

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) 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
(分担研究者) 高橋孝雄 (慶應義塾大学 医学部小児科教授)

研究要旨

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。

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、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。

研究の対象としてバルプロ酸を選択した理由として、① 広い種類の痙攣性疾患に有効である(新生児痙攣を含む)、② 大量療法が行われる場合がある、③ 血中濃度/投与量の個人差が大きい(6-8倍)、④ 致死的肝障害等の重大な副作用が発症する可能性があるが、発症の予測が困難である、⑤新生児・乳児における使用量が未確立である、が挙げられる。

B. 研究方法

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

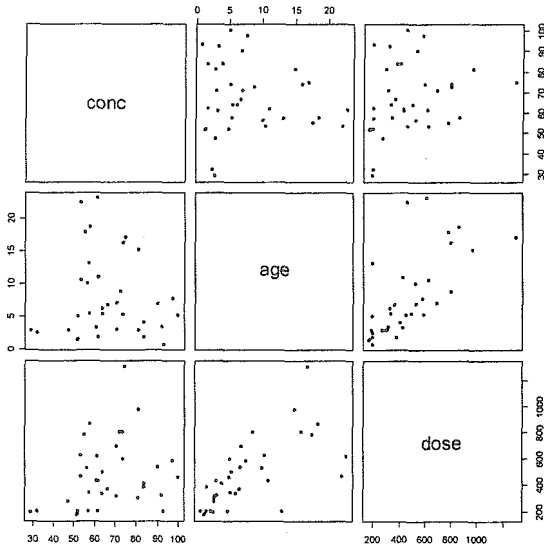
齢を3節の3次スプライン関数で補間した。統計解析には、S言語(R言語環境)を使用し、多重回帰分析およびノモグラムの作成には、バージニア大学Harrell教授が開発した、DesignおよびHmiscプログラム・ライブラリを使用した。

(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

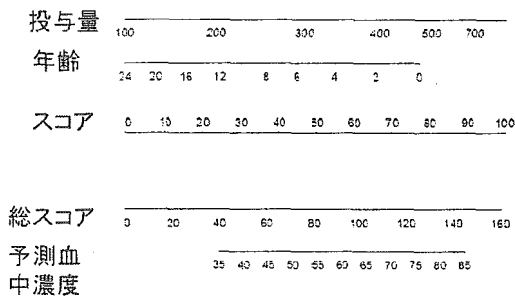
下に血中濃度(conc)、年齢(age)、投与量(dose)について、相関図を示す。年齢と投与量の間比較的強い相関を認めた。



```
library(survival)
library(hmisc, T)
library(design, T)
library(nlme)
valproate<-read.csv("valprocsv.csv")
attach(valproate)
names(valproate)
#各患者ごとに、血中濃度を年齢と投与量で表現するモデルを作成する。
valproate.group<-groupedData(conc ~ age + dose | id)
valproate.summary<-gsummary(valproate.group)
valproate.summary
#ID番号を文字から数値に変換
valproate.summary$id<-as.numeric(valproate.summary$id)
plot(valproate.summary[1:3])
dd<-datadist(valproate.summary)
options(datadist='dd')
f<-ols(conc
rcs(dose, 3)+rcs(age, 3), data=valproate.summary)
r<-resid(f)
xyplot(r ~ fitted(f), method='quantile')
qqmath(~ r)
g<-update(f, x=T)
s<-summary(f)
plot(s)
nomogram(f)
```

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。

バルプロ酸のノモグラム



まず、投与量および年齢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血中濃度を読み取る。例えば、一日投与量が200mg 年齢が6歳であれば、それぞれのスコア値は25点と35点である。両者の和(総スコア)は60点であり、対応する予測血中濃度は45と判定される。

D. 考案

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。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。

E. 結論

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。次年度の研究により、バルプロ酸の代謝に関わる酵素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

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) チオプリンメチル転移酵素のハプロタイプ構造

(分担研究者) 熊谷昌明 (国立成育医療センター 血液腫瘍科医長)

研究要旨 6メルカプトプリン(6MP)はチオグアニンヌクレオチド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によりメチル化を受けて不活化される。人口の一部はチオプリンメチル転位酵素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6MPの抗腫瘍効果は増大し、通常の投与量によって強い骨髄毒性を来す。本研究では、日本人におけるチオプリンメチル転位酵素遺伝子の多型解析を通じて、日本人におけるチオプリンメチル転位酵素遺伝子座位におけるハプロタイプ構造を決定し、同遺伝子座位のほぼ全域にわたり連鎖不平衡が存在することを明らかにした。次年度以降、6MP投与後の強い骨髄抑制が特定のハプロタイプと関連しているかどうかを検討する。

研究協力者

森 鉄也 慶應義塾大学医学部
小児科助手

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。ハプロタイプ構造が得られれば、特定のハプロタイプが強い骨髄抑制の発症と関連しているかどうか検討を行う。

A. 研究目的

小児リンパ芽球性白血病(ALL)の治療において、アザチオプリンおよびその活性中間体である6メルカプトプリン(6MP)は重要な薬物である。6MPは標的臓器である骨髄細胞において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(図1)。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。既に欧米においては、6MPの投与前にTPMTの遺伝子多型の検査が行われ、遺伝子多型に応じて、初期投与量が調節されている。

欧米人においてTPMTの活性を低化させる多型は*2や*3Aであり、そのヘテロ接合体頻度は1/10と極めて高い。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

B. 研究方法

以下のデータベースおよびコンピュータ・プログラムを使用して、TPMT 遺伝子における日本人多型および周囲の遺伝子配列を入手した。

① 遺伝子データベース

UCSC ゲノム・ブラウザー

<http://genome.cse.ucsc.edu/>

エクソン・イントロン構造

JSNPs データベース

<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>

日本人 SNPs データベース

② 解析ソフトウェア

BLAST:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

相同性検索

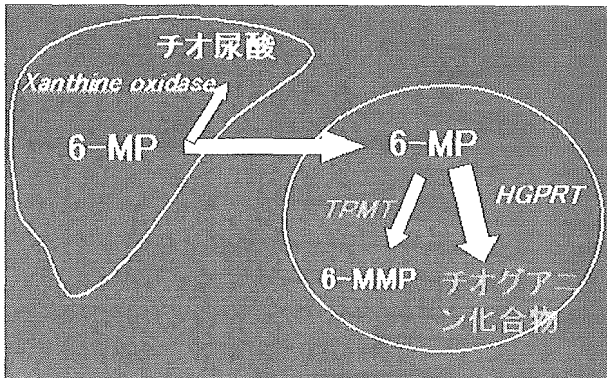
RepeatMasker:

[http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/](http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker)

RepeatMasker

ゲノム DNA 配列に存在するリピート配列の同定と除去。

図1 肝臓と血球における6MPの代謝



TPMT遺伝子の周辺に存在する SNPs を数個選択した。この際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、多型性の高い SNPs を選択した。SNP を増幅するための PCR プライマーを設計した。正常人由来のゲノム DNA40 名分の等濃度混合物を鋳型とし PCR 法を行い、直接シーケンシング法によりクロマトグラムを得た。2つのアレル由来のシグナルが明白に認められる場合に SNPs のヘテロ接合率が高いと判定した。

次に 40 名の連結不能匿名化した個別のゲノム DNA を増幅し、DHPLC 法または直接シーケンシング法を用いて SNP タイピングを行った。解析した SNP の位置を図 2 に示す。得られたジェノタイプデータに対してハプロタイプ解析を行った。統計解析には R 言語のパッケージ haplo.score を利用した。まず haplo.em 関数を用いて最大尤度推定法に基づき、日本人において、存在するハプロタイプのパターンを推定した。推定されたハプロタイプデータを利用して、の TPMT 遺伝子近傍における連鎖不平衡を定量化した。解析には、Gold プログラム(<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/GOLD/index.html>)を利用した。

haplo.score パッケージと Gold プログラムは、異なる研究グループにより開発されており、前者の出力をそのまま、後者の出力とすることは出来ない。そこで、2つのプログラムの入出力をインターフェースするプログラムを作成した。以下に R 言語で記述したプログラム・スクリプトを記載する。R 言語利用の詳細については、慶應義塾大学小児科臨床治験整備チーム「平成14年度報告書を参照されたい。

```
library(survival);library(design,T);library(nlme)
library(genetics);library(haplo.score)
set.haplo.a1 = function(x)
{allele.recode(allele(genotype(x))[,1],
allele(genotype(x))[,2])[1]}
set.haplo.a2 = function(x)
{allele.recode(allele(genotype(x))[,1],
allele(genotype(x))[,2])[2]}
set.haplo = function(x)
{data.frame(set.haplo.a1(x), set.haplo.a2(x))}
tpmt<-read.csv("tpmt.csv")
attach(tpmt)
geno<-cbind(set.haplo(poly01), set.haplo(poly02), set
.haplo(poly03), set.haplo(poly04), set.haplo(poly06),
set.haplo(poly07), set.haplo(poly08), set.haplo(poly0
9), set.haplo(poly10), set.haplo(poly11), set.haplo(po
ly12))
locus.label<-c("poly01", "poly02", "poly03", "poly04",
"poly06", "poly07", "poly08", "poly09", "poly10", "poly
1", "poly12")
resp<-runif(nrow(tpmt))
hap.gaus.tpmt<-haplo.score(resp, geno, trait.type="ga
ussian", offset=NA, x.adj=NA,
skip.haplo=0.005, locus.label=locus.label, miss.val=0
, n.sim=0)
templ.dtf<-data.frame(hap.gaus.tpmt$haplotype)
replnum<-nrow(templ.dtf)
hap.gaus.tpmt$haplotype
zz <- file("HAPLO.LST", "w")
for (j in 1:replnum){
hap.id<-paste("HAPLO", j, sep="")
temp.txt<-c(hap.id, as.numeric(templ.dtf[j,]),
"%n")
cat(temp.txt, file=zz, sep=" ", append=TRUE)}
close(zz)
shell(cmd="copy haplo.lst c:\¥¥genetics¥¥gold")
shell(cmd="haploxt")
shell(cmd="c:\¥¥genetics¥¥gold¥¥gold")
```

(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、ジェノタイプ解析とハプロタイプ解析を行った。

C. 研究結果

図3にTPMT遺伝子近傍における連鎖不平衡の分布を示した。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明らかにした。

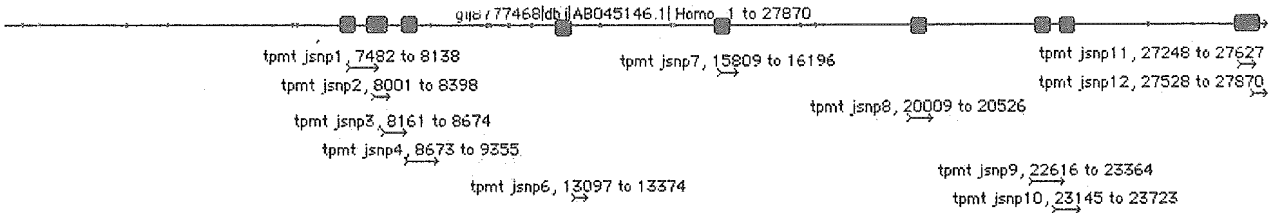


図2 TPMT遺伝子近傍のSNPsの分布

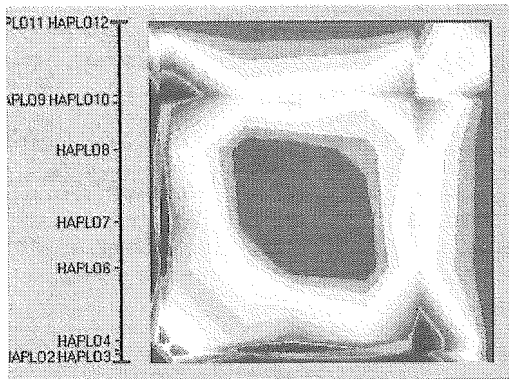


図3 TPMT遺伝子近傍のSNPsの連鎖不平衡

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。今回の解析法を利用して、TPMT以外の薬物代謝酵素についてもハプロタイプ構造の決定をすすめる予定である。

E. 結論

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。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。

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ーポストゲノム時代を展望するー 遺伝 別冊15号 158-164 (2002)

D. 考案

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) エストロゲン α 受容体のハプロタイプ構造
(分担研究者) 長谷川奉延 (慶應義塾大学小児科 助教授)

研究要旨 ミクロペニスとは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。ミクロペニスには男性ホルモンであるテストステロンエナンテ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関解析を行っている。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。

研究協力者

佐々木 理恵
慶應義塾大学医学部小児科 助手

A. 研究目的

ミクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。ミクロペニスには男性ホルモンであるテストステロンエナンテート(TE)の筋肉内注射が広く行われている。このTE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TEへの治療反応性について包括的な連関解析を行っている。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(以下ESR1)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ESR1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。

B. 研究方法

以下のデータベースおよびコンピュータ・プログラムを使用して、ESR1 遺伝子における日本人多型および周囲の遺伝子配列を入手した。

① 遺伝子データベース

UCSC ゲノム・ブラウザー

<http://genome.cse.ucsc.edu/>

エクソン・イントロン構造

JSNPs データベース

<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>

日本人 SNPs データベース

② 解析ソフトウェア

BLAST:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

相同性検索

RepeatMasker:

<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>

ゲノム DNA 配列に存在するリピート配列の同定と除去。

ESR1 遺伝子の周辺に存在する SNPs を 10 個選択した。この際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、多型性の高い SNPs を選択した。SNP を増幅するための PCR プライマーを設計した。正常人由来のゲノム DNA40 名分の等濃度混合物を鋳型とし PCR 法を行い、直接シーケンシング法によりクロマトグラムを得た。2つのアレル由来のシグナルが明白に認められる場合に SNPs のヘテロ接合率が高いと判定した。

次に 86 名の連結不能匿名化した個別のゲノム DNA を増幅し、DHPLC 法または直接シーケン

シング法を用いて SNP タイピングを行った。解析した SNP の位置を図1に示す。得られたジェノタイプデータに対してハプロタイプ解析を行った。統計解析には R 言語のパッケージ haplo.score を利用した。まず haplo.em 関数を用いて最大尤度推定法に基づき、日本人において、存在するハプロタイプのパターンを推定した。推定されたハプロタイプデータを利用して、の ESR1 遺伝子近傍における連鎖不平衡を定量化した。解析には、Gold プログラム(

<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/GOLD/index.html>)を利用した。

haplo.score パッケージと Gold プログラムは、異なる研究グループにより開発されており、前者の出力をそのまま、後者の出力とすることは出来ない。そこで、2つのプログラムの入出力をインターフェースするプログラムを作成した。以下に R 言語で記述したプログラム・スクリプトを記載する。R 言語利用の詳細については、慶應義塾大学小児科臨床治験整備チーム「平成14年度報告書を参照されたい。

C. 結果

日本人における ESR1 遺伝子のハプロタイプ構造を明らかにした。エストロゲン α 受容体のリガンド結合ドメインの周辺において強い連鎖不平衡が存在することを示した(下図参照)。

D. 考案

日本人における ESR1 遺伝子のハプロタイプ構造

を明らかにした。リガンド結合ドメインの周辺について強い連鎖不平衡を認めることから、テストステロン治療に反応する患者と、不応性の患者について、ハプロタイプの分布を比較することにより、治療反応性と関連する ESR1 ハプロタイプを特定できると予測される。次年度は、TE 反応性が、特定のハプロタイプと関連するかどうか検討する。

E. 結論

日本人における ESR1 遺伝子のハプロタイプ構造を明らかにした。今回の解析法を利用して、他の内分泌ホルモンやその受容体についてもハプロタイプ構造の決定をすすめる予定である。

F. 健康危険情報

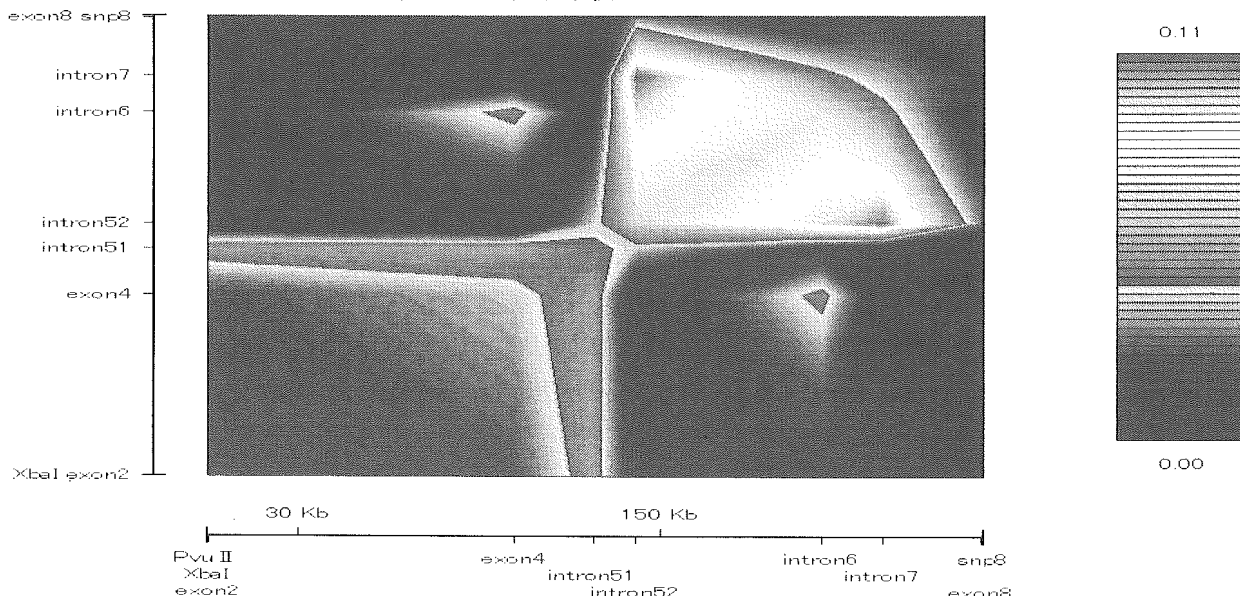
特記すべきこと無し

G. 研究発表

論文発表

Sasaki G, Ogata T, Ishii T, Kosaki K, Hasegawa T, Sato S, Homma K, Takahashi T, Matsuo N. Micropenis and the 5 α -reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (in press).

図 ESR1 遺伝子近傍の SNPs の分布と連鎖不平衡



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) 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ナルモン治療効果

(分担研究者) 緒方 勤 (国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部部長)

研究要旨

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ミ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。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。

A. 研究目的

ミクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。ミクロペニスには男性ホルモンであるテストステロンエナンテート(TE)の筋肉内注射が広く行われている。この TE 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(活性とアンドロゲン受容体機能に大きく依存する。そして、5 α 還元酵素2型遺伝子(SRD5A2)の V89L 多型が酵素活性をの 30%程度低下させること、アンドロゲン受容体遺伝子(AR)の CAG リピート多型長が AR 機能に逆比例することから、これらの遺伝子多型はミクロペニスにたいする TE 治療の効果を規定していると推測される。本研究では、この可能性を検討した。

B. 研究方法

<対象>

解析に関して親のインフォームドコンセントが得られた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。全ての患者は、

(1)伸展陰茎長が日本人同年齢対照の-2.0 SD 未満, (2)尿道下裂なし, (3)女性化乳房なし, (4)身長が日本人同年齢対照の-2.0 SD 以上かつ長+2.0 SD 以下, (5)性腺ないし外性器異常を合併する奇型症候群なし, (6)染色体核型 46,XY, (7)SRD5A2 および AR 遺伝子の変異なし, の条件を満たした。

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男児 50 人と成人男性 50 人を解析した。すべて、精査後に特発性低身長と診断された日本人で、外性器・身体所見に異常なく、染色体核型は 46,XY であった。

<SRD5A2 と AR の多型解析>

SRD5A2 の V89L 多型は、直接シーケンス法により決定した。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 PCR で増幅し、autosequencer 上において Gene Scan をにより決定した。

<テストステロン治療効果>

エナルモン 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学的に解析した。さらに、陰茎長増加量と、治療開始時の年齢や体表面積との相関も検討した。

(倫理面への配慮)国立成育医療センター・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

陰茎増加量は、SRD5A2遺伝子V89L多型とは相関しなかったが(表1)、AR遺伝子CAGリピート数とは有意の負の相関を示した(図1)。また、エナルモン25mgあたりの陰茎長増加量(cm/dose)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、エナルモン25mgあたりの陰茎長増加量(Sスコア/dose)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(図2)。

D. 考案

今回の成績から、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いうる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、25mg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。

表1. SRD5A2遺伝子のV89L多型と男性ホルモン効果の関係

Patient number		PL-increment per TE 25 mg	
		(cm)c	(SDS)d
V/V	19	0.46±0.04	0.83±0.08
		0.40 (0.23~1.00)	0.83 (0.30~1.50)
V/L	33	0.45±0.02	0.82±0.05
		0.50 (0.20~0.75)	0.80 (0.30~1.40)
L/L	6	0.38±0.04	0.74±0.05
		0.37 (0.27~0.50)	0.77 (0.60~0.85)
<i>P-value</i>		0.40	0.82

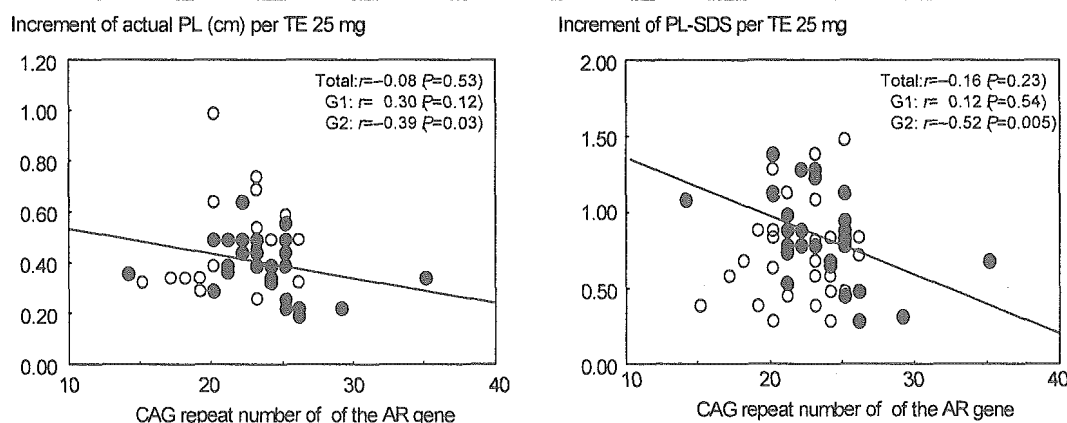
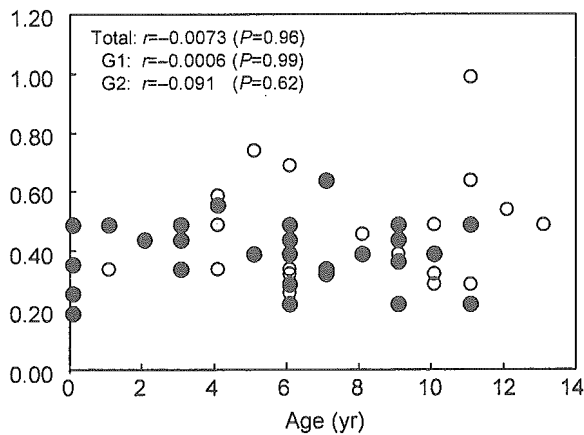
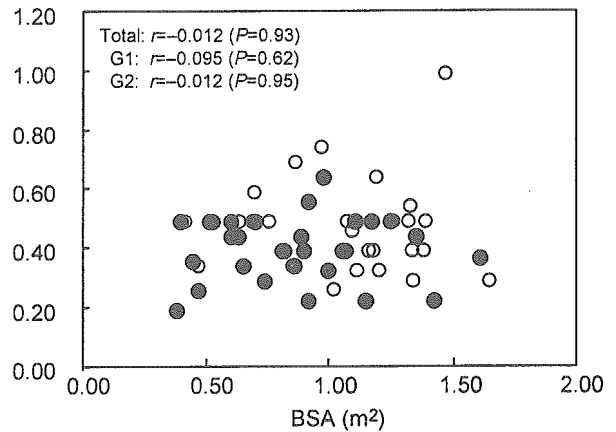


図1. エナルモン25mgあたりの陰茎増加: 陰茎長の増加とSDSでの増加は、共に、アンドロゲン受容体遺伝子のCAG数と逆相関

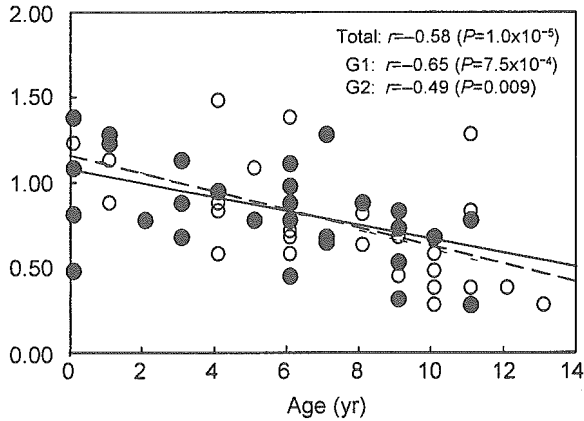
Increment of actual PL (cm) per TE 25 mg



Increment of actual PL (cm) per TE 25 mg



Increment of PL-SDS per TE 25 mg



Increment of PL-SDS per TE 25 mg

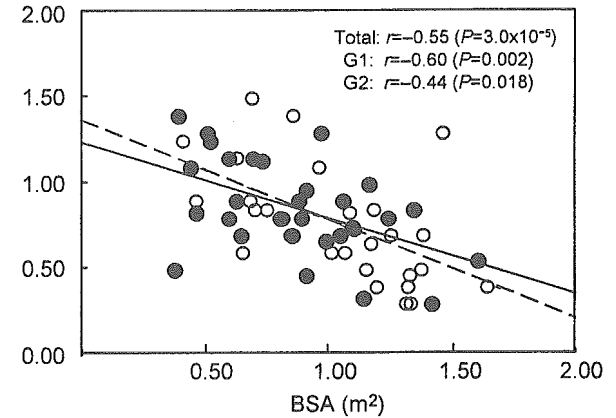


図2. エナルモン 25 mg 当たりの陰茎増加: 実際の cm での増加は、年齢、体表面積と無関係で、SDS での増加は、年齢、体表面積逆相関。

E. 結論

エナルモン 25mg 当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。

F. 研究発表

論文発表

Sasaki G, Nakagawa K, Hshiguchi A, Hasegawa T, Ogata T, Murai M. Giant seminoma in a

patient with 5 α -reductase-2 deficiency. Journal of Urology (in press).

Sasaki G, Ogata T, Ishii T, Kosaki K, Hasegawa T, Sato S, Homma K, Takahashi T, Matsuo N. Micropenis and the 5 α -reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (in press).

Ishii T, Sato S, Kosaki K, Sasaki G, Muroya K, Ogata T, Matsuo N. Micropenis and the AR gene: mutation and CAG repeat-length analysis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86 (11): 5372-5378, 2001.

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) 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
(分担研究者) 奥山虎之(国立成育医療センター 遺伝診療科医長)

研究要旨

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

難聴を引き起こすミトコンドリア遺伝子変異は多数報告されているが、特にミトコンドリアDNA1555番目の遺伝子変異については、アミノグリコシド系抗生物質に高い感受性を示す非症候性群難聴の原因として注目されている。1555番目の塩基は、12SリボソームRNA遺伝子内にあり、アデニンがグアニンに変化したものである。この遺伝子変異は、ホモプラスミーの状態で母系遺伝するため、家族集積性を認める。

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

- 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

難聴の家族歴を有する家系でとくにミトコンドリア遺伝の特徴が見られる家系において、ミトコンドリア 1555 変異がホモプラスミーとして存在することが、Prezant らによりはじめて報告された(1)。また、家族性を示さない難聴症例のなかにもミトコンドリア 1555 変異を示す症例が Huchin らにより示されている(2)。1555 変異を持つ難聴患者のなかには、アミノグリコシド系抗生物質の使用歴が明らかでないものも少なくない。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。

D. 考案

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を確認する必要がある。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。

来年度は、微量検体で迅速に 1555 変異を同定する技術を確認し、日本人正常集団および非症候性難聴症例におけるミトコンドリア 1555 変異の出現頻度を推定し、この遺伝子変異をアミノグリコシド

系抗生物質の使用前に検出する意義について検討する予定である。

E. 結論

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、易罹患性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。

参考文献

- 1) Prezant TR, et al. Nat. Genet, 4:289-294, 1993
- 2) Huchin T, et al. Nucleic Acid Res. 21, 4174-4179, 1993

研究構成員名簿

研究構成員名簿

氏名	郵便番号	勤務先住所・所属・役職	電話番号	FAX
----	------	-------------	------	-----

主任研究者

小崎 健次郎	160-8582	東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 小児科専任講師	03-3353-1211 内線 62368	03-5379-1978
--------	----------	--------------------------------------	--------------------------	--------------

分担研究者

高橋 孝雄	160-8582	東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 小児科教授	03-3353-1211 内線 62364	03-5379-1978
長谷川 奉延	160-8582	東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 小児科助教授	03-3353-1211 内線 62365	03-5379-1978
山岸 敬幸	160-8582	東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 小児科専任講師	03-3353-1211 内線 62363	03-5379-1978
奥山 虎之	157-8535	東京都世田谷区大蔵 2-10-1 国立成育医療センター 遺伝診療科医長	03-3416-0181	03-3416-2222
熊谷 昌明	157-8535	東京都世田谷区大蔵 2-10-1 国立成育医療センター 血液腫瘍科医長	03-3416-0181	03-3416-2222
百々 秀心	157-8535	東京都世田谷区大蔵 2-10-1 国立成育医療センター 循環器科医長	03-3416-0181	03-3416-2222
緒方 勤	154-8509	東京都世田谷区太子堂 3-35-31 国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部部長	03-3414-8121	03-3419-0381
菅谷 明則	204-8567	東京都清瀬市梅園 1-3-1 都立清瀬小児病院 循環器内科医長	0424-91-0011	0424-91-0044

氏名	郵便番号	勤務先住所・所属・役職	電話番号	FAX
----	------	-------------	------	-----

研究協力者

谷川原 祐介	160-8582	東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 薬剤部教授	03-5363-3847	03-5269-4576
森 鉄也	160-8582	東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 小児科助手	03-3353-1211 内線 62362	03-5379-1978
佐々木 理恵	160-8582	東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 小児科助手	03-3353-1211 内線 62365	03-5379-1978

本厚生労働科学研究の遂行に当たって多大なご尽力を下さいました分担研究者、若手医師、臨床研究協力者各位に、主任研究者として、深甚なる謝意を表します。(小崎 健次郎)