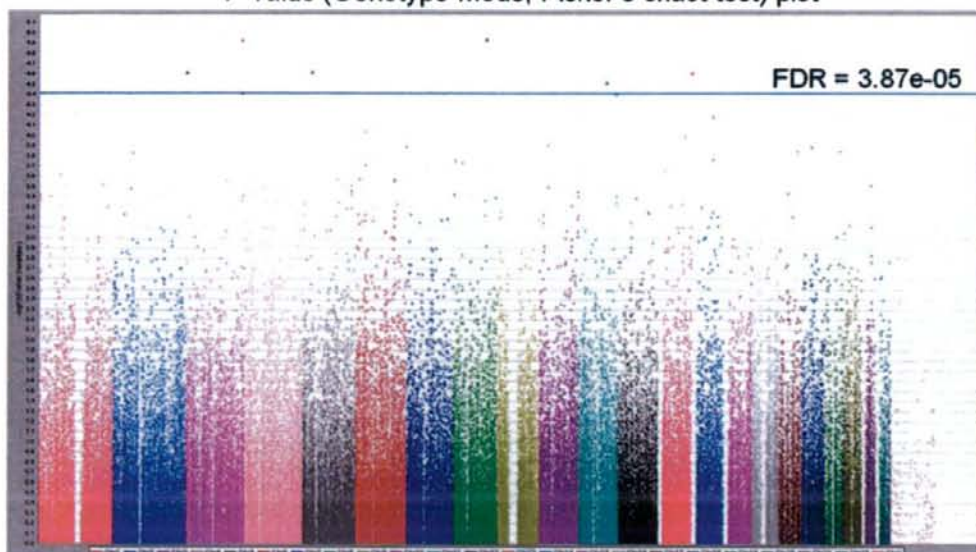


図 1-3 図 1-2 SJS/TEN と確定された被験者（ケース群）82 名と対照群（コントロール群）183 名を用いた関連解析での p 値の分布（遺伝子型モード、フィッシャーの正確検定法）

P-value (Cochrane-Armitage test) plot

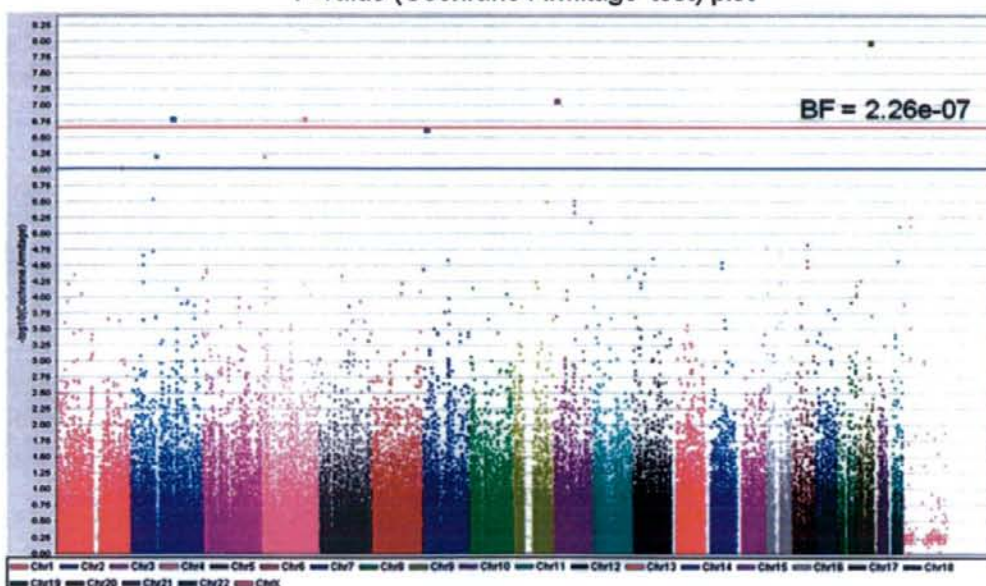


図 2-1 被疑薬がカルバマゼピンの被験者をケース群(10名)とし、コントロール群(157名)を用いた関連解析での p 値の分布（傾向検定）

P-value (Genotype mode, Chi-square test) plot

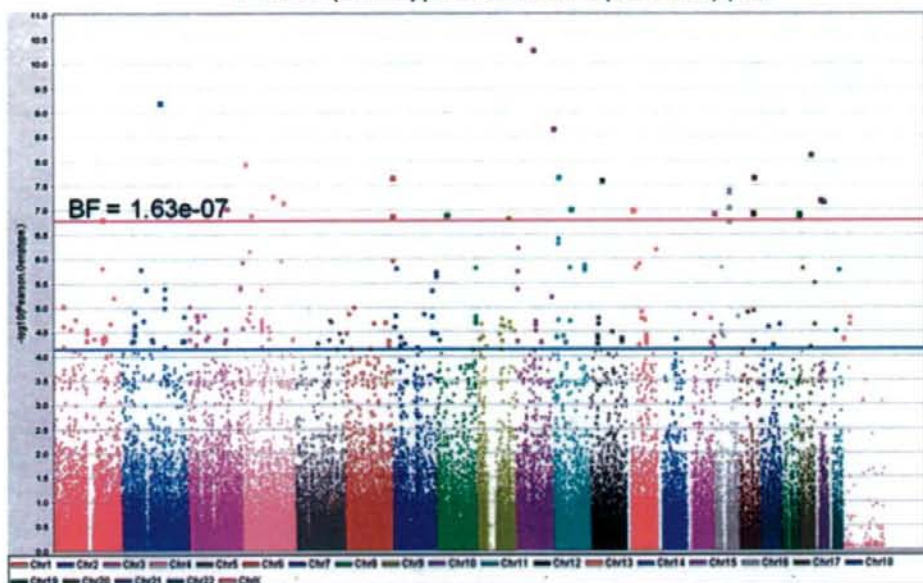


図 2-2 被疑薬がカルバマゼピンの被験者をケース群(10名)とし、コントロール群(157名)を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)

P-value (Genotype mode, Fisher's exact test) plot

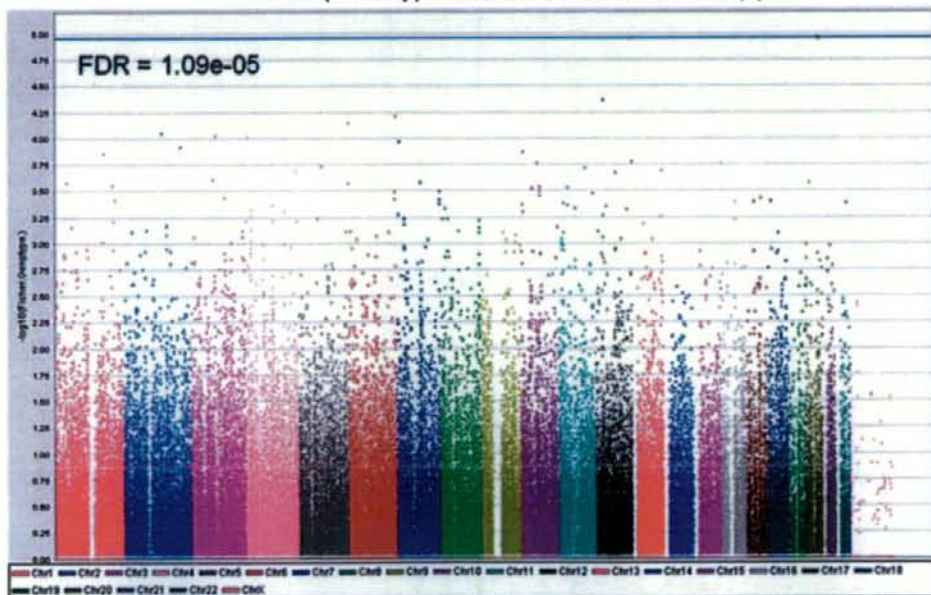


図 2-3 被疑薬がカルバマゼピンの被験者をケース群(10名)とし、コントロール群(157名)を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、フィッシャーの正確検定法)

P-value (Cochrane-Armitage test) plot

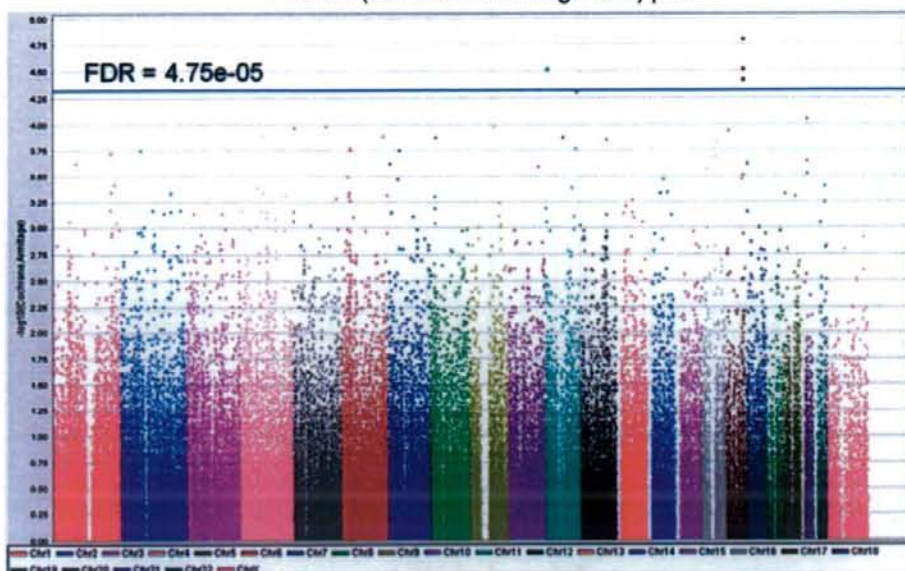


図 3-1 被疑薬が芳香族系抗てんかん薬の被験者をケース群 (24 名) とし、抗てんかん薬を服用しても発症しなかったコントロール群 (17 名) を用いた関連解析での p 値の分布 (傾向検定)

P-value (Genotype mode, Chi-square test) plot

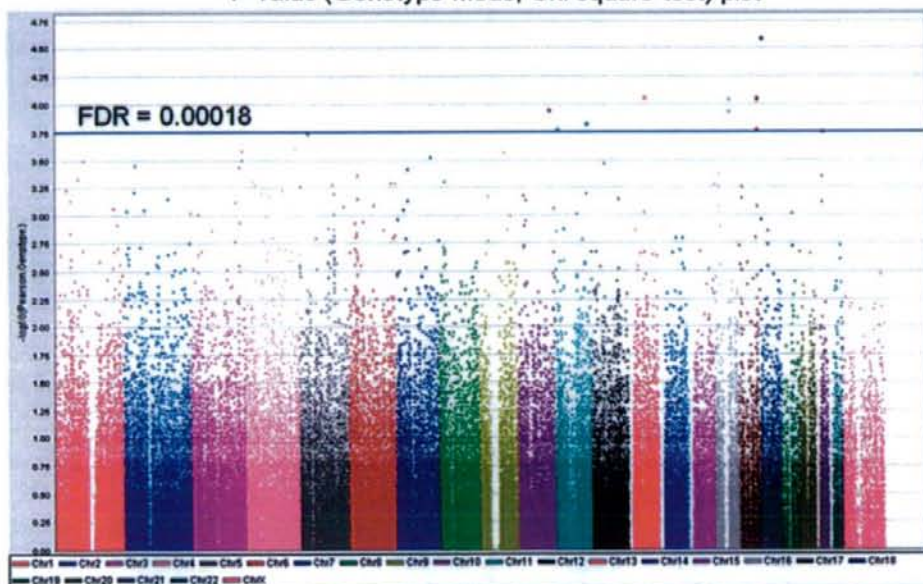


図 3-2 被疑薬が芳香族系抗てんかん薬の被験者をケース群 (24 名) とし、抗てんかん薬を服用しても発症しなかったコントロール群 (17 名) を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)