

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

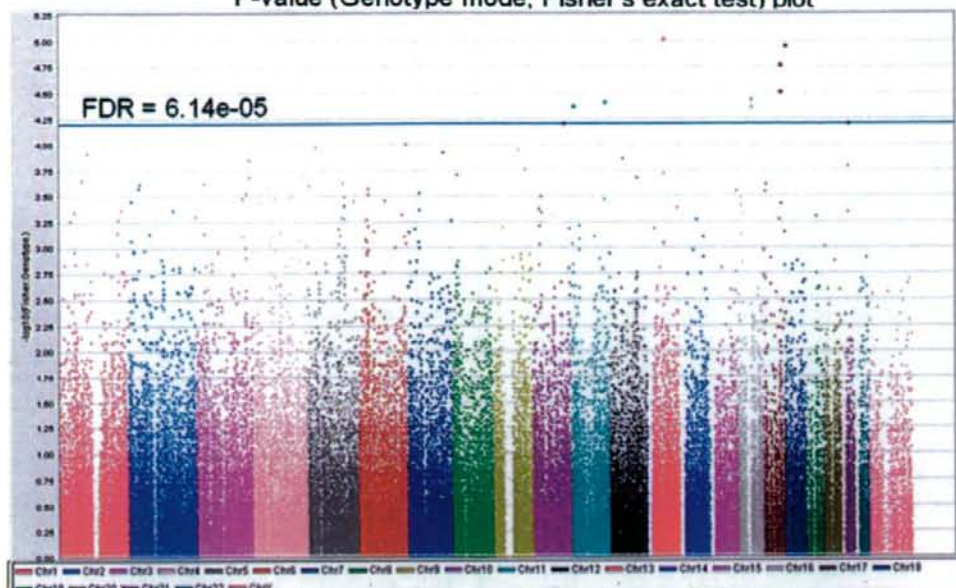


図 3-3 被疑薬が芳香族系抗てんかん薬の被験者をケース群 (24 名) とし、抗てんかん薬を服用しても発症しなかったコントロール群 (17 名) を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、フィッシャーの正確定法)

P-value (Cochrane-Armitage test) plot

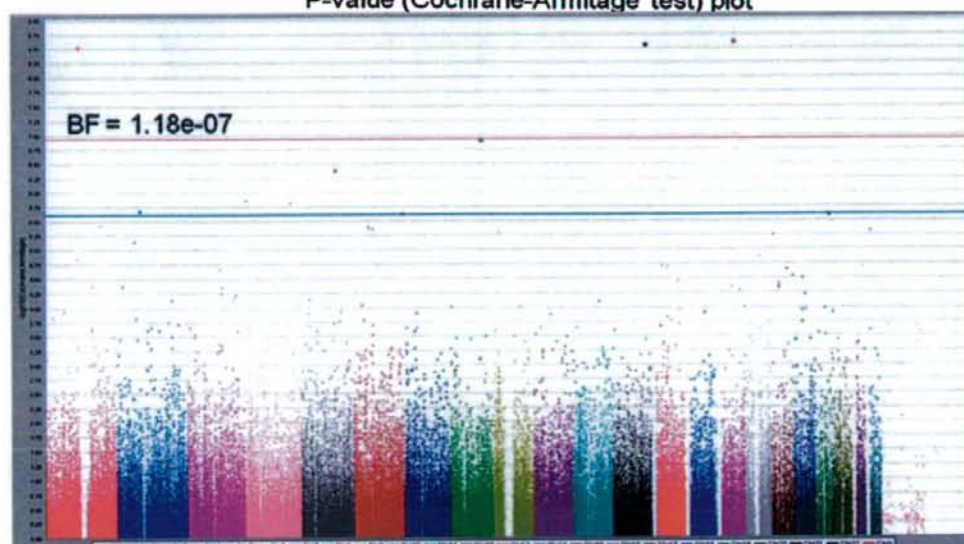


図 4-1 被疑薬がロキソプロフェンの被験者をケース群 (13 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いて関連解析での p 値の分布 (傾向検定)

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

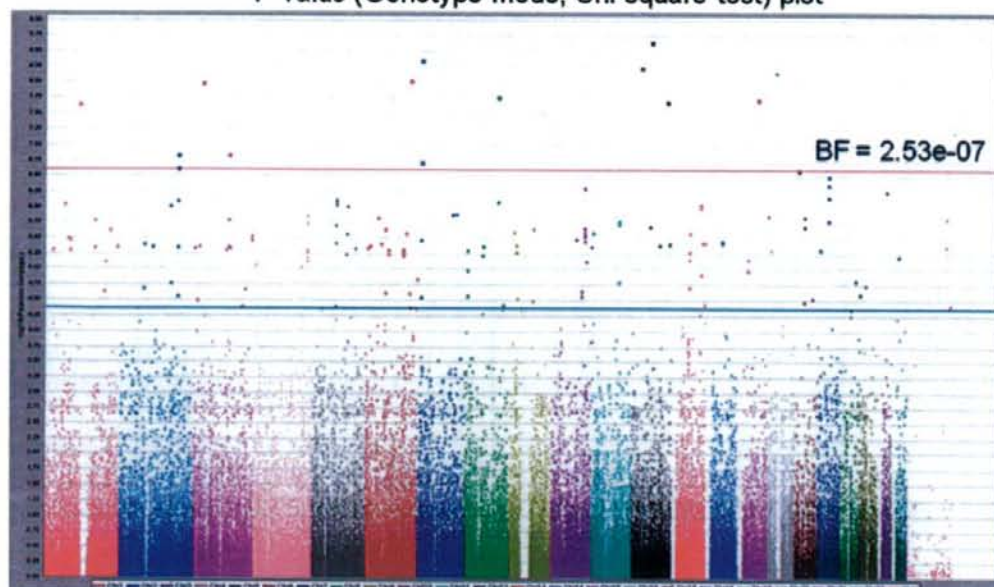


図 4-2 被疑薬がロキソプロフェンの被験者をケース群(13名)とし、コントロール群(157名)を用いて関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)

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

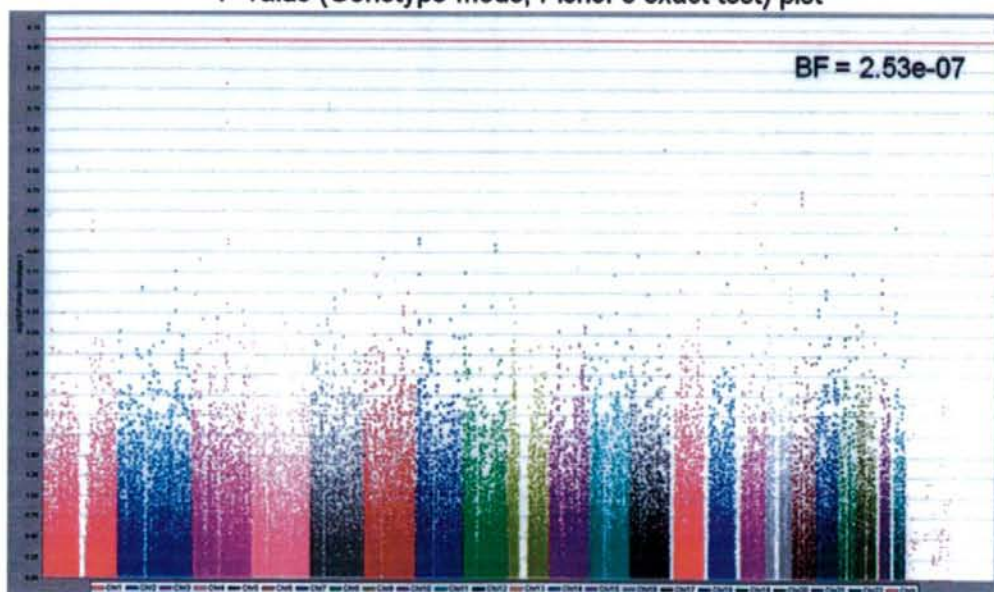


図 4-3 被疑薬がロキソプロフェンの被験者をケース群(13名)とし、コントロール群(157名)を用いて関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、フィッシャーの正確定法)

P-value (Cochrane-Armitage test) plot

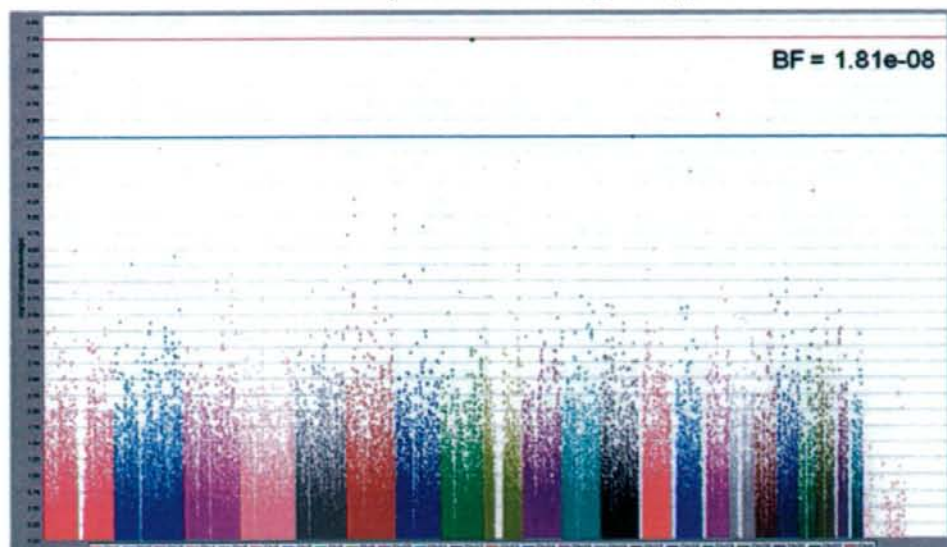


図 5-1 被疑薬が非ステロイド性抗炎症薬の被験者をケース群 (32 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いた関連解析 (傾向検定)

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

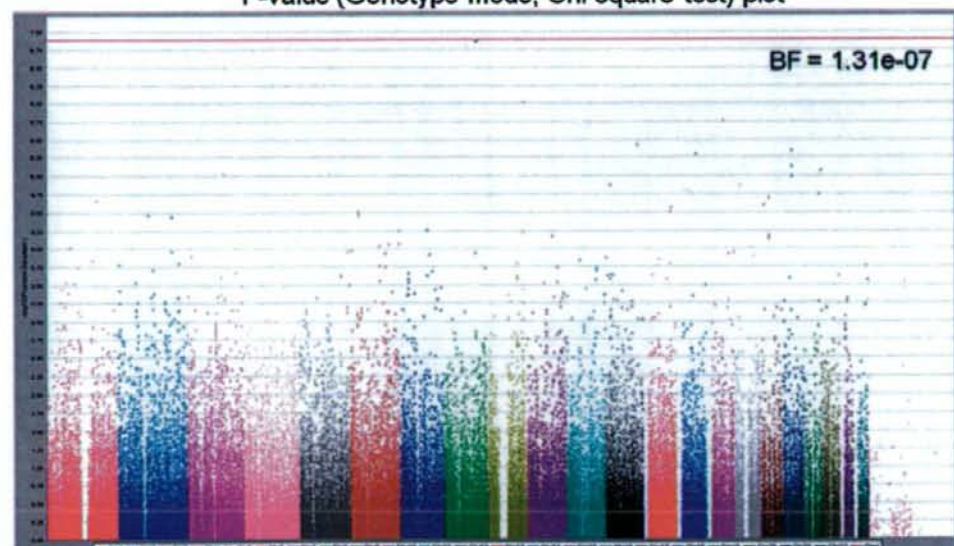


図 5-2 被疑薬が非ステロイド性抗炎症薬の被験者をケース群 (32 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いた関連解析 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)

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

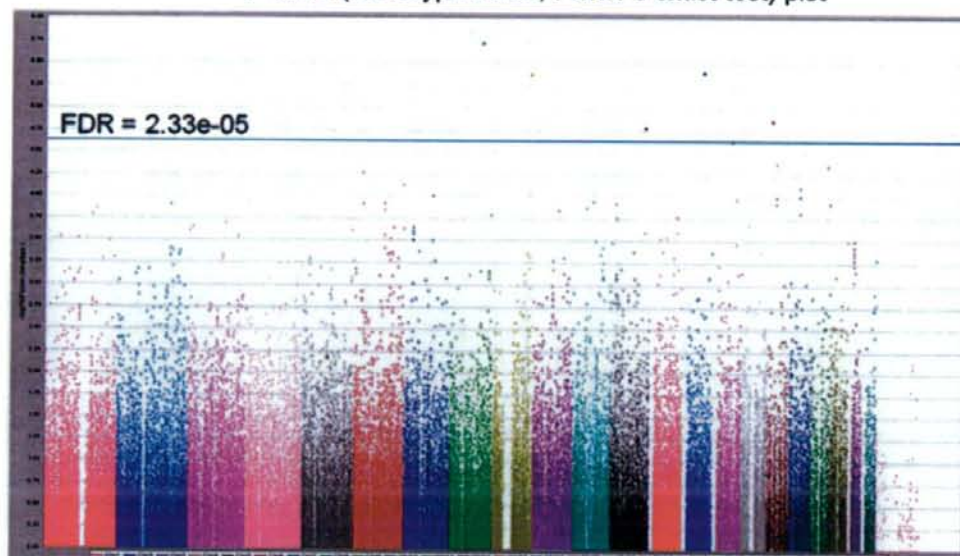


図 5-3 被疑薬が非ステロイド性抗炎症薬の被験者をケース群 (32 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いた関連解析 (遺伝子型モード、フィッシャーの正確定法)

表 1 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解析①の傾向検定で有意とされた SNPs について、第 2 段階の検証研究での検出力を測定する SNP の種類およびケース群・コントロール群の症例数を変えて試算した。

| SNP   | 検出力     |         |         |         |         |         |         |         |         |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|       | 有意水準 1  |         |         | 有意水準 2  |         |         | 有意水準 3  |         |         |
|       | 50/50   | 100/100 | 150/150 | 50/50   | 100/100 | 150/150 | 50/50   | 100/100 | 150/150 |
| SNP_A | 13.567% | 14.102% | 14.139% | 20.155% | 23.878% | 24.476% | 22.373% | 28.263% | 29.459% |
| SNP_B | 8.458%  | 8.954%  | 9.004%  | 12.923% | 16.138% | 16.846% | 14.443% | 19.461% | 20.838% |
| SNP_C | 56.121% | 56.753% | 56.775% | 66.692% | 70.726% | 71.069% | 69.396% | 75.415% | 76.069% |
| SNP_D | 36.192% | 37.135% | 37.197% | 45.836% | 51.419% | 52.246% | 48.428% | 56.677% | 58.206% |
| SNP_E | 6.052%  | 6.513%  | 6.573%  | 9.321%  | 12.120% | 12.888% | 10.430% | 14.734% | 16.187% |
| SNP_F | 4.878%  | 5.353%  | 5.434%  | 7.374%  | 9.968%  | 10.858% | 8.189%  | 12.068% | 13.682% |
| SNP_G | 3.813%  | 4.137%  | 4.182%  | 6.150%  | 8.193%  | 8.787%  | 6.988%  | 10.180% | 11.321% |
| SNP_H | 4.000%  | 4.401%  | 4.470%  | 6.178%  | 8.425%  | 9.202%  | 6.910%  | 10.302% | 11.726% |

有意水準 1 : 上記の 8 種類の SNPs を測定する。

有意水準 2 : p 値の昇順に 50SNPs を測定する。

有意水準 3 : p 値の昇順に 100SNPs を測定する。

50/50 : ケース群・コントロール群それぞれ 50 症例

100/100 : ケース群・コントロール群それぞれ 100 症例

150/150 : ケース群・コントロール群それぞれ 150 症例

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 | 斎藤嘉明 | 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 90 検体を含む 132 検体につき HLA 型の解析をシーケンシングにて行った。ケース群における頻度と日本人健常人における頻度の比較を行い、多重性補正後も有意に異なる HLA 型を同定した。また各医薬品別の解析も行い、アロプリノールで HLA-B\*5801 が有意に相関することを見いだした。

#### 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、皮膚粘膜移行部を中心とする発疹、びらんを主症状とする。発症頻度は非常に低いものの、時に死に至ることが知られていることから、その発症を事前に予測し、他の医薬品の投与等により回避することが可能となれば、医薬品の適正使用上、大きな貢献となる。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（ケース群）、SJS/TEN の

可能性有りと診断された患者群（可能性群）、及びコントロール患者群（含む、健常人）につき解析を進めた。即ち、累計で SJS/TEN 確定診断（ケース）群 90 検体、SJS/TEN 可能性群 14 検体、コントロール群 28 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)を用いて解析を行った。

#### 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、SJS/TEN 可能性群、コントロール群のゲノム DNA を用いた。なお、SJS 初期と考えられる検体は、SJS/TEN 可能性群に含めた。

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/μl のゲノム DNA を、HLA-A, B, Cw では 5 μl、DRB1 では 1 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 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 (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 μl (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 (DYEamic 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 周辺の配列解析結果も用いて判定した。デ

イ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 型のアレル頻度としては、Tanaka H et al., Clin. Transpl. 139-144 (1996) (HLA-A, -B)、Tokunaga K. et al., Immunogenetics, 46, 199-205 (1997) (HLA-Cw)、Hashimoto et al., Tissue Antigens, 44, 166-173 (1994) (HLA-DRB1)、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、既報の日本人健常者における HLA 型のアレル頻度との比較を行った。なお、特許出願等のため、具体的な HLA 型名は伏せて記載した。また、ケース群と可能性群を合わせた 104 例より検出された HLA 型の種類を表 1 に示した。

#### 1) 全例での解析

全ケース症例 (90 検体)、または可能性群 14 例を含めた 104 例での解析を行った。

a) HLA-A: ケース群 90 例の解析で、HLA-A\*2XXX が  $p=0.035$ 、HLA-A\*3XXX が  $p=0.020$  で、それぞれ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。また可能性群を含めた 104 例

での解析で、HLA-A\*0XXX が  $p=0.019$ 、HLA-A\*2XXX が  $p=0.045$  で、それぞれ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。

b) HLA-B：ケース群 90 例の解析で、HLA-B\*5XXX が  $p=0.043$ 、HLA-B\*5YYY が  $p=0.029$  で、HLA-B\*5ZZZ が  $p=0.0004$  で、それぞれ頻度差が認められたが、多重性補正後に、有意な差は認められた型は HLA-B\*5ZZZ ( $p=0.012$ ) のみであった。また可能性群を含めた 104 例での解析では、HLA-B\*1XXX が  $p=0.033$ 、HLA-B\*1YYY が  $p=0.018$  で、HLA-B\*5ZZZ が  $p=0.0009$  で、それぞれ頻度差が認められたが、多重性補正後に、有意な差は認められた型は HLA-B\*5ZZZ ( $p=0.028$ ) のみであった。

c) HLA-Cw：ケース群 90 例の解析で、HLA-Cw\*0XXX が  $p=0.0012$ 、HLA-Cw\*1XXX が  $p=0.0051$  で、それぞれ頻度差が認められたが、多重性補正後に、有意な差は認められた型は HLA-Cw\*0XXX ( $p=0.018$ ) のみであった。また可能性群を含めた 104 例での解析では、HLA-Cw\*0XXX が  $p=0.0022$ 、HLA-Cw\*0YYY が  $p=0.031$ 、HLA-Cw\*0ZZZ が  $p=0.038$  で、HLA-Cw\*1XXX が  $p=0.021$  で、それぞれ頻度差が認められたが、多重性補正後に、有意な差は認められた型は HLA-Cw\*0XXX ( $p=0.033$ ) のみであった。なお、本 HLA-Cw\*0XXX は、前記 HLA-B\*5ZZZ と連鎖しているものであった。

d) HLA-DRB1：ケース群 90 例の解析で、HLA-DRB1\*0XXX が  $p=0.0002$  で頻度差が認められ、多重性補正後も  $p=0.005$  で有意な差が認められた。本相関は、可能性群を含めた 104 例における解析でも認められており、多重性補正前で  $p=0.0002$ 、補正後に  $p=0.005$  で

あった。オッズ比は、ケース群 90 例の解析で 2.07、可能性群を含めた 104 例の解析で 2.01 であった。

## 2) 医薬品別の解析

### a) アロプリノール

抗尿酸血症薬アロプリノール服用ケース患者 15 例について解析し、HLA-B\*5801 及びこれに連鎖している HLA-Cw\*0302 が、多重性補正後もそれぞれ  $p<0.003$ 、 $p<0.002$  と有意な相関を示した。オッズ比は、HLA-B\*5801 で 33 と算出された。

### b) カルバマゼピン

抗てんかん薬カルバマゼピン服用ケース患者 12 例について解析を行った。多重性補正前には 5 タイプで頻度差がみられたものの、多重性補正後に有意な頻度差を示した HLA 型は認められなかった。なお、台湾の漢民族やタイ人で有意な相関が報告されている HLA-B\*1502 は、全解析症例で検出されなかった。

### c) 芳香環を有する抗てんかん薬

芳香環を有する抗てんかん薬（カルバマゼピン、フェノバルビタール、フェニトイン、ゾニサミド、クロナゼパムのいずれか）を服用したケース患者 26 例を対象とした解析を行った。多重性補正前には 8 タイプで頻度差がみられたものの、多重性補正後に有意な頻度差を示した HLA 型は認められなかった。

### d) ロキソプロフェン

非ステロイド性抗炎症剤ロキソプロフェンを服用したケース患者 14 例を対象とした解析を行った。多重性補正前には 2 タイプで頻度差がみられたものの、多重性補正後に有意な頻度差を示した HLA 型は認められなかった。

#### 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。本研究では、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。

医薬品当たりの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、アリル頻度に関して、ケース (SJS/TEN) 群 90 例 (または可能性群を含めた 104 例) 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。90 例及び 104 例での解析ともに、HLA-B、-Cw、-DRB1 でそれぞれ 1 種の多重性補正後も有意な頻度差を示すタイプが認められた。このうち、HLA-B\*57:01、Cw\*03:02 に関しては、特定の医薬品における強い相関に基づくと考えられた。一方、HLA-DRB1\*07:01 に関しては、それぞれ多重性補正前の予備的な解析であるが、芳香環を有する抗てんかん薬、セフェム系抗生物質、アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症剤で相関が見られるものの、アロプリノール、クラリスロマイシン等では相関が弱かった。相関が認められる医薬品では、代謝活性化後または直接的にタンパク質と結合するとされている医薬品が多いことから、感作段階における本 HLA タイプの関与が考えられた。

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\*15:02 (Chung W.H. et al., *Nature* 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\*58:01 (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。日本人を対象にし

た本研究では、アロプリノール服用患者で、漢民族 (及び白人、Lonjou C et al., *Pharmacogenet. Genomics*, 18: 99-107 (2008)) で有意な相関が報告されている HLA-B\*58:01 がやはり有意な相関を示した。オッズ比は約 33 と、白人の場合 (オッズ比: 80) と比較しても低かった。これはアロプリノールを服用しているものの、SJS/TEN 発症の原因医薬品はアロプリノール以外である症例も含まれている可能性があるためと考えられた。一方、カルバマゼピンに関しては、HLA-B\*15:02 が日本人検体では検出されず、他の遺伝子マーカーの関与が示唆された。

多くの種類の医薬品に関し、現時点では多重性補正後に有意な頻度差を示さないものの、多重性補正前には有意な HLA 型も数種認められているため、今後は、検体数を増やして、薬剤毎に相関する HLA 型の探索を主として行う予定である。

#### E. 結論

累計で SJS/TEN 患者 (ケース) 群 90 検体を含む 132 検体につき HLA 型の解析をシーケンシングにて行った。医薬品の種類を区別せず全例を対象に、ケース群における頻度と日本人健常人におけるアレル頻度の比較を行い、多重性補正後も有意に異なる HLA 型を同定した。また各医薬品別の解析も行い、アロプリノールで HLA-B\*58:01 が有意に相関することを見いだした。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表



1) Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, Sawada J, Furuya H, Takahashi Y, Muramatsu M, Kinoshita S, Abe M, Ikeda H, Kashiwagi M, Song Y, Ueta M, Sotozono C, Ikezawa Z, Hasegawa R; JSAR research group. HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Pharmacogenomics*, 9: 1617-1622 (2008).

2) 斎藤嘉朗, 澤田純一「ファーマコゲノミクス」日本臨床 印刷中 (2009)

## 2. 学会発表

1) 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)。第 15 回日本免疫

毒性学会学術大会 平成 20 年 9 月 12 日 (東京)。

2) 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) のゲノム薬理学。第 29 回日本臨床薬理学会年会シンポジウム 平成 20 年 12 月 5 日 (東京)。

## 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 ケース群及び可能性群、計 104 例より検出された HLA 型

| A      | B    | Cw     | DRB1   |
|--------|------|--------|--------|
| 0101   | 0702 | 0102   | 0101   |
| 0201   | 1301 | 0302   | 0301   |
| 0203   | 1302 | 0303   | 0401   |
| 0206   | 1501 | 0304   | 0403   |
| 0207   | 1507 | 0401   | 0405   |
| 0210   | 1511 | 0602   | 0406   |
| 1101   | 1518 | 0702   | 0407   |
| 1102   | 1527 | 0704   | 0410   |
| 2402   | 2704 | 0801   | 0701   |
| 2420   | 3501 | 0803   | 0802   |
| 2601   | 3701 | 1202   | 0803   |
| 2602   | 3802 | 1203   | 0901   |
| 2603   | 3901 | 1402   | 1101   |
| 3001   | 3904 | 1403   | 1201   |
| 3101   | 4001 | 1502   | 1202   |
| 3303   | 4002 | 15 アレル | 1301   |
| 16 アレル | 4003 |        | 1302   |
|        | 4006 |        | 1401   |
|        | 4403 |        | 1402   |
|        | 4601 |        | 1403   |
|        | 4801 |        | 1405   |
|        | 5101 |        | 1406   |
|        | 5102 |        | 1407   |
|        | 5201 |        | 1501   |
|        | 5401 |        | 1502   |
|        | 5502 |        | 25 アレル |
|        | 5504 |        |        |
|        | 5601 |        |        |
|        | 5801 |        |        |
|        | 5901 |        |        |
|        | 6701 |        |        |
| 31 アレル |      |        |        |

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  
血清中バイオマーカーに関する研究  
-サイトカイン-

|       |       |                                       |
|-------|-------|---------------------------------------|
| 研究分担者 | 高橋 幸利 | 独立行政法人国立病院機構<br>静岡てんかん・神経医療センター臨床研究部長 |
| 研究協力者 | 池田浩子  | 国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター                |
|       | 山崎悦子  | 国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター                |
|       | 角替央野  | 国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター                |
|       | 西村成子  | 国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター                |

研究要旨 重症薬疹症例の血清サイトカインを測定し、免疫学的な病態を明らかにし、早期診断マーカーを見出す研究を行った。

炎症性サイトカインのうちでは、急性期IL-1 $\beta$ の値（ $4.39 \pm 3.16 \text{ pg/ml}$ ）は健康成人対照に比べて高値であった（Mann Whitney test,  $p=0.018$ ）。IL-6の急性期（ $44.65 \pm 53.51 \text{ pg/ml}$ ）、回復期（ $23.45 \pm 33.95 \text{ pg/ml}$ ）の値は健康成人対照に比べて高値であった（Mann Whitney test,  $p=0.030$ ,  $p=0.023$ ）。IL-17、TNF  $\alpha$ は、急性期・回復期ともに対照に比べて有意差がなかった。Th1細胞関連サイトカインでは、急性期IFN  $\gamma$ （ $164.16 \pm 85.35 \text{ pg/ml}$ ）は健康成人対照に比べて高値であった（Mann Whitney test,  $p=0.010$ ）。IL-2は急性期（ $42.67 \pm 29.57 \text{ pg/ml}$ ）、回復期（ $11.45 \pm 13.67 \text{ pg/ml}$ ）の値は健康成人対照に比べて高値であった（Mann Whitney test,  $p=0.002$ ,  $p=0.028$ ）。Th1・Th2分化に関するサイトカインでは、L-12、IL-10は、急性期・回復期ともに対照に比べて有意差がなかった。

重症薬疹では薬物による何らかの刺激でTh1細胞が活性化、活性化Th1がIL-2を分泌し、細胞障害性T細胞が活性化され、表皮細胞のアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

#### 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。

SJS、中毒性表皮壊死症（TEN）などの重症薬疹は医薬品（ときに感染症）により生じた免疫・アレルギー反応により発症すると考えられているが、種々の説が唱えられており、未だ統一された見解はない（重篤

副作用疾患別対応マニュアル、平成18年11月厚生労働省)。

マニュアルによると、病変部では著明なCD8<sup>+</sup>T細胞の表皮への浸潤がみられることから、発症は活性化された細胞傷害性Tリンパ球(CD8<sup>+</sup>T細胞)の表皮細胞攻撃の結果と考えられるが、その機序としては、直接的に表皮細胞のアポトーシスを誘導する、もしくはこの細胞から産生されるIFN- $\gamma$ やマクロファージから産生されるTNF- $\alpha$ が細胞傷害を引き起こすと想定されている。また、細胞死を誘導する受容体であるFasとFasに対するリガンドであるFas ligand(FasL)の異常発現を認め、分子の相互作用によって表皮細胞のアポトーシスが生じるとの考え方もある。すなわち、原因薬剤刺激により産生される末梢血単核球由来の可溶性FasL(sFasL)が表皮細胞のFasに結合しアポトーシスを誘導することによりSJS/TENを発症させ得ると推測されている。

そこで我々は、重症薬疹症例の血清サイトカインを測定し、免疫学的な病態を明らかにし、早期診断マーカーを見出す研究を行った。

## B. 対象・研究方法

SJS/TEN遺伝子多型研究班において診断された重症薬疹症例10例を対象とした。推測される原因薬剤は、抗てんかん薬5例、解熱鎮痛薬1例、抗生剤1例、不明3例である。10症例の凍結保存血清(急性期、5検体;回復期、9検体)を用い、Bio Plexサスペンションビーズアレイシステムにより、27種類のサイトカイン等(IL-1b、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL

-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、Eotaxin、FGF basic、G-CSF、GM-CSF、IFN-g、IP-10、MCP-1、MIP-1a、MIP-1b、PDGF bb、RANTES、TNF-a、VEGF)を測定した。

### (倫理面への配慮)

個人情報の管理に注意し、匿名化して送付を受けた検体を用いた。

## C. 研究結果

### 1. 炎症性サイトカイン

IL-1 $\beta$ は急性期 $4.39 \pm 3.16$  pg/ml、回復期 $2.94 \pm 2.01$  pg/mlで、急性期の値は健康成人対照に比べて高値であった(Mann Whitney test,  $p=0.018$ ) (図1)。IL-6は急性期 $44.65 \pm 53.51$  pg/ml、回復期 $23.45 \pm 33.95$  pg/mlで、急性期・回復期の値は健康成人対照に比べて高値であった(Mann Whitney test,  $p=0.030$ ,  $p=0.023$ )。IL-17、TNF  $\alpha$ は、急性期・回復期ともに対照に比べて有意差がなかった。

### 2. 抗炎症サイトカイン

IL-10は急性期・回復期ともに対照に比べて有意差がなかった。IL-13は急性期 $37.60 \pm 31.46$  pg/ml、回復期 $26.88 \pm 34.57$  pg/mlで、急性期の値は健康成人対照に比べて高値であった(Mann Whitney test,  $p=0.014$ ) (図2)。

IL-1raは急性期 $801.62 \pm 563.13$  pg/ml、回復期 $345.29 \pm 283.12$  pg/mlで、急性期の値は健康成人対照に比べて高値であった(Mann Whitney test,  $p=0.014$ )。

### 3. Th1細胞関連サイトカイン

IFN  $\gamma$ は急性期 $164.16 \pm 85.35$  pg/ml、回復期 $107.19 \pm 73.58$  pg/mlで、急性期の値は健康成人対照に比べて高値であった(Mann

Whitney test,  $p=0.010$ ) (図3)。IL-2は急性期 $42.67 \pm 29.57$  pg/ml、回復期 $11.45 \pm 13.67$  pg/mlで、急性期・回復期の値は健康成人対照に比べて高値であった (Mann Whitney test,  $p=0.002$ ,  $p=0.028$ )。IL-6は前述したように、急性期・回復期の値は健康成人対照に比べて高値であったが、TNF  $\alpha$  は、対照に比べて有意差がなかった。

#### 4. Th1・Th2分化に関係するサイトカイン

IL-4は急性期 $4.27 \pm 1.55$  pg/ml、回復期 $3.72 \pm 1.78$  pg/mlで、急性期の値は健康成人対照に比べて高値であった (Mann Whitney test,  $p=0.039$ ) (図4)。IL-5は急性期 $10.05 \pm 8.71$  pg/ml、回復期 $6.26 \pm 9.79$  pg/mlで、急性期の値は健康成人対照に比べて高値であった (Mann Whitney test,  $p=0.023$ )。IL-12、IL-10は、急性期・回復期ともに対照に比べて有意差がなかった。

#### D. 考察

SJS/TENと診断された重症薬疹症例10例のサイトカインの検討では、急性期を主体に炎症性サイトカインのIL-1 $\beta$ 、IL-6、Th1細胞の活性化を示唆するIFN  $\gamma$ 、IL-2の上昇が見られたが、Naïve T細胞からTh1細胞への分化を誘導するIL-12は多くの症例で上昇しておらず、自己反応性Th1細胞を抑制する制御性T細胞の働きを示唆するIL-10も低下していなかった。増加したサイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN  $\gamma$ 、IL-2) の中で特に大きく上昇していたのはIL-2であり、Th1細胞の活性化が重症薬疹の大きな病態因子である可能性がある。自己免疫疾患とは異なり制御性T細胞の機能は低下していないが、薬物による何らかの刺激でTh1細胞が

活性化し、IL-2を分泌し、細胞障害性T細胞 (CTL) が活性化され、直接的に表皮細胞のアポトーシスを誘導している可能性が高い。今後CTLの活性化マーカーであるGranzymeなどを測定していく予定である。

炎症性サイトカインのうちのTNF  $\alpha$  の上昇は確認できなかったが、より安定なsTNFR1による検討を今後行う予定である。自己免疫疾患で上昇するIL-17には有意な上昇がなく、重症薬疹の特徴かもしれない。今後さらに症例を増やして検討する必要がある。

#### E. 結論

重症薬疹ではIL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN  $\gamma$ 、IL-2が増加し、薬物による何らかの刺激でTh1細胞が活性化し、IL-2を分泌し、細胞障害性T細胞 (CTL) が活性化され、直接的に表皮細胞のアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。自己免疫疾患で上昇するIL-17には有意な上昇がなく、Th1分化を促進するIL-12も大きく上昇しないのが重症薬疹の特徴かもしれない。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yukitoshi Takahashi, Epitope of autoantibodies to NMDA-receptor in paraneoplastic limbic encephalitis, *Annals of Neurology*, 2008; 64: 110-111.

2. Yukitoshi Takahashi, Yuko Kubota, Etsuko Yamasaki, Shigeo Nishimura, Hisano Tsunogae, Tateki Fujiwara, Autoantibodies against GluR epsilon 2 in adult patients with non-paraneoplastic acute limbic encephalitis, *J Neuroimmunology*, 2008; 203: 180.
3. Yukitoshi Takahashi, Jun Mine, Yuko Kubota, Etsuko Yamazaki, Tateki Fujiwara, A substantial number of Rasmussen syndrome patients have increased IgG, CD4<sup>+</sup> T cells, TNF  $\alpha$ , and Granzyme B in CSF, *Epilepsia*, in press.
4. Yukitoshi Takahashi, Hisashi Mori, Masayoshi Mishina, Masahiko Watanabe, Naomi Kondo, Jiro Shimomura, Yuko Kubota, Kazumi Matsuda, Katsuyuki Fukushima, Naohide Shiroma, Noriyuki Akasaka, Hiroshi Nishida, Atsushi Imamura, Hiroo Watanabe, Nobuyoshi Sugiyama, Makoto Ikezawa, Tateki Fujiwara, Autoantibodies to NMDA-type GluR  $\epsilon$  2 in patients with Rasmussen's encephalitis and chronic progressive epilepsy partialis continua, *Epilepsia* in press.
5. Masaya Kubota, Yukitoshi Takahashi, Steroid-responsive chronic cerebellitis with positive glutamate receptor delta 2 antibody. *J Child Neurology*, 2008; 23: 228-230.
6. Takashi Ichiyama, Hiroshi Shoji, Yukitoshi Takahashi, Takeshi Matsushige, Madoka Kajimoto, Takashi Inuzuka, Susumu Furukawa, Cerebrospinal fluid levels of cytokines in non-herpetic acute limbic encephalitis: Comparison with herpes simplex encephalitis, *Cytokine* 2008; 44: 149-153.
7. 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, Ryuichi Hasegawa, HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis, *Pharmacogenomics*, 2008; 9: 1617-1622.
8. Kiyoshi Egawa, Yukitoshi Takahashi, Yuko Kubota, Hideki Kubota, Yushi Inoue, Takeki Fujiwara, Osamu Onodera, Electroclinical Features of Epilepsy in Patients with Juvenile Type Dentatorubral-pallidoluysian Atrophy, *Epilepsia*, 2008; 49(12): 2041-2049.
9. Kiyoshi Fukaya, Hisao Nagata,

- Takumi Yoshimura, Toshiyo Tamura, Osamu Tanaka, Yukitoshi Takahashi, Mituya Uchida, DEVELOPMENT OF WEARABLE AIRBAGS FOR FALLS ON THE LEVEL FLOORS, Proceedings of International Conference on Slips, Trips and Falls 2007: From Research to Practice, in press.
10. Mariko Kashiwagi, Michiko Aihara, Yukitoshi Takahashi, Etsuko Yamazaki, Yumiko Yamane, Yixuan Song, Masaaki Muramatsu, Zenro Ikezawa, HLA genotypes in carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug response in Japanese patients, *J Dermatology*, in press.
  11. 高橋幸利、ADHD との鑑別を要した身体疾患の症例、症例 3、編集：AD/HD の診断・治療指針に関する研究会、斎藤万比古、渡部京太、注意欠如・多動性障害-ADHD-の診断・治療ガイドライン 第3版、じほう、pp97-115.
  12. 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、p 39-42、日本医事新報社、2009年1月発行.
  13. 高橋幸利、西村成子、角替央野、急性辺縁系脳炎におけるグルタミン酸受容体自己免疫の病態、*Clinical Neuroscience*, 2008; 26: 508-511.
  14. 永井勲久、川尻真和、伊賀瀬道也、高橋幸利、小原克彦、三木哲郎、長期の人工呼吸管理後軽快した重症非ヘルペス性辺縁系脳炎の1例、*神経内科* 2008; 68: 282-286.
  15. 六反田拓、稲富雄一郎、米原敏郎、高橋幸利、平野照之、内野誠、血清・髄液中抗グルタミン酸受容体抗体陽性が診断を混乱させた glioblastoma の1例、*臨床神経学*、2008; 48: 497-500.
  16. 高橋幸利、山崎悦子、西村成子、角替央野、藤原建樹、急性非ヘルペス性脳炎-自己免疫的アプローチ-、*Neuroinfection*, 2008; 6: 85-92.
  17. 大谷英之 高橋幸利 井上有史 藤原建樹、パニック障害として SSRI を投与され、てんかん発作が増悪した側頭葉てんかんの1例、*小児科臨床*、2008; 61: 1854-1858.
  18. 高橋幸利、向田壮一、池上真理子、高橋宏佳、美根潤、てんかんの最新情報、9. 免疫学的病態解明・診断と治療、*PharmaMedica*、2008; 26: 51-54.
  19. 高橋幸利、向田壮一、池上真理子、高橋宏佳、美根潤、3. 抗 GluR 抗体と脳炎、*神経内科*、2008; 69: 350-358.
  20. 小林史和、長坂高村、小林理恵子、塩澤全司、高橋幸利、ウィルス性小脳炎による opsoclonus-polymyoclonia 症候群の1例、*神経内科*、2008; 69: 390-393.
  21. 高橋幸利、山崎悦子、西村成子、角替央野、丹羽憲司、Josep Dalmau、藤原建樹、急性辺縁系脳炎・脳症と NMDA 型グルタミン酸受容体、*臨床神経学*、2008; 48: 926-929.
  22. 高橋幸利、山崎悦子、長尾雅悦、小出信雄、宇留野勝久、遠山潤、岡田久、渡辺宏雄、樋口嘉久、高田裕、夫敬憲、馬場啓至、村木幸太郎、田中滋己、湯浅龍彦、須貝研司、急性脳炎の後遺症に関する調査、-ADL・てんかん発作・

- 知的障害・精神障害・記憶障害・運動障害-、Neuroinfection, in press.
23. 高橋幸利、池上真理子、向田壮一、小児疾患診療のための病態生理 2、てんかん、小児内科増刊号、41：印刷中。
  24. 高橋幸利、向田壮一、池上真理子、病氣と薬パーフェクトブック 2009：てんかん、薬局、印刷中。
  25. 高橋幸利、木全かおり、高山留美子、向田壮一、池上真理子、高橋宏佳、美根潤、小児てんかんの診療-最近の考え方、III. てんかんと鑑別が必要な発作性疾患、6. 光感受性発作、小児内科、2009；41：印刷中。
  26. 高橋幸利、久保田裕子、今井克美、池田浩子、山崎悦子、小児てんかんの診療-最近の考え方、II. 小児で重要なてんかん症候群、3. 小児の慢性進行性持続性部分てんかん・ラスムッセン症候群、小児内科、2009；41：印刷中。
  27. 高橋幸利、高山留美子、向田壮一、池上真理子、高橋宏佳、美根潤、特集II /抗 NMDA 受容体抗体と脳炎、5. グルタミン酸受容体抗体、神経内科、印刷中。
  28. 木全かおり、高橋幸利、藤原建樹、ビデオゲーム誘発発作における誘発因子の調査、日本小児科学会誌、印刷中。
2. 学会発表
    1. Masaaki Muramatsu, Michiko Aihara, Mariko Kashiwagi, Yukitoshi Takahashi, Zenro Ikezawa, Naoko Kaniwa, HLA genotypes in carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug response: difference between Japanese and Han-Chinese, 13<sup>th</sup> International genome congress, Sep 26-Oct 1<sup>st</sup>, 2008.
    2. Nahoko Kaniwa, Yoshiro Saito, Michiko Aihara, Kayoko Matsunaga, Masahiro Tohkin, Kouichi Kurose, Hirokazu Furuya, Yukitoshi Takahashi, Masaaki Muramatsu, Shigeru Kinoshita, Zenro Ikezawa, Ryuichi Hasegawa, An exploratory study of genetic biomarkers associated with Japanese SJS/TEN patients: a nation-wide multi-center study in Japan, International Society for the Study of Xenobiotics, October, 12, 2008, San Diego.
    3. Kouichi Kurose, Yoshiro Saito, Masahiro Tohkin, Nahoko Kaniwa, Michiko Aihara, Kayoko Matsunaga, Yukitoshi Takahashi, Hirokazu Furuya, Masaaki Muramatsu, Shigeru Kinoshita, Zenro Ikezawa, Jun-ichi Sawada, Ryuichi Hasegawa, Association between HLA alleles and carbamazepine- and allopurinol-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients, International Society for the Study of Xenobiotics, October, 12, 2008, San Diego.
    4. Yukitoshi Takahashi, Yuko Kubota, Etsuko Yamasaki, Shigeko Nishimura, Hisano Tsunogae, Tateki Fujiwara,



- Autoantibodies against GluR epsilon 2 in adult patients with non-paraneoplastic acute limbic encephalitis, 9<sup>th</sup> International Congress of Neuro Immunology, October 26-30 2008, Fort Worth, Texas.
5. 高橋幸利、西村成子、角替央野、藤原建樹、丹羽憲司、卵巣奇形腫を合併する急性辺縁系脳炎・脳症 16 症例の臨床特徴と抗 GluR2 抗体、第 20 回日本神経免疫学会学術集会、2008 年 4 月 17-18 日、新潟。
  6. 高橋幸利、分野別シンポジウム No6 「脳炎・脳症の新しい概念、病態、治療」非ヘルペス性急性辺縁系脳炎、第 111 回日本小児科学会、2008 年 4 月 25 日-27 日、東京。
  7. Yukitoshi Takahashi, Etsuko Yamasaki, Shigeko Nishimura, Hisano Tsunogae, Tateki Fujiwara, Josep Dalmau, Symposium on anti-NMDAR antibodies encephalopathy, Acute limbic encephalitis and NMDA Receptor, 第 49 回日本神経学会、2008 年 5 月 15-17 日、横浜。
  8. 高橋幸利、山崎悦子、西村成子、角替央野、藤原建樹、小児の急性辺縁系脳炎における抗 GluR2 抗体の意義、第 50 回日本小児神経学会、2008 年 5 月 28-31 日、東京。
  9. 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)、平成 20 年度免疫毒性学会、2008 年 9 月 11 日-12 日、東京。
  10. 高橋幸利、池田浩子、山崎悦子、藤原建樹、鹿庭なほ子、斎藤嘉朗、相原道子、個に応じた医療を目指して、カルバマゼピンによる重症薬疹に係わる HLA の研究、日本人類遺伝学会 第 53 回大会、2008 年 9 月 27-30 日、横浜。
  11. 市山高志、庄司紘史、高橋幸利、松重武志、梶本まどか、古川 漸、非ヘルペス性辺縁系脳炎の髄液サイトカイン解析:単純ヘルペス脳炎との比較検討、第 13 回日本神経感染症学会、2008 年 10 月 10-11 日、東京。
  12. 中嶋秀人、細川隆史、杉野正一、木村文治、花房利昭、高橋幸利、非ヘルペス性辺縁系脳炎における髄液中ケモカインの解析、第 13 回日本神経感染症学会、2008 年 10 月 10-11 日、東京。
  13. 高橋幸利、山崎悦子、西村成子、角替央野、藤原建樹、急性非ヘルペス性辺縁系脳炎・脳症における抗 GluR2 抗体のエピトープの意義、第 13 回日本神経感染症学会、2008 年 10 月 10-11 日、東京。
  14. 高橋幸利、久保田裕子、美根潤、山崎悦子、角替央野、西村成子、藤原建樹、ラスムッセン症候群の CD8<sup>+</sup>T 細胞の分子免疫学的病態研究、トランスレーションリサーチセッション、第 42 回日本てんかん学会、2008 年 10 月 18-19 日、東京。
  15. 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 回年会、2008 年 3 月 26 日～28 日、京都。
16. 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 回年会、2008 年 3 月 26 日～28 日、京都。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
当該研究に関するものはなし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

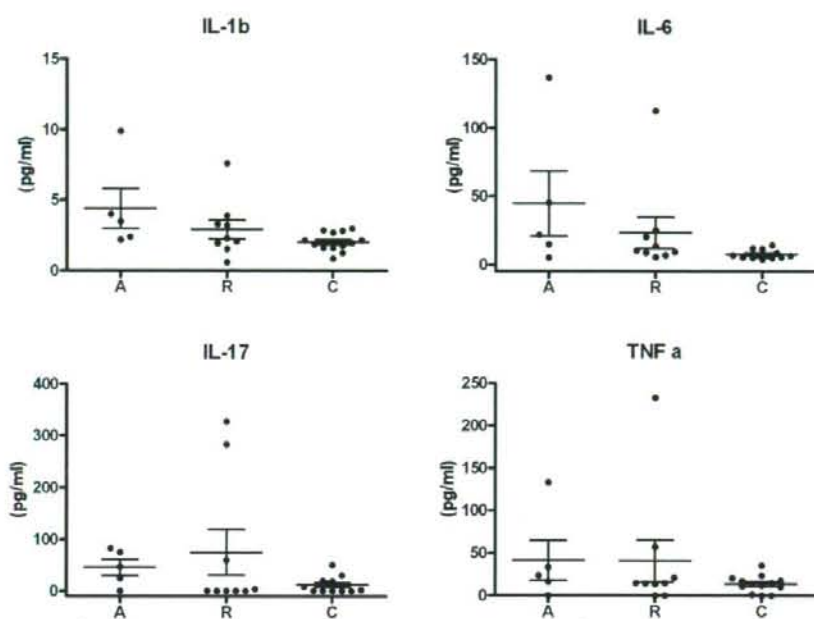


図1. 炎症性サイトカイン、A、急性期血清；R、回復期血清；C、健康成人対照血清、図の中のバーは平均±SE（標準誤差）を示す。

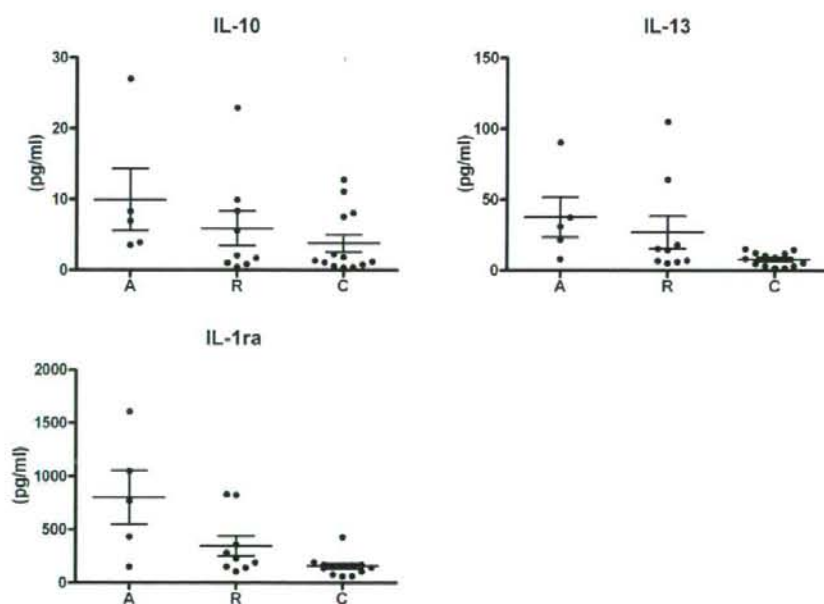


図2. 抗炎症性サイトカイン、A、急性期血清；R、回復期血清；C、健康成人対照血清、図の中のバーは平均±SE（標準誤差）を示す。

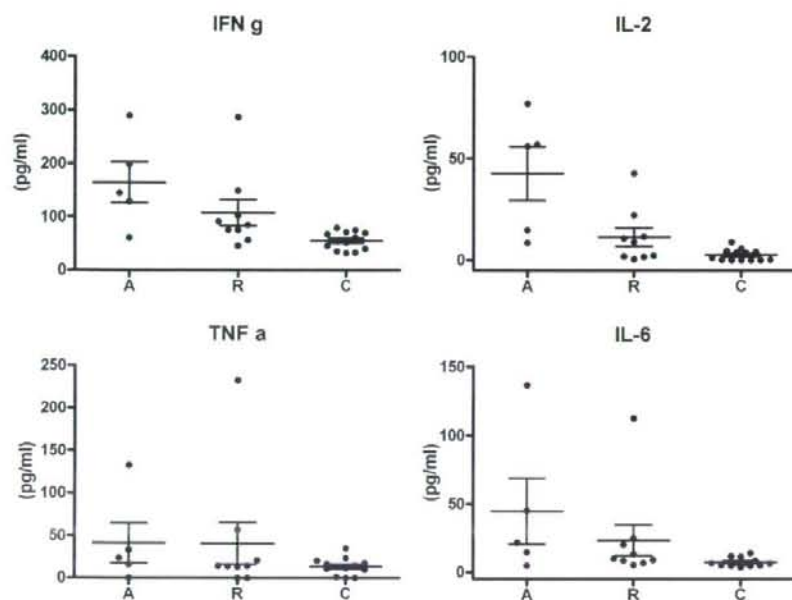


図3. Th1細胞関連サイトカイン、A、急性期血清；R、回復期血清；C、健康成人対照血清、図の中のバーは平均±SE（標準誤差）を示す。

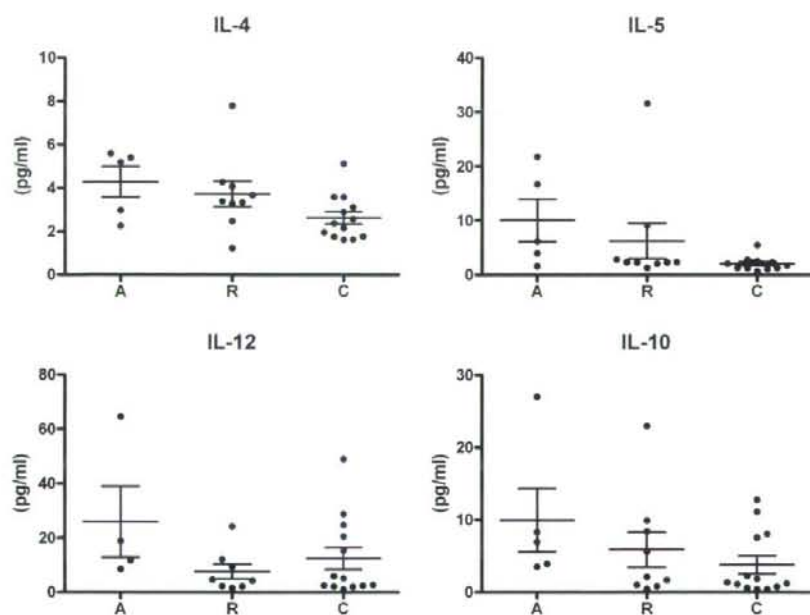


図4. Th1Th2細胞分化関連サイトカイン、A、急性期血清；R、回復期血清；C、健康成人対照血清、図の中のバーは平均±SE（標準誤差）を示す。