

200200585A

厚生労働科学研究研究費補助金
効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

小児科診療における効果的薬剤使用のための遺伝子多型
スクリーニングシステムの構築に関する研究
(H14-(小児)-003)

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年4月

主任研究者：小崎健次郎

厚生労働科学研究費補助金
効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

小児科診療における効果的薬剤使用のための遺伝子多型スクリーニング
システムの構築に関する研究 (H14 - 小児 - 003)

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小崎 健次郎

平成 15 年 4 月

目 次

総括研究報告

小児科診療における効果的薬剤使用のための遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究 小崎健次郎... (1)

分担研究報告

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化 小崎健次郎..... 1

ワーファリン適正投与量と CYP2C9*3 遺伝子多型と相関についてのメタ解析 百々 秀心..... 3

CYP2C9 遺伝子第エクソン 4 遺伝子多型の検討 山岸 敬幸..... 7

ワーファリンの投与量と INR 値の相関についてのノモグラムの作成 菅谷 明則..... 9

バルプロ酸の投与量と血中濃度の相関についてのノモグラムの作成 高橋 孝雄... 1 2

チオリペンメチル転移酵素のハプロタイプ構造 熊谷 昌明... 1 4

エストロジェン α 受容体のハプロタイプ構造 長谷川奉延... 1 7

マイクロペニスにおけるアンドロゲン受容体および 5 α 還元酵素 2 型の遺伝子多型とエナルモン治療効果 緒方 勤... 1 9

ミトコンドリア DNA1555 変異のスクリーニングと薬剤感受性難聴の予防 奥山 虎之... 2 2

研究構成員名簿..... 2 5

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 小児疾患に関する臨床研究)
総括研究報告書

小児科診療における効果的薬剤使用のための遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究
(主任研究者) 小崎 健次郎 (慶應義塾大学 小児科専任講師)

研究要旨

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化

小崎健次郎

薬物代謝酵素の遺伝子検査を、臨床応用するためには、迅速・正確・低コストに、遺伝子検査を実施しうるシステムを構築する必要があるが、現在、使用されているRFLP法や直接シーケンシング法はこれらの要件を満たしていない。本研究では、遺伝子多型の効率的な解析法である熱変性高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)を用いて代表的な薬物代謝酵素であるCYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、の遺伝子多型をタイピングする方法を最適化した。

ワーファリン適正投与量とCYP2C9*3 遺伝子多型と相関についてのメタ解析 百々秀心

CYP2C9 遺伝子の*1*3 多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は*1*1 ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値であることが6論文報告されている。本研究ではこれらの報告のメタ解析を行った。両群における一日投与量の平均値の差は2.20mg (95%信頼限界 1.46~2.97)と推定された。ワーファリンの常用量が5から6mgであることを考慮すると、*1*3多型ヘテロ接合体患者に対しては、初期投与量を減量することが合理的であると考えられた。

CYP2C9 遺伝子第エクソン4遺伝子多型の検討 山岸敬幸

欧米の報告によればCYP2C9*1*3あるいは*1*2多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値である(百々分担研究参照)。日本人においてCYP2C9*2および*3頻度は欧米に比して低いにも拘わらず、ワーファリンの投与量-効果(INR)の関係には大きな個人差がある(菅谷分担研究参照)ことから、日本人に特有な多型が存在すると考えられる。最近、LeungらがCYP2C9遺伝子の第4エクソンにアジア人に特異的な3ヶ所のアミノ酸置換Ile181Leu、Gln192Pro、Leu208Valが存在することが示唆した。われわれはCYP2C9の相同遺伝子であるCYP2C8およびCYP2C19遺伝子との配列の比較により、①Gln192Pro、Leu208ValがCYP2C9座位の多型ではなく、LeungらがCYP2C8およびCYP2C19遺伝子を共増幅によって観察している可能性が高いこと、②527ATT>CTT(Ile181Leu)はCYP2C9の遺伝子多型であり日本人にも存在することを明らかにした。

ワーファリンの投与量とINR値の相関についてのノモグラムの作成 菅谷明則

本分担研究では、ワーファリン投与後のINR値を予測する統計モデル式を導くことを目的とした。初年度は、薬物代謝酵素多型に関するデータは未調査であるので、多型以外の共役変数のみを用いたモデル式を作成した。投与量と体重からINR値を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。今後、説明変数に遺伝子多型等を組み込み、モデルの予測性の向上を目指す。

バルプロ酸の投与量と血中濃度の相関についてのノモグラムの作成 高橋孝雄

本分担研究では、バルプロ酸の血中濃度を予測する統計モデル式を導くことを目的とした。初年度は、薬物代謝酵素多型に関するデータは未調査であるので、多型以外の共役変数のみを用いたモデル式を作成した。投与量と年齢からバルプロ酸の血中濃度を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。今後、説明変数に遺伝子多型等を組み込み、モデルの予測性の向上を目指す。

チオプリンメチル転移酵素のハプロタイプ構造 熊谷昌明

6メルカプトプリン(6MP)はチオグアニンヌクレオチド(TGN)に変換され抗腫瘍効果を発揮する。一部の6MPは、TGNに変換されず、チオプリンメチル転位酵素(以下 TPMT)によりメチル化を受け、不活化される。人口の一部は TPMT 活性の低い遺伝子多型を持っており、これらの多型を持つ患者においては、6MPの抗腫瘍効果は増大し、通常の投与量によっても強い骨髄毒性を来す。本研究では、日本人における TPMT 遺伝子の多型解析を通じて、日本人における TPMT 遺伝子座位におけるハプロタイプ構造を決定し、同遺伝子座位における連鎖不平衡について評価した。次年度以降、6MP投与後の強度の骨髄抑制が特定のハプロタイプと相関しているかどうか、検討する。

エストロゲン α 受容体のハプロタイプ構造 長谷川奉延

マイクロペニスとは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。マイクロペニスには男性ホルモンであるテストステロンエンタートの筋肉内注射が広く行われている。このテストステロンの効果を治療前に予測することは困難である。われわれは、内分泌ホルモンおよびその受容体の遺伝子多型をテストステロンへの治療反応性について包括的な連鎖解析を行っている。エストロゲン α 受容体は治療反応性を規定する候補遺伝子の一つである。本研究では、エストロゲン α 受容体の多型とテストステロンへの反応性について検討を行うために、日本人におけるエストロゲン α 受容体近傍の連鎖不平衡の評価とハプロタイプ構造を決定した。

マイクロペニスにおけるアンドロゲン受容体および5 α 還元酵素2型の遺伝子多型とエナルモン治療効果 緒方 勤

アンドロゲン受容体遺伝子のCAGリピート多型長がアンドロゲン受容体機能に逆比例することから、これらの遺伝子多型はマイクロペニスに対するテストステロン治療の効果を規定していると仮定した。エナルモン25mgあたりの陰莖長増加量(cm/doseとSDスコア/dose)とアンドロゲン受容体遺伝子のCAGリピート数多型との相関を解析したところ、有意の負の相関を示した。アンドロゲン受容体遺伝子CAGリピート多型は薬剤応答規定多型であると考えられる。これは、薬剤応答性を予測して各患者に適切な治療を行いうることを期待させるものである。

ミトコンドリアDNA1555変異のスクリーニングと薬剤感受性難聴の予防 奥山虎之

アミノグリコシド系抗生物質には、中耳に毒性を与え難聴を誘発するという副作用がある。この副作用が誘発される症例には家族集積性があり、その原因がミトコンドリアDNAの遺伝子変異と関連があることが示されている。小児の薬剤感受性難聴の予防に対するミトコンドリアDNA遺伝子変異スクリーニングの有用性について検討した。

A. 研究目的

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化 小崎健次郎

薬物代謝酵素の遺伝子検査を、臨床現場で利用するためには、迅速・正確・低コストに、遺伝子検査を実施しうるシステムを構築する必要がある。本研究では、遺伝子多型の効率的な解析法である、熱変成高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)を用いて代表的な薬物代謝酵素であるチトクロームCYP2D6、CYP2C9、CYP2C19の遺伝子多型をタイプピングする方法を開発した。ワーファリン適正投与量とCYP2C9*3遺伝子多型と相関についてのメタ解析 百々秀心

*1*3多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値であることが6論文報告されている。本研究の目的は、6論文のデータを統合したメタ解析を行い、平均値の差を推定し、治療ガイドライン策定の根拠を得ようとするものである。CYP2C9遺伝子第エクソン4遺伝子多型の検討 山岸敬幸

Leungらが米国血液学会誌に報告したCYP2C9の「遺伝子多型」と称している部位は、CYP2C8およびCYP2C19遺伝子を観察している可能性に注目した。CYP2C8、CYP2C19の第4エクソンの共増幅を排するPCRプライマーを設計した上で、日本人におけるCYP2C9の第4エクソンの多型分布を検討した。

ワーファリンの投与量とINR値の相関についてのノモグラムの作成 菅谷明則

血中濃度・薬効に対しては、投与量以外にも、年齢・体重などの共役変数が大きな影響を与える。統計モデリングの手法を用いると、これらの共役変数から、血中濃度・薬効を予測するモデル式を作成することができる。本研究では、ワーファリン投与後のINR値を予測する統計モデル式を導くことを目的とした。バルプロ酸の投与量と血中濃度の相関についてのノモグラムの作成 高橋孝雄

血中濃度・薬効に対しては、投与量以外にも、年齢・体重などの共役変数が大きな影響を与える。統計モデリングの手法を用いると、これらの共役変数から、血中濃度・薬効を予測するモデル式を作成することができる。本研究では、バルプロ酸投与後のINR値を予測する統計モデル式を導くことを目的とした。チオリンメチル転移酵素のハプロタイプ構造 熊谷昌明

日本人においてTPMTの活性を低化させる既知の多型は、*3Cであり、ヘテロ接合体頻度は1/50程度であることが知られている。6MPによる副反応の発生頻度は1/50より高いことから、日本人においては未発見の多型が副反応の発症に寄与していると推測される。本研究の目的は、日本人におけるTPMT遺伝子のハプロタイプ構造を決定することである。

エストロゲン α 受容体のハプロタイプ構造 長谷川奉延

エストロゲン α 受容体は矮小陰茎に対するテストステロン治療の応性を規定する候補遺伝子の一つである。本研究では、エストロゲン α 受容体の多型とテストステロンへの反応性について検討を行うために、日本人における、エストロゲン α 受容体近傍のSNPsの分布、連鎖不平衡の程度の評価、ハプロタイプ構造を試みた。

マイクロペニスにおけるアンドロゲン受容体および5 α 還元酵素2型の遺伝子多型とエナルモン治療効果 緒方勤

マイクロペニスに対するテストステロンエナンテートの筋肉内注射の治療反応性を規定する遺伝子の同定を目的とした。テストステロンの効果は、TEが5 α 還元酵素2型により変換されたジヒドロテストステロ

ンがアンドロゲン受容体に結合して発現することから、5 α 還元酵素2型遺伝子(SRD5A2)のV89L多型とアンドロゲン受容体遺伝子(AR)のCAGリピート多型長とテストステロンによる治療の効果の相関を検討した。

ミトコンドリアDNA1555変異のスクリーニングと薬剤感受性難聴の予防 奥山虎之

アミノグリコシド系抗生物質のなかで、ストレプトマイシンによる難聴がはじめて報告されたが、小児科領域で現在でも広く使われているゲンタマイシンにも同様の聴力毒性が指摘されている。本研究の目的は、薬剤感受性難聴の予防に対するミトコンドリア1555遺伝子の変異スクリーニングの有用性を検証し、その実施における問題点を指摘し、次年度以降の研究課題を明確にすることである。

B. 研究方法

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化 小崎健次郎

フランス国立保健衛生研究所薬理遺伝部門の研究グループによってRFLPなどの従来法を用いて薬物代謝酵素の遺伝子多型のジェノタイプピングが終了している検体を熱変成高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)により再解析し、DHPLC法分析条件を最適化した。DHPLC法はヘテロデュプレックス法の変法である。

ワーファリン適正投与量とCYP2C9*3遺伝子多型と相関についてのメタ解析 百々秀心

ワーファリンの遺伝子多型と臨床的エンドポイントの関連についての研究を網羅的に文献検索し、2000年から2002年で、欧米成人患者を対象とした研究6論文について検討した。固定効果モデル、混合効果モデルに基づき、2群における平均値の差について推定を行った。

CYP2C9遺伝子第エクソン4遺伝子多型の検討 山岸敬幸

CYP2C9、CYP2C8、CYP2C19の第4エクソン周辺のゲノム配列をNIHゲノムデータベースより入手し、整理した。Leungらが発表したPCRプライマー対の特異性に付いて検討した。各エクソンを特異的に増幅するPCRプライマー対を設計した。これらのプライマー対を用いて、日本人15名に付いて第4エクソンを増幅し、直接シーケンシング法により遺伝子配列を決定した。

ワーファリンの投与量とINR値の相関についてのノモグラムの作成 菅谷明則

小児循環器外来に受診し、ワーファリンの単剤投与をうけている人工弁弛緩術後患者のうち、内服量が3ヶ月以上不変である3から33歳の24名について、診療録から、INR値、投与量、体重を抽出した。非説明変数をINR、説明変数を投与量と体重とした多重回帰モデルを作成した。投与量および年齢を4節の3次スプライン関数で補間し、ノモグラムを作成した。

バルプロ酸の投与量と血中濃度の相関についてのノモグラムの作成 高橋孝雄

小児神経外来に受診し、バルプロ酸の単剤投与をうけているてんかん患者のうち、内服量が6ヶ月以上不変である者(8ヶ月から32歳)について、診療録から、血中濃度(トラフ)、投与量、年齢を抽出した。非説明変数を血中濃度、説明変数を投与量と年齢とした多重回帰モデルを作成した。投与量および年齢を3節の3次スプライン関数で補間し、ノモグラムを作成した。

チオリンメチル転移酵素のハプロタイプ構造 熊谷昌明

公開されている日本人のSNPsデータベースであるJSNPを利用して、TPMT遺伝子近傍の多型性の高いSNPsを選択し、SNPタイプピングを行った。得られたジェノタイプデータに対してhaplo.scoreプログ

ラムを利用してハプロタイプ解析を行った。推定されたハプロタイプデータに対して Gold プログラムを利用して TPMT 遺伝子近傍における連鎖不平衡を定量化した。

エストロジェン α 受容体のハプロタイプ構造 長谷川奉延

公開されている日本人の SNPs データベースである JSNP を利用して、エストロジェン α 受容体遺伝子近傍の多型性の高い SNPs を選択し、SNP タイピングを行った。得られたジェノタイプデータに対して haplo.score プログラムを利用してハプロタイプ解析を行った。推定されたハプロタイプデータに対して Gold プログラムを利用してエストロジェン α 受容体遺伝子近傍における連鎖不平衡を定量化した。ミクロペニスにおけるアンドロゲン受容体および5 α 還元酵素2型の遺伝子多型とエンアルモン治療効果 緒方勤

ミクロペニス日本人患者 58 例(年齢 0-14 才, 中央値 7 才)を対象とした。対照群として、親のインフォームドコンセントが得られた特発性低身長男児 50 人と成人男性 50 人を解析した。SRD5A2 の V89L 多型は、直接シークエンス法で、AR 遺伝子の CAG リピート数多型は、蛍光プライマーを使用したキャピラリー電気泳動法によりタイピングした。エンアルモン 25mg あたりの陰茎長増加量(cm/dose と SD スコア/dose)を各患者において算出し、陰茎長増加量と SRD5A2 遺伝子の V89L 多型および AR 遺伝子の CAG リピート数多型との相関を統計解析した。

ミトコンドリア DNA1555 変異のスクリーニングと薬剤感受性難聴の予防 奥山虎之

① ミトコンドリア 1555 変異と家族性難聴について文献的考案を行い、その原因や予防法などに関する研究の現状を把握した。② ミトコンドリア 1555 遺伝子変異のスクリーニングの臨床に即した技術的問題について検討した。

C. 研究結果

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化 小崎健次郎

CYP2D6、CYP2C19、CYP2C9 遺伝子について、フランス国立保健衛生研究所において RFLP 解析に用いられているプライマー対を用いて、DHPLC 解析条件の最適化を行った。上記の解析条件下で、変異アレルのヘテロ接合体が表中のカラム最適温度下で二峰性または三峰性の DHPLC クロマトグラムを示し、ホモデュプレックスとヘテロデュプレックスを分離することが可能であった。

ワーファリン適正投与量と CYP2C9*3 遺伝子多型と相関についてのメタ解析 百々秀心

混合効果モデル(DerSimonian-Laird 法)によれば、*1*1 ホモ接合体(野生)と *1*3 ヘテロ接合体におけるワーファリンの平均投与量の差の推定値は 2.20mg/日(95%信頼限界 1.46~2.96)であった。ペイズの原理にもとづく REML 法によれば、*1*1 ホモ接合体(野生)と *1*3 ヘテロ接合体におけるワーファリンの平均投与量の差の推定値は 2.20mg/日(95%信頼限界 1.49~2.90)であった。効果サイズが、標準偏差の大きさと相関していることから、公表バイアスは小さいと判断された。

CYP2C9 遺伝子第エクソン4 遺伝子多型の検討 山岸敬幸

Leung らが発表した 561CAG>CCG(Gln192Pro) および 608TTG>GTG(Leu208Val) は CYP2C9 座位の多型ではなく CYP2C8 および CYP2C19 遺伝子を観察していると考えられた。527ATT>CTT(Ile181Leu) は CYP2C9 の遺伝子多型であり、日本人 15 人の検討の結果、1 人がヘテロ接合体であった。ワーファリンの投与量と INR 値の相関についてのノモグラムの作成 菅谷明則

投与量と年齢からワーファリン服用後の INR 値を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。

バルプロ酸の投与量と血中濃度の相関についてのノモグラムの作成 高橋孝雄

投与量と年齢からバルプロ酸の血中濃度を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。

チオリンメチル転移酵素のハプロタイプ構造 熊谷昌明

日本人における TPMT 遺伝子のハプロタイプ構造を明らかにした。TPMT 遺伝子のほぼ全域にわたり強い連鎖不平衡が存在することを示した。

エストロジェン α 受容体のハプロタイプ構造 長谷川奉延

日本人におけるエストロジェン α 受容体のハプロタイプ構造を明らかにした。エストロジェン α 受容体のリガンド結合ドメインの近傍において強い連鎖不平衡が存在することを示した。

ミクロペニスにおけるアンドロゲン受容体および5 α 還元酵素2型の遺伝子多型とエンアルモン治療効果 緒方勤

陰茎増加量は、SRD5A2 遺伝子 V89L 多型とは相関しなかったが AR 遺伝子 CAG リピート数とは有意の負の相関を示した。また、エンアルモン 25mg あたりの陰茎長増加量は、患児の年齢や体表面積に変わりなくほぼ同等であったが、エンアルモン 25mg あたりの陰茎長増加量は、標準偏差の年齢差を反映して患児の年齢や体表面積と逆相関していた。

ミトコンドリア DNA1555 変異のスクリーニングと薬剤感受性難聴の予防 奥山虎之

① ミトコンドリア 1555 変異と家族性難聴について文献的考案を行い、その原因や予防法などに関する研究の現状を把握した。

② ミトコンドリア 1555 遺伝子変異のスクリーニングの臨床に即した技術的問題について検討した。

D. 考案

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化 小崎健次郎

従来法である、RFLP 法から DHPLC 法に検査方法を変更することにより、臨床サービスとして遺伝子多型検査を実施することが、容易になると期待できる。今後、分析コストや感度を踏まえたプライマーの選択やカラム最適温度の検討が必要と思われる。ワーファリン適正投与量と CYP2C9*3 遺伝子多型と相関についてのメタ解析 百々秀心

ワーファリンの常用量が 5 から 6mg であることを考慮すると、30% から 40% の減量である。*1*3 多型ヘテロ接合体患者に対しては、初期投与量を減量することが合理的であるというエビデンスが得られた。日本人における *1*3 ヘテロ接合体の頻度は 3 から 4% であることから、通常の初期投与量を使用すると、30 人に 1 人ほどの患者にとっては、過量となることが明らかになった。

CYP2C9 遺伝子第エクソン4 遺伝子多型の検討 山岸敬幸

日本人の数%の人口が、CYP2C9 の Ile181Leu 多型のヘテロ接合体であることが明らかになった。次年度以降の研究により、Ile181Leu 多型のヘテロ接合体と野生型ホモ接合体の患者におけるワーファリンの一日投与量に差があるかどうか検討する計画である。ワーファリンの投与量と INR 値の相関についてのノモグラムの作成 菅谷明則

多重回帰モデルに基づく計算式をそのまま、外来で使用することは煩雑であり、実用性を欠く。今回、作成したワーファリンの投与量と INR 値の相関についてのノモグラムは比較的簡便に使用可能と思われる。次年度は、以下の3点について、モデルの向上を図る計画である。①薬物代謝酵素多型に関するデータをモデルに組み込む、②血中濃度測定も加えた検

討を行う、③多施設からのデータを統合し、症例数を増やす。

バルプロ酸の投与量と血中濃度の相関についてのノモグラムの作成 高橋孝雄
グラム作成 菅谷明則

多重回帰モデルに基づく計算式をそのまま、外来で使用することは煩雑であり、実用性を欠く。今回、作成したバルプロ酸の投与量と血中濃度の相関についてのノモグラムは比較的簡便に使用可能と思われる。次年度は、以下の3点について、モデルの向上を図る計画である。①薬物代謝酵素多型に関するデータをモデルに組み込む、②血中濃度測定を複数回行い母集団薬物動態学的手法を用いる、③多施設からのデータを統合し、症例数を増やす。
チオリンメチル転移酵素のハプロタイプ構造 熊谷昌明

日本人におけるTPMT遺伝子のハプロタイプ構造を明らかにした。遺伝子全域について強い連鎖不平衡を認めた。6-メルカプトプリンにより強い骨髄抑制をきたした患者と、きたさなかった患者について、ハプロタイプの分布を比較することにより、骨髄抑制の発症と相関のあるハプロタイプを特定できると予測される。
エストロジェン α 受容体のハプロタイプ構造 長谷川奉延

日本人におけるエストロジェン α 受容体遺伝子のハプロタイプ構造を明らかにした。遺伝子全域について連鎖不平衡を認めた。連鎖不平衡はリガンド結合部位において特に大きかった。テストステロンにより治療効果の得られた矮小陰茎患者と、治療効果の得られなかった患者について、ハプロタイプの分布を比較することにより、テストステロンへの治療反応性と相関のあるハプロタイプを特定できると予測される。
マイクロペニスにおけるアンドロゲン受容体および5 α 還元酵素2型の遺伝子多型とエナルモン治療効果 緒方勤

SRD5A2 遺伝子 V89L 多型は薬剤応答規定多型ではないが、AR 遺伝子 CAGリピート多型は薬剤応答規定多型であると考えられる。これは、薬剤応答性を予測して各患者に適切な治療を行うことを期待させるものである。さらに、テストステロン治療は、25 mgの筋肉注射による効果が年齢や体表面積を問わず、ほぼ一定であることが判明し、遺伝子多型に基づく治療計画の策定が可能になると考えられる。

ミトコンドリアDNA1555変異のスクリーニングと薬剤感受性難聴の予防 奥山虎之

臨床応用のためには、微量の検体を用いて迅速に診断する技術の確立する必要がある。しかも、スクリーニングとして多数の症例に適応するためには、コストをできるだけ低くおさえることも重要である。典型的な手法であるPCR-RFLP法は、少量の検体で検査を行なえる方法であるが、診断に要する時間については更なる短縮が必要であろう。

E. 結論

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化 小崎健次郎

DHPLCを用いて3種類の薬剤代謝酵素CYP2D6、CYP2C19、CYP2C9、6種類の遺伝子多型を迅速にタイプング可能であることが示された。
ワーファリン適正投与量とCYP2C9*3遺伝子多型と相関についてのメタ解析 百々秀心

6論文のメタ解析によりCYP2C9遺伝子の*1*3多型ヘテロ接合体の成人患者群と*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量の平均値の差は2.2mg(95%信頼限界1.46~2.97)と推定された。
CYP2C9遺伝子第4エクソン4遺伝子多型の検討 山岸敬幸

CYP2C9遺伝子第4エクソンの遺伝子多型の検討においては、CYP2C8遺伝子およびCYP2C19遺伝子

の共増幅に十分に注意する必要がある。CYP2C9遺伝子第4エクソンを特異的に増幅するPCRプライマーを用いて、日本人において未報告であるアミノ酸置換Ile181Leuが存在することを示した。

ワーファリンの投与量とINR値の相関についてのノモグラムの作成 菅谷明則

投与量と年齢からワーファリン投与後のINR値を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。遺伝子多型を取り込むなどして予測性を改善することが今後の課題である。
バルプロ酸の投与量と血中濃度の相関についてのノモグラムの作成 高橋孝雄

投与量と年齢からバルプロ酸の血中濃度を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。遺伝子多型を取り込むなどして予測性を改善することが今後の課題である。
チオリンメチル転移酵素のハプロタイプ構造 熊谷昌明

日本人におけるTPMT遺伝子のハプロタイプ構造を明らかにした。遺伝子全域について強い連鎖不平衡を認めた。

エストロジェン α 受容体のハプロタイプ構造 長谷川奉延

日本人におけるエストロジェン α 受容体遺伝子のハプロタイプ構造を明らかにしたリガンド結合部位において強い連鎖不平衡を認めた。

マイクロペニスにおけるアンドロゲン受容体および5 α 還元酵素2型の遺伝子多型とエナルモン治療効果 緒方勤

エナルモン 25mgあたりの陰茎長増加量(cm/doseとSDスコア/dose)とアンドロゲン受容体遺伝子のCAGリピート数多型との相関を解析したところ、有意の負の相関を示した。アンドロゲン受容体遺伝子CAGリピート多型は薬剤応答規定多型であると考えられる。

ミトコンドリアDNA1555変異のスクリーニングと薬剤感受性難聴の予防 奥山虎之

小児科領域におけるアミノグリコシド系抗生物質の使用は比較的多く、特に新生児期の使用頻度が高い。薬剤使用前に遺伝子診断を行い、易罹患者の高い患者を同定できれば、難聴の発症を未然に防ぎうる。

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金

(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 小児疾患に関する臨床研究)

平成14年度分担研究報告書

小児科診療における効果的薬剤使用のための

遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究

(主任研究者)小崎 健次郎(慶應義塾大学医学部小児科 専任講師)

(分担研究課題) 熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化

(分担研究者) 小崎健次郎 (慶應義塾大学医学部小児科 専任講師)

研究要旨

薬物代謝酵素の遺伝子検査を、臨床応用するためには、迅速・正確・低コストに、遺伝子検査を実施しうるシステムを構築する必要があるが、現在、使用されているRFLP法や直接シーケンシング法はこれらの要件を満たしていない。本研究では、遺伝子多型の効率的な解析法である熱変性高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)を用いて代表的な薬物代謝酵素であるCYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、の遺伝子多型をタイピングする方法を最適化した。

研究協力者

前山克博 慶應義塾大学医学部
小児科研究員

Krishnamoorthy
フランス国立保健衛生研究所
薬理遺伝部門 主任研究員

谷川原祐介 慶應義塾大学医学部
薬剤部教授

B. 研究方法

フランス国立保健衛生研究所薬理遺伝部門の研究グループによって RFLP などの従来法を用いて薬物代謝酵素の遺伝子多型のジェノタイピングが終了している検体を熱変成高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)により再解析し、DHPLC法分析条件を最適化した。DHPLC法はヘテロデュプレックス法の変法である。ヘテロデュプレックスはPCR増幅産物を熱変性後、徐冷却により得られる変異部位においてミスマッチをふくむ分子であり、特定の条件下においてヘテロデュプレックスの存在を検出することが可能である。

DHPLC法においては疎水性の高い特殊なカラムと、疎水性の部分と陽性荷電した部分をもつトリエチルアンモニウム酢酸(TEAA)を使用する。このカラム表面とTEAAの疎水性部分が疎水結合を、TEAAの陽性荷電した部分と陰性荷電しているDNAがイオン結合する。疎水結合とイオン結合によりカラムDNA分子を吸着する。吸着力は溶媒中のアセトニトリル濃度とカラム温度に依存する。

ホモデュプレックスとヘテロデュプレックスのカラムに対する親和性にはわずかな差違があり、PCR産物が熱変性する前後の温度において溶媒中のアセトニトリルの濃度を漸増させると両者が分離される。両者によるピークが最も分離するカラム温度とアセトニトリル濃度勾配が至適な分析条件である。ホモ接合体のクロマトグラムは、どの温度においても単一のピークを示す。

A. 研究目的

薬剤に対する効果や副作用の発症には個人差があることが知られて、薬剤代謝酵素の遺伝子の一塩基多型(SNPs)が関与する場合がある。薬剤使用前にこれらの遺伝子多型の検査を実施できれば、副作用の予防や、最適投与量の予測に利用できると期待されている。

薬物代謝酵素の遺伝子検査を、臨床現場で利用するためには、迅速・正確・低コストに、遺伝子検査を実施しうるシステムを構築する必要がある。しかし、現在、使用されているRFLP法や直接シーケンシング法はこれらの要件を満たしていない。本研究では、遺伝子多型の効率的な解析法である、熱変性高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)を用いて代表的な薬物代謝酵素であるチトクロームCYP2D6、CYP2C9、CYP2C19の遺伝子多型をタイピングする方法を開発した。

(倫理面への配慮)

慶應義塾大学医学倫理委員会の承認を得て3省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行した。

C. 研究結果

CYP2D6, *CYP2C19*, *CYP2C9* 遺伝子について、フランス国立保健衛生研究所においてRFLP解析に用いられているプライマー対を用いて、DHPLC解析条件の最適化を行った。以下に、本研究により決定した至適分析条件を示す。

変異アレル	正プライマー	逆プライマー	DHPLC カラム最適温度
CYP2D6*3	gctggggcctga gactt	ggctgggtccca ggtcatac	63.4°C
CYP2D6*4	tgccgccttgcg caaccact	tcgccctgcagag actcctc	64.9°C
CYP2D6*10	gtgctgagagtgt cctgcc	caccaccatcc atgtttgc	63.6°C
CYP2C19*2	aattacaaccag agcttggc	tatcactttccata aaagcaag	52.6°C
CYP2C19*3	tattattatctgtt aactaatatga	acttcagggcttg gtcaata	66.4°C
CYP2C9*2	tacaaatacaat gaaaatatcatg	ctaacaaccaga ctcataatg	57.6°C

上記の解析条件下で、変異アレルのヘテロ接合体が表中のカラム最適温度下で二峰性または三峰性のDHPLCクロマトグラムを示し、ホモデュプレックスとヘテロデュプレックスを分離することが可能であった。

D. 考案

DHPLC法により、*CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9* を容易にジェノタイプング可能であることが示された。従来法である、RFLP法からDHPLC法に検査方法を変更することにより、臨床サービスとして遺伝子多型検査を実施することが、容易になると期待できる。

DHPLC分析はPCR産物や多型の相対的位置によって異なるクロマトグラムを示す。今回の検討では従来RFLPに用いられたプライマー対によってDHPLC

分析の最適化を行うことが可能であった。今後、分析コストや感度を踏まえたプライマーの選択やカラム最適温度の検討が必要と思われる。

E. 結論

DHPLCを用いて3種類の薬剤代謝酵素 *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, 6種類の遺伝子多型を迅速にタイピング可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し

G. 研究発表

論文発表

小崎健次郎. 遺伝学はゲノム情報でどう変わるか - ポストゲノム時代を展望する - 遺伝 別冊 15号 158-164 (2002)

その他

研究協力者 前山克博 博士のフランス国立保健衛生研究所での研究について長寿科学振興財団「外国への日本人研究者派遣」事業から助成を受けた。

厚生労働科学研究費補助金

(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 小児疾患に関する臨床研究)

平成14年度分担研究報告書

小児科診療における効果的薬剤使用のための

遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究

(主任研究者)小崎 健次郎(慶應義塾大学医学部小児科 専任講師)

(分担研究課題) ワーファリン適正投与量とCYP2C9*3 遺伝子多型と相関についてのメタ解析
(分担研究者) 百々秀心 (国立成育医療センター 循環器科医長)

研究要旨

CYP2C9 遺伝子の*1*3 多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は*1*1 ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値であることが6論文報告されている。本研究ではこれらの報告のメタ解析を行った。両群における一日投与量の平均値の差は 2.20mg (95%信頼限界 1.46~2.97)と推定された。ワーファリンの常用量が5から6mgであることを考慮すると、*1*3 多型ヘテロ接合体患者に対しては、初期投与量を減量することが合理的であると考えられた。

研究協力者

小崎健次郎 慶應義塾大学医学部小児科
専任講師
鮫島葉月 慶應義塾大学医学部小児科
臨床研究協力者

*3ホモ接合体のワーファリン必要投与量は*1ホモ接合体の患者(野生型)の10分の1程度であることが示されている。

*1*3多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値であることが6論文報告されている。各研究において、対照患者の数が十分に多くないために、平均値の差の推定区間は大きく、ヘテロ群における一日投与量の予定投与量を設定する根拠となる十分なデータは得られていない。本研究の目的は、6論文のデータを統合したメタ解析を行い、平均値の差を推定し、治療ガイドライン策定の根拠を得ようとするものである。

A. 研究目的

ワーファリンは抗凝固剤として、高頻度に使われているが、治療域が狭い薬剤であり、過剰量の投与により出血合併症をきたし過少量の投与では十分な効果が得られない。そのうえ、投与量と治療効果の関係に大きな個人差が存在し、治療開始にあたって至適投与量を予測することが困難である。

ワーファリンの代謝に関わっているおもな酵素はCYP2C9 で、比較的頻度の高い遺伝子多型CYP2C9*2とCYP2C9*3が存在する。両者はワーファリン代謝能を低下させる。これらの遺伝子多型を持つ患者においては、ワーファリンの必要維持量が低値となることが複数の研究グループにより報告されている。

このうち日本人において比較的頻度が高い変異遺伝子は*3多型である。*3はアデニンからチトシンへの一塩基置換(1075A>C)によるアミノ酸置換(Ile 359Leu)である。この置換は酵素が基質薬物の形状を認識する部位に近いアミノ酸におきるSNPであり、

B. 研究方法

ワーファリンの遺伝子多型と臨床的エンドポイントの関連についての研究を網羅的に文献検索し、*1*3 多型と平均投与量、標準偏差に関するデータを抽出し、メタ解析の方法により、統合した。以下の6論文について検討した。各論文の要旨を補遺欄に要約した。出版年は2000年から2002年で、欧米成人患者を対象とした研究である。

以下に検討対象とした論文とその要約を示す。

① Taube, J., D. Halsall, et al. (2000).
Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of

over-anticoagulation in patients on long-term treatment.” Blood 96(5): 1816-9.

Taube らは INR 測定のために検査センターに送付された匿名化された検体のうち標的 INR が 2.5 である患者 561 人について遺伝子型を決定し、平均ワーファリン投与量と遺伝子型が関連することを明らかにした

遺伝子型	症例数	平均投与量 (mg/日)	標準偏差 (mg/日)
*1*1	392 名	5.01	2.43
*1*2	107 名	4.31	1.94
*2*2	3 名	3.04	1.29
*1*3	53 名	3.97	1.79
*3*3	0 名	—	—
*2*3	6 名	4.09	2.09

② Loebstein, R., H. Yonath, et al. (2001).
Interindividual variability in sensitivity to warfarin--Nature or nurture?
Clin Pharmacol Ther 70(2): 159-64.

Lobstein らは 156 名の患者のデータをもとに、体表面積で補正した一日投与量を非説明変数、年齢、2C9 遺伝子型(*1、*2、*3 の3群)、血中ワーファリン濃度、血中ビタミン K 濃度、併用薬を説明変数として、多重回帰分析を用いた統計モデルを作成した。

③ Higashi, M. K., D. L. Veenstra, et al. (2002).
Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy: Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications.
JAMA 287(13): 1690-8.

Higashi らは標的 INR が 2.0-3.0 である患者 185 人(弁置換術後の者は標的 INR2.5-3.5)について遺伝子型を決定し、まず、これまでの研究と同様、遺伝子型と平均一日投与量の関係を検討している。

遺伝子型	症例数	平均 投与量 (mg/日)	標準偏差 (mg/日)
*1*1	127 名	5.63	2.56
*1*2	28 名	4.88	2.57
*2*2	4 名	4.07	1.48
*1*3	18 名	3.32	0.94
*3*3	5 名	1.60	0.81
*2*3	3 名	2.34	0.35

④ Margaglione, M., D. Colaizzo, et al. (2000).
Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin
Thromb Haemost 84(5): 775-8.

Margaglione らは標的 INR が 2.5 である患者 180 人(年齢中央値 40.5 歳、範囲 15-84 歳)について遺伝子型を決定し、平均ワーファリン投与量と遺伝子型が関連することを明らかにした(Kruskal-Wallis, p=0.001)

遺伝子型	症例数	平均投与量 (mg/日)	標準偏差 (mg/日)
*1*1	88 名	6.7	2.9
*1*2	62 名	5.2	2.2
*1*3	28 名	3.8	2.0
*2*3	2 名	1.8	0.1
*3*3	2 名	—	—

⑤ Tabrizi, A. R., B. A. Zehnbauer, et al. (2002).
The frequency and effects of cytochrome P450 (CYP) 2C9 polymorphisms in patients receiving warfarin
J Am Coll Surg 194(3): 267-73.

Tabrizi らは論文で上記のような表を提示していないが、各群の標準誤差を記載している。

*1*1 40.1 +/- 1.7 mg/wk N=107

*1*3 27.9 +/- 2.4 mg/wk N= 21

⑥ Scordo, M. G., V. Pengo, et al. (2002).

Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance
Clin Pharmacol Ther 72(6): 702-10.

国立公衆衛生院の丹後俊郎博士著「メタアナリシス」(朝倉書店)に収載されているS言語によるプログラムをR言語環境下で、実行し、メタ解析を行った。固定効果モデル、混合効果モデル(DerSimonian-Laird法およびベイズ推定法)により、2群における平均値の差について推定を行った。

以上の6研究を集計し、以下の結果を得た。

*1*1群 876名、*1*3群 156名

	標的 INR	*1*		*1*3			
		N	投与量 mg/日	SD	N	投与量 mg/日	SD
Taube		392	5.0 1	2.43	53	3.97	1.79
Margaglione	2.5	88	6.7	2.9	28	3.8	2
Higashi	2.0 -3. 0	127	5.6 3	2.56	18	3.32	0.94
Loebstein		108	6.5	3.2	20	3.3	2
Scordo	2.0 -3. 0	54	5.5 9	2.21	16	2.94	1.02
Tabrizi	1.8 -3. 5	107	5.7 3	2.51	21	3.99	1.57

C. 研究結果

同質性の検討

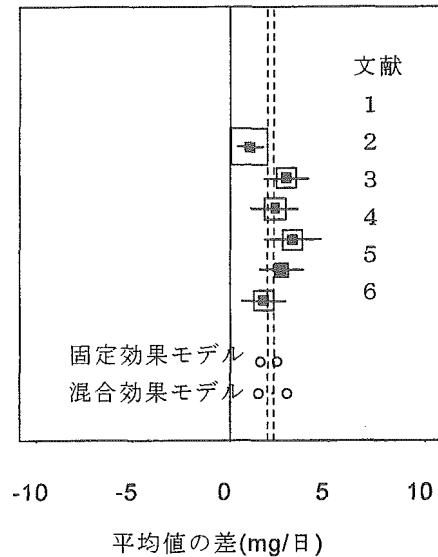
上記6研究、*1*1群(野生)876名、*1*3群156名を解析した。固定効果モデルによれば、*1*1ホモ接合体(野生)と*1*3ヘテロ接合体におけるワーファリンの平均投与量の差の推定値は1.94mg/日(95%信頼限界1.52~2.36)であった。同質性の検定によれば、Cochran Q(ChiSq)値は14.34 自由度5で p値は0.0136であり、均質性は否定され、混合効果モデルの適用が望ましいと判定された。

混合効果モデル(DerSimonian-Laird法)によれば、*1*1ホモ接合体(野生)と*1*3ヘテロ接合体におけるワーファリンの平均投与量の差の推定値は2.20mg/日(95%信頼限界1.46~2.96)であった。ベイズの原理にもとづくREML法によれば、*1*1ホモ接合体(野生)と*1*3ヘテロ接合体におけるワーファリンの平均投与量の差の推定値は2.20mg/日(95%信頼限界1.49~2.90)であった。

右にメタアナリシスに含めた、各研究における平均値の差の推定範囲(95%信頼限界)を示した。白い長方形は、それぞれの研究に含まれる患者の総数の相対的な割合を示し、黒い長方形はxxを示す。水平線はそれぞれの研究における平均値の差の推定値を示す。白い○は6つの研究成績のメタアナリ

シスを行って得られた平均値の差の推定範囲(95%信頼限界)を示す。固定効果モデルにより得られた範囲(上)および混合効果モデルにより得られた範囲(下)を示す。

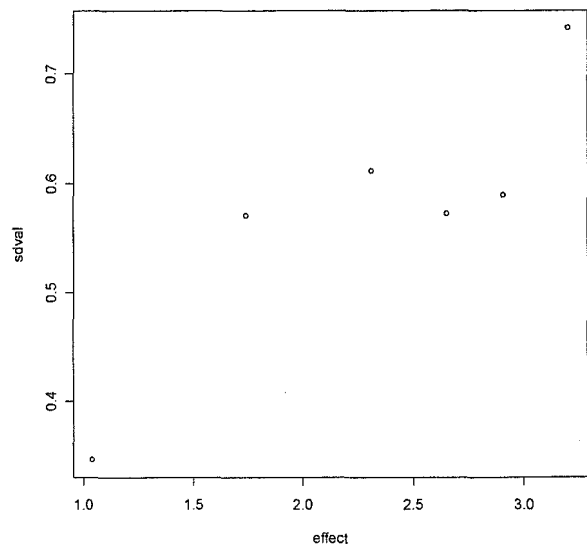
図2 *1*1 と*1*3 群におけるワーファリン一日投与量の平均値の差の推定値とその信頼限界



公表バイアスの有無を評価するために漏斗図(funnel plot、図2)を作成した。効果サイズが、標準偏差の大きさと相関していることから、公表バイアスは小さいと判断された。

図2 メタ解析結果の漏斗図

横軸:効果サイズ、
縦軸:各研究における標準偏差の大きさ



D. 考案

*1*3多型ヘテロ接合体の成人患者群と*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量の平均値の差は2.20mg (95%信頼限界1.46~2.97 mg)と推定された。ワーファリンの常用量が5から6mgであることを考慮すると、30%から40%の減量である。*1*3多型ヘテロ接合体患者に対しては、初期投与量を減量することが合理的であるというエビデンスが得られた。日本人における*1*3ヘテロ接合体の頻度は3から4%であることから、通常の初期投与量を使用すると、30人に1人ほどの患者にとっては、過量となることが明らかになった。

研究対象とした患者群における標的INR値に差があることから、必ずしも均質な集団を解析したとは言えない。ベイズ推定法であるREML法を用いても、2群の間に有意な差を認めたことは、*1*3ヘテロ接合体におけるワーファリン必要量が*1*1に比して30から50%少ないことを示唆した。

小児における必要ワーファリン量と*3多型との関連についての研究は未だに行われておらず、次年度以降の検討課題である。小児のためのワーファリン治療ガイドラインの策定の際に遺伝子多型を考慮すべきであることが強く示唆された。

E. 結論

6論文のメタ解析によりCYP2C9遺伝子の*1*3多型ヘテロ接合体の成人患者群と*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量の平均値の差は2.20mg (95%信頼限界1.46~2.97)と推定された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

参考文献

Cochran WG (1954) The combination of estimates from different experiments *Biometrics* 10:101-129.

Dickersin A, Berlin JA (1992) Meta-analysis: state of the science. *Epidemiol Rev* 14:154-176.

Greenland S (1987) Quantitative methods in the review of epidemiological literature. *Epidemiol Rev.* 9:1-30.

Gailbraith RF (1988) A note on graphical presentation of estimated Odds Ratios from several clinical trials. *Stat. Med.*7:889-894.

Cochran WG (1937) Problems arising in the analysis of a series of similar experiments *J. Roy. Stat. Soc.* 4(supp)102-118.

DerSimonian R Laird N (1986) Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clin. Trials* 7:177-188.

Duval S and Tweedie R (2000) A nonparametric Trim and Fill method of accounting for publication bias in meta-analysis. *J. Amer. Stat. Ass.* 95:449 p 89-98.

Duval S Tweedie R (2000) Trim and Fill: A simple funnel plot based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 56:455-463.

厚生労働科学研究費補助金

(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 小児疾患に関する臨床研究)

平成14年度分担研究報告書

小児科診療における効果的薬剤使用のための

遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究

(主任研究者)小崎 健次郎(慶應義塾大学医学部小児科 専任講師)

(分担研究課題) CYP2C9 遺伝子第4エクソン4遺伝子多型の検討

(分担研究者) 山岸敬幸(慶應義塾大学医学部小児科 専任講師)

研究要旨

欧米の報告によればCYP2C9*1*3あるいは*1*2多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値である(百々分担研究参照)。日本人においてCYP2C9*2および*3頻度は欧米に比して低いにも拘わらず、ワーファリンの投与量-効果(INR)の関係には大きな個人差がある(菅谷分担研究参照)ことから、日本人に特有な多型が存在すると考えられる。最近、LeungらがCYP2C9遺伝子の第4エクソンにアジア人に特異的な3ヶ所のアミノ酸置換Ile181Leu、Gln192Pro、Leu208Valが存在することが示唆した。われわれはCYP2C9の相同遺伝子であるCYP2C8およびCYP2C19遺伝子との配列の比較により、①Gln192Pro、Leu208ValがCYP2C9座位の多型ではなく、LeungらがCYP2C8およびCYP2C19遺伝子を共増幅によって観察している可能性が高いこと、②527ATT>CTT(Ile181Leu)はCYP2C9の遺伝子多型であり日本人にも存在することを明らかにした。

A. 研究目的

海外の報告によれば*1*3あるいは*1*2多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値である(百々分担研究参照)。アジア人において*2および*3頻度は欧米に比して低い。Leungらは、中国人検体の検討により、CYP2C9遺伝子の第4エクソンに527ATT>CTT(Ile181Leu)、561CAG>CCG(Gln192Pro)および608TTG>GTG(Leu208Val)の3ヶ所のアミノ酸置換が存在することを米国血液学会誌に報告した。この成績から、この3種類の多型のいずれかが、アジア人におけるCYP2C9活性の個人差に関連する可能性が指摘されていた。日本人においても、ワーファリンの投与量-効果(INR)の関係には個人差がある(菅谷分担研究参照)ことから、日本人におけるCYP2C9遺伝子第4エクソンの多型の意義を検討する必要がある。

ヒトゲノム計画の進展に伴い、CYP2C9遺伝子近傍のゲノム配列が公表され、CYP2C8、CYP2C19

各遺伝子のゲノム配列が、CYP2C9のゲノム配列と比べて相関性が高いことが明らかになった。

われわれはLeungの研究プロトコルを検討し、彼らがCYP2C9の「遺伝子多型」と称している部位は、CYP2C8およびCYP2C19遺伝子を観察している可能性に注目した。本研究ではCYP2C8、CYP2C19の第4エクソンの共増幅を排するPCRプライマーを設計した上で、CYP2C9の第4エクソンの日本人における多型分布を検討した。

B. 研究方法

- ① CYP2C9、CYP2C8、CYP2C19の第4エクソン周辺のゲノム配列をNIHゲノムデータベースより入手し、整列した。Leungらが発表したPCRプライマー対の特異性に付いて検討した。
- ② 各エクソンを特異的に増幅するPCRプライマー対を設計した。
- ③ これらのプライマー対を用いて、日本人15名に付いて第4エクソンを増幅し、直接シーケンシング法により遺伝子配列を決定した。

(倫理面への配慮)

慶應義塾大学医学倫理委員会の承認を得て研究を実施した。全ての検体を連結不能匿名化した後、ジェノタイプングとハプロタイプイング解析を行った。

C. 研究結果

Leungらが発表したPCRプライマー対によつては、CYP2C9, CYP2C8, CYP2C19を区別できないことが明らかになった。3遺伝子の遺伝子配列の差異を利用して、3者を区別可能なプライマー対を設計しえた。

561CAG>CCG(Gln192Pro)および608TTG>GTG(Leu208Val)はCYP2C9座位の多型ではなくCYP2C8およびCYP2C19遺伝子を観察していると考えられた。

527ATT>CTT(Ile181Leu)は CYP2C9 の遺伝子多型であり、日本人 15 人の検討の結果、1人がヘテロ接合体であった

D. 考案

本研究により日本人の数%の人口が、CYP2C9のIle181Leu多型のヘテロ接合体であることが明らかになった。次年度以降の研究により、Ile181Leu多型のヘテロ接合体と野生型ホモ接合体の患者におけるワーファリンの一日投与量に差があるかどうか検討する計画である。

また、CYP2C9、CYP2C19、CYP2C8 遺伝子の間に gene conversion が起こりうるかどうか、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

E. 結論

CYP2C9遺伝子第4エクソンの遺伝子多型の検討においては、CYP2C8遺伝子およびCYP2C19遺伝子の共増幅に十分に注意する必要がある。CYP2C9遺伝子第4エクソンを特異的に増幅するPCRプライマーを用いて、日本人において未報告であるアミノ酸置換Ile181Leuが存在することを示した。

厚生労働科学研究費補助金

(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 小児疾患に関する臨床研究)

平成14年度分担研究報告書

小児科診療における効果的薬剤使用のための

遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究

(主任研究者)小崎 健次郎(慶應義塾大学 小児科専任講師)

(分担研究課題) ワーファリンの投与量と INR 値の相関についてのノモグラムの作成
(分担研究者) 菅谷 明則 (東京都立清瀬小児病院 循環器科医長)

研究要旨

本分担研究では、ワーファリン投与後の INR 値を予測する統計モデル式を導くことを目的とした。初年度は、薬物代謝酵素多型に関するデータは未調査であるので、多型以外の共役変数のみを用いたモデル式を作成した。投与量と体重から INR 値を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。今回、作成したノモグラムは比較的簡便に使用可能と思われる。

研究協力者

小崎健次郎 慶應義塾大学小児科
専任講師

B. 研究方法

A. 研究目的

本研究班全体の主たる目的は、薬剤の投与量と血中濃度・薬効の関係に対して、薬物代謝酵素の遺伝子多型が与える影響を明らかにすることである。血中濃度・薬効に対しては、投与量以外にも、年齢・体重などの共役変数が大きな影響を与える。統計モデリングの手法を用いると、これらの共役変数から、血中濃度・薬効を予測するモデル式を作成することができる。本分担研究では、ワーファリン投与後のINR値を予測する統計モデル式を導くことを目的とした。初年度は、薬物代謝酵素多型に関するデータは未調査であるので、多型以外の共役変数のみを用いたモデル式を作成した。

研究の対象としてワーファリンを選択した理由は① 継続的内服が必須である、② INR/投与量の個人差が大きい(～10倍)、③ 致死性出血などの重大な副作用が発症する場合がある。

小児循環器外来に受診し、ワーファリンの単剤投与をうけている人工弁弛緩術後患者のうち、内服量が3ヶ月以上不変である3から33歳の24名について、診療録から、INR値、投与量、体重を抽出した。

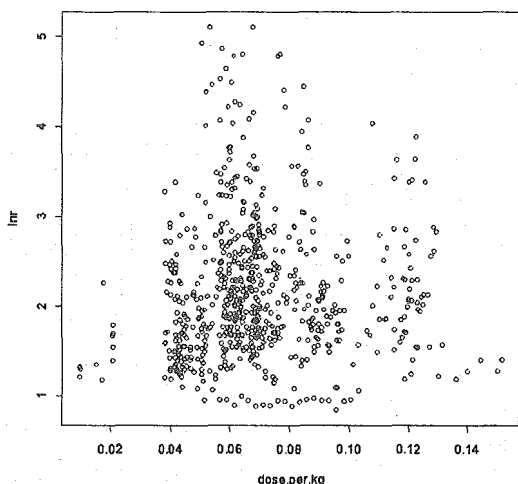
非説明変数をINR、説明変数を投与量と体重とした多重回帰モデルを作成した。投与量および年齢を4節の3次スプライン関数で補間した。統計解析には、S言語(R言語環境)を使用し、多重回帰分析およびノモグラムの作成には、バージニア大学Harrell教授が開発した、DesignおよびHmiscプログラム・ライブラリを使用した。

(倫理面への配慮)

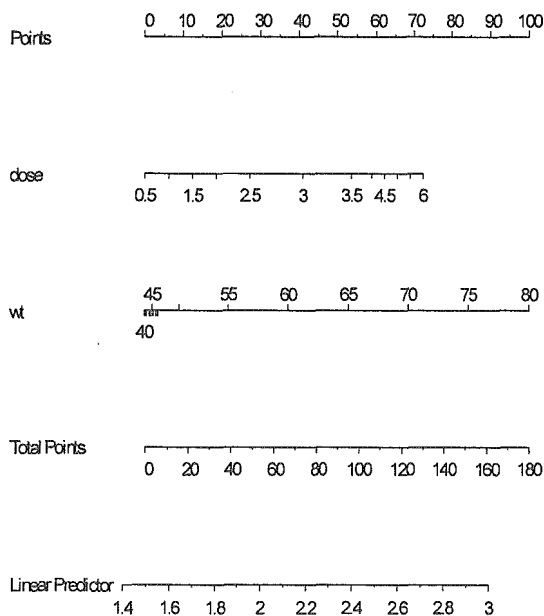
患者氏名等、個人を特定できる情報について匿名化したのち、統計解析を行った。なお、分担研究者の施設における診療録の回顧的検討であり、「疫学研究指針」に抵触しないと判断し研究を遂行した。

C. 研究結果

下にINR、年齢(age)、投与量(dose)について、
相関図を示す。年齢と投与量の間に比較的強い
相関を認めた。



Harrell モデリングライブラリを用いて多重回帰分
析を行い、以下のノモグラムを得た。



```
library(survival)
library(nlme)
library(genetics)
warfarinGroup<-read.csv("warfarinGroup22.csv")
attach(warfarinGroup)
names(warfarinGroup)
bod.date<-as.date(as.vector(bod))
clv.date<-as.date(as.vector(clv))
age<-(clv.date-bod.date)/365
dose.per.kg<-dose/wt
warfmod<-data.frame(warfarinGroup,dose.per.kg)
pairs(warfmod)
warfarin.age<-groupedData(inr ~ age | id,
data=warfmod)
warfarin.age
plot(warfarin.age)
plot(dose.per.kg,inr)
warfarin.dose.per.kg<-groupedData(inr ~
dose.per.kg | id, data=warfmod)
gsummary(warfarin.age)
coplot(inr~ age | id)
```

まず、投与量および体重に応じたスコアをノモグラムより読み取り、加え合わせて総スコアを求める。得られた総スコア値から予測INR値を読み取る。例えば、一日投与量が3mg 体重が55kgであれば、それぞれのスコア値は40点と20点である。両者の和(総スコア)は60点であり、対応するINRは2.1と判定される。

D. 考案

投与量と年齢からワーファリン服用後のINR値を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。多重回帰モデルに基づく計算式をそのまま、外来で使用することは煩雑であり、実用性を欠く。今回、作成したノモグラムは比較的簡便に使用可能と思われる。次年度は、以下の3点について、モデルの向上を図る計画である。①薬物代謝酵素多型に関するデータをモデルに組み込む、②血中濃度測定も加えた検討を行う、③多施設からのデータを統合し、症例数を増やす。

E. 結論

投与量と年齢からワーファリン投与後のINR値を予測する統計モデル式を作成し、ノモグラムの作成が可能であることを示した。次年度の研究により、ワーファリンの代謝に関わるCYP2C9遺伝子の多型がモデルの予測性を改善するかどうか検討する。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。