

意に関連があると判断される SNPs があつた (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 名には健康人 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、健康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、コ克蘭・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

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

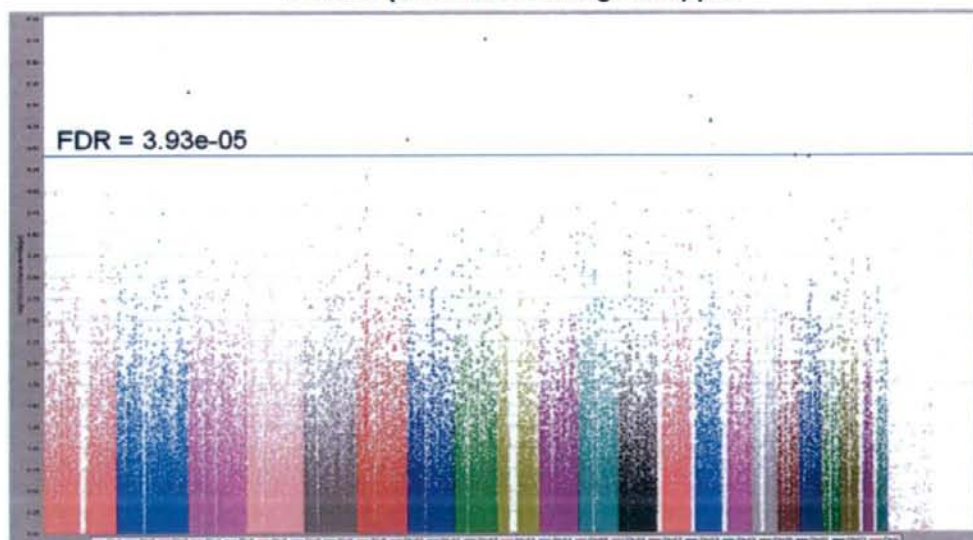


図 1-1 SJS/TEN と確定された被験者 (ケース群) 82 名と対照群 (コントロール群) 183 名を用いた関連解析での p 値の分布 (傾向検定)

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

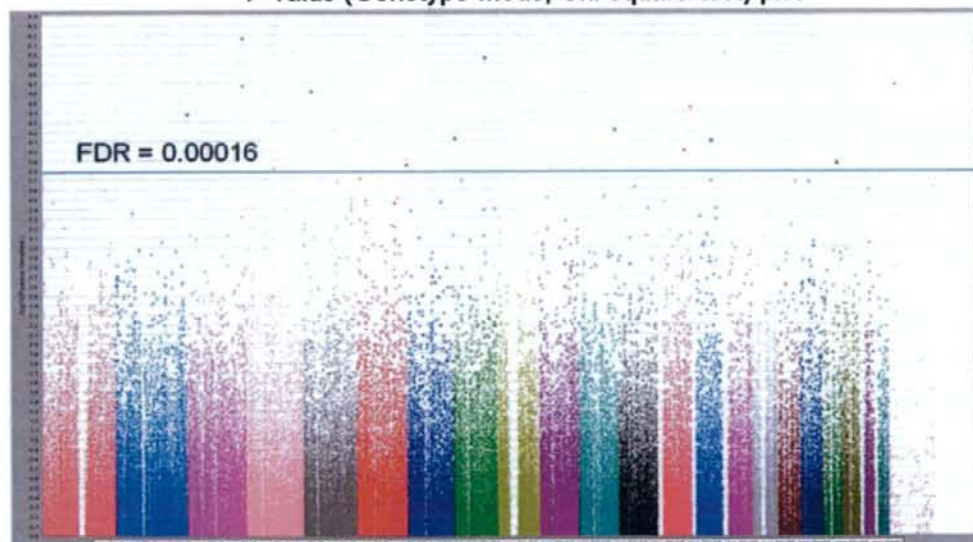


図 1-2 SJS/TEN と確定された被験者 (ケース群) 82 名と対照群 (コントロール群) 183 名を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)

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

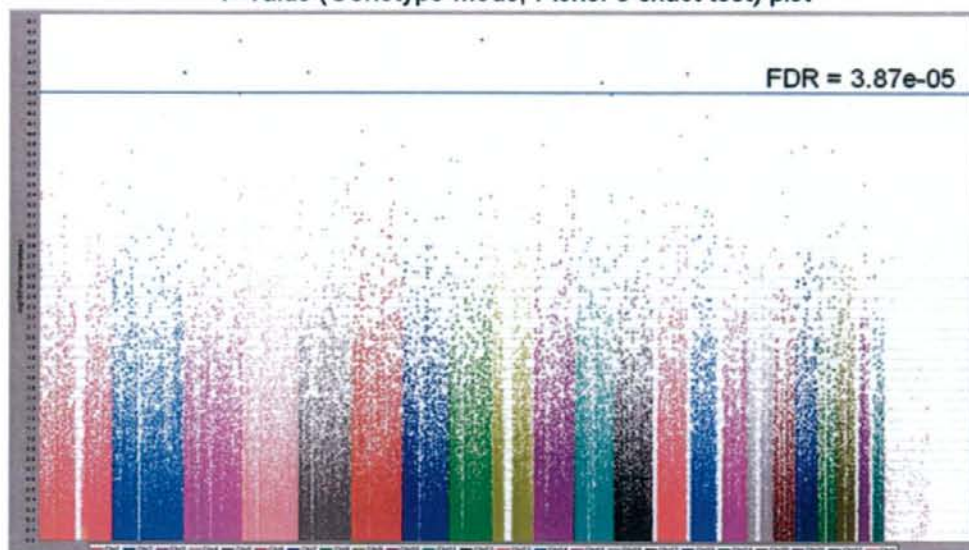


図 1-3 図 1-2 SJS/TEN と確定された被験者（ケース群）82 名と対照群（コントロール群）183 名を用いた関連解析での p 値の分布（遺伝子型モード、フィッシャーの正確検定法）

P-value (Cochrane-Armitage test) plot

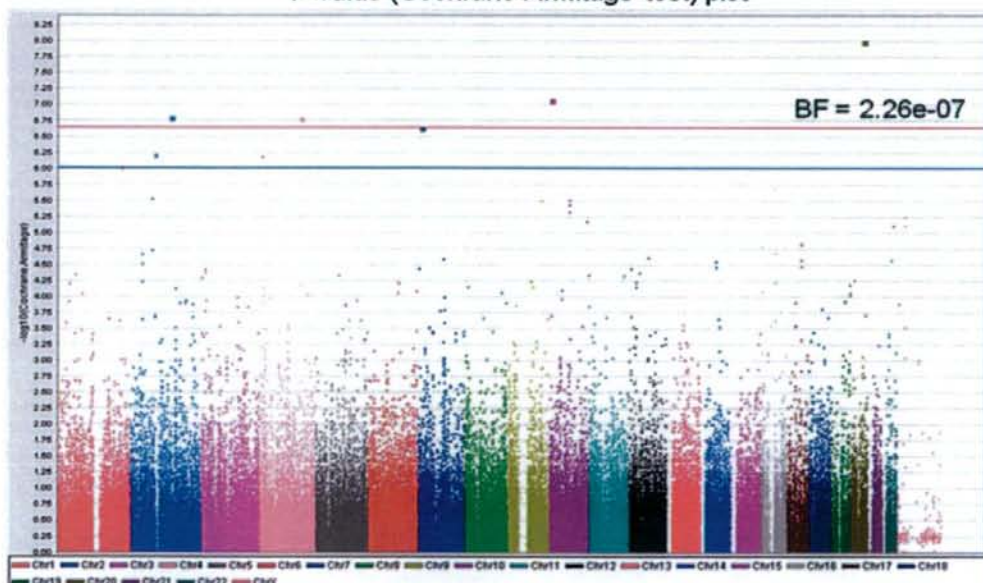


図 2-1 被疑薬がカルバマゼピンの被験者をケース群(10名)とし、コントロール群(157名)を用いた関連解析での p 値の分布（傾向検定）

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

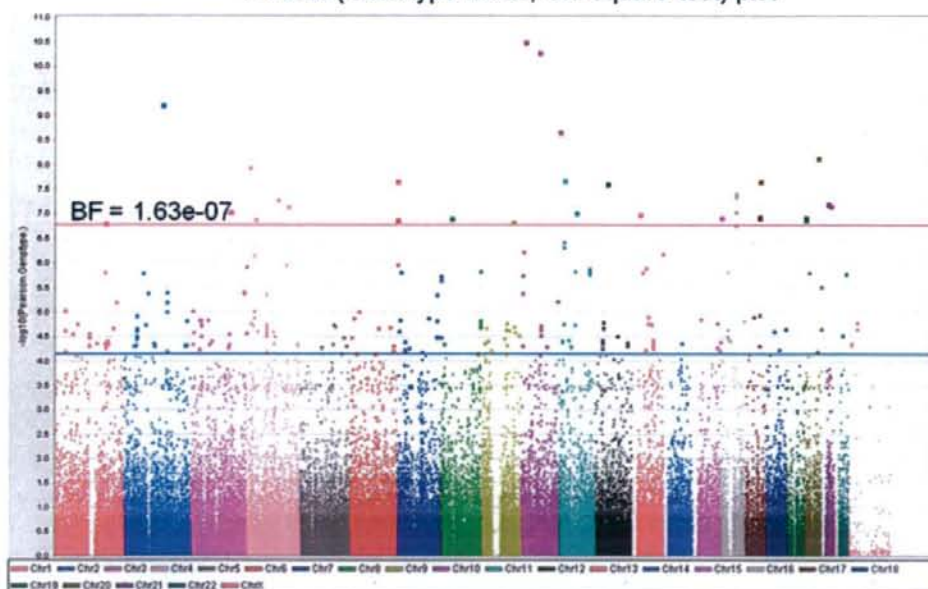


図 2-2 被疑薬がカルバマゼピン<sup>®</sup>の被験者をケース群(10名)とし、コントロール群(157名)を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)

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

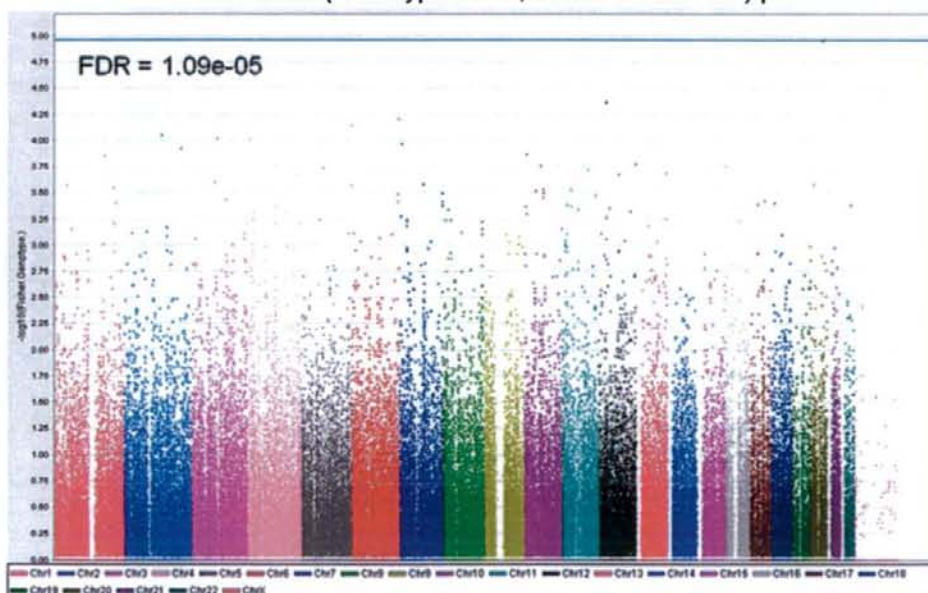


図 2-3 被疑薬がカルバマゼピン<sup>®</sup>の被験者をケース群(10名)とし、コントロール群(157名)を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、フィッシャーの正確検定法)



P-value (Cochrane-Armitage test) plot

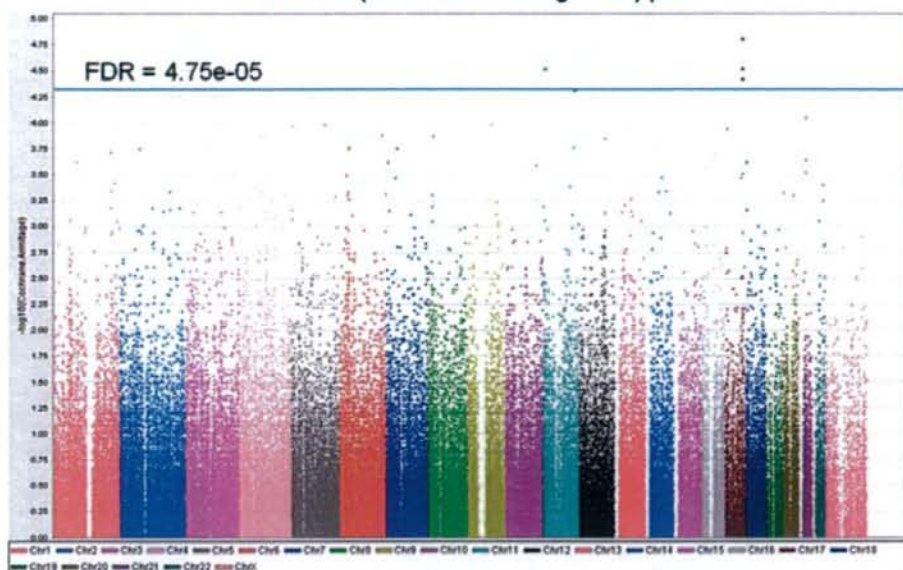


図 3-1 被疑薬が芳香族系抗てんかん薬の被験者をケース群 (24名) とし、抗てんかん薬を服用しても発症しなかったコントロール群 (17名) を用いた関連解析での p 値の分布 (傾向検定)

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

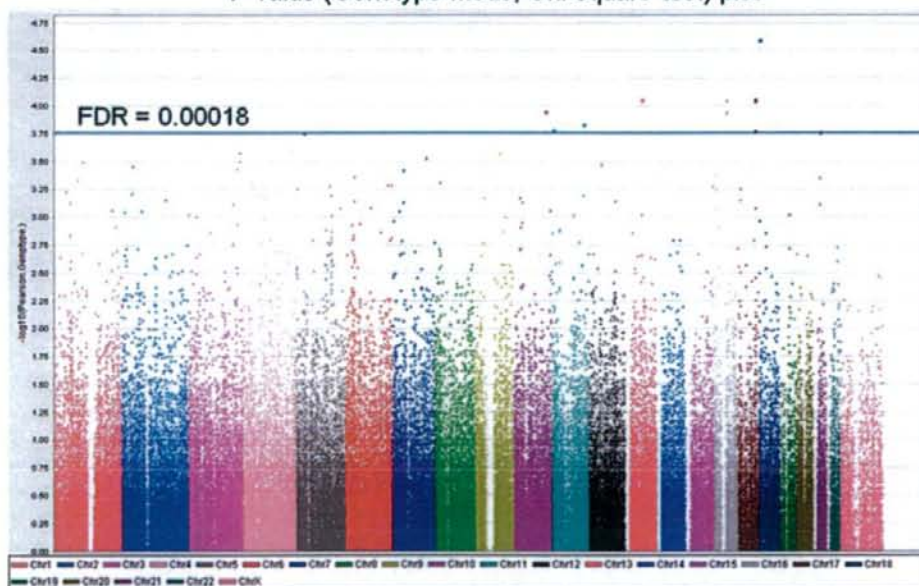


図 3-2 被疑薬が芳香族系抗てんかん薬の被験者をケース群 (24名) とし、抗てんかん薬を服用しても発症しなかったコントロール群 (17名) を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)

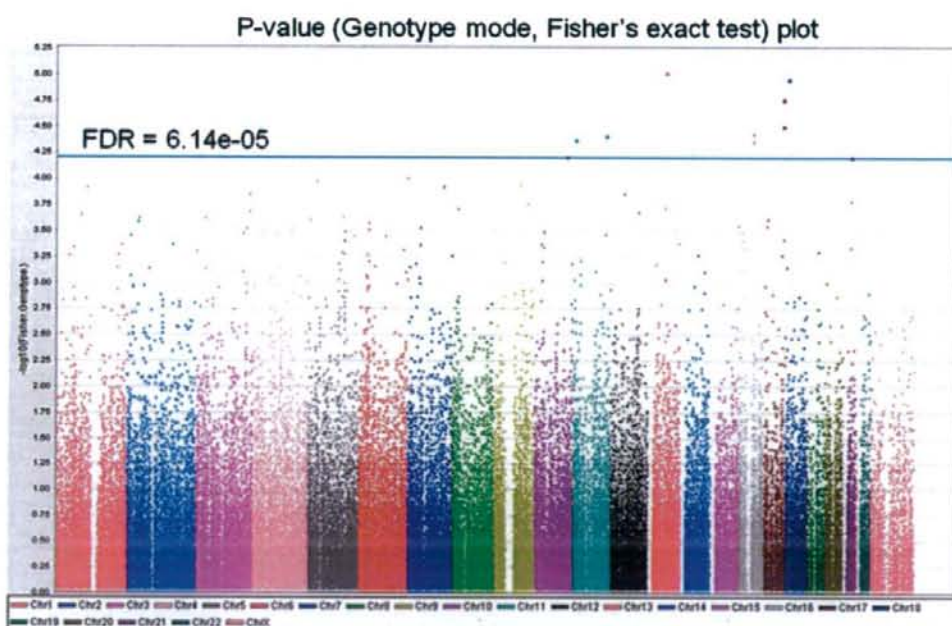


図 3-3 被疑薬が芳香族系抗てんかん薬の被験者をケース群 (24 名) とし、抗てんかん薬を服用しても発症しなかったコントロール群 (17 名) を用いた関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、フィッシャーの正確定法)

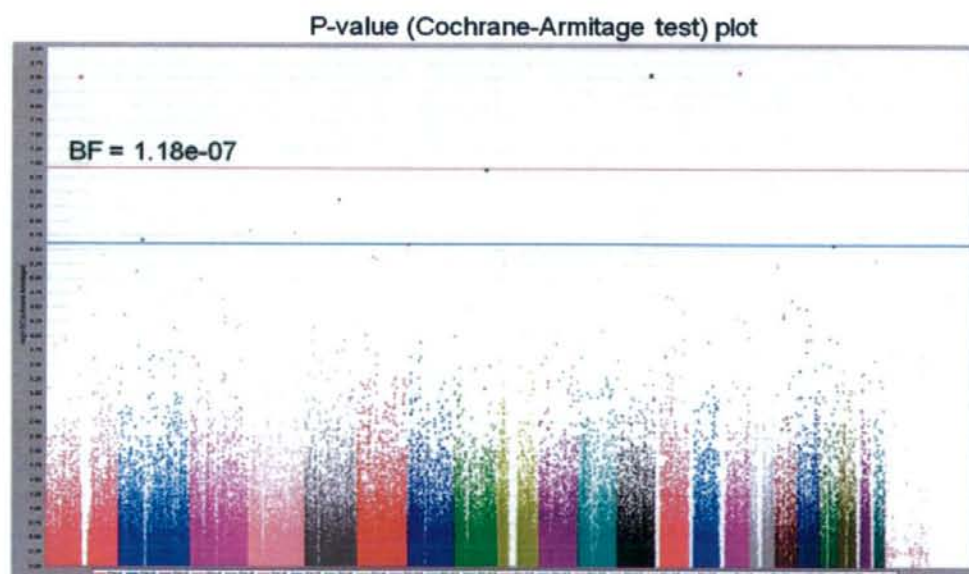


図 4-1 被疑薬がロキソプロフェンの被験者をケース群 (13 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いて関連解析での p 値の分布 (傾向検定)



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

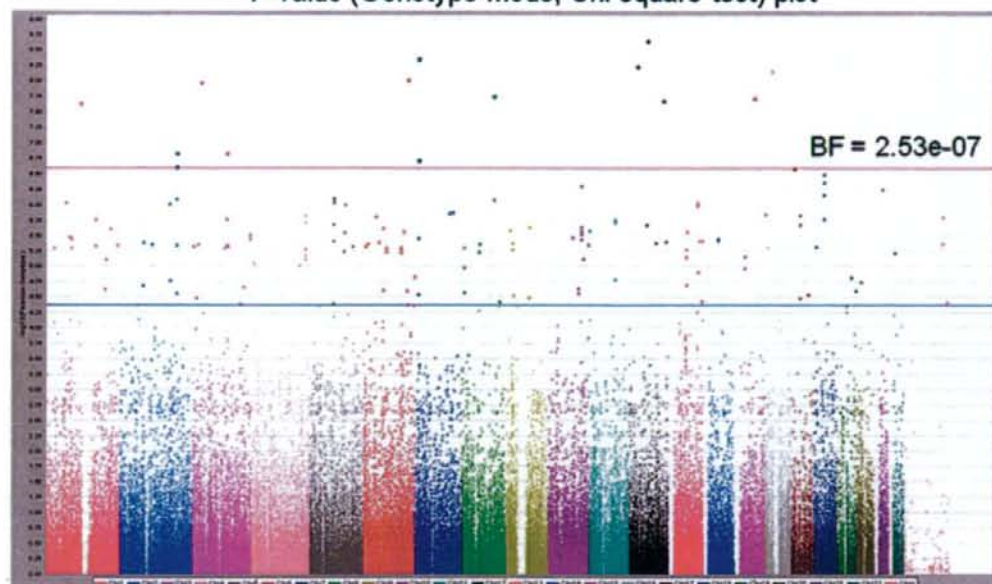


図 4-2 被疑薬がロキソプロフェンの被験者をケース群 (13 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いて関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)

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

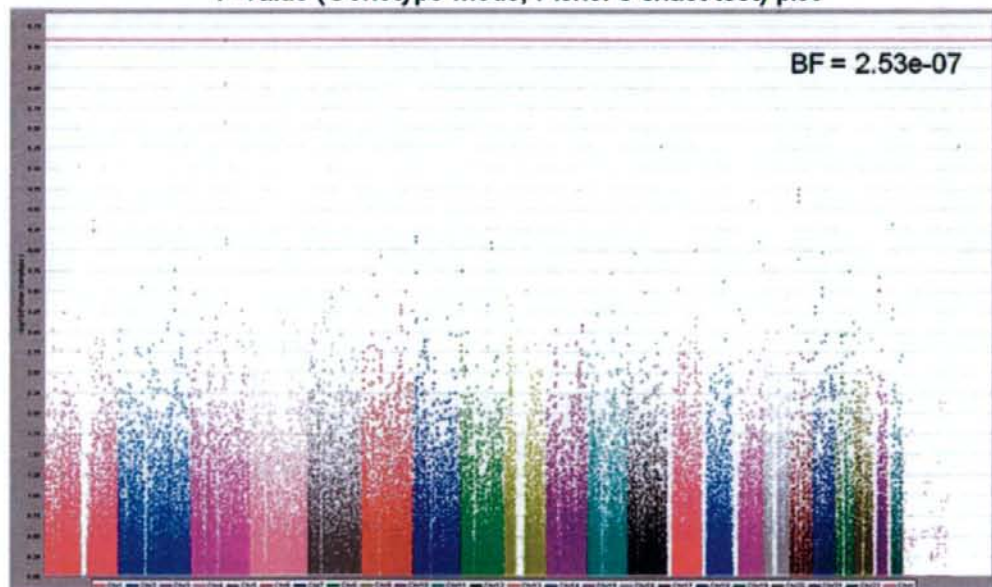


図 4-3 被疑薬がロキソプロフェンの被験者をケース群 (13 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いて関連解析での p 値の分布 (遺伝子型モード、フィッシャーの正確定法)

P-value (Cochrane-Armitage test) plot

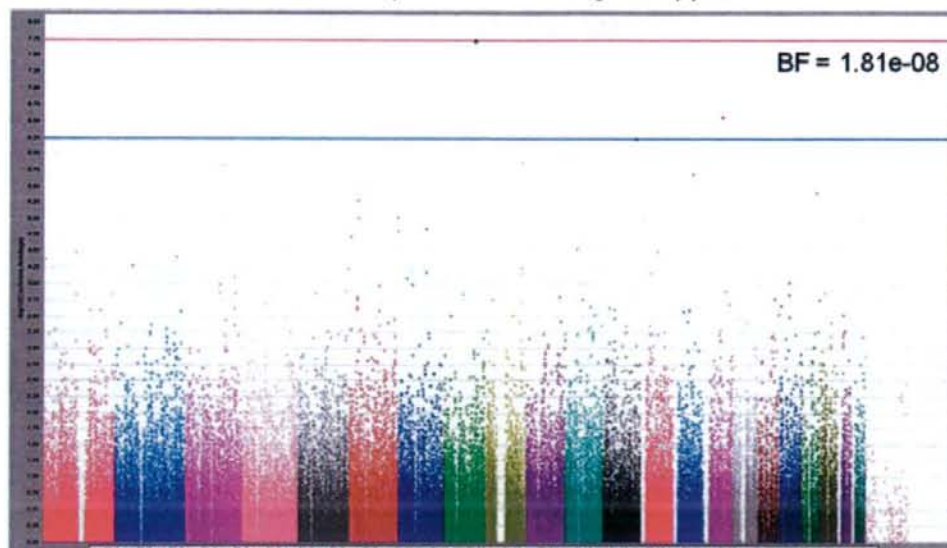


図 5-1 被疑薬が非ステロイド性抗炎症薬の被験者をケース群 (32 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いた関連解析 (傾向検定)

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

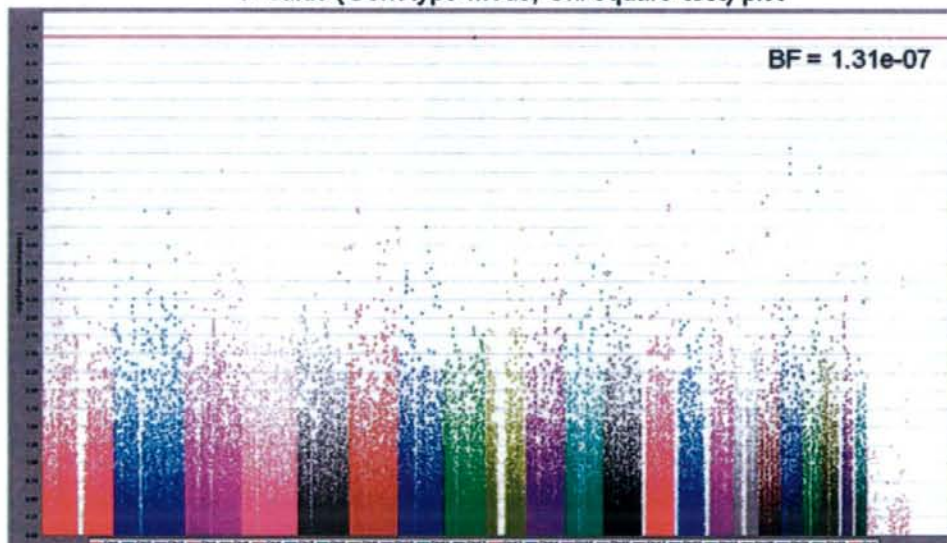


図 5-2 被疑薬が非ステロイド性抗炎症薬の被験者をケース群 (32 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いた関連解析 (遺伝子型モード、カイ 2 乗検定法)

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

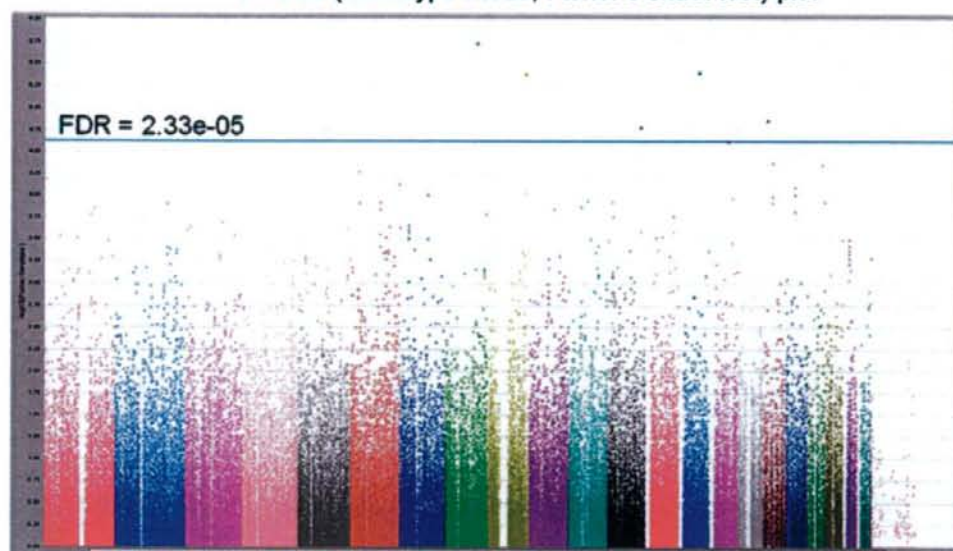


図 5-3 被疑薬が非ステロイド性抗炎症薬の被験者をケース群 (32 名) とし、コントロール群 (157 名) を用いた関連解析 (遺伝子型モード、フィッシャーの正確定法)

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

研究分担者	斎藤嘉朗	国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長
研究協力者	澤田純一	国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 部長
研究協力者	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** 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 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しない全例を対象にした解析で、ケース群における頻度と日本人健康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、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。発生頻度は非常に低いものの、副作用被害救済の上位に毎年挙げられており、時に死に至ることが報告されていることから、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 の可能性有りとは診断された患者群（可能性群）、及びコントロール患者群（含む、健康人）につき解析を進めた。即ち、平成 18 年度より 20 年度の 3 年間で収集された、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。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  $\mu$ 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。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、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ليل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

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、アレル頻度に関して、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\*5ZZZ, Cw\*0XXX 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\*0XXX 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に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 型の関与が考えられた。別の可能性としては、本 HLA-DRB1\*0XXX に連鎖している近傍の遺伝子の多型、特に MHC class III 領域に存在する遺伝子の多型が、真の原因多型である可能性が考えられた。今後、連鎖解析や *in vitro* 感作実験等により、相関の要因を絞り込む必要がある。

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* 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。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\*5801 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\*1502 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

3 年間の累計で、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康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\*5801 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) 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) 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).

- 3) 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



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

-疫学、HLA型および血清中バイオマーカーに関する研究-

研究分担者 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  
研究協力者 池田 浩子 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  
研究協力者 山崎 悦子 同上  
研究協力者 角替 央野 同上  
研究協力者 西村 成子 同上

研究要旨 抗てんかん薬による重症薬疹の予防のために、疫学、HLA型および血清中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ための研究を行った。

難治てんかん患者における抗てんかん薬による薬疹の出現頻度は0.64%（重症薬疹、0.10%；軽症薬疹、0.54%）であった。重症薬疹症例では複数の抗てんかん薬にアレルギーを有する症例が多かった。

CBZによるSJS5例のHLA-class Iの検討では、B\*1518、B\*5901、C\*0704の相対危険度が高く、HLA\*A、B、Cハプロタイプの相対危険度では、HLA-A\*2402-B\*5901-C\*0102が高かった。HLA-B\*5901を有する症例は5例中2例と高率であり、HLA-B\*5901が日本人CBZ-SJSの素因候補として有力である。

炎症性サイトカインのうちでは、急性期IL-1 $\beta$ の値（4.39 $\pm$ 3.16pg/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 $\pm$ 53.51pg/ml）、回復期（23.45 $\pm$ 33.95 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）。Th1細胞関連サイトカインでは、急性期IFN  $\gamma$ （164.16 $\pm$ 85.35pg/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 $\pm$ 29.57pg/ml）、回復期（11.45 $\pm$ 13.67 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）。

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

てんかん治療のための抗てんかん薬は、

長期に内服することになるため医療者・患者家族ともにその副作用について感心が高く、その人に合った、より安全で副作用の少ないオーダーメイド医療の実現が望まれている。薬物の副作用は①直接的（1次的あるいは2次的）薬理作用に基づくもの、②既知の薬理作用では説明できない特異体質によるもの（idiosyncratic drug reaction）、③長期間使用効果によるもの、④遅発性効果によるものに分類されるが、②特異体質による薬疹の予知・早期治療のためのマーカーの発見は、重症薬疹の予後が不良であることを考えると、重要なテーマである。

我々は抗てんかん薬による重症薬疹の頻度、HLA型との関連、血清中サイトカインからみた病態の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 抗てんかん薬による重症薬疹の頻度の検討

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

### 2. カルバマゼピン（CBZ）による重症薬疹症例のHLA-class I解析

CBZによると思われる軽症薬疹症例は10症例、重症薬疹症例はSJSが5例でHLA-class Iは遺伝子タイピングにより決定した。

### 3. 重症薬疹症例と血清サイトカイン

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）

サイトカインは、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。HLA型は文書による同意を得た後、匿名化して解析した。

## C. 研究結果

### 1. 抗てんかん薬による重症薬疹の頻度の検討

21655例の難治てんかん患者中、薬疹を来たした症例は166例（0.77%）で、抗てんかん薬によると思われる薬疹頻度は0.64%

（重症薬疹、21例＝0.10%；軽症薬疹、118例＝0.54%）であった。重症薬疹症例では複数の抗てんかん薬にアレルギーを有する症例が多い（ $\chi^2$ 検定、 $p<0.001$ ）。重症薬疹症例の原因抗てんかん薬としては、PHT（12例）、CBZ（11例）、PB（5例）が多かった。難治てんかん患者における抗てんかん薬-薬疹頻度が0.64%、抗てんかん薬以外による頻度が0.18%であることから、抗てんか

ん薬は薬疹を起し易いことが推定された ( $\chi^2$ 検定、 $p < 0.001$ )。

## 2. CBZによる重症薬疹症例のHLA-class I解析

CBZによるSJS5例では、相対危険度が高いHLA\*Aは見られなかった。HLA\*Bについて相対危険度でみるとB\*1518、B\*5901が10.0以上であり、重症薬疹の発病因子となっている可能性が示唆された。HLA\*Cについて相対危険度でみるとC\*0704が10.0以上であり、重症薬疹の発病因子となっている可能性が示唆された。HLA\*A, B, Cハプロタイプの相対危険度でみると、

HLA-A\*2402-B\*5901-C\*0102が10.0以上であり、CBZによるSJS発病に関与している可能性が示唆された。CBZによるSJSにおけるHLA-A\*1101, HLA-A\*3303, HLA-B\*1501, HLA-B\*4403, HLA-B\*5101, HLA-B\*5201, HLA-C\*0702, HLA-C\*1202の頻度は、日本人における頻度よりかなり低く、SJS発病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、発病因子として推測される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。

## 3. 重症薬疹症例と血清サイトカイン

炎症性サイトカインのうちでは、急性期IL-1 $\beta$ の値(4.39 $\pm$ 3.16pg/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 $\pm$ 53.51pg/ml)、回復期(23.45 $\pm$ 33.95 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 $\pm$ 85.35pg/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 $\pm$ 29.57pg/ml)、回復期(11.45 $\pm$ 13.67 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分化に関係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。

## D. 考察

難治てんかん患者における抗てんかん薬による薬疹の出現頻度は0.64% (重症薬疹、0.10%；軽症薬疹、0.54%)であった。調査は、診療録の1号紙の注意事項記載欄を主体に後方視的に行っており、記載漏れなどで把握できていない症例もあると推測される。実際にはもう少し頻度が高いものと思われる。今後の前方視的な調査が期待される。

重症薬疹症例では複数の抗てんかん薬にアレルギーを有する症例が多く、抗てんかん薬に共通した素因が存在する可能性がある。しかし、CBZによるSJSの漢民族の素因であるHLA-B\*1502は、他の抗てんかん薬によるSJSでも素因として機能しているとの報告は見られない。日本人ではHLA-B\*1502は出現頻度が極めて低く、HLA-B\*1502以外のHLA-class IがCBZによる重症薬疹の素因となっていると考えられており、抗てんかん薬によるSJSに共通した素因、あるいは個々の抗てんかん薬の重症薬疹の素因が日本人に無いか？検討していきたい。

CBZによるSJS5例のHLA-class Iを検索し、