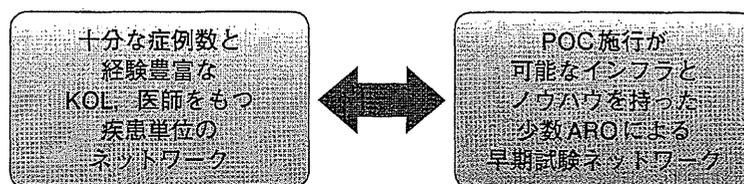


Fig. 5 ネットワークの連携へ



ひとつの早期試験ネットワークまたは ARO がすべての疾患領域で POC を行うに十分な症例数と医師を有するはずがない。疾患単位ごとの考え方が必要。

が乱立しても仕方がない。POC 施行が可能なインフラのノウハウ、あるいは支援が可能な少数 ARO による早期試験のネットワークが複数あって、これが協力して疾患単位のネットワークをそのたびごとに作る、あるいは既存のネットワークに依頼をする。このような形で複数のネットワークを連携して POC を行っていくのが、おそらく将来の形でしょう (Fig. 5)。これを速く、品質も高く行うには、KOL のネットワークを使って有機的に必要に応じて連携していけるようにする必要があります。ARO による技術的、人的なサポートも必要です。

7. 施設の体制

POC 試験にふさわしい施設の requirement はさほど多くはありません。基本的なインフラでは、シンプルな臨床薬理試験が施行可能なら、ノウハウを持ったところがサポートすればいい。また、PI としては KOL は必ずしも必要ではなく、むしろ有害なことがある。PI と KOL は必ずしも一致させる必要はない。しかし少なくとも疾患領域に造詣が深く志を持った PI である必要があります。

また、できれば POC 試験が可能な施設の中に ARO とか CP (clinical pharmacology) unit とか、きちんとサポートできる治験管理部門がある。CRC がきちんとその試験の内容を理解してサポートできる体制があるというのが有益です。

次に共同 IRB ですが、北里大学の例をお示しします。例えば複数の医療機関がある。それぞれに

事務局を持つのは当然ですが、それぞれに共同 IRB を持って、その共同 IRB を運用する中央管理体制を作るのが我々の考え方です。例えば、これは健康人対象の試験になるので北里大学臨床薬理研究所の IRB が得意だからこちらで審査してもらう、などの形です。J-CLIPNET であれば、参加施設の審査を例えば大分大学で行い他は追加的に承認する、などの形が考えられます。

IRB システムは電子化することで企業、事務局、双方の負担を減らすことが重要です。この電子化に関しては IRB 以外でもリモート SDV (source document verification) を行うことが望ましく、そのためには治験業務を効率化するクラウドサービスが必要です。データ保管に関しては超えなければいけないハードルはまだ多くありますが、乗り越えようとする努力は各施設必要です。

8. 言語の問題

言語の問題もあります。国際共同試験では試験計画書、e-CRF (case report form) の入力、query まで含めて、一見英文で対応できており国際共同試験はあまり難しくないと意見が多いですが、これには裏があります。例えば CRF や query に入力する文書の文案をモニターさんが作って持ってくるのが非常に多くなってきています。本来これらは PI が作るべきですが、これで 1 つお願いしますと文案を持ってこられる。うまい人もいますが、うまくない人もいます。余計な努力をモニターさんがしている。CRF をモニターさ

んに入力してもらおうCRCすらいます。

また、英文の計画書でできると言っても英文の計画書は全然見ていなくて、日本語の翻訳しか見ていない。日本語の翻訳ではうまくいかず、英語の原本に戻って確認すればすぐわかることでもすぐにモニターさんに確認する。そういうことが日常茶飯事です。ですから、今の日本での国際共同試験の運用がうまくいっているというのは幻想に過ぎない。こうした施設には企業からの依頼が来ないという状況をつくるべきです。

9. 企業の問題点

次に企業の問題点です。多くの外資系企業は早期試験と後期試験の担当部門が別です。日本では後期試験の担当者のほうが早期試験の担当者より偉いみたいな風潮がありますが、そのたびに「こっちは十把一絡げの誰でもできる試験をやっているんじゃないからと言いつ返しなさい」と言っています。

もう1つは、日本の状況が意外にheadquarterに知られていなくて、「日本の品質はいい」と言っても「そう？」でおしまいになることが多い。また、headquarterではカウンターパートがMDであることが非常に多いので、MDと意思疎通をする日本側のカウンターパートがMDでないとなかなか難しい。それはよく聞く問題点です。

それから、内資系企業は早期試験の経験自体が少なく、プロトコル作成に難渋されているようです。経験が少ないから専門家をどう教育するかという問題が出てきます。2011年に行ったPMx (pharmacometrics) のシンポジウムで、pharmacometricianは日本でどうやって育つのかと韓国のシンポジストから聞かれ、自然に育つのだと答えて苦笑されましたが、きちんとした教育体制がないのが現状です。

当たり前の結論ですが、我が国の状況を自覚した志のある医師が必要です。汗をかいて勉強することをいとわない、歯車の一部でいることに満足しないスタッフが必要です。我が国で開発する意

思を強く持って真剣に考える企業が必要ですし、規制当局も理解ある、少なくとも理解しようと努力してくれる姿勢が必要です。これら3者のパートナーシップ体制を築き上げることが最重要です。

10. 国際共同試験のパートナー

国際共同試験のパートナーはどこか。もちろん全世界で進めるのですが、やはり我が国はアジアと手を組んでいくべきだというのが私の意見です。ここに並べた青年たちの写真の中で日本人はどれか。皆に聞いて回りましたが、わからないですね。こちらの女性の場合はどうでしょう。それぞれ日本人が1人いますが、わからないでしょう。とてもよく似ています。これは韓国のSeoul大学のIn-Jing Jangが発表したスライドですが、genetic variationをscatter chartで描くと、African, Caucasian, East Asianときれいに分かります。でも、Asianの中でChinese, Korean, Japaneseは本当に区別できません。

我々の仲間は皆、箸を使って鍋を食うような民族です。このような仲間たちは、おそらく理解し合える、文化的にも近い。哲学は若干違いますが、薬を開発していく考え方の上では非常に共通すると考えます。

これもIn-Jing Jangのスライドですが、PK/PDの試験を進めるべきです。Genotypeが疑わしいものは特にそうです。また、バイオマーカーを用いてPK/PD studyでアジア民族間の類似性を見ていく。どのバイオマーカーが有望かをチェックしていくことが重要です。

11. 求められる人材

早期臨床試験は立案のところから難しいです。例えばfirst-in-humanでは、安全性の担保のために非臨床試験も読まなければいけません。動態、作用に関しても、非臨床データから読まなければいけない。バイオマーカーの外挿、薬効評価、

PMxを将来的に使うことを前提にデータを取る、といったことが総論的に全部できる人でないといけません。

毒性学、薬理学、臨床薬理学、臨床各論、統計学など、造詣が深い必要はありませんがどれもわかる、どれも応用できる人材が必要です。我々の北里大学医学部附属臨床研究センターは医学部の中の大学院のコースがあり、臨床試験のprofessional、臨床開発全体のprofessional、総合的なマネジメントができる人材を養成することを前提にコース設定を始めています。

アジア各国からも学生を集めて、英語で講義をする。当然webベースで講義をして、レクチャー、クイズ、レポートもあります。週に1回はschoolingを行います。当然ながらインセンティブが必要なので、学位を出すことを前提に考えています。

我が国では既に早期臨床試験ができるのですが、それが海外の人たちに知られていないことが問題なので、きちんと発信していく努力をしたいと考えています。

<質疑応答>

渡邊 アカデミアにおけるGLP対応の確立という点ですが、言うは易く行うは非常に困難です。GLPではシステムが継続して動いていなければいけないので、そこに人を配置して、常にその人が日常的にそれを動かしていることが求められます。アカデミアで本当にこれが可能なのか、北里大学ではどうされているのでしょうか。

熊谷 これは努力目標で、例えば臨床検査、治験における臨床検査は別ですが、治験に関するバイオマーカーの測定に関しては、当然GLP対応で行う体制をつくりあげる準備をしています。それには人の雇用が必要ですし場所とシステムが必要です。これは当然行うつもりです。治験による収入を臨床研究にあてるという考え方です。

フロア 治験はGCP遵守ですが、新しいバイオマーカーの検出をどのステージでGCPの中に取り込んでいくべきなのでしょうか。

熊谷 バイオマーカーの測定自体は、例えば血圧を測るとか脈拍を測ると全く同じ感覚でいいと思います。ただ、それが非常に稀な物質であるとか非常に不安定な物質であった時に、きちんと測れている保証がとれればいいのだと思います。どれくらいのvalidationをとるかが問題になりますが、例えば健康人で動く可能性があるバイオマーカーならば、first-in-humanの時点から測っても全然問題ないと思います。企業の方々は余計なもの動いたら困ると言われることが多いですが、どこで測ってもいいと思います。

フロア その測る方法は確立してなくてもいいのでしょうか。

熊谷 少なくとも測っているものが何かわかっていれば、ファンクションがわかっていなくてもよいと思います。

司会 (大橋) アカデミアで早期臨床試験をという動きがありますが、日本がこれまでとってきた道筋はCRO的なところも多数あります。韓国や中国はアカデミアで体制整備されています。これを踏まえて日本のアカデミアの役割はいかにあるべきでしょうか。

熊谷 韓国や中国のように、例えば血中濃度のassayからすべてアカデミアで行っているというのが本当にいいのか、疑問もあるかもしれません。日本でアカデミアが早期段階の臨床試験に貢献するとしたら、もちろんunitとしての機能もありますが、戦略策定の部分と、定められた試験計画に沿った最適な症例の蓄積という役割ではないかと思います。そうは言っても製薬企業は、内資企業でも、POCは海外で行ったほうが速いしきちんとしている、というところが多い。そういう状態で日本に持ってくるかと考えると、まずないと思います。ということは、バイオマーカーが日本発のものから進めていく。その意味でもアカデミアのvalidationの努力が必要です。

フロア 外資企業にいる者ですが、POCはPhase Iからどンドンつながって速く進めていくので、Phase IをしないとPOCも来ません。Phase Iをまず日本に持ってくれば、POCも次につな

がります。

フロア 実は内資系も大きな会社はほとんど、
どんどん外資化しています。アメリカのhead-
quarterで開発計画が決まって、どの試験をどの
国でというallocationはグローバルの中で協議し
ながら決めていきます。ではfirst-in-humanや
POCをいかに日本に持ってくるかというと、日
本の施設はここが優れている、海外とスピードが

違う、コストが違う、それを明確に示さないとも
う持ってこられません。

熊谷雄治先生と10年ぐらい前に polysomnogra-
phyの測定を検討したことがあります。POCの走
りだと思いますし、Thorough QTcも先生が日本
で先駆けて着手されました。こうしたことを日本
主導で進めていく必要があると思います。

* * *

シリーズ (医療品評価をめぐる最近の話題)

市販後安全性確保に係るバイオマーカーと診断

Biomarkers and Their Diagnosis in Post-marketing Stage of Drugs

斎藤 嘉朗*, 前川 京子, 田島 陽子,
児玉 進, 黒瀬 光一

Yoshiro SAITO, Keiko MAEKAWA, Yoko TAJIMA,
Susumu KODAMA and Kouichi KUROSE

Abstract

Unexpected adverse reactions are often encountered in post-marketing stages of drugs due to their low frequencies and varieties of patients' backgrounds. Severe adverse reactions are most problematic issues for proper usage of drugs. Biomarker has been expected to be useful for prediction and early diagnosis of the adverse reactions, and many researches have performed to explore the biomarkers, particularly on genomic area. For example, associations of several HLA types with severe cutaneous adverse reactions caused by carbamazepine and allopurinol have been revealed in several populations including Japanese. Proteomic and metabolomic biomarkers, which can reflect both genetic and environmental factors, have been also found for a few adverse reactions. In this review, we show up-to-date informations on biomarkers related to adverse reactions, including their ethnic-differences. Accelerated progress on this area would be anticipated for proper usage of drugs.

抄 録

発生頻度や患者背景の多様性の点から、市販後に明らかになる副作用は比較的多く、特に重篤な副作用は医薬品の適正使用の観点から問題となっている。バイオマーカーは副作用の予測および早期診断に有用と期待され、ゲノムを中心に解析が進展している。例えば、カルバマゼピン、アロプリノール等による重症薬疹に関しては、その発症と強く関連するヒト白血球抗原 (HLA) 型が、日本人を含む多くの人種で見いだされている。また薬物性肝障害に関しても、予測ゲノムバイオマーカーが明らかになってきている。一方で、環境的要因を反映しうるタンパク質および体内代謝物マーカーについても期待が寄せられており、少数であるが報告例もある。本項では、著者らが行っている研究を含め、これらの最新の知見を、民族差を含めて紹介する。バイオマーカー研究がさらに進み、医薬品のより安全な使用に応用されることを期待したい。一方で、これらを実臨床に応用するためには、前向き研究により診断の有用性を示すことが極めて重要であり、その進展が期待される。

Key words: diagnosis, drug-induced liver injury, pharmacogenomics, pharmacovigilance, severe cutaneous adverse reaction

1. はじめに

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、また科学の進歩に伴って、市販後に明らかになるケースは比較的多い。臨床試験段階において特定された、またはその潜在性や情報不足が把握された安全性検討事項に関しては、平成24年4月11日に発出された医薬品リスク管理計画指針に基づき、平成25年4月1日より、ICH E2Eに規定されている医薬品安全性監視計画に加えて、リスク最小化計画に反映させ、販売開始予定時期の1ヶ月前までに提出することとなる¹⁾。これらは、副作用等の安全性検討事項が市販後に明らかになった場合には、見直しを行う必要がある。市販後の安全性監視方法としては、製造販売後安全管理の基準に関する省令（GVP）に基づく市販直後調査²⁾、製造販売後の調査及び試験の実施の基準に関する省令（GPSP）に基づき行われる使用成績調査、特定使用成績調査、製造販売後臨床試験²⁾、さらには薬事法第77条の4の2第1項に基づき、薬事法施行規則第253条第1項に規定される副作用症例報告等がある¹⁾。これらの情報、さらには研究報告や諸外国の規制当局の動き等を鑑み、添付文書が改訂されている。その件数としては、表1に示すように、平成22年度には警告が11件、禁忌が21件等となっている。このよ

表1 過去3年間の添付文書の改訂項目

	平成 22年度	平成 21年度	平成 20年度
警告	11	3	5
禁忌	21	6	9
重大な副作用	127	86	52
重要な基本的注意	61	39	26
慎重投与	32	12	4
妊婦、産婦、授乳婦等への 投与	18	4	3
用法・用量に関連する使用 上の注意	5	4	0

注：一つの医薬品が複数の改訂項目を含む場合がある

うな施策は、副作用の早期発見、早期治療による重篤化の回避に役立っている。しかし、副作用の発生には大きな個人差があり、特に比較的正常な副作用は予測・発見が難しく、早期発見により服用を中止しても症状が重篤化してしまうケースも少なくない。予測・予防型の市販後安全対策の実現のためには、より積極的な対応も必要と考えられる。

2. バイオマーカー

医薬品の副作用発現には、遺伝的要因と環境的要因が関連する。遺伝的要因としては、ゲノム配列上に存在する遺伝子多型（塩基の置換・挿入・欠失）があり、コピー数多型も知られる。このような塩基配列の変化の中には、遺伝子発現やタンパク質機能に影響を及ぼすものがあり、副作用発現に個人差が現れる原因となりうる。ゲノム薬理学（ファーマコゲノミクス）は、ICH E15に「薬物応答と関連するDNA及びRNAの特性の変異に関する研究」と定義されており³⁾、実際に副作用発現と関連する遺伝子多型が多数報告されている。また、環境的要因には、併用薬（薬物相互作用）、飲食物、喫煙、基礎疾患等がある。これらの影響は後天的であるため、ゲノム情報では捕捉不可能であるが、タンパク質（プロテオーム）や代謝物（メタボローム）の変化として捉えることが可能である。

FDAにて「バイオマーカーとは、正常な生物学的プロセス、疾病学的プロセス、あるいは治療介入に対する生物学的な反応の指標として客観的に測定および評価される項目である」と定義されている⁴⁾。各医薬品につき副作用を発現しやすい患者側の要因と関連するバイオマーカーを同定し、臨床現場で利用することができれば、副作用回避が可能となり、医薬品の適正使用につながる。

3. ゲノムバイオマーカーと重篤副作用

副作用に関するバイオマーカー研究は、ゲノム分野が進んでいる。ゲノムバイオマーカーとは、

「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ICH E15ガイドラインにおいて定義されている³⁾。その探索には、関与が想定される候補遺伝子の解析の他、DNAマイクロアレイや次世代シーケンサー等が用いられる。なお、欧州では医薬品安全性監視におけるファーマコゲノミクス情報の収集、報告、添付文書への記載および評価やリスク管理計画との関連等についてのコンセプトペーパーを2011年に発表している⁵⁾。以下に解析例と行政施策への反映について、本邦での事例を中心に紹介する。

3-1. 好中球減少症

抗がん剤イリノテカン[®]は、多くの消化器癌等に用いられるが、副作用として重篤な骨髄抑制や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、体内で活性代謝物SN-38に変換され薬効を発揮する。SN-38はグルクロン酸転移酵素UGT1A1によりグルクロン酸抱合を受け解毒代謝される。このUGT1A1には、活性低下型の遺伝子多型である*6 (G71R, 日本人での染色体単位での頻度:約16%)と*28 (-54_-39A(TA)₆TAA>A(TA)₇TAA, 頻度:約11%)が存在し、日本人で両方の染色体にこの*6または*28を有する割合は7.3%である⁶⁾。これら*6または*28のホモ接合または複合ヘテロ接合患者では、有意に重篤な好中球減少症が発現しやすいことが明らかとなっている⁷⁾。本事項は、添付文書での注意喚起に加えて、多型診断用の対外診断薬も販売されている。米国およびシンガポールでも、同様の添付文書の改訂が行われているが、*6は東・東南アジア人に特有の多型のため、米国では*28の影響のみ記載されている⁷⁾。

3-2. 重症薬疹

重症薬疹は医薬品による健康被害被害救済制度において、救済副作用の症例数の常に上位を占めている。特に重篤なものは、ステイブンス・

ジョンソン症候群 (SJS) 及び中毒性表皮壊死症 (TEN)、薬物過敏症候群 (DIHS, 過敏症候群 (HSS) は同義語) である。SJSとTENは、市販の風邪薬を含めた多くの医薬品が被疑薬となり、皮膚・粘膜部の発疹・びらん、発熱等を主症状とし、表皮の水疱・びらん・剥離面積によりSJS, SJS/TEN, TENに分類される。致死率もSJSで約5%, TENで約30%と比較的高く、失明等の重い後遺症が残ることがある。一方DIHSは、抗てんかん薬など比較的原因薬が限定されており、発熱、紅斑、肝機能障害等を主症状とし、多くの場合ヒト6型ヘルペスウイルス再活性化を伴う。これらの重篤副作用は、特異体質が原因とされ、発症の予測は困難とされてきた。しかし近年、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、一部は民族特異的な強い関連が明らかとなっている。現在までの主要な相関例を表2としてまとめた。

3-2-1. カルバマゼピン

抗てんかん薬カルバマゼピン服用患者に関し、台湾の漢民族において、HLA-B*1502との非常に強い関連が報告された (表2の文献23)。さらにタイ人、マレー人、インド人等の東南・南アジア系の民族でも関連が認められている (同26~30)。しかし、白人や日本人ではこの関連は認められていない (同31, 32)。一方で、韓国人と日本人では、HLA-B*1502と同じ血清型B75に属するHLA-B*1511との関連が報告されており (同32, 33)、最近、B75分子はカルバマゼピンと直接結合して、細胞障害性T細胞を活性化させることが報告された⁸⁾。さらに、白人、日本人において、オッズ比の値はSJS/TENで高いなど各病型で異なるものの、HLA-A*3101との相関が薬疹のタイプに依存せずに認められている (同34~36)。

また台湾のグループは、カルバマゼピン投薬開始前にHLA-B*1502保有の有無を診断し、非保有者にのみ同薬を投与した場合、SJS/TENの発

表2 重症薬疹発症との関連が報告されたHLAタイプ

原因医薬品	HLA 型	病型	民族または人種	ケース群 (保有者数/解析数)	コントロール群 (保有者数/解析数)	オッズ比	文献	
カルバマゼピン	<i>B*1502</i>	SJS/TEN	漢民族 (台湾)	59/60	6/144	1357	23	
			漢民族 (大陸)	16/17	2/21	152	24	
		SJS	タイ人	9/9	11/80	114.8	25	
			タイ人	6/6	0/4	25.5	26	
		SJS/TEN	タイ人	37/42	5/42	54.8	27	
			タイ人	32/34	7/40	75.4	28	
		SJS/TEN	インド人	6/8	0/10 ^{a)}	71.4	29	
			マレー人	12/16	47/300 ^{a)}	16.15	30	
		SJS/TEN	白人	0/8	-	-	31	
			日本人	0/14	-	-	32	
		<i>B*1511</i>	SJS/TEN	日本人	0.143 (4/28) ^{b)}	0.010 (10/986) ^{a, b)}	16.3	32
			SJS	韓国人	3/7	2/50	18.0	33
			HSS		10/27		12.4	
			SJS/TEN	白人	5/12	10/257	25.9	34
MPE			23/106		8.3			
HSS			2/13		6.4			
MPE	漢民族 (台湾)		6/18	4/144	17.5	23		
HSS	韓国人		10/17	7/50	8.8	33		
DIHS			21/36	54/420	9.5	35		
SJS/TEN	日本人		5/6	54/420	33.9			
Severe cutaneous reactions		11/22	53/371 ^{a)}	4.33 ^{c)}	36			
アロプリノール	<i>B*5801</i>	SJS/TEN/HSS	漢民族 (台湾)	51/51	20/135	580.3	37	
			日本人	0.278 (10/36) ^{b)}	0.006 (12/1972) ^{a, b)}	62.8	38	
		SJS/TEN	白人	15/27	28/1822 ^{a)}	80	39	
			タイ人	27/27	7/54	348.3	40	
		DIHS	韓国人	4/5	6/57	34.0	41	
			韓国人	20/21		161.5		
アバカビル	<i>B*5701</i>	HSS	主として白人	14/18	4/167	117	42	
			白人	57/129 (42/42) ^{d)}	8/202	19 (1945) ^{d)}	43	
		skin rash	黒人	10/69 (5/5) ^{d)}	2/206	17 (900) ^{d)}		
			タイ人	25/143	2/181	18.96	44	
ネビラピン	<i>B*3505</i>	Severe cutaneous reactions	タイ人	10/52	7/173	5.65		
			アジア人 ^{e)}	14/71	15/227	3.47		
		Severe cutaneous reactions	タイ人	18/52	32/179	2.43	45	
			アジア人 ^{e)}	25/71	41/233	2.55		
		Severe cutaneous reactions	黒人	15/27	15/77	5.17		

SJS: スティーブンス・ジョンソン症候群, TEN: 中毒性表皮壊死症, DIHS: 薬剤性過敏症症候群 (HSS: 過敏症症候群), MPE: 斑状丘疹状発疹. なお, DIHS と HSS の表記は, 各文献における記載に従った.

a) コントロールは健常人 (無印は医薬品投与耐性患者)

b) アレル頻度 (染色体別の解析), 無印は保有率 (ヒト単位での解析)

c) 左記, ケース群・コントロール群の記載は保有率だが, オッズ比はアレル頻度を用いて算出

d) 括弧内はアバカビルによる皮膚パッチテストで陽性となった症例による解析

e) 同一の w 論文におけるタイ人の結果を含む

症は認められなかったと報告した⁹⁾。台湾では同投薬前検査が義務づけられており、保険償還もなされている。また米国でも *HLA-B*1502* 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されている。本邦では、*HLA-B*1502* および *HLA-A*3101* に関する注意喚起が添付文書でなされている。

3-2-2. アロプリノール

高尿酸血症薬アロプリノールでは、SJS/TEN/DIHS (HSS) の発症と *HLA-B*5801* との関連が、漢民族、韓国人、日本人、タイ人、白人で、オッズ比は異なるものの報告されている (表2, 文献37~41)。日本人では、さらにゲノム網羅的遺伝子多型解析の結果、*HLA-B*5801* と完全に連鎖する遺伝子多型が見出され (文献38)、簡便なタイピング法が開発されており¹⁰⁾、将来の発症予測のための多型診断対象として有用と考えられる。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*5801* 検査が義務づけられており、日本でも添付文書において注意喚起がなされている。

3-2-3. アバカビル

HIV 治療薬であるアバカビルは、白人において服用開始6週間以内に約5%がHSSを発症するとされる。アバカビル誘因性HSS発症には、*HLA-B*5701* が関連することが白人および黒人で報告されている。また表2 (文献43) に示すように、他の併用薬でなくアバカビルが、HSS発症の原因であることがパッチテストにより明らかな患者に関しては、白人と黒人のいずれに関しても、*HLA-B*5701* の保有率がHSS発症患者で100%であり、非常に強い関連性が報告されている。一方で、日本人や韓国人をはじめとするアジア人では、このような相関は報告されていない。米国では *HLA-B*5701* の投薬開始前診断が推奨されており、本邦でも添付文書において注意喚起がなされている。

3-2-4. ネビラピン

ネビラピンも HIV 治療に用いられる逆転写酵素阻害剤である。投薬された患者の15-20%に軽症からSJS/TENに至るまでの薬疹が認められる。タイ人を対象にした解析で、*HLA-B*3505* との関連が報告されており、特異度も98.9%と高い (表2, 文献44)。本結果は、タイ人、台湾人を含むアジア人を対象にした別解析で検証されている (表2, 文献45)。興味深いことに、本相関は、白人・黒人では見られていない。一方で、アジア人、黒人では *HLA-C*04* との関連も示されている。

3-3. 薬物性肝障害 (DILI)

DILIは中毒性と特異体質性に大別されるが、特異体質性はさらに代謝性とアレルギー性に分類される。遺伝的要因が懸念されるアレルギー性に関しては、近年、HLAタイプとの関連が多く報告されている。遺伝的要因との関連が報告されているものについて、表3にまとめた。

3-3-1. チクロピジン

チクロピジンは抗血小板薬であり、胆汁うっ滞型肝障害を誘因することが知られている。日本人を対象に解析が行われた結果、*HLA-A*3303* とDILI発症との強い関連が認められた (表3の文献46)。チクロピジン誘因性DILIの発症頻度は白人よりも日本人において高いことが知られているが、その理由の一つの可能性として、日本人母集団における *HLA-A*3303* のアレル頻度 (7~13%) が、白人 (0.3~1%) より高いことが挙げられる。

3-3-2. トログリタゾン

トログリタゾンは肝障害により市場撤退した経口糖尿病薬である。日本人対象の候補遺伝子多型関連解析の結果、*glutathione S-transferase (GST) MI* および *GSTTI* 両遺伝子の欠損とDILIとの関連が示された (表3の文献51)。日本人における *GSTMI/TI* 両欠損型の頻度は約20~30%である

表3 薬物性肝障害あるいは筋障害の発症と関連する HLA タイプまたはアレル

原因医薬品	HLA 型	病型	人種 (国民)	ケース群 (保有者数/解析数)	コントロール群 (保有者数/解析数)	オッズ比	文献
チクロピジン	A*3303		日本人	22/15	12/85	13.0	46
アモキシシリン/ クラブラン酸	DRB1*1501- DRB5*0101- DQB1*0602		ベルギー人	20/35	7/60 ^{a)}	10.1	47
ラパチニブ	DQAI*0201	薬物性 肝障害	主に白人	14/35 17/24	58/285 33/155	2.6 9.0	48
フルクロキサシリン	B*5701		白人	43/51	4/64	80.6	49
ルミラコキシブ	DRB1*1501			88/137		7.5	50
	DQB1*0602			85/137	111/577	6.9	
	DRB5*0101		主に白人	88/137	115/577	7.2	
	DQAI*0102			101/137	178/577	6.3	
原因医薬品	遺伝子・アレル	病型	人種 (国民)	ケース群 (保有者数/解析数)	コントロール群 (保有者数/解析数)	オッズ比	文献
トログリタゾン	GST M1 & T1 両欠損	薬物性 肝障害	日本人	10/25	13/85	3.7	51
シンバスタチン	SLCO1B1/ rs4149056	筋障害	白人	56/85	20/90	4.5/16.9 ^{b)}	52

a) コントロールは健常人（無印は医薬品投与耐性患者）

b) ヘテロ接合体の場合4.5, ホモ接合体の場合16.9

が、白人では約10%である。DILIの発症頻度が非常に低いのに対して、*GSTM1/T1*両欠損型は比較的頻度が高く、またオッズ比もそれほど高くないことから、DILIの発症には他の因子も寄与すると考えられる。また、*GSTM1/T1*両遺伝子欠損型に関しては、他の医薬品（抗菌薬、非ステロイド性抗炎症薬、中枢神経系薬、等）に関しても、有意にDILI発症リスクが高まることが、白人を対象にした研究で報告されている¹¹⁾。

3-3-3. アモキシシリン/クラブラン酸合剤

抗菌薬のアモキシシリン/クラブラン酸合剤に関し、ベルギーにおいて、DILI発症とHLAクラスII分子の*DRB1*1501-DRB5*0101-DQB1*0602*ハプロタイプとの関連が報告されている（表3の文献47）。また、当該ハプロタイプとの関連は白人を対象とした解析によって検証された¹²⁾。

3-3-4. ラパチニブ

乳がんに対する抗悪性腫瘍薬ラパチニブは、EGFRとHER2に対する分子標的薬である。主として白人を対象にした解析において、*HLA-DQAI*0201*がラパチニブ誘因性DILIと関連性が認められた（表3の文献48）。*HLA-DQAI*0201*の陽性・陰性的中率はそれぞれ0.17と0.97であった。*HLA-DQAI*0201*のヨーロッパ民族（白人）での頻度は10~20%であるのに対して、日本人では1%以下であることから、本結果が日本人に適用しうるかは今後の検証が必要である。

3-3-5. フルクロキサシリン

ペニシリン系抗菌薬フルクロキサシリン（日本では未承認）は、欧州等で使用されているが、胆汁うっ滞型の肝障害を引き起こすことが知られている（投薬患者10万人当たり8.5人）。遺伝子解析により、北ヨーロッパ起源の白人に関して、

DILI 発症と *HLA-B*5701* との関連が報告された (表 3 の文献 49)。*HLA-B*5701* の保有率は、白人は数%であるが、日本人においては 0.1% 以下である。

3-3-6. ルミラコキシブ

非ステロイド性消炎鎮痛薬 (選択的 *cox-2* 阻害剤) ルミラコキシブは、重篤な肝障害 (服用患者 10 万人当たり 6.39 人) のため、2007 年に市場から撤退した (日本では未承認)。白人を主体とした解析により、ハプロタイプ *HLA-DRB1*1501-DQB1*0602-DRB5*0101-DQA1*0102* と DILI 発症とに強い関連性が認められた (表 3 の文献 50)。また、この中で、*DQA1*0102* の陰性的中率は 99.0% と最も高いが、母集団におけるアレル頻度が高いため、陽性的中率は 5.8% と低く、発症には他の要因も関連していると思われる。

3-4. 筋障害

スタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) は高コレステロール血症治療薬として汎用されており、その代表的副作用としては筋痛や筋炎、さらには重篤な横紋筋融解症である。その発生頻度はスタチン単独投与の場合で 10,000 人当たり年間 1 件程度であるが、高用量あるいは、スタチンの体内動態に影響を及ぼす他の薬剤との併用により発症頻度は上昇するため、スタチンの血中濃度上昇が原因の一つと考えられる。

SLCO1B1 遺伝子によってコードされる *OATP1B1* は、肝細胞におけるスタチン取り込みに関与するトランスポーターである。白人を対象にした解析で、*SLCO1B1* の非同義 SNP rs4149056 (521T>C, Val174Ala) とシンバスタチンによる筋障害との関連性が示された (表 3 の文献 52)。本多型によるアミノ酸置換により、シンバスタチン・アシッド体 (活性型) の取り込み活性が低下し、血漿中濃度が上昇する。日本人における 521T>C のアレル頻度は 0.139 であり、ヨーロッパ諸国民の 0.183 より若干低めである⁶⁾。

3-5. 重篤副作用ゲノムバイオマーカーに関する厚生労働省の研究

国立医薬品食品衛生研究所では、本邦における重篤副作用発症の予測と低減化を目指して、厚生労働省の研究として、SJS/TEN、横紋筋融解症、間質性肺疾患のゲノム DNA を収集し、遺伝子多型解析を行っている (図 1)。収集に際し、厚生労働省医薬食品局安全対策課より、研究に協力いただくことを依頼する課長通知が、日本製薬団体連合会宛に発出された¹³⁾。薬事法に基づき、製造販売業者は、当該医薬品との関連が明らかに否定できる以外の全ての有害事象症例 (死亡、障害、死亡または障害につながる恐れのあるもの、治療のための入院またはその延長が必要なもの、等と対象を規定) を、医薬品医療機器総合機構に報告する義務が課されている (図 1、①と②)。その際、当該副作用が重症薬疹、横紋筋融解症、間質性肺疾患の場合、一症例毎に当所への報告を依頼する FAX を、同安全第二部より送付いただいている (同③)。製造販売業者より当所宛に連絡をいただくと (同④)、当所より簡単な研究内容および協力方法に関する文書を折り返し送付し (同⑤)、製造販売業者より担当医にご依頼いただいている (同⑥)。担当医が興味を持っていただくと、始めて担当医の連絡先が当所に伝えられ (同⑦と⑧)、その後は当所が担当医と直接連絡を取り、詳しい研究内容や協力方法を説明している (同⑨)。担当医と患者様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などを行っている。さらに共同研究者である専門医が確定診断している (同⑩)。この方法で、2012 年 5 月末までに SJS/TEN では 169 例、横紋筋融解症では 68 例、間質性肺疾患では 10 例を収集した。SJS/TEN に関しては、既にカルバマゼピンおよびアロプリノールに関する成果を上げている (表 2 の文献 32, 38)。

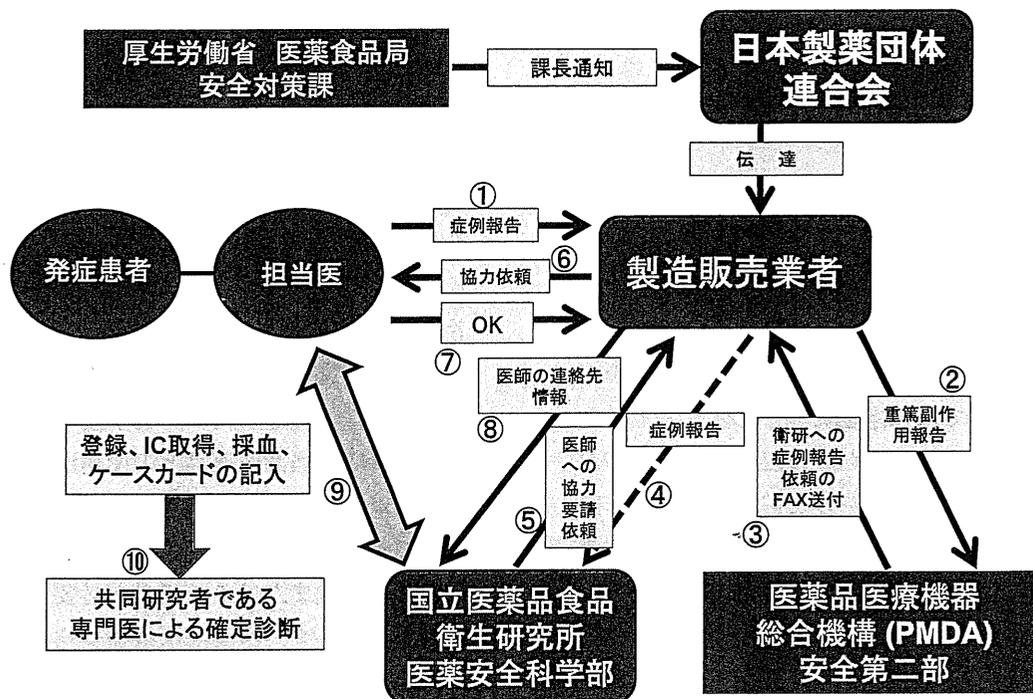


図1 重篤副作用のための症例集積システムの手順

4. ゲノム以外のバイオマーカーと副作用

タンパク質や体内代謝物は、副作用症状などのフェノタイプ（表現形質）に近く、遺伝的要因の他に環境的要因を反映しうるため、バイオマーカーとして有用と考えられる。これらの探索には、それぞれを網羅的に解析しうるプロテオームおよびメタボローム測定法が用いられる。しかしゲノムに比して報告数は少数にとどまっている。以下に例を述べる。

4-1. プロテオーム解析

我々は、日本人において、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を報告した¹⁴⁾。本結果は、別の2つの患者群でも検証された。また、米国での肝障害患者の血清を用いた解析で、アポリポタンパク質Eのレベルが89%の正確性で肝障害患者と健常人を区別しうることを、またフマリルアセ

トアセターゼのレベルが、肝細胞障害型と胆汁うっ滞型間で異なることが報告されている¹⁵⁾。

4-2. メタボローム解析

日本人患者を対象に、薬物性肝障害に関して、電荷を有する血清中内在性代謝物の解析を行った結果、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ということが報告された¹⁶⁾。海外の研究では、抗がん剤カペシタピン投与前の血清を用いたNMR解析で、脂質の部分構造である $(-CH_2-)_n-$ やコリンの部分構造 $-N(CH_3)_3$ のレベルが、副作用（種類不特定）発現患者で有意に高いことを報告している¹⁷⁾。また最近、米国FDAの国立毒性研究センターは副作用に関するメタボロミクス解析を進めており、急性腎障害患者17例の血清を対象としたパイロット研究で、アシルカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加、リゾフォスファチジルコリンの減少を報告している¹⁸⁾。

5. バイオマーカーの診断

医薬品の承認販売後における利用に加えて、最近では非臨床および臨床開発の段階からバイオマーカーを積極的に活用する事例が増加している。米国の ClinicalTrials.gov を用いて調査した報告によると、ゲノム薬理学に関する検討項目が記載された臨床試験は、2011年8月末までに7,922件に達している¹⁹⁾。医薬品の安全かつ効果的な使用のために不可欠な情報を提供する体外診断薬（機器）をコンパニオン診断薬と呼び、米国や欧州からは関連するガイダンス案も発表されている^{20, 21)}。しかし最近までに承認されたケースでは、抗体医薬品の標的分子が多く有効性に関わるケースがほとんどであり、安全性に関するものはイリノテカンにおける UGT1A1 試験等の一部である。

このような診断に関しては、バイオマーカーの感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率と診断薬の診断精度が重要であるが、その両者の基盤となるのが、診断対象試料の品質要件である。現在、当所ではゲノム DNA および血液・尿に関する品質要件の研究を行っている。

5-1. ゲノム DNA の品質²²⁾

DNA マイクロアレイをアッセイ系として、アレイ当たりの、サンプル毎のタイピング成功率を指標としてバイオマーカー探索用試料としての品質評価を行い、95%以上のコールレートが得られた場合、品質基準を満たすものとした。全血保存条件に関しては25℃での24時間保存や凍結融解の5回繰り返す、ゲノム DNA 抽出法に関しては液層分離法とシリカ膜スピンカラム法、ゲノム DNA の保存条件に関しては20回の凍結融解を行ったが、いずれの条件でも品質基準を満たした。一般に、DNA の凍結融解を繰り返すことは、断片化を加速させ、品質低下を招くと言われており、4℃での保存を推奨するケースもある。しかし、DNA マイクロアレイ法によるゲノムバイオ

マーカーの探索に供する DNA の保存方法としては、長期保存に耐えうる凍結保存の方が適していると考えられた。

5-2. メタボローム測定用試料の適性

脂質メタボローム解析系を用いて、ラットおよびヒト試料を対象に、血漿と血清間の内在性脂質代謝物レベルを比較した。概して比較2群間で同様のレベルを示す代謝物が多かったものの、血液凝固に関するもの等、一部にレベルが大きく異なる分子も認められた。探索したバイオマーカーが、これらに該当する場合には、血漿と血清という測定試料選択において注意を要することが示唆された。

6. おわりに

副作用の予測という観点において、バイオマーカーは、治療用量域が狭い医薬品に対して、関連性が強く、低コストの診断方法を開発できる場合には、特に有用と考えられる。また、死亡等につながる副作用を回避するなど社会的に重要な場合にも検討すべきであろう。最近では臨床試験段階で発症が検出できない比較的頻度が低い重篤副作用に関しても、得られた情報が添付文書に反映され、諸外国では投薬前診断が必須となっている場合もある。バイオマーカー研究がさらに進み、医薬品のより安全な使用に応用されることを期待したい。一方で、これらを実臨床に応用するためには、前向き研究により診断の有用性を示すことが極めて重要である。本邦でも理化学研究所がカルバマゼピンによる薬疹に関し、1000例を対象に *HLA-A*3101* 事前診断（陽性の場合、別薬を投与）の薬疹発症率への影響に関する臨床研究を開始しており、その結果が待たれるところである。

謝 辞

本稿で紹介した著者らの報告の一部は、厚生労働省や医薬基盤研究所の支援を受けてなされたものである。

文 献

- 1) 医薬品リスク管理計画指針について(平成24年4月11日付. 薬食安発0411第1号. 薬食審査発0411第2号).
- 2) 医薬品・医療機器等 製造販売後安全対策業務指針2010. 薬事日報社. 2010年4月.
- 3) ゲノム薬理学における用語集について(平成20年1月9日付. 薬食審査発第0109013号. 薬食安発第0109002号).
- 4) <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugDevelopmentToolsQualificationProgram/ucm284395.htm>.
- 5) Concept paper on key aspects for the use of pharmacogenomic methodologies in the pharmacovigilance evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/917570/2011, 15 Dec. 2011.
- 6) Kurose K, Sugiyama E, Saito Y. Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27: 9-54.
- 7) Sai K, Saito Y. Ethnic differences in the metabolism, toxicology and efficacy of three anticancer drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011; 7: 967-988.
- 8) Wei CY, Chung WH, Huang HW, Chen YT, Hung SI. Direct interaction between HLA-B and carbamazepine activates T cells in patients with Stevens-Johnson syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129: 1562-1569.
- 9) Chen P, Lin JJ, Lu CS, Ong CT, Hsieh PF, Yang CC, et al. Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1126-1133.
- 10) Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, et al. Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27: 447-450.
- 11) Lucena MI, Andrade RJ, Martínez C, Ulzurrún E, García-Martín E, Borraz Y, et al. Glutathione S-transferase m1 and t1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology.* 2008; 48: 588-596.
- 12) Lucena MI, Molokhia M, Shen Y, Urban TJ, Aithal GP, Andrade RJ, et al. Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles. *Gastroenterology.* 2011; 141: 338-347.
- 13) 重篤な有害事象(皮膚障害, 横紋筋融解症及び間質性肺疾患)に関する研究への協力について(平成23年9月26日. 薬食安発0926第2号).
- 14) Matsubara J, Ono M, Negishi A, Ueno H, Okusaka T, Furuse J, et al. Identification of a predictive biomarker for hematologic toxicities of gemcitabine. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 2261-2268.
- 15) Bell LN, Vuppalanchi R, Watkins PB, Bonkovsky HL, Serrano J, Fontana RJ, et al. Serum proteomic profiling in patients with drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 35: 600-612.
- 16) Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, et al. Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol.* 2011; 55: 896-905.
- 17) Backshall A, Sharma R, Clarke SJ, Keun HC. Pharmacometabonomic profiling as a predictor of toxicity in patients with inoperable colorectal cancer treated with capecitabine. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 3019-3028.
- 18) Sun J, Shannon M, Ando Y, Schnackenberg LK, Khan NA, Portilla D, et al. Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: a pilot study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 893-894: 107-113.
- 19) 南雲明. ファーマコゲノミクスの利用動向と課

- 題. 政策研ニュース. 2012; 35: 19-23.
- 20) Reflection paper on co-development of pharmacogenomic biomarkers and Assays in the context of drug development (Draft). EMA/CHMP/641298/2008, 24 June 2010.
 - 21) In Vitro Companion Diagnostic Devices (Draft guidance). July 14, 2011.
 - 22) Kurose K, Koizumi T, Nishikawa J, Maekawa K, Saito Y. Quality requirements for genomic DNA preparations and storage conditions for a high-density oligonucleotide microarray. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35: 1846-1848.
 - 23) Hung SI, Chung WH, Jee SH, Chen WC, Chang YT, Lee WR, et al. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. *Pharmacogenet Genomics.* 2006; 16: 297-306.
 - 24) Zhang Y, Wang J, Zhao LM, Peng W, Shen GQ, Xue L, et al. Strong association between HLA-B*1502 and carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in mainland Han Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011; 67: 885-887.
 - 25) Wang Q, Zhou JQ, Zhou LM, Chen ZY, Fang ZY, Chen SD, et al. Association between HLA-B*1502 allele and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions in Han people of southern China mainland. *Seizure.* 2011; 20: 446-448.
 - 26) Lochareernkul C, Loplumlert J, Limotai C, Korkij W, Desudchit T, Tongkobetch S, et al. Carbamazepine and phenytoin induced Stevens-Johnson syndrome is associated with HLA-B*1502 allele in Thai population. *Epilepsia.* 2008; 49: 2087-2091.
 - 27) Tassaneeyakul W, Tiamkao S, Jantararoungtong T, Chen P, Lin SY, Chen WH, et al. Association between HLA-B*1502 and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions in a Thai population. *Epilepsia.* 2010; 51: 926-930.
 - 28) Kulkantrakorn K, Tassaneeyakul W, Tiamkao S, Jantararoungtong T, Prabmechai N, Vannaprasaht S, et al. HLA-B*1502 strongly predicts carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Thai patients with neuropathic pain. *Pain Pract.* 2012; 12: 202-208.
 - 29) Mehta TY, Prajapati LM, Mittal B, Joshi CG, Sheth JJ, Patel DB, et al. Association of HLA-B*1502 allele and carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome among Indians. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009; 75: 579-582.
 - 30) Chang CC, Too CL, Murad S, Hussein SH. Association of HLA-B*1502 allele with carbamazepine-induced toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome in the multi-ethnic Malaysian population. *Int J Dermatol.* 2011; 50: 221-224.
 - 31) Lonjou C, Thomas L, Borot N, Ledger N, de Toma C, LeLouet H, et al. A marker for Stevens-Johnson syndrome ...: ethnicity matters. *Pharmacogenomics J.* 2006; 6: 265-268.
 - 32) Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, et al. HLA-B*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Epilepsia.* 2010; 51: 2461-2465.
 - 33) Kim SH, Lee KW, Song WJ, Kim SH, Jee YK, Lee SM, et al. Carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions and HLA genotypes in Koreans. *Epilepsy Res.* 2011; 97: 190-197.
 - 34) McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S, Farrell JJ, Kasperavičiūtė D, Carrington M, et al. HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. *N Eng J Med.* 2011; 364: 1134-1143.
 - 35) Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, Takahashi A, Kubo M, Shirakata Y, et al. Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-

- induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 2011; 20: 1034-1041.
- 36) Kashiwagi M, Aihara M, Takahashi Y, Yamazaki E, Yamane Y, Song Y, et al. Human leukocyte antigen genotypes in carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug response in Japanese patients. *J Dermatol.* 2008; 35: 683-685.
- 37) Hung SI, Chung WH, Liou LB, Chu CC, Lin M, Huang HP, et al. HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 4134-4139.
- 38) Tohkin M, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kurose K, Nishikawa J, et al. A whole-genome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Pharmacogenomics J* in press.
- 39) Lonjou C, Borot N, Sekula P, Ledger N, Thomas L, Halevy S, et al. A European study of HLA-B in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis related to five high-risk drugs. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18: 99-107.
- 40) Tassaneeyakul W, Jantararoungtong T, Chen P, Lin PY, Tiamkao S, Khunarkornsiri U, et al. Strong association between HLA-B*5801 and allopurinol-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a Thai population. *Pharmacogenet Genomics.* 2009; 19: 704-709.
- 41) Kang HR, Jee YK, Kim YS, Lee CH, Jung JW, Kim SH, et al. Positive and negative associations of HLA class I alleles with allopurinol-induced SCARs in Koreans. *Pharmacogenet Genomics.* 2011; 21: 303-307.
- 42) Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet.* 2002; 359: 727-732.
- 43) Saag M, Balu R, Phillips E, Brachman P, Martorell C, Burman W, et al. High sensitivity of human leukocyte antigen-b*5701 as a marker for immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 1111-1118.
- 44) Chantarangsu S, Mushiroda T, Mahasirimongkol S, Kiertiburanakul S, Sungkanuparph S, Manosuthi W, et al. HLA-B*3505 allele is a strong predictor for nevirapine-induced skin adverse drug reactions in HIV-infected Thai patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2009; 19: 139-146.
- 45) Yuan J, Gūo S, Hall D, Cammett AM, Jayadev S, Distel M, et al. Toxicogenomics of nevirapine-associated cutaneous and hepatic adverse events among populations of African, Asian, and European descent. *AIDS.* 2011; 25: 1271-1280.
- 46) Hirata K, Takagi H, Yamamoto M, Matsumoto T, Nishiya T, Mori K, et al. Ticlopidine-induced hepatotoxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case-control study. *Pharmacogenomics J.* 2008; 8: 29-33.
- 47) Hautekeete ML, Horsmans Y, Van Waeyenberge C, Demanet C, Henrion J, Verbist L, et al. HLA association of amoxicillin-clavulanate-induced hepatitis. *Gastroenterology.* 1999; 117: 1181-1186.
- 48) Spraggs CF, Budde LR, Briley LP, Bing N, Cox CJ, King KS, et al. HLA-DQA1*02:01 is a major risk factor for lapatinib-induced hepatotoxicity in women with advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 667-673.
- 49) Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, Shen Y, Pe'er I, Floratos A, et al. HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nat Genet.* 2009; 41: 816-819.
- 50) Singer JB, Lewitzky S, Leroy E, Yang F, Zhao X, Klickstein L et al. A genome-wide study

identifies HLA alleles associated with lumiracoxib-related liver injury. *Nat Genet.* 2010; 42: 711-714.

- 51) Watanabe I, Tomita A, Shimizu M, Sugawara M, Yasumo H, Koishi R, et al. A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in

Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 73: 435-455.

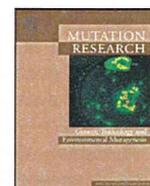
- 52) SEARCH Collaborative Group, Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy -a genomewide study. *N Engl J Med.* 2008; 359: 789-799.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gen tox
Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis[☆]

Kazuya Suenaga^{a,1}, Hironao Takasawa^{b,1}, Takashi Watanabe^{a,2}, Yumi Wako^b, Takayoshi Suzuki^c, Shuichi Hamada^b, Chie Furihata^{a,c,*}

^a Functional Genomics Laboratory, School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, Fuchinobe 5-10-1, Chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5258, Japan

^b Safety Assessment Department, Mitsubishi Chemical Medicine Corp., 14-1 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki 314-0255, Japan

^c Division of Cellular & Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1 Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2012

Accepted 11 November 2012

Available online 24 November 2012

Keywords:

Gene expression

Quantitative real-time PCR

PCA

Gene network

Rat liver

ABSTRACT

We recently successfully discriminated mouse genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens via selected gene expression profiling in the mouse liver based on quantitative real-time PCR (qPCR) and statistical analysis using principal component analysis (PCA). In the present study, we applied these candidate marker genes to rat hepatocarcinogens in the rat liver. qPCR analysis of 33 genes was conducted on liver samples from groups of 4 male 4-week-old F344 rats at 4 and 48 h after a single oral administration of chemicals [2 genotoxic hepatocarcinogens: diethylnitrosamine and 2,6-dinitrotoluene; a non-genotoxic hepatocarcinogen: di(2-ethylhexyl)phthalate; and a non-genotoxic non-hepatocarcinogen: phenacetin]. Thirty-two genes exhibited significant changes in their gene expression ratios (experimental group/control group) according to statistical analysis using the Williams' test and the Dunnett's test. The changes appeared to be greater at 4 h than at 48 h. Finally, statistical analysis via PCA successfully differentiated the genotoxic hepatocarcinogens from the non-genotoxic hepatocarcinogen and the non-genotoxic non-hepatocarcinogen at 4 h based on 16 genes (*Ccnf*, *Ccng1*, *Cyp4a10*, *Ddit4l*, *Egfr*, *Gadd45g*, *Gdf15*, *Hspb1*, *Igfbp1*, *Jun*, *Myc*, *Net1*, *Phlda3*, *Pml*, *Rcan1* and *Tubb2c*) and at 48 h based on 10 genes (*Aen*, *Ccng1*, *Cdkn1a*, *Cyp21a1*, *Cyp4a10*, *Gdf15*, *Igfbp1*, *Mdm2*, *Phlda3* and *Pmm1*). Eight major biological processes were extracted from a gene ontology analysis: apoptosis, the cell cycle, cell proliferation, DNA damage, DNA repair, oxidative stress, oncogenes and tumor suppression. The major, biologically relevant gene pathway suggested was the DNA damage response, which signals through a *Tp53*-mediated pathway and leads to the induction of apoptosis. Immunohistochemical analyses for the expression of *Cdkn1a* and *Hmox1* proteins and the level of apoptosis measured by the TUNEL assay in the liver confirmed the aforementioned results. The present results showed that mouse candidate marker genes are applicable for differentiating genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens examined in this paper in the rat liver.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

For risk assessment purposes, there is general agreement that chemicals acting through genotoxic and non-genotoxic

mechanisms of carcinogenesis should be distinguished [1]. According to Waters et al., although the number of presumably non-genotoxic rodent carcinogens has dramatically increased over the past two decades, the fact remains that ~90% of the known, probable and possible human carcinogens, classified by the International Agency for Research on Cancer, are detected in conventional short-term tests for genotoxicity and induce tumors at multiple sites in rodents [2]. Mathijs et al. [3] hypothesized that genotoxic and non-genotoxic carcinogens induce distinct gene expression profiles, which may therefore be used to classify the mechanisms of compounds as either genotoxic carcinogens or non-genotoxic carcinogens. DNA microarrays are a powerful technology for characterizing gene expression on a genome-wide scale [4], although issues regarding the reliability, reproducibility and correlation of

[☆] This work was the 4th collaborative study by Toxicogenomics/JEMS-MMS.

* Corresponding author. Present address: Division of Cellular & Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81 3 3700 1926; fax: +81 3 3700 1926.

E-mail address: chiefurihata@gmail.com (C. Furihata).

¹ Contributed equally to the manuscript.

² Present address: Laboratory for Immunogenomics, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN Yokohama Institute, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan.

the data produced across the different DNA microarray technologies are still being addressed [5]. qPCR is the field standard for measuring gene expression and is often used to confirm DNA microarray data [6] because qPCR is the most sensitive technique for the detection and quantification of mRNA targets [7].

Previously, we (the collaborative study group of toxicogenomics of the Japanese Environmental Mutagen Society/Mammalian Mutagenicity Study Group; Toxicogenomics/JEMS-MMS) examined differential gene expression using DNA microarrays following the application of 13 different chemicals, including 8 genotoxic hepatocarcinogens [*o*-aminoazotoluene, chrysene, dibenzo[*a,l*]pyrene, diethylnitrosamine (DEN), 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene, dimethylnitrosamine, dipropylnitrosamine and ethylnitrosourea (ENU)], 4 non-genotoxic hepatocarcinogens [carbon tetrachloride, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), phenobarbital and trichloroethylene] and a non-genotoxic non-hepatocarcinogen [ethanol]. DNA microarray analysis was conducted on 9-week-old male mouse liver samples at 4 h and for up to 28 days following a single intraperitoneal administration of these chemicals. A considerable number of candidate genes were extracted to differentiate the genotoxic hepatocarcinogens from the other chemicals (the non-genotoxic hepatocarcinogens and a non-genotoxic non-hepatocarcinogen). The results were reported in part [8] and registered in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (GEO accession GSE33248). Notably, the changes in gene expression observed at 4 h were much greater than those at 20 h, 14 days and 28 days. Additionally, dose-dependent alterations in gene expression were demonstrated for 31 out of 51 of the examined candidate genes at 4 h and 28 days after the administration of DEN (3, 9, 27 and 80 mg/kg bw) and ENU (6, 17, 50 and 150 mg/kg bw), as determined by qPCR [9]. More recently, we demonstrated successful discrimination between 8 genotoxic mouse hepatocarcinogens (2-acetylaminofluorene, 2,4-diaminotoluene, diisopropanolnitrosamine, 4-dimethylaminoazobenzene, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, *N*-nitrosomorpholine, quinoline and urethane) and 4 non-genotoxic hepatocarcinogens (1,4-dichlorobenzene, dichlorodiphenyltrichloroethane, DEHP and furan) using qPCR analysis and PCA for 12 genes associated with a *Trp53*-mediated signaling pathway involved in the DNA damage response; this discrimination was demonstrated at 4 and 48 h after a single administration of the chemicals [10].

Rats, as well as mice, are often used for the study of experimental chemical carcinogenesis and *in vivo* genotoxicity tests. However, studies published on the gene expression profiles induced by genotoxic hepatocarcinogens in the *in vivo* rat livers are still limited; studies on the changes in gene expression profiles within a few hours after the administration of genotoxic hepatocarcinogens are particularly scarce. In the present study, we applied our mouse candidate marker genes [8–10] to rat hepatocarcinogens in an established rat liver genotoxicity test system. We evaluated the gene expression profiles in the rat liver treated with the 4 chemicals [DEN, 2,6-dinitrotoluene (DNT), DEHP and phenacetin (PNT)] that were previously examined previously using the liver micronucleus assay by the collaborative study group of micronucleus test of the Japanese Environmental Mutagen Society/Mammalian Mutagenicity Study Group (CSGMT/JEMS-MMS) [11,12]. DEN and DNT exhibited positive results [12] and DEHP [11] and PNT [12] exhibited negative results in the liver micronucleus assay. DEN [13] and DEHP [14] induce hepatocellular carcinoma in mice and rats. DNT induces hepatocellular carcinoma in rats, but not in mice [15]. Whether the mouse candidate marker genes will also be responsive to DNT in the rat liver is a topic of interest. PNT has been shown to induce tumors of the urinary tract in mice and rats and tumors of the nasal cavity in rats [16]. The induction of liver tumors in mice and rats by PNT has not previously been reported, although

the addition of *N*-hydroxyphenacetin, a PNT metabolite, has been shown to induce liver tumors in rats [17]. DEN [13] and DNT [18] are positive and DEHP [14] and PNT [19] are negative in the Ames test using rat S9 mix.

The chemicals were administered orally by gavage into 4-week-old male F344 rats, which were analyzed at 4 and 48 h after administration using the qPCR analysis of 33 genes. We speculated that the period of 4 h post-hepatocarcinogen administration in the liver would be the time by which DNA damage would occur, as determined by the *in vivo/in vitro* unscheduled DNA synthesis (UDS) assay [20–22] and the *in vivo* Comet assay [23], and that the 48 h time point would represent the period of DNA replication after damage, as determined with a replicative DNA synthesis test [20–22,24].

Finally, we succeeded in differentiating the genotoxic hepatocarcinogens from the non-genotoxic hepatocarcinogens and the non-genotoxic non-hepatocarcinogen *via* statistical analysis using PCA. We showed that the major biologically relevant gene pathway associated with the PCA-contributed genes is a *Trp53*-mediated DNA damage response signaling pathway, which ultimately results in the induction of apoptosis. We additionally examined both the protein expression level of the DNA damage markers, *Cdkn1a* and *Hmox1*, by immunohistochemistry and the level of apoptosis by the TUNEL assay in the rat liver following treatment with the 4 hepatocarcinogens. The results confirmed the expression of *Cdkn1a*, *Hmox1* proteins and an enhanced level of apoptosis in rat liver following treatment with the genotoxic hepatocarcinogens (DEN and DNT).

2. Materials and methods

2.1. Animal treatment

Male F344 rats were obtained at 3 weeks of age from Charles River Japan, Inc. (Yokohama, Japan). They were maintained in plastic cages with wood chips as bedding in an air-conditioned room [12 h light (7 a.m. to 7 p.m.), 12 h dark; 22 ± 3 °C; 55 ± 20% humidity], and they were provided food (Oriental MF, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) and water provided *ad libitum*. All animal experiments were conducted in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Mitsubishi Chemical Medicine Corp.

DEN (CAS No. 55-18-5) and PNT (CAS No. 62-44-2) were purchased from Wako Pure Chem. Ind. Ltd., Osaka, Japan. DNT (CAS No. 606-20-2) was obtained from Johnson Matthey Company, London, UK, and DEHP (CAS No. 117-81-7) was purchased from Tokyo Chem. Ind. Co. Ltd., Tokyo, Japan.

Groups of 4-week-old rats (4 rats per group) were dosed by gavage (p.o.) with DEN (12.5, 25 and 50 mg/kg bw) dissolved in sterile water, DNT (125 and 250 mg/kg bw) suspended in olive oil, DEHP (1000 and 2000 mg/kg bw) dissolved in olive oil or PNT (500 and 1000 mg/kg bw) suspended in olive oil. The doses for DEN [12], DNT [12], DEHP [11] and PNT [12] were comparable to the doses used in the previous young rat micronucleus assay. The control animals received only sterile water or olive oil. At 4 and 48 h after treatment, the left lateral lobe of the liver was dissected and stored in either RNAlater (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA) at –20 °C until use in qPCR experiments or in 10% buffered formalin for immunohistochemical and histopathological analyses.

2.2. RNA isolation and relative quantification via real-time PCR

Total RNA was extracted from a liver sample of approximately 30 mg from each rat using Micro Smash MS-100 (TOMY DIGITAL BIOLOGY Co., LTD., Tokyo, Japan) and QuickGene-800 (FUJIFILM Holdings Corp., Tokyo, Japan). Complimentary DNA (cDNA) was prepared from the total RNA using the SuperScript first-strand synthesis system for RT-PCR kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). qPCR analyses were performed in triplicate assays using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a DNA Engine Opticon 2 Real-Time Cycler (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA). The reactions were carried out as previously described [10]. We quantified 33 genes based on our previous DNA microarray and qPCR studies performed in the mouse liver. The symbols, gene names and accession numbers of the 33 genes are summarized in Table 1. The sequences of the primers used in our experiments and the cycle threshold (Ct) values that were obtained are shown in Table 2. The primer sequences were determined using Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). *Gapdh* was selected as a housekeeping gene. Finally, the relative quantitative values for each sample were normalized to the value of the *Gapdh* gene. The variability of the relative *Gapdh* expression in the

Table 1
The 33 genes examined in the present study.

No.	Symbol	Gene name	Accession no.
1	<i>Aen</i>	Apoptosis enhancing nuclease	NM_001108487
2	<i>Bax</i>	Bcl2-associated X protein	NM_017059
3	<i>Btg2</i>	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	NM_017259
4	<i>Ccnf</i>	Cyclin F	NM_001100474
5	<i>Ccnf1</i>	Cyclin G1	NM_012923
6	<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	NM_080782
7	<i>Cyp21a1</i>	Cytochrome P450, subfamily 21A, polypeptide 1	NM_057101
8	<i>Cyp4a1</i>	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 1	NM_175837
9	<i>Ddit4l</i>	DNA-damage-inducible transcript 4-like	NM_080399
10	<i>Egfr</i>	Epidermal growth factor receptor	NM_031507
11	<i>Ephx1</i>	Epoxide hydrolase 1, microsomal	NM_012844
12	<i>Gadd45b</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	NM_001008321
13	<i>Gadd45g</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	NM_001077640
14	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_017008
15	<i>Gdf15</i>	Growth differentiation factor 15	NM_019216
16	<i>Hhex</i>	Hematopoietically expressed homeobox	NM_024385
17	<i>Hmox1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	NM_012580
18	<i>Hspb1</i>	Heat shock protein 1	NM_031970
19	<i>Igf1bp1</i>	Insulin-like growth factor binding protein 1	NM_013144
20	<i>Jun</i>	Jun oncogene	NM_021835
21	<i>Lpp</i>	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	NM_001013864
22	<i>Ly6al</i>	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A-like	NM_001128009
23	<i>Mdm2</i>	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)	NM_001108099
24	<i>Myc</i>	Myelocytomatosis oncogene	NM_012603
25	<i>Net1</i>	Neuroepithelial cell transforming 1	NM_001039023
26	<i>Phlda3</i>	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 3	NM_001012206
27	<i>Plk2</i>	Polo-like kinase 2 (Drosophila)	NM_031821
28	<i>Pml</i>	Promyelocytic leukemia	XM_236296
29	<i>Pmm1</i>	Phosphomannomutase 1	NM_001008323
30	<i>Rcan1</i>	Regulator of calcineurin 1	NM_153724
31	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	NM_012675
32	<i>Tp53</i>	Tumor protein p53	NM_030989
33	<i>Tubb2c</i>	Tubulin, beta 2c	NM_199094

Table 2
Primer sequences of the 33 genes examined in this study.

No.	Symbol	Left primer	Right primer	Ct
1	<i>Aen</i>	GCACTGCAACAATGACTTCCAG	GCCAGGTCCTTAAGAGAGACCC	26–30
2	<i>Bax</i>	GGCGAATTGGAGATGAACTGG	GTTGAAGTTGCCATCAGCAAAC	29–33
3	<i>Btg2</i>	GAGAGGTGGCTCAAAGCTCCAG	AGGACCCAACCCGAGGAAAG	23–29
4	<i>Ccnf</i>	CCATAAGCTCCCTGGATGGTG	CATGACTTCTGGCCTGATGG	26–30
5	<i>Ccnf1</i>	TAAGGCAAAGCCTTCTGTGCTG	CTCGGCCACTTATCTTGGAAATG	26–33
6	<i>Cdkn1a</i>	TTGTCCGCTGTCTTCACTCTGG	GCGCTTGGAGTGATAGAAATCTG	22–28
7	<i>Cyp21a1</i>	GACATGATTGACTACATGCTCCAG	GTGAAGCAGGAAAGCCACAG	30–35
8	<i>Cyp4a1</i>	TCTGACAAGGACTACGTGCTGAGG	GTGTGTGGCCAGAGCATAGAAGATC	25–28
9	<i>Ddit4l</i>	CCTGGGAGTCTGCTAAGTGATTTC	CCAAATCTGGCATGTTGTCTC	28–34
10	<i>Egfr</i>	ACAGCAAGGCTTCTTCAACAGC	GTCTTCTTTGACACGGCAGCTC	26–29
11	<i>Ephx1</i>	TACCGTGAAGTGGAGGATGGAG	GAGGAGACAATGGTTCCTGTGC	18–21
12	<i>Gadd45b</i>	GAGCGACAACCGGTTTCAAGAG	TCAGTTTGGCCCTCGTACAC	27–34
13	<i>Gadd45g</i>	GAAAGCACAGCCAGGATGCAG	TTCAGGACTTTGGCGGACTCG	27–30
14	<i>Gapdh</i>	ATGGCCTTCCGTGTTCTACCC	GCCTGCTTACCACCTTCTTGATG	17–20
15	<i>Gdf15</i>	CTGGAGACTGTGCAGGCAACTC	CATGCAGGCGTCTTTGATC	27–34
16	<i>Hhex</i>	GGACAGTTTGGACACTTCTGTG	GGTCCGAATCCTCTGAGATCTC	24–26
17	<i>Hmox1</i>	CAAGCACAGGGTGACAGAAGAGG	TCTGTGAGGACTCTGGTCTTTGTG	18–28
18	<i>Hspb1</i>	TCCCTGGACGTCAACCACTTCG	TTTCCGGTGAAGCACCAGAG	24–28
19	<i>Igf1bp1</i>	GACCTCAAGAAATGGAAGGAGCC	CCATTCTTGTGAGATTTGGCAG	20–27
20	<i>Jun</i>	AAAGGAAGCTGGAGCGGATCG	CACCTGTTCCCTGAGCATGTTGG	24–29
21	<i>Lpp</i>	CCGTGATTTCCATGTGCACTGC	CTTGGCCGTCAAGACCCTGATG	29–31
22	<i>Ly6a1</i>	CTGCAGACCCCTGTGTGATGTC	AAGGTGTTGCACACCCTACCC	36–40
23	<i>Mdm2</i>	GCCTGGATCAGGATTCAGTTTCTG	GTGACCCGATAGACCTCATCATCC	24–29
24	<i>Myc</i>	AGAGGGCCAAGTTGGACAGTGG	GACGTTGTGTCTCCGCTCTTG	25–30
25	<i>Net1</i>	ATTGTCTGGCTGAACCAAGAGG	TGCAGGTATGAGAAACCAAGG	24–28
26	<i>Phlda3</i>	CGCATCAAAGCCGTGGAGTG	AGGGTGATCTGAGCGTCCAG	23–27
27	<i>Plk2</i>	TGGAGGAGAACCTCATGGATGG	CACCTGAAATGTGCCGCTATTG	23–27
28	<i>Pml</i>	TCAAGGCCTTGGATGAGAGCC	CGGAACCTGCTTCCCGGTTTC	27–31
29	<i>Pmm1</i>	GAAGACAGAGTTTCTGGCAAGG	CTGTCCAGGCAGTAGCCCTTATC	24–29
30	<i>Rcan1</i>	AGAGGGCAGAGGAGTTTCAAG	AAAGGCAGTGTCCCTCAGG	24–30
31	<i>Tnf</i>	GCTGAGCTCAAAGCCCTGGTATG	CCCGGACTCCGTGATGCTAAG	32–35
32	<i>Tp53</i>	ATGGCTTCCACCTGGGCTTC	TGACCACAACCTGCACAGGGC	26–29
33	<i>Tubb2c</i>	GCTAAATGCTGACTCGGAAAC	CTGGGTGAGCTCAGGAACTGTC	23–26

The Ct (cycle threshold) is defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold under the present experimental conditions.