

薬剤アレルギー同定の効率化に関する基礎的検討 — 1次スクリーニングとしての細胞動態解析 —

安高勇気^{*1,2}, 芝口浩智^{2,3}, 黒木政秀³, 松永 彰⁴, 二神幸次郎^{1,2}

福岡大学薬学部実務薬剤学¹, 福岡大学病院薬剤部²

福岡大学医学部生化学³, 福岡大学医学部臨床検査医学⁴

Fundamental Study of Improving an Efficient Assay in Patient of Drug-induced Allergy — Kinetic Analysis of Cell Mobility as a Primary Screening Method —

Yuki Yasutaka^{*1,2}, Hiroto Shimaguchi^{2,3}, Masahide Kuroki³, Akira Matsunaga⁴ and Koujiro Futagami^{1,2}

Department of Pharmaceutical and Health Care Management, Faculty of Pharmaceutical Science, Fukuoka University¹,

Department of Hospital Pharmacy, Fukuoka University Hospital²,

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Fukuoka University³,

Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University⁴

〔 Received September 6, 2014 〕
〔 Accepted October 17, 2014 〕

The drug-induced lymphocyte stimulation test (DLST) and the cell migration analysis (CMA) are widely used as *in vitro* techniques to identify medicine causing drug-induced allergy (DIA). Unfortunately, however, the positive rate of these tests for identifying the causative drug in DIA is insufficiently high. In this study, we tried to establish a simple and rapid method with Jurkat cells and patients' serum to screen DIA before confirming by DLST and CMA. The sera were obtained from the healthy volunteer and the patients who had allergy-like symptoms and CMA. The real-time recording of cell mobility was performed up to 4 h using an optical accessible chemotaxis apparatus with Jurkat cells and patients' serum. When the kinetics of Jurkat cells were analyzed using the images of cell migration and the ImageJ software, the significant chemotaxis of Jurkat cells was observed against the sera of patients who had the drug for DIA identified by CMA. The positive rate of CMA rose from 16.7% to 50% after employing this rapid and beforehand method for diagnosing DIA followed by selecting patients' serum for the inspection. These results suggest that it may be an effective method for analyzing the kinetics of Jurkat cells with patients' serum before CMA for diagnosing the possibility of DIA.

Key words — drug-induced allergy, cell migration assay, chemotaxis, hypersensitivity

緒 言

薬剤アレルギーには、比較的軽度な薬疹や血液障害をはじめ、Stevens-Johnson 症候群 (SJS)、中毒性皮膚壊死融解症 (toxic epidermal necrolysis: TEN) や薬剤過敏性症候群 (drug-induced hypersensitivity syndrome: DIHS) として知られる重症薬疹、あるいは肝臓や肺、消化管などの臓器障害やアナフィラキシーショックのようなものがある。¹⁻³⁾ 薬剤アレルギーの発現は事前検査による回避が望ましい

が、現在行われている負荷試験などの精度は十分とは言えず、発現後に原因薬剤の同定と薬剤変更で対処しているのが現状である。接触皮膚炎の原因を明らかにするために施行されるパッチテストにおいても実施者の技量や判定のタイミングなどによって結果がばらつくことが報告されている。⁴⁾

現在、薬剤アレルギーの検出法としては、薬剤誘発リンパ球刺激試験 (drug-induced lymphocyte stimulation test: DLST) が汎用されているが、試験を実施する時期による陽性率の違いが報告され

* 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

ている。^{5,6)} 一方、白血球遊走試験 (leukocyte migration test) としても知られる chemotaxis cell migration assay (CMA) は、DLST と同様に遅発型の薬剤アレルギーの原因薬剤を同定できる試験であり、*in vitro* の試験としては高い検出率を有している。⁷⁾ 当院では、アレルギー性副作用が疑われる場合、医師と協議したうえで薬剤師が CMA を実施している。

これまで白血球の走化性を測定する方法はボイデンチャンバーやケモタキシスチャンバーの開発により簡便化されてきたが、CMA は DLST と同様に結果の判明までに 3 日～10 日程度を要するなど、時間的な側面からも改善の必要がある。⁸⁻¹⁰⁾ また、これまでの報告で検査時期以外にも、有害事象を発現した患者の疾患の違いや被疑薬の種類により DLST や CMA などの陽性率に差が生じることからも、有害事象発現時の原因薬剤の同定とともに薬剤誘発性アレルギーの鑑別が困難であることがわかる。^{7,11)} さらに、アレルギー試験には 1 回あたり 10 mL 以上の患者血液が必要であり、患者の負担を考慮すると不要な採血を避けるのが望ましい。従って、このような問題点や困難を解決し、DLST や CMA などのアレルギー検査の精度を上げ、陽性率を向上させる簡便な方法の確立が必要である。

EZ-TAXIScanTM (GE Healthcare, Tokyo, Japan) は細胞遊走の状況を観察できる装置であり、アレルギー領域において好酸球や好中球の遊走能、あるいはマスト細胞の脱顆粒に関する検討などが報告されている。¹²⁻¹⁶⁾ そこで本研究では、CMA および DLST における陽性率向上と薬剤アレルギーの検査効率の向上を目的に、EZ-TAXIScanTM を用いた患者血清による樹立細胞株の走化性について CMA とともに比較・検討した。

方 法

1. 患者

当院にて、薬剤アレルギーが疑われ医師より CMA の依頼があった患者 6 名 (A～F) およびアレルギー症状のない健常ボランティアを対象とした。本研究を行うにあたり、当院臨床研究審査

委員会にて審査・承認を受けた (IRB 11-4-16)。また、患者へ本研究の目的および内容について文書による説明を行い、文書にて同意を得た。

2. 細胞

単核球は、被験者のヘパリン加末梢血から LymphoprepTM (AXS, Oslo, Norway) を用いた密度勾配遠心法により採取し、hanks' balanced salt solution (HBSS, Sigma-Aldrich, MO, USA) で洗浄後、培養液 [RPMI1640 (Invitrogen, CA, USA) に 10% ウマ血清 (Invitrogen) を加えたもの] にて細胞数が 1.25×10^6 cells/mL になるように浮遊した。また、顆粒球はアレルギー症状のない血液 (ヘパリン添加) より密度勾配遠心分離法にて分離し、HBSS で洗浄後、 1×10^7 cells/mL に調整した。ヒト T 細胞系樹立細胞株 Jurkat 細胞 (American Type Culture Collection, VA, USA) は、経代用培養液 [DMEM (Sigma-Aldrich) に 10% FBS (JRH Biosciences, KS, USA) と 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) を添加したもの] にて維持し、週 2 回培養液の交換を行った。Jurkat 細胞は培養液 (DMEM) 5 mL に懸濁し、CO₂ インキュベータで 37℃, 1 時間培養した後、 1×10^6 cells/mL の濃度に調整、走化性細胞として用いた。

3. 抗原調製

薬剤抗原液の作製で用いる被験者血清は、被験者の血液に血清分離剤を加え室温にて静置後、2,000 rpm で 30 分間の遠心分離にて分離した。また、薬剤の抗原濃度は原則として C_{max} の 1/2 を用い、被験者の血清添加液と血清非添加液を作製した。この時、被疑薬剤溶解液を HBSS にて希釈した薬剤溶液 50 µL に、患者血清または培養液 50 µL を加えた。薬剤抗原液の対照液では、薬剤溶液の代わりに HBSS 50 µL を用いた。また、positive control としてはマイトゲンである phytohemagglutinin (PHA, Wako Pure Chemical Industries, Inc, Osaka, Japan) を 1 µg/mL の濃度で用いた。

4. Chemotaxis cell migration assay

単核球の浮遊液 400 μL と抗原液 100 μL を 24-well plate にて混合し、37°C、5% CO_2 インキュベータで 72 時間培養し、上清を分離後、遊走試験まで -20°C で保存した。遊走試験は、顆粒球を反応上清液 250 μL にて懸濁し、96-well chemotaxis chamber AC96 (Neuro Probe, MD, USA) の上層に 1 検体につき 4 well ずつ分注した。この chemotaxis chamber は、37°C、5% CO_2 インキュベータで 1.5 時間培養後、メンブランフィルターを取り外し HBSS にて洗浄した。メンブランフィルターは、Diff-Quick (Sysmex, Hyogo, Japan) にて固定・染色し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan) にて吸光度 (490 nm) を測定した。得られた吸光度 (測定値) から、各試験薬剤での遊走指数 (migration index: MI) は以下のように求めた。MI = (薬剤添加群の単核球反応上清液における白血球の吸光度 / 薬剤無添加群の単核球反応上清液における白血球の吸光度) $\times$ 100 判定は、MI 値 > 150 あるいは MI < 60 を陽性とした。

5. Real-time monitoring of cell migration

細胞の血清に対する走化性は EZ-TAXIScan™ を用いて観察し、比較的移動距離の大きかった細胞を無作為に選択し、個々の細胞の移動距離を画像処理ソフトウェア ImageJ (Wayne Rashband (NIH), MA, USA) にて解析した。走化性細胞は、EZ-TAXIScan™ のホルダー下部ウェルに 5 μL /ウェルずつ注入し観察テラス端まで吸引法にて寄せた。次いで、血清を上部ウェルにマイクロシリッジを用いて 1.5 μL /ウェルずつ注入し、観察テラスに濃度勾配を作製し、観察テラス上に存在する走化性細胞の画像を経時的に記録した。なお、この時テラスの深さは 8 μm とした。

6. 統計解析

数値データは、一元配置分散分析後にボンフェローニ多重比較検定法により解析を行い、有意水準が 5% 未満の場合を有意差ありと判断した。統計解析は GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc, CA, USA) を用いて行った。

結 果

患者 A は薬剤性の好酸球増多および発疹が疑われた症例であり、被疑薬剤とされたセフェピム塩酸塩水和物およびランソプラゾール中止後、好酸球数は減少し過敏症状が改善した。また、抗ヒスタミン薬内服により発疹は軽快した。患者 B は薬剤性の好酸球増多が疑われた症例であり、被疑薬剤であるスルピリドおよびラベプラゾール Na 中止 3 日後に好酸球数のピークをむかえ、徐々に減少し過敏症状が改善した。患者 C は薬剤性の汎血球減少が疑われた症例であり、被疑薬とされたナファモスタットメシル酸塩およびニフェジピンを中止後も汎血球数は改善しなかった。患者 D は、薬剤性の腎障害が疑われた症例であり、フェノフィブラート中止後、血清クレアチニン (serum creatinine: Scr) および血中尿素窒素 (blood urea nitrogen: BUN) は改善した。患者 E は、薬剤性の肝障害が疑われた症例であり、タゾバクタム、ピペラシリン水和物およびアセトアミノフェン中止後、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase: AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase: ALT) などの肝機能検査値の改善がみられた。患者 F は、トフスロキサシントシル酸塩水和物による腎障害が疑われた症例であり、患者 D 同様、薬剤中止後に Scr および BUN が改善した (表 1)。

薬剤抗原液として血清添加液を用いた CMA の結果、患者 A においてランソプラゾールでは PHA と同程度の陽性、セフェピム塩酸塩水和物では陰性だった。陽性群の MI 値は対照群 (negative control) に対し有意差を示した ($P < 0.05$)。一方、患者 B~F においては、いずれの被疑薬でも陰性となった (図 1)。なお、PHA による CMA の反応性は良好であった。本研究において、アレルギーが疑われた患者における CMA の陽性率は 16.7% (1/6) であった。

EZ-TAXIScan™ を用いて被験者血清に対する Jurkat 細胞の細胞動態をリアルタイム画像解析したときの観察開始直後と 100 分後の画像をそれぞれ図 2 に示す。EZ-TAXIScan™ では、患者 A の血清は複数の細胞を上部テラス付近まで引き寄せ

表1 患者背景

	年齢	性別	症状	対応・経過	アレルギー 既往歴
患者 A	68 歳	男性	好酸球増多	中止により軽快	無
患者 B	64 歳	男性	好酸球増多	中止により軽快	無
患者 C	84 歳	男性	汎血球減少	中止後も改善なし	無
患者 D	63 歳	男性	腎障害	中止により軽快	無
患者 E	61 歳	男性	肝障害	中止により軽快	無
患者 F	17 歳	女性	腎障害	中止により軽快	無

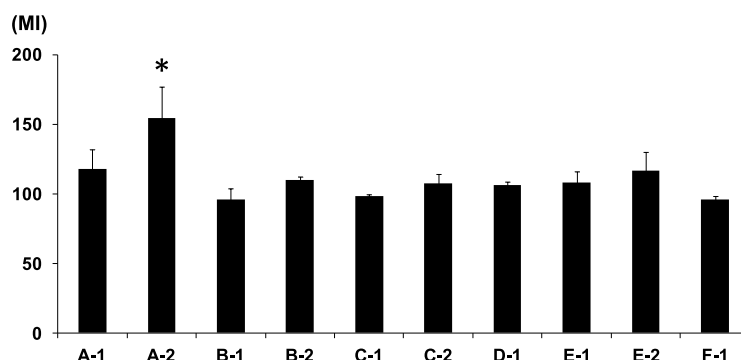


図1 アレルギー疑い患者 (A, B, C, D, E, F) の CMA 判定結果データは平均 ± 標準誤差 (n = 4). MI: Migration Index. A-1: セフェピム塩酸塩水和物, A-2: ランソプラゾール, B-1: スルピリド, B-2: ラベプラゾール Na, C-1: ナファモスタットメシル酸塩, C-2: ニフェジピン, D-1: フェノフィブラート, E-1: タゾバクタム, ピペラシリン水和物, E-2: アセトアミノフェン, F-1: トフスロキサシントシル酸塩水和物. * $P < 0.05$.

た。また、患者 B の血清はテラス中央付近まで細胞を遊走したものの、患者 A で認められたほど強力な引寄せ効果は示さなかった。一方、患者 C～F の血清は健常ボランティアの血清同様、細胞をほとんど遊走させなかった。比較的移動距離の大きかった細胞を無作為に選択し、個々の細胞の移動距離を ImageJ により数値化し、それぞれの患者と健常ボランティアについて解析した結果を図 3 に示す。患者 A および患者 B の血清による細胞の移動距離は、ほとんど細胞が動かなかった患者 C～F や健常ボランティアとの間に統計的に有意な差が認められた。また、患者 A と患者 B との間にも有意な差が認められた。一方、患者 C～F では健常ボランティアとの間に統計的に有意な細胞動態は認められなかった。患者血清を用いた EZ-TAXIScan™ によるアレルギー試験の陽性率は 33.3% (2/6) であった。

考 察

今回の 7 症例の検討では、加療中に薬剤アレルギー様症状を発現した患者において、CMA に先立ち、患者血清に対する細胞の移動度を解析することは、薬剤アレルギーの可否の判断に有用である可能性が示唆された。

通常、薬剤の多くは低分子化合物であり抗原にはなり得ない。よって、薬剤アレルギーが生じる際、低分子の薬剤であれば薬剤自身あるいはその活性代謝物が何らかの高分子蛋白と結合することで抗原性を獲得しているものと考えられる。¹⁷⁾ *In vitro* 試験にてこのような原理を再現させる際、感作 T 細胞へ薬剤の単独刺激のみでアレルギー反応が誘発されるとは考えにくい。CMA では、薬剤刺激を行う際に薬剤と患者血清を混合することで高分子とし、抗原性を獲得させることとした。

白血球遊走因子 (LMAF) はアレルギー反応の

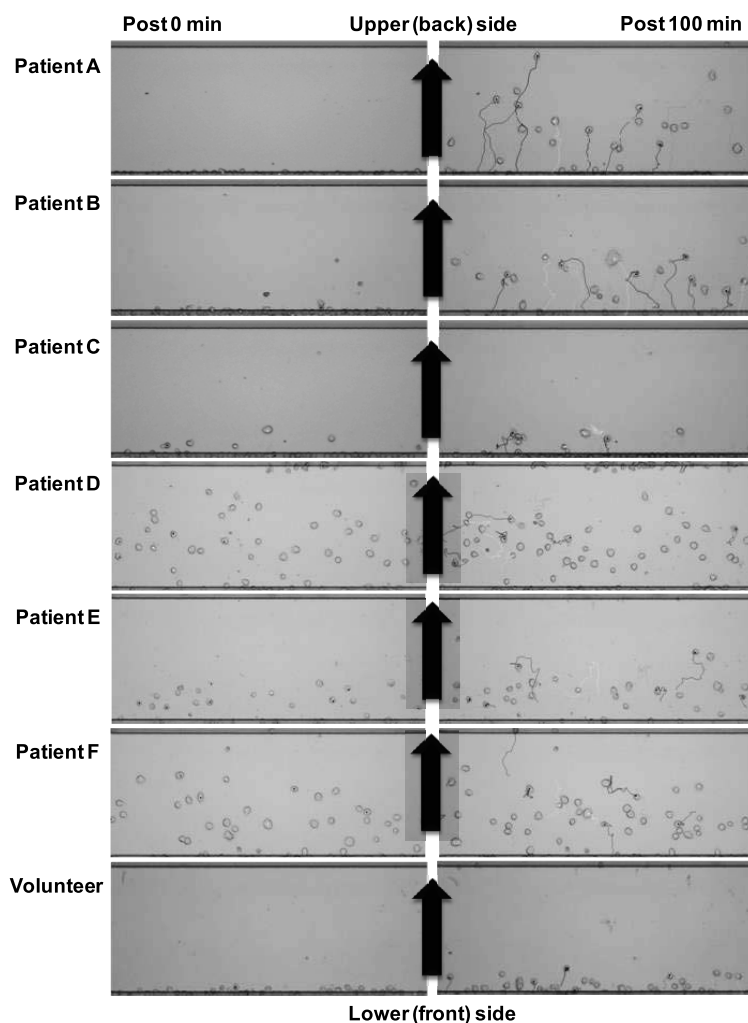


図2 アレルギー疑い患者 (A, B, C, D, E, F) と健常ボランティア (Volunteer) の血清による細胞動態試験の結果

EZ-TAXIScan™ を用いて被験者血清に対する Jurkat 細胞の細胞動態をリアルタイム画像解析したときの観察開始直後と 100 分後の画像。

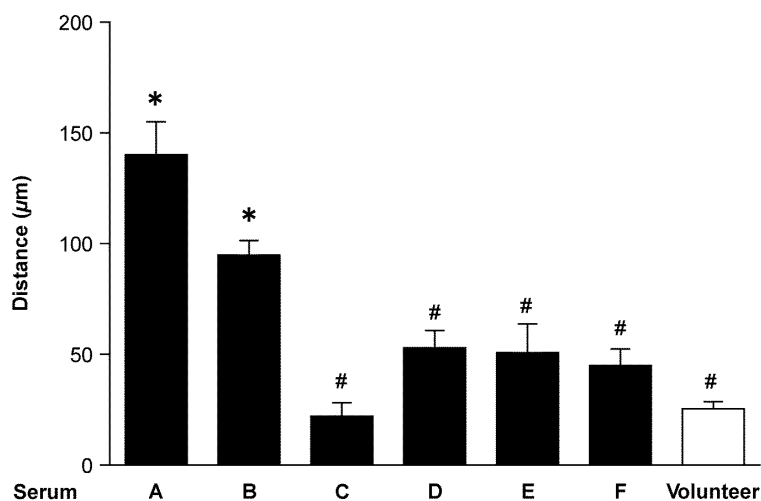


図3 アレルギー疑い患者 (A, B, C, D, E, F) と健常ボランティア (Volunteer) の血清による細胞動態解析の結果

個々の細胞の移動距離を ImageJ により数値化. * $P < 0.05$, ほかの全ての患者に対して有意差あり. # $P < 0.05$, 患者 A と患者 B に対して有意差あり.

初期に産生され白血球の活性化を促し、白血球遊走阻止因子（LMIF）はアレルギー反応の後期に産生され白血球の炎症巣への集積化を促していると考えられている。^{18, 19)} CMAの結果より、患者Aではアレルギー反応の初期に産生されたLMAFが白血球の活性化を促したことにより過敏症状が起きたと推測される。一方、患者Bに生じた好酸球増多や患者Cに生じた汎血球減少は薬剤アレルギー以外に原因があった可能性が推測される。あるいは、薬物代謝で生成される活性代謝物がアレルギーの原因となっていた場合は、その代謝物であらかじめ抗原刺激をしなければ陽性とはならない可能性が考えられる。²⁰⁻²²⁾ 再生不良性貧血などの疾患として汎血球減少を生じる場合もあり、症状があっても原因が特定されることなく、薬とアレルギー様反応の関与が結びつかないケースもしばしばある。²³⁾ また、代謝の特異体質により肝障害リスクが上昇するという報告や通風治療薬のアロプリノールや抗てんかん薬のカルバマゼピンと特定のヒト組織適合性抗原（HLA）遺伝子型の危険因子としての関与が報告されているように、徐々に明らかにされつつある遺伝子の問題も除外することはできない。²⁴⁻²⁶⁾

EZ-TAXIScanTMを用いた試験により、患者A同様、CMA陰性であった患者Bからもアレルギー反応が生じている可能性が示唆された。これより、今回のCMAで試験を行わなかった薬剤の中にアレルギー起因薬が含まれていた可能性も考えられる。

DLSTもしくはCMAの結果が出るまでは有害事象の原因は不明のまま治療が行われていくのが現状である。今回、我々はEZ-TAXIScanTMを利用することで、薬剤アレルギーが疑われる患者において、発現した有害症状が薬剤性か非薬剤性か迅速に鑑別できる可能性を見いだした。CMAに先立ち、血清に対する細胞の移動度を解析にて4例（患者C～F）を除外することにより、CMAの陽性率は16.7%（1/6）から50%（1/2）へ上昇する。DLSTやCMAのような薬剤誘発性アレルギーの原因薬剤を同定する試験を実施する前に患者血清を用いた走化性試験を行い、明らかに遊走しないものを除外することで、原因薬剤同定試験のなかでも比較的高い陽性率を示すCMAの有用性が今

後さらに向上していくことが期待できる。

また、*in vitro*の試験においてステロイドや免疫抑制剤の影響はしばしば問題となる。kanoらはDLSTにおいて、プレドニン換算で0.8-1.0 mg/kg/dailyの投与でも影響を与えないことを報告している。⁵⁾ 本試験ではステロイドや免疫抑制剤を併用している患者は含んでいない。今後、本試験におけるステロイド等の免疫抑制作用を有する薬剤の影響も検討課題と考える。

本検討は、細胞の走化性を視覚的に測定することで薬剤アレルギーの迅速な検出の可能性を示唆するものである。今後、症例数を増やしCMAの事前試験としての有用性について検証していく必要がある。

謝 辞

本検討の遂行にあたり献身的な協力を惜しまなかった福岡大学病院臨床検査部の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Bastuji-Garin S, Rzany B, Stern RS, Shear NH, Naldi L, Roujeau JC, Clinical classification of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, and erythema multiforme, *Arch Dermatol*, 1993, **129**, 92-96.
- 2) Roujeau JC, Kelly JP, Naldi L, Rzany B, Stern RS, Anderson T, Auquier A, Bastuji-Garin S, Correia O, Locati F, Mockenhaupt M, Paoletti C, Shapiro S, Shear N, Schöpf E, Kaufman DW, Medication use and the risk of Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis, *N Engl J Med*, 1995, **333**, 1600-1607.
- 3) Roujeau JC, Stern RS, Severe adverse cutaneous reactions to drugs, *N Engl J Med*, 1994, **331**, 1272-1285.
- 4) Mowad CM, Patch testing: pitfalls and performance, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006, **6**, 340-344.

- 5) Kano Y, Hirahara K, Mitsuyama Y, Takahashi R, Shiohara T, Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity: dependence on its timing and the type of drug eruption, *Allergy*, 2007, **62**, 1439-1444.
- 6) Pichler WJ, Tilch J, The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity, *Allergy*, 2004, **59**, 809-820.
- 7) Saito M, Yagi M, Uno K, Takanaka K, Comparative study of the usefulness of the drug-induced lymphocyte stimulation test and the leukocyte migration test in drug allergies, *Biol Pharm Bull*, 2008, **31**, 299-304.
- 8) Boyden S, The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes, *J Exp Med*, 1962, **115**, 453-466.
- 9) Falk W, Goodwin RH Jr., Leonard EJ, A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration, *J Immunol Methods*, 1980, **33**, 239-247.
- 10) Harvath L, Falk W, Leonard EJ, Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly, *J Immunol Methods*, 1980, **37**, 39-45.
- 11) Schnyder B, Pichler WJ, Mechanisms of drug-induced allergy, *Mayo Clin Proc*, 2009, **84**, 268-272.
- 12) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN, Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis, *Nature*, 2009, **458**, 524-528.
- 13) Ito W, Chiba T, Kanehiro A, Kato H, Yamaguchi K, Ueki S, Kayaba H, Chihara J, Hepatocyte growth factor attenuates eotaxin and PGD₂-induced chemotaxis of human eosinophils, *Allergy*, 2007, **62**, 415-422.
- 14) Kanegasaki S, Nomura Y, Nitta N, Akiyama S, Tamatani T, Goshoh Y, Yoshida T, Sato T, Kikuchi Y, A novel optical assay system for the quantitative measurement of chemotaxis, *J Immunol Methods*, 2003, **282**, 1-11.
- 15) Nishikimi A, Fukuhara H, Su W, Hongu T, Takasuga S, Mihara H, Cao Q, Sanematsu F, Kanai M, Hasegawa H, Tanaka Y, Shibasaki M, Kanaho Y, Sasaki T, Frohman MA, Fukui Y, Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis, *Science*, 2009, **324**, 384-387.
- 16) Sawada J, Shimizu S, Tamatani T, Kanegasaki S, Saito H, Tanaka A, Kambe N, Nakahata T, Matsuda H, Stem cell factor has a suppressive activity to IgE-mediated chemotaxis of mast cells, *J Immunol*, 2005, **174**, 3626-3632.
- 17) Griem P, Wulferink M, Sachs B, Gonzalez JB, Gleichmann E, Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise?, *Immunol Today*, 1998, **19**, 133-141.
- 18) Uno K, Yamasaku F, Application of leucocyte migration tests to detection of allergenic drugs in patients with hypersensitivity to beta-lactam antibiotics, *J Antimicrob Chemother*, 1989, **24**, 241-250.
- 19) Uno K, Yamasaku F, Structural correlations with cross-reactivity of beta-lactam antibiotics in delayed type hypersensitivity. Cross-allergenicity in hypersensitivity to cepheims with a tetrazolyl group in the C-3 side chain, *J Antimicrob Chemother*, 1989, **24**, 251-264.
- 20) Knowles SR, Uetrecht J, Shear NH, Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes, *Lancet*, 2000, **356**, 1587-1591.
- 21) Naisbitt DJ, Gordon SF, Pirmohamed M, Burkhart C, Cribb AE, Pichler WJ, Park BK, Antigenicity and immunogenicity of sulphamethoxazole: demonstration of metabolism-dependent haptentation and T-cell proliferation in vivo, *Br J Pharmacol*, 2001, **133**, 295-305.
- 22) Park BK, Naisbitt DJ, Gordon SF, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Metabolic activation in drug allergies, *Toxicology*, 2001, **158**, 11-23.
- 23) Biswajit H, Pratim PP, Kumar ST, Shilpi S, Krishna GB, Aditi A, Aplastic anemia: a common hematological abnormality among peripheral pancytopenia, *N Am J Med Sci*, 2012, **4**, 384-388.
- 24) Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Lee SD, Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis, *Hepatology*, 2003, **37**, 924-930.
- 25) Yip VL, Marson AG, Jorgensen AL, Pirmohamed M, Alfirevic A, HLA genotype and carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions: a systematic review, *Clin Pharmacol Ther*, 2012, **92**, 757-765.
- 26) Yun J, Adam J, Yerly D, Pichler WJ, Human leukocyte antigens (HLA) associated drug hypersensitivity: consequences of drug binding to HLA, *Allergy*, 2012, **67**, 1338-1346.