

2030510

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

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：小崎健次郎

平成16(2004)年 4月

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小崎 健次郎

平成 16 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

CYP2C19 の遺伝子型がエヌデスメチルクロバザムの血中濃度に与える影響についての検討	小崎健次郎... 1
葉酸代謝酵素多型とメントレキセート投与後の副作用の発症	熊谷 昌明... 10
マイクロペニスにおけるテストステロンエナンテート治療効果：単一遺伝子病と多因子疾患の観点から	緒方 勤... 20
アミノ配糖体抗生物質と難聴—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究—	奥山 虎之... 23
ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立とバリデーション	長谷川奉延... 28
ジアゾキシドの薬物動態に関する文献的考察	谷川原祐介... 42
薬理遺伝学的検査の実施における個人情報匿名化に関する研究	高橋 孝雄... 47
薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査	山岸 敬幸... 55
薬理遺伝学検査に関する FDA ガイドライン (案) の検討	百々 秀心... 64
薬理遺伝学的研究のもつ倫理的問題に関する考察	菅谷 明則... 74
研究構成員名簿.....	101

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 助教授)

研究要旨

CYP2C19 の遺伝子型がエヌデスメチルクロバザムの血中濃度に与える影響についての検討

小崎健次郎

Desmethyl N-clobazam (以下 N-CLB) は、clobazam (以下 CLB) の主たる代謝産物であって、CLB の治療効果および副作用の発生に大きな影響をもたらすと考えられている。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比に大きな個人差が存在することが以前から知られていた。本研究によりわれわれは CYP2C19 の多型とこれらの比率の間に遺伝子表現型の関連が存在することを示した。CYP2C19 の変異アレルを2コピー持つ患者においては、これらの比率は野生型を持つ患者に比べて著明に高くなり、1コピーのみ変異アレルを持つ患者は中間的な表現型を示した。すなわちこれらの値の上昇の程度は CYP2C19 の変異アレルのコピー数に依存していた(遺伝子量効果)。N-CLB/CLB の血中濃度比は変異アレルを2コピー持つ患者においては、野生型の患者と比べて6倍の値をとっていた。したがって血中濃度の中の N-CLB/CLB の比率は、副作用の発症の可能性のある患者をスクリーニングする上で良い臨床的な指標となる。変異アレルの頻度が高い民族(例えばアジア人では35%)に臨床的に有用と考えられる。CYP3A4 誘導性の抗癌薬併用例においては、CLB 血中濃度・CLB 投与量の比率は低めになり、また N-CLB・CLB の血中濃度比は高めとなった。しかしながら CYP3A4 誘導性の抗てんかん薬の N-CLB の代謝に対する影響は小さく、我々は CYP2C19 の遺伝子型が N-CLB の血中濃度の主たる決定因子であると判断した。

葉酸代謝酵素多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症 熊谷昌明

メソトレキセート(methotrexate:以下 MTX)は急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia:以下 ALL)やリンパ腫など小児リンパ系腫瘍の治療に用いられる葉酸拮抗剤である。MTXによる毒性の標的臓器は口内炎・嘔吐などの消化器から、皮膚、中枢神経、肝、腎、および造血器(骨髄)まで多様である。各症例における毒性発症の予測は困難である。小児 ALLあるいはリンパ芽球性リンパ腫症例において、葉酸代謝酵素 Methylene tetrahydrofolate reductase(以下 MTHFR) 677C/T、および葉酸を細胞内にとりこむ輸送蛋白 Reduced folate carrier 1 80G/A 多型と大量 MTX 療法に伴う毒性発症の関連を後方視的に解析した。1992年から2003年の間に慶應義塾大学病院で治療が行われた ALL、またはリンパ芽球性リンパ腫例で、他の細胞障害性薬剤の全身投与による併用なく大量 MTX

(3g/m²) の投与が行われた症例を研究対象とし、毒性を National Cancer Institute Common Toxicity Criteria によりスコア化した。因子の統計解析には generalized estimating equations 法 (以下 GEE 法) を用いた。1)MTX 血中濃度と各種毒性の発症、2)CFR の増量の有無と各種毒性の発症、3)RFC1 80G/A あるいは MTHFR 677C/T における変異アレル数と各種毒性の発症、4)RFC1 80G/A あるいは MTHFR 677C/T における変異アレル数と CFR の増量の有無について前者を説明変数、後者を目的変数として解析した。A アレル数の増加と NCI-CTC Grade 2 以上の嘔吐発症の減少に有意な関連を認めた (Odds Ratio=0.319, P=0.034)。RFC1 多型による個体差が毒性発症に寄与した可能性が示唆される。

マイクロペニスにおけるテストステロンエナンテート治療効果 緒方 勤

マイクロペニスの治療としてテストステロンエナンテート (TE) の筋肉注射が行われている。TEは5 α 還元酵素2型によりジヒドロテストステロン (DTH)に変換されたのちにアンドロゲン受容体に結合して作用する。したがって5 α 還元酵素2型遺伝子 (SRD5A2) 変異を有する患者ではTEの治療効果は極めて乏しいと予測され、原因療法としてDTH (軟膏) 投与が有効と予測される。本研究では、マイクロペニス日本人患者81人を対象として、SRD5A2変異解析を行ったあと、変異の有無で層別化して対症療法としてのTE (25 mg/dose) の効果と原因療法としてのDTH軟膏の効果と比較した。変異陰性患者では、TE効果を解析した。3症例においてSRD5A2遺伝子変異Y26X/R227Q、G34R/R227Q、R227Q/R227Qを同定した。SRD5A2遺伝子変異を有する3例におけるTE効果は乏しかった (0.2 cm/dose以下)。当該3例に対して患者・家族の同意のもとにDTH軟膏を塗布したところ、全例とも陰茎長は正常範囲内に到達した。SRD5A2遺伝子変異陰性例における陰茎長は、TE (25 mg/dose) 1-4回投与により全例正常範囲内に到達した。以上の成績から、SRD5A2変異は、TE治療に対する反応性を規定する因子であり、変異のある症例では、DTH軟膏という原因治療が可能であることが明らかにされた。

アミノ配糖体抗生物質と難聴—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究—奥山虎之

ミトコンドリア DNA 中に存在する A1555G ホモプラスミー変異は、アミノグリコシド系抗生物質の投与による難聴誘発との関連性が指摘されている。本研究では、アミノグリコシド系抗生物質による副作用を未然に防ぐ為の手段として、ミトコンドリア DNA 変異のスクリーニング検査を実用化するための方法論について検討した。(1) PCR・直接塩基配列決定法、(2) PCR-RFLP 法、(3) TaqMan プロブ、(4) 熱変性高速液体クロマトグラフィーを用いた方法を比較した。時間的には TaqMan プロブが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。緊急性に応じて両者を使い分けることが理想的であると考えられた。

アゾキシドの血中濃度測定法の確立とバリデーション 長谷川奉延

高インスリン血性低血糖症の治療薬であるジアゾキシドの用法・用量を合理的に設定するためには血中薬物濃度を測定し薬物動態を検討することが必要である。本研究では、まず HPLC による血中濃度測定法の確立を試みた。想定される血中濃度は $10\sim 100\ \mu\text{g/mL}$ であり、UV 検出器による測定で十分な感度が期待できた。1 試料あたり 25 分ですべて溶出させることができ、ジアゾキシドは約 8 分後に単一のピークとして発現した。内部標準物質はフェナセチンとし、血清も添加した標準溶液を調製してジアゾキシド濃度が $0.5\sim 200\ \mu\text{g/mL}$ の範囲で検量線の線形性が確認できた。血清試料は $100\ \mu\text{L}$ であり、採血量も問題ないと思われる。さらに、バリデーションにより本法が血清中ジアゾキシド濃度測定法として信頼できることが確認できた。本研究の成果は、臨床研究におけるジアゾキシドの血中濃度測定および薬物動態試験を行うにあたり有用である。

ジアゾキシドの薬物動態に関する文献的考察 谷川原祐介

ジアゾキシドは、乳児期における高インスリン血性低血糖症の第一選択薬である。我が国では未承認薬でありながら、低血糖症の内科的治療に使用されている実態があり、有効性、安全性の確かな情報が必要である。そこで、ジアゾキシドの薬理効果や薬物動態特性を文献調査し、臨床研究に向けての検討事項を整理した。ジアゾキシドの薬理効果はインシュリンの分泌抑制による血糖上昇作用である。寛解までには 4~6 年と長期にわたる投与が必要である。半減期は 20 時間以上と長く、一日 3 回投与の本薬剤は、半減期に比べ投与間隔が非常に狭いことを特徴としている。本薬剤を適正に使用するためには、治療量と血中濃度の関係および血中濃度と治療効果、副作用との関係を明らかにすることが必要である。今後は、ジアゾキシドの適正使用に向けた、母集団薬物動態 (PPK) 解析および血中濃度と治療効果、副作用との関係 (PK/PD) 解析が望まれる。

薬理遺伝学的検査の実施における個人情報匿名化に関する研究 高橋孝雄

薬剤代謝酵素の遺伝子多型を薬剤反応性の予測・副作用の予見に利用するためには、遺伝子検査の実施が不可欠である。European Medicines Evaluation Agency (EMA) の薬理遺伝学における匿名化の定義についての position paper を参照して遺伝学研究における匿名化の問題を薬理遺伝学的立場から検討した。本研究班の分担研究「薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査」で示したとおり、患者の多くは、individual feedback (個人の検査結果を患者に返す) を希望しており、single coded sample として匿名化をおこなうことが適切であると判断した。文部科学省、厚生労働省、経済産業省のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針・遺伝医学関連学会の「遺伝学的検査に関するガイドライン」・日本衛生検査所協会の「ヒト遺伝子検査受託に関する倫理指針」を遵守した匿名化システムを設計し、その運用方法について検討した。

薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査 山岸敬幸

本邦における一般人の薬理遺伝学的研究に対する意識を明らかにする目的で、慶應義塾大学病院小児科一般外来を受診した患者および患者の保護者40名に対してアンケート票(添付)を直接に配布してアンケート調査を行った。アンケート内容は米国 NIH によって行われたアンケート調査票を参考にして作成した。

- ① 回答者の大部分(97%)が、テーラーメイド医療に興味を持ち、研究の推進にたいしても肯定的な意見をもっていることが明らかにされた。自身(あるいは子)が研究に参加しても良いと考える人が約 3/4 存在した。
- ② 回答者の大部分(90%以上)が遺伝子検査結果について、individual feedback を希望した。
- ③ 私企業を主体とする研究の推進には抵抗のある意見もあり、公的な病院(大学病院・国立病院等)を研究対象の場とし、政府補助金を財源として検討を進めることが望ましいと考えられた。

薬理遺伝学検査に関する FDA ガイドライン(案)の検討 百々 秀心

米国医薬品局(FDA)は薬理ゲノム学分野における科学的な進歩を促し、医薬品の統制に関わる決定を行う際に薬理ゲノム学的なデータの使用を促進するために、新薬申請における薬理遺伝学的データ(当該文書では薬理ゲノム学的データ)の取り扱いについてのガイドライン(案) Guidance for Industry Pharmacogenomic Data Submissions [draft] 以下 PGD ガイドライン案と略す)を発表した。FDA が薬理ゲノム学的データの収集に積極的に取り組んでゆく考えであることを明文化した最初の指針である PGD ガイドライン案に述べられている基本的な見解について整理し、今後、わが国において臨床試験に薬理遺伝学的検査成績を取り入れる際に考慮すべき問題点について検討した。FDA は、薬理ゲノム学的データを、医薬品の承認の判断材料に用いる立場ではなく、薬理ゲノム学的データと医薬品の有効性・副作用の関係に関するデータを積極的に収集したいという立場にある。

薬理遺伝学的研究のもつ倫理的問題に関する考察 菅谷明則

イギリスのナッフィールド・バイオエシックス評議会 Nuffield Council on Bioethic が刊行した「Pharmacogenetics: ethical issues」のついて、薬剤開発において薬理遺伝学が果たす役割と、診療において薬理遺伝学を応用する際に考慮すべき倫理的問題についての章を翻訳し、内容を検討した。新薬の開発に対して薬理遺伝学が一定の役割を果たすことが期待される、薬理遺伝学の診療への利用において一般開業医(GP)や薬剤師を含む医療従事者への薬理遺伝学教育と一般人の啓蒙が不可欠である、遺伝情報を扱うことに必ずしもなれていない一般開業医または薬剤師が遺伝情報を保管する責務を負うこと等が強調されている。

A.研究目的

CYP2C19 の遺伝子型がエヌデスメチルクロバザムの血中濃度に与える影響についての検討 小崎健次郎

抗けいれん剤 clobazam(CLB)は活性中間体 N-desmethyloclobazam (N-CLB)に代謝される。N-CLB の薬効は CLB の 1/4 程度であるが血中半減期が長くと定常状態血中濃度も高いため、CLB 投与時の治療効果・副作用発症に大きく寄与する。N-CLB の代謝能には大きな個人間差を認めるがその原因は不明であった。最近、N-CLB/CLB 血中濃度比と N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比が著増しているイタリア人 2 症例に薬物代謝酵素 CYP2C19 の変異を認めたとの報告が行われた。日本人において CYP2C19 の変異アレル(*2、*3 アレル)の頻度が高いことに着目し、変異アレル数と CLB・N-CLB 代謝能の相関について検討した。

葉酸代謝酵素多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症 熊谷昌明

メソトレキセート (methotrexate: 以下 MTX) は急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: 以下 ALL) やリンパ腫など小児リンパ系腫瘍の治療に用いられる葉酸拮抗剤である。MTX による毒性の標的臓器は口内炎・嘔吐などの消化器から、皮膚、中枢神経、肝、腎、および造血器 (骨髄) まで多様である。各症例における毒性発症の予測は困難である。小児 ALL あるいはリンパ芽球性リンパ腫症例において、葉酸代謝酵素 Methylene tetrahydrofolate reductase (以下 MTHFR) 677C/T、および葉酸を細胞内にとりこむ輸送蛋白 Reduced folate carrier 1 80G/A 多型と大量 MTX 療法に伴う毒性発症の関連を後方視的に解析した。

マイクロペニスにおけるテストステロンエナンテート治療効果: 単一遺伝子病と多因子疾患の観点から

緒方勤

マイクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。マイクロペニスは量的形成異常として捉えられ、その原因には単一遺伝子変異と多因子疾患の両者が関与する前者では、原因療法がしばしば可能であり、後者では対象療法が主体となる。

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ナンテート (TE) の筋肉注射が広く行われている。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 (DTH) がアンドロゲン受容体に結合して発現することから、単一遺伝子病としての 5 α 還元酵素 2 型遺伝子 (SRD5A2) 変異やアンドロゲン受容体遺伝子 (AR) 変異を有する患者では極めて乏しく、多因子疾患としての特発性マイクロペニス患者では有効と考えられる。そして、SRD5A2 変異では原因療

法としての DTH 軟膏が有効と推測される。本研究では、この可能性を検討した。

アミノ配糖体抗生物質と難聴—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究— 奥山虎之

1555 番目の塩基であるアデニンがグアニンに変化したミトコンドリア DNA のホモプラスミー個体は、ゲンタマイシンなどのアミノ配糖体系抗生物質を投与された場合、高頻度に感音性難聴という副作用を呈することが知られている。小児科臨床において、アミノグリコシド系抗生剤の投与が考慮されるのは、敗血症、細菌性髄膜炎などの重症感染症の治療においてでありで緊急を要する場合が少なくない。本研究の目的は、ミトコンドリア A1555G 変異を正確・迅速に解析する方法を開発し、臨床検査としての最適化について検討することである。

ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立とバリデーション 長谷川奉延

ジアゾキシドは、高インスリン血症に対する治療薬として、米国、欧州などで広く用いられているが、日本においては未承認である。用量は効果や副作用の状況を見ながら調整されているのが現状である。血中薬物濃度を測定し薬物動態を検討することは、用法・用量の合理的な設定や臨床試験の計画を行う上で必要不可欠と考えられるが、本薬剤の血中濃度を測定する方法は確立されていない。本研究では、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による血中濃度測定法を確立し、血清中ジアゾキシドの HPLC による濃度測定法の妥当性を検証した。

ジアゾキシドの薬物動態に関する文献的考察 谷川原祐介

ジアゾキシドは、高インスリン血症に対する治療薬として、米国、欧州などで広く用いられているが、日本においては未承認である。用量は効果や副作用の状況を見ながら調整されているのが現状である。血中薬物濃度を測定し薬物動態を検討することは、用法・用量の合理的な設定や臨床試験の計画を行う上で必要不可欠と考えられるが、本薬剤の血中濃度を測定する方法は確立されていない。本研究では、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による血中濃度測定法を確立し、血清中ジアゾキシドの HPLC による濃度測定法の妥当性を検証した。本研究では、ジアゾキシドの薬物動態試験を実施するために必要な事項について、調査、検討を行うことを目的とした。

薬理遺伝学的検査の実施における個人情報匿名化に関する研究 高橋孝雄

薬剤代謝酵素の遺伝子多型を薬剤反応性の予測・副作用の予見に利用するためには、遺伝子検査の実施が不可欠である。遺伝学研究におけ

る匿名化の問題を薬理遺伝学的立場から検討した上で、匿名化を行うためのコンピュータ・システムのあり方について検討した。

薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査 山岸敬幸

一般人が薬理遺伝学的研究を支持するか、その背景にある考え方を理解しているのか、自ら研究に参加しても良いと考えているのか、どのような条件下なら参加しても良いと考えているのか、どのような様な研究機関が主導する研究に信頼をおくのか、新薬の開発に対して楽観的な考えなのか、薬理遺伝学的研究が公衆の役に立つと期待しているのか、ゲノム研究に関してプライバシーの問題に関して重大な関心を寄せているのかを2002年に米国のNIHの研究グループが検討した。本研究では、大学病院の一般小児科外来に通院する親を対象としてアンケートを行い、本邦における一般人の薬理遺伝学的研究に対する意識調査を行った。

薬理遺伝学検査に関するFDAガイドライン(案)の検討 百々秀心

平成15年秋に米国医薬品局(FDA)は、新薬申請における薬理遺伝学的データ(当該文書では薬理ゲノム学的データ)の取り扱いについてのガイドライン(案)Guidance for Industry Pharmacogenomic Data Submissions(draft以下、PGDガイドライン案と略す)を発表した。このガイドラインは、「強制力を持つ規制」ではなく「薬理遺伝学的データ」の自発的な提出を求めるための「推奨」であると理解される。本分担研究ではPGDガイドラインに述べられている基本的な見解について整理し、今後、わが国において臨床試験に薬理遺伝学的検査成績を取り入れる際に考慮すべき問題点について検討した。

薬理遺伝学的研究のもつ倫理的問題に関する考察 菅谷明則

分担研究報告書「薬理遺伝学検査の運用の実際」に要約したごとく、本研究事業では、インフォームド・コンセント→検体の匿名化→検体の管理→遺伝子検査→結果の患者へのフィードバックを一貫して行いうるシステムを確立した。このようなシステムを臨床試験のプロトコルの一部としてあるいは診療のために運用する際には、薬理遺伝学的研究のもつ倫理的・法律・社会的な問題ELSIについて十分な検討が必要である。英国では、薬理遺伝学に関する倫理学的研究が進められている。本分担研究報告書では、英国のナッフィールド・バイオエシックス評議会が昨年発行した報告書「Pharmacogenetics: ethical issues」の内容について検討し、わが国における状況と比較した。

B.研究方法

CYP2C19の遺伝子型がエヌデスメチルクロバザムの血中濃度に与える影響についての検討 小崎健次郎

小児神経外来に通院中の16名のてんかん患者を対象とした。少なくとも4週間、処方量に変化のない患者を対象とした。7名の患者は少なくとも1剤のCYP3A4誘導性抗癌薬(フェノバルビタール・カルバマゼピン・フェニトイン)を内服しており、一方9名の患者はCYP3A4非誘導性の抗癌薬(バルプロ酸・エドサクシミド・ゾミサミド)を内服していた。CLBとN-CLBの血中濃度をガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー法によって測定した。全血からゲノムDNAを抽出し、CYP2C19の*2および*3アレルを直接シーケンシング法または熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いて解析した。患者を変異アレルの総数によって以下のごとくに分類した。グループ1: CYP2C19*1*1、グループ2: CYP2C19*1*2 または CYP2C19*1*3、グループ3: CYP2C19*2*2、CYP2C19*3*3、CYP2C19*2*3 さらに患者をCYP3A4誘導性の抗癌薬の併用の有無によっても分類した。反応変数としてCLB血中濃度/CLB投与量比、N-CLB血中濃度/CLB投与量比、N-CLB血中濃度/CLB血中濃度比を採用し、二元配置分散分析法によってその差を比較した。

薬酸代謝酵素多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症 熊谷昌明

1992年から2003年の間に慶應義塾大学病院で治療が行われたALL、またはリンパ芽球性リンパ腫例で、他の細胞障害性薬剤の全身投与による併用なく大量MTX(3g/m²)の投与が行われた症例を研究対象とした。患者情報および臨床経過は後方視的に収集した。毒性の評価はNational Cancer Institute Common Toxicity Criteria(以下NCI-CTC)第2版に基づいた。血清中のMTX濃度はMTX投与開始後48時間に測定した。各患者における複数回のMTX投与それぞれについて毒性発症の有無を評価し、すべてのMTX投与に対する毒性発症について解析を行った。統計解析にはgeneralized estimating equations法(以下GEE法)を用いた。

マイクロペニスにおけるテストステロンエンテート治療効果: 単一遺伝子病と多因子疾患の観点から

緒方勤

解析に関して両親いずれかの承諾が得られたマイクロペニス日本人患者81人を対象とした。伸展陰茎長はSchonfeldらの方法に従って測定した。すなわち、陰茎を十分に伸展させた状態で、陰茎の背面に定規を当て、恥骨枝から亀頭先端までの距離を測定した。SRD5A2

の全翻訳領域を含むようにプライマーを設定し、各領域をPCRで増幅した。その後、熱変性高速液体クロマトグラフィー法により解析した。SRD5A2 遺伝子変異陽性患者では、対症療法としてのTE (25 mg/dose) の効果と原因療法としてのジヒドロテストステロン軟膏の効果と比較した。変異陰性患者では、テストステロン効果を解析した。

アミノ配糖体抗生物質と難聴—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究— 奥山虎之

ミトコンドリア A1555G 変異を以下に示す種々の方法での検出を試みた。

①PCR-直接塩基配列決定法、②PCR-RFLP法、③TaqMan プローブ、④ 熱変性高速液体クロマトグラフィーを用いた SNP 解析法を試み、おのおの方法の検査にかかる時間費用を比較検討した。

ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立とバリデーション 長谷川奉延

試料作成法、内部標準物質、カラム、移動相、UV 検出器の吸光度を検討した。感度は、定常状態の血中濃度を想定し 0.5-200 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で線形性が保たれる条件を設定した。試料は血清とした。確立された測定法について、特異性・検量線の直線性・同時再現性および日間再現性・回収率・分析中の 24 及び 48 時間安定性についてバリデーションを行った。

ジアゾキシドの薬物動態に関する文献的考察 谷川原祐介

ジアゾキシドの薬理効果や薬物動態特性を文献調査し、臨床研究に向けての検討事項を整理した。ジアゾキシドの使用実態および薬物動態パラメータの報告を調査し、ジアゾキシドの母集団薬物動態試験を行うにあたり必要な情報を収集した。

薬理遺伝学的検査の実施における個人情報匿名化に関する研究 高橋孝雄

European Medicines Evaluation Agency (EMA) が、定義した薬理遺伝学における匿名化の分類を参照して、薬理学的研究のためにコンピュータ・プログラムを開発し、その運用方法について検討した。本研究班の分担班研究「薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査」の報告書で述べたように、薬理遺伝学的研究に参加する患者の殆どが、遺伝子検査結果に対して individual feedback を希望していることが明らかにされたため、連結可能匿名化を前提として、匿名化システムを開発した。

薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査 山岸敬幸

NIH によって行われた薬理遺伝学に関するア

ンケート調査をもとに慶應義塾大学病院小児科一般外来を受診した患者および患者の保護者 40 名に対してアンケート票を直接に配布してアンケート調査を行った。ただし、以下の点について、改変した。

①回答に必要な時間を短縮するため、アンケート項目を削減した。

②我が国の実情に合わない質問（民族・人種に関する質問、健康保険に関する質問を割愛した。（政府管掌保険のない米国と我が国の国情は異なる）

③米国でのインタビューは電話によるものであったが、本研究では、病院外来でアンケート票を直接に配布する方式を使った。このため、個人を間接的に特定しうる質問内容を削除した。

薬理遺伝学検査に関する FDA ガイドライン（案）の検討 百々秀心

Guidance for Industry Pharmacogenomic Data Submissions (draft)の全文を検討し、医薬品臨床試験における薬理ゲノム学的検査結果の取り扱いについての FDA の基本的な考え方を明らかにした。著作権の制限上、翻訳文を掲載することは出来ないが、特に PGD ガイドライン案中、繰り返し記述され、強調されている事項について要約した。次に、薬理ゲノム学的検査は In Vitro Diagnostic Test として当局による規制を受けることを考慮し、Feigal らの論文 Drug Development, regulation, and genetically guided therapy(2003 年)の論旨について検討を行った。

薬理遺伝学的研究のもつ倫理的問題に関する考察 菅谷明則

イギリスのナッフィールド・バイオエシックス評議会 Nuffield Council on Bioethic が刊行した「Pharmacogenetics: ethical issues」のうち特に本研究事業に関連が深いと考えられる、第 3 章「治療および診療における倫理的諸問題」、補遺「付録 4：一般との協議」および、を翻訳し、我が国における薬理遺伝学的研究における意味づけを検討した。

C. 研究結果

CYP2C19 の遺伝子型がエヌデスメチルクロバザムの血中濃度に与える影響についての検討 小崎健次郎

変異のない群(*1/*1:以下、第 1 群)、変異を 1 アレル有する群(*1/*2 と *1/*3:以下、第 2 群)、変異を 2 アレル有する群(*2/*2 と *2/*3:以下、第 3 群)はそれぞれ、7・6・3 名であった。各群の平均 N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比はそれぞれ 2111・7156・13504 ng/ml/mg/kg/日、平均 N-CLB/CLB 血中濃度比はそれぞれ 5.3・12.4・29.5 であり、両比とも変異アレル数の増加に依存して上昇していた。N-CLB/CLB 血中濃度比は

変異アレル数に依存して増加していた。これらの成績は遺伝子量効果 gene dosage effect を示していた。CYP3A4 誘導性併用薬併用患者と非併用患者の間における CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB/CLB 血中濃度比の差を2次元配置分散分析により比較した。CLB 血中濃度/CLB 投与量比は変異アレル数によらず、不変であったが ($p=0.63$)、3A4 誘導性抗癌薬併用群において有意に低下していた ($p=0.005$)。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比は変異アレル数に大きく依存しており ($p<0.0001$)、CYP3A4 誘導性薬剤の併用群において著明に低下していた ($p=0.001$)。N-CLB/CLB 血中濃度比も変異アレル数に依存しており ($p<0.0001$)、CYP3A4 誘導性の抗癌薬併用群において著明に増加していた ($p=0.004$)。

葉酸代謝酵素多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症 熊谷昌明

大量 MTX (3g/m²) の投与が行われた 15 例における 43 回の MTX 投与を解析対象とした。遺伝子多型解析に不同意、プロトコール違反などの理由により 5 例は解析対象から除外した。残る 1 例は初回の MTX 投与後に血液透析を要する腎不全を生じ以後の予定された MTX 投与が行われなかったため多型解析対象から除外した。2 例に重大な MTX 関連毒性を認めた。1 例は初回 MTX 投与後に血液透析を要する腎不全を生じた (上記; 多型解析対象からは除外)。他の 1 例は MTX 投与に関連する白質脳症による運動麻痺を生じた。白質脳症は 3 回の MTX 投与後の MRI で確認された。各種毒性の中で、肝機能障害は特定の患者に繰り返し生じる傾向を示した。まず、投与開始 48 時間後の MTX 血中濃度とそれぞれの毒性発症の関連に有意な関連を認めなかった。CFR 増量例では、NCI-CTC Grade 4 の血球減少発症が有意に増加した (Odds Ratio=8.319, $p=0.032$)。RFC1 80G/A における A アレル数の増加と NCI-CTC Grade 2 以上の嘔吐発症の減少に有意な関連を認めた (Odds Ratio=0.319, $P=0.034$)。その他の毒性発症と RFC1 80G/A における A アレル数の増加に有意な関連を認めなかった。同様に MTHFR 677C/T における T アレル数と毒性発症の関連を GEE 法で解析したが、いずれも有意な関連を認めなかった。

マイクロペニスにおけるテストステロンエンタート治療効果：単一遺伝子病と多因子疾患の観点から 緒方勤

3 症例において SRD5A2 遺伝子変異が同定された。その内容は、Y26X/R227Q、G34R/R227Q、R227Q/R227Q で、全例に R227Q が共有されていた。この R227Q は、正常コントロール 100 名中の 1 例において、へ

テロの状態で検出された。SRD5A2 遺伝子変異を有する 3 例における TE 効果は乏しかった (0.2 cm/dose 以下)。SRD5A2 遺伝子変異を有する 3 例では、患者・家族の同意のもとに DTH 軟膏塗布を治療として行い、全例陰茎長は正常範囲内に到達した (2.8→4.5 cm、2.0→5.0 cm、2.2→4.2 cm)。SRD5A2 遺伝子変異陰性例における陰茎長は、TE (25 mg/dose) 1-4 回投与により全例正常範囲内に到達した。初回 TE 25mg あたりの陰茎長増加量 (cm) は、患児の年齢や体表面積に化変わりなくほぼ同等であったが、テストステロンエンタート 25mg あたりの陰茎長増加量 (SDS/dose) は、患児の年齢および体表面積と逆相関していた (図 1)。また、TE 25mg 初回投与時の陰茎長反応は、治療前マイクロペニス軽度群 (-2.0~-2.5 SD) と重度群 (-2.5 SD 以下) の患者の間で等しく ($P=0.96$)、一方、TE 25mg 2 回投与群において 3 回投与群よりも良好であった ($P=0.009$) (表 1)。

アミノ配糖体抗生物質と難聴—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究— 奥山虎之

(1) PCR-直接塩基配列決定法、(2) PCR-RFLP 法、(3) TaqMan プローブ、(4) 熱変性高速液体クロマトグラフィーを用いた SNP 解析法について、検査結果の再現性、検査時間と費用を比較検討し時間的には TaqMan プローブ法 (3 時間) が有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。

ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立とバリデーション 長谷川奉延

標準溶液 (STD 溶液) の調製、内部標準溶液 (IS 溶液) の調製、検量線試料の調製、血清試料の前処理、HPLC 測定条件、特異性についてプロトコルを確立した。測定クロマトグラム上、ジアゾキシド及び IS 溶出位置に夾雑ピークは検出されず、ジアゾキシドの特異的な測定が可能であった。異なる各測定日における検量線試料 (STD 0.5~200) の測定結果から求めた検量線の相関係数 (r) はすべて 1.000 であった。各濃度ポイントでの真度 (RE 値) は -4.8~0.6 で許容範囲内であり、良好な直線性が得られた。血清中濃度 25 及び 200 μ g/mL 相当の各標準添加試料の測定結果から得られた RE 値は 0.4~1.0% であり、変動係数 (CV 値) は 0.7% であり同時再現性における良好な真度及び精度がえられた。血清中濃度 25 及び 200 μ g/mL 相当の各標準添加試料の測定結果から得られた RE 値は -0.6~0.5% であり、変動係数 (CV 値) は 0.7~1.2% であり、日間再現性における良好な真度及び精度が得られた。血清中濃度 0.5 及び 200 μ g/mL 相当の標準添加試料と回収率測定用リファレンス試料の各測定結果から、ピーク面積より算出したジアゾキシド及び IS の回収率平均値は

78.3%以上であり、安定した回収率が得られた。各濃度の標準添加試料保存前の測定結果の平均値と、分析中の安定性 24 時間あるいは 48 時間の測定結果の平均値より求めた残存率は 101.4~104.3%で、いずれも許容範囲内であり、分析中の 48 時間の安定性が確認された。

ジアゾキシドの薬物動態に関する文献的考察 谷川原祐介

インシュリン分泌調節の中心的役割を担っているのは、膵β細胞のATP感受性K⁺(KATP)チャンネルであるが、ジアゾキシドは、膜2回貫通型であるKir6.2とスルホニルウレア受容体SUR1の二つのサブユニットから成るKATPチャンネルを開口し、インシュリン分泌を抑制する。一方、血管平滑筋のK⁺チャンネルオープン作用により膜の脱分極を起し、間接的にCa²⁺チャンネルを遮断して細胞内Ca²⁺量を減らし、平滑筋を弛緩させる(血压降下作用)。

投与量としては、3mg/kg/day 一日3回(8時間毎)で開始し、維持量を8~15mg/kg/day、一日3~4回に分けて経口投与するのが一般的である。必要に応じて副作用に注意しながら20~25mg/kg/dayに増量する。副作用は多毛、浮腫、嘔気、高尿酸血症などであり、注意深い観察下で長期間の投与が可能である。半減期は28±8.3hrと長いのが特徴である。約50%は未変化体として腎排泄される。バイオアベイラビリティは85-95%で、蛋白結合率は90%である。ジアゾキシドの代謝物は、3位の水酸化体とカルボキシル体の二つが確認されているが、血中濃度は親化合物の1/10程度で活性はないとされている。

薬理遺伝学的検査の実施における個人情報匿名化に関する研究 高橋孝雄

我が国のガイドラインにおいては「匿名化」は「連結可能匿名化」「連結不能匿名化」に分類されている。これに対して、EMAのposition paperは、それぞれのカテゴリーをさらに2個に分類している。すなわち「連結可能匿名化」検体はsingle coded sample、double coded sampleの二つに分けられ、「連結不能匿名化」検体はanonymised sample、anonymous samplesの二つに分けられる。なお、「匿名化」のないサンプルはIdentified sampleと称される。本研究班の分担研究「薬理遺伝学検査の運用の実際」で述べたように、患者の多くは、individual feedback(個人の検査結果を患者に返す)を希望しており、single coded sampleとして匿名化をおこなうことが適切であると判断した。氏名と暗号との関係に対応させたりリストをデータベース内に保持するが、個人情報管理者の権限をもつ医師のみにアクセスする権限を付与することで、セキュリティレベルを維持しつつ、出来る限り処理を自動化し匿名化にかかる労力を軽減させた。暗号化方式として本システムでは、「TripleDES」方式を採用し、基幹とした。

これは「DES」を3回繰り返す構造をとり、鍵長の伸長、アルゴリズムの統計的偏りの減少を図り、暗号強度を高める方式である。

薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査 山岸敬幸

アンケート票を配布した全員から回答を得ることができた。87%の回答者がオーダーメイド医療の実現がよりよい医療に貢献すると表明した。遺伝子検査により最も良く効く薬を予測することや最適な投薬量を予測することは「良いことである」と回答した人が67%を占め「どちらかいうと良い」と答えた人が27%であり、全体として95%の人が肯定的な意見を表明した。研究への参加については、積極的な意見は少なくなり、「参加したい」と回答した人は30%にとどまった。「どちらかというとなら参加したくない」人は23%に上った。遺伝子検査の結果は「知りたい」と述べた人が92%をしめた。研究を行う施設として、大学病院>国公立病院>それ以外の病院の順で肯定的な意見が聞かれた。研究費の支援については国からの支援に対して肯定的な意見が多く、「是非参加したい」「どちらかというとなら参加したい」が全体の70%を占めた。検査会社や製薬会社が研究費用を支援する場合は、「是非参加したい」「どちらかというとなら参加したい」は全体の50%にとどまった。

薬理遺伝学検査に関するFDAガイドライン(案)の検討 百々秀心

PGDガイドライン案は、薬理ゲノム学の分野における科学的な進歩を促し、医薬品の統制に関わる決定を行う際に薬理ゲノム学的なデータの使用を促進するために作成された。しかし、FDAは、薬理ゲノム学的データを、医薬品の承認の判断材料に用いる立場ではなく、薬理ゲノム学的データと医薬品の有効性・副作用の関係に関するデータを積極的に収集したいという立場にある。PGDガイドライン案中でshouldという単語が用いられているが、これは「義務」を表す単語ではなく「推奨」を表す単語である旨が明言されている。上記の立場に立ち、PGDガイドライン案は薬品開発の過程で得られる薬理ゲノム学的知識を集積したデータベースを開発して、新薬開発における薬理遺伝学的データの合理的な利用を促進し、データの集積により得られた一般的な知識を共有する計画であると述べている。このようなデータの集積により、FDAが科学的理論に立脚してよりよい規制方針を立案できると期待している。薬理ゲノム学的検査はCLIA(Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988)にもとづいて、Center for Devices and Radiological Healthによっても規制される。

薬理遺伝学的研究のもつ倫理的問題に関する考察 菅谷明則

「Pharmacogenetics: ethical issues」のうち特に本研究事業に関連が深いと考えられる、第3章「治療および診療における倫理的諸問題」、補遺「付録4: 一般との協議」および、を日本語へ翻訳し、我が国における薬理遺伝学的研究における意味づけを検討した。
翻訳を本報告書に添付した。

D. 考案

CYP2C19 の遺伝子型がエヌデスメチルクロバザムの血中濃度に与える影響についての検討 小崎健次郎

CYP2C19 の遺伝子型が N-CLB の定常状態における血中濃度の主要な決定因子であると結論した。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比の値が変異アレルを 2 コピー有する患者において、変異アレルを持たない患者の 6 倍であったことは、臨床的な観点から重要である。N-CLB の抗痙攣効果は CLB の 1/4 程度であることが報告されているが、変異アレルを 2 コピー有する患者において N-CLB の血中濃度が著明に上昇しており、これらの患者が N-CLB あるいは CLB の副作用を受けやすい可能性が示唆された。実際に変異アレルを 2 コピー有する患者の 1 人は標準的な量の CLB の投与を受けていたにもかかわらず、CLB の副作用として知られる強い眠気を訴えた。今後、規模な前向き研究によって CYP2C19 の変異アレルを 2 コピー有する場合に CLB の副作用を起しやすいかどうか、さらなる検討が必要である。

薬酸代謝酵素多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症 熊谷昌明

NCI-CTC Grade4 の血球減少発症は CFR 増量と有意な関連を示した。CFR の増量は MTX 投与開始後の血中濃度を経時的に測定し、基準よりも高値を示した場合に行われている。CFR 増量は、ある時点での血中濃度だけでなく薬物の排泄速度にも関与する因子であり、体内薬物動態を反映する因子と考えられる。すなわち、NCI-CTC Grade4 の血球減少発症は MTX の排泄遅延に関連すると考えられる。一方、CFR 増量は大量 MTX 投与に関連する毒性軽減を目的とした対応であり、今回の対象に用いられた CFR 増量法は、少なくとも NCI-CTC Grade4 の血球減少の発症阻止には効果的でなかったと考えられる。MTHFR 677C/T あるいは RFC1 80G/A 多型と毒性発症の関連についての解析の結果、RFC1 80G/A 多型における A アレル数の増加と NCI-CTC Grade 2 以上の嘔吐発症の減少に有意な関連を認めた。嘔吐発症と投与開始 48 時間後の MTX 血中濃度、あるいは CFR の増量に有意な関連がみられなかったことから、機序は明らかでないものの RFC1 多型による個体差が毒性発症に寄与した可能性が示唆される。「患者個人に最適な MTX 投与方法」の確立のためには、同一条件の多数例を

対象としたリスク因子の解析のみならず、各臓器における毒性発症の機序の解明も重要な課題と考えられる。

マイクロペニスにおけるテストステロンエンタート治療効果：単一遺伝子病と多因子疾患の観点から

緒方勤

本研究は、小児マイクロペニスにおいて単一遺伝性疾患としての SRD5A2 遺伝子変異が存在することを明らかとした。そして、R227Q という約 5% の残存酵素活性を有することが知られている変異が 3 例に共有され、これは、残存酵素活性と男性化障害の間に相関関係が存在することを示すものである。さらに、SRD5A2 遺伝子変異患者では、ジヒドロテストステロン軟膏という、保険適応にはなっていないが有効な原因治療薬が存在することから、その診断は患者の治療に大きく貢献すると考えられる。

SRD5A2 遺伝子変異陰性例における TE 療法は、全員において有効であった。さらに、TE 25 mg の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、これは、本治療法があらゆるマイクロペニス患者において使用しうることを示唆する。

アミノ配糖体抗生物質と難聴—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究— 奥山虎之

時間的には TaqMan プローブが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。緊急性に応じて両者を使い分けることが理想的であると考えられた。

ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立とバリデーション 長谷川奉延

ジアゾキシドの常用量 3~15mg/kg/day を投与されている小児の定常状態血中濃度は 10~100 μg/mL であると予想され、投与中止 7 日後でも 1 μg/mL 前後である。そこで HPLC による測定で十分な感度が得られ、0.5~200 μg/mL と設定した濃度範囲で良好な直線性が認められた。従って、ジアゾキシドの薬物動態試験を行う上で必要な血中濃度測定法が確立できたと言える。必要な試料量は 100 μL と少量で済むため、新生児にも実用可能と考えられる。測定法の評価も行い、特異性、直線性、同時および日間再現性、回収率、24 および 48 時間安定性については評価できた。本法により血中濃度測定を行って、ジアゾキシドの母集団薬物動態解析を実施できれば、本薬剤の適正な使用法を明らかにできると期待される。

ジアゾキシドの薬物動態に関する文献的考察 谷川原祐介

ジアゾキシドは現在日本では未承認薬であり、

治療量と有効性、安全性との関係は明らかとなっていない。このような状態で使用を続けると、医師の立場からは、自己責任の下で使用するにもかかわらず、必要で確かな情報が不足しているというリスクが常に伴い、患者の立場からは、適正な治療を受けられるまでに時間を要する、すなわち投与の開始、あるいは適正な投与量の決定までに時間を要してしまう恐れがある。本薬剤は半減期が長いにも関わらず一日3回投与が行われているため、定常状態では最高血中濃度とトラフ値の差が少なく、ほぼ一定の濃度を保っていると考えられる。小児患者を対象として血中濃度を測定する場合、採血回数や採血量に制限がある上、外来治療では、採血時間帯も限られる。そこで、一人あたりの採血点数が少なくても多数の患者からデータを得ることにより解析が可能となる母集団薬物動態試験が有用であると考えられる。文献的研究からえられた成績をもとに、母集団薬物動態試験のシミュレーションを行い、本年度臨床治験チーム分担研究報告書「ジアゾキシドの母集団薬物動態試験法の検討」として纏めた。

薬理遺伝学的検査の実施における個人情報匿名化に関する研究 高橋孝雄

文部科学省、厚生労働省、経済産業省のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針・遺伝医学関連学会の「遺伝学的検査に関するガイドライン」・日本衛生検査所協会の「ヒト遺伝子検査受託に関する倫理指針」を遵守した匿名化システムを設計した。上記3指針に従い、患者検体およびその関連するデータについて、single coded sample、double coded sample、anonimised sample、anonymous samplesのいずれかの匿名化を行うことが必要と考えられた。本研究班の分担研究班報告書「薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査」で述べたように、患者の多くは、individual feedback(個人の検査結果を患者に返す)を希望しており、single coded sample または double coded sample として匿名化をおこなうことが適切であると判断した。本プロトタイプでは、single coded sample として匿名化を行ったが、今後セキュリティ・レベルを高める観点から double coded sample としての匿名化の利点・欠点について評価を進める必要がある。

薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査 山岸敬幸

オーダーメイド医療全体に関しては肯定的な傾向が認められたが、研究への参加については、積極的な意見は少なくなり、「参加したい」と回答した人は30%にとどまった。遺伝子検査の結果について多くの人が individual feedback を求めることが明らかにされた。今回のアンケート結果は、相当数の人間が「連結可能匿名化」の研究スタイルを是認している可能性を示唆している。研究を行う施設と

して、大学病院>国公立病院>それ以外の病院の順で肯定的な意見が聞かれた。研究費の支援については国からの支援に対して肯定的な意見が多く、「是非参加したい」「どちらか」というと参加したいが全体の70%を占めた。公的な病院(大学病院・国立病院等)を研究対象の場とし、政府補助金を財源として検討を進めることが望ましいと考えられた。今回の研究では大学病院の一般小児科外来受診患者とその親を調査対象としたが、回答者の背景により、回答が異なるかどうか、さらに大規模な検討する必要がある。

薬理遺伝学検査に関する FDA ガイドライン(案)の検討 百々秀心

PGD ガイドライン案はFDAが薬理ゲノム学的データの収集に積極的に取り組んでゆく考えであることを明文化した最初の指針である。FDAが製薬企業に対して「義務として」ではなく、「自主的に」データの提出を求めている点が特徴的である。薬理ゲノム学的データが新薬開発を促進する効果が期待できる。しかし、下記の問題点を内包している。① 現在、各製薬会社が薬理ゲノム学的なデータを収集していると考えられるが、製薬会社にとって不利なデータが得た場合に報告の義務がない。② 製薬の開発段階で、多型と薬効の関係が明らかになった際に、患者の「層別化」が必要と予測される場合に、企業の開発意欲が低下する可能性が懸念される。企業にとって「層別化」が必要な場合、製品のマーケットが縮小する可能性があるためである。③ PGD ガイドライン案中でゲノム薬理ゲノム学的データの標準的な報告形式が明文化されていない。研究者間・製薬会社間のデータの交換が容易ではない。国際的標準的となるフォーマットを策定し、国際間のデータ交換を促進することが望ましい。

薬理遺伝学的研究のもつ倫理的問題に関する考察 菅谷明則

新薬の開発における薬理遺伝学の役割に関するアンケート結果についてのナッフィールド・バイオエシックス評議会のコメントの要点は① 薬理遺伝学的検討を導入した初期には、臨床試験にかかわるコストが一時的に増加するが、患者の層別化により、臨床試験をトライ&エラーではない形で行えるために、成功率が上昇し、臨床試験にかかる期間も短縮すると期待される。② 臨床的には有用だが、経済的には余り利益の上らない薬品を推奨するために orphan drug の仕組みと離れて「pharmacogenetic medicine」を推進するための新しい規制を設けることが望ましい。これらの意見は米国FDAの薬理遺伝学に関するガイドライン案 Guidance for Industry Pharmacogenomic Data Submissions [draft] (分担研究報告書「薬理遺伝学検査に関するFDAガイドライン(案)の検討」参照)

の内容とおおむね一致する。薬理遺伝学の診療への利用における倫理的諸問題点としてナッフィールド・バイオエシックス評議会は、薬理遺伝学検査によってもある薬剤に反応する患者と反応しない患者という明確な2つのカテゴリーに患者が明確に層別化できず、検査の結果得られる情報はあくまでも確率的予測にとどまる点を強調している。医師および患者に十分な判断能力をもたせるために、臨床医・患者の双方に対する正確な遺伝学教育が不可欠である。

E. 結論

CYP2C19 の遺伝子型がエヌデスメチルクロバザムの血中濃度に与える影響についての検討 小崎健次郎

N-CLB は、抗てんかん薬 clobazam の主たる代謝産物であって、CLB の治療効果および副作用の発生に大きな影響をもたらすと考えられている。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比に大きな個人差が存在することが以前から知られていた。本研究によりわれわれはこれらの比率の個人差が CYP2C19 の多型により説明できることを示した。

葉酸代謝酵素多型とメソトレキセート投与後の副作用の発症 熊谷昌明

小児 ALL あるいはリンパ芽球性リンパ腫症例において、葉酸輸送蛋白 Reduced folate carrier 1 80G/A 多型と大量 MTX 療法に伴う毒性発症の関連を 15 例における 43 回の MTX 投与を対象として後方視的に解析した。A アレル数の増加と NCI-CTC Grade 2 以上の嘔吐発症の減少に有意な関連を認めた (Odds Ratio=0.319, P=0.034)。RFC1 多型による個体差が毒性発症に寄与した可能性が示唆される。

ミクロペニスにおけるテストステロンエンテート治療効果：単一遺伝子病と多因子疾患の観点から 緒方勤

ミクロペニス患者のうち SRD5A2 変異解析を有する症例では、TE 筋肉注射は無効であるが、DHT 軟膏塗布は有効である。すなわち SRD5A2 遺伝子の遺伝子型を効果的治療法の選択に利用しうる。

アミノ配糖体抗生物質と難聴—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究— 奥山虎之

今回の検討によりミトコンドリア A1555G 変異スクリーニングのためには TaqMan プローブおよび熱変性高速液体クロマトグラフィーを用いた SNP 解析法がもっとも安価で迅速な結果を得ることが判明した。

ジアゾキシドの血中濃度測定法の確立とバリ

デーション 長谷川奉延

HPLC 法による血清中ジアゾキシド濃度測定法を確立でき、各確認項目 (特異性、検量線の濃度範囲と直線性、同時再現性、日間再現性、回収率) の測定結果は、すべて許容範囲内であった。しかがって、本法は血清中ジアゾキシドの HPLC による濃度測定法として信頼できることが確認できた。この成果は、本薬剤の薬物動態試験を実施するにあたり必要不可欠な条件であり、ジアゾキシドの適正使用に向けた研究を行う上で有用である。

ジアゾキシドの薬物動態に関する文献的考察 谷川原祐介

高インスリン血性低血糖症に対するジアゾキシドの現在の使用実態と本薬剤の薬物動態特性を調査した。これらの情報は今後の PPK 解析および PK/PD 解析を行うにあたり有用である。

薬理遺伝学的検査の実施における個人情報匿名化に関する研究 高橋孝雄

本分担研究では、慶應義塾大学病院の専用イントラネットの中のみで匿名化エンジンを運用した。外部施設からの検体を受け入れる際には外部施設で一旦匿名化を行い、慶應義塾大学医学部の研究室に受け入れる際に、再度、匿名化作業を行った。Virtual private network (VPN) を利用すればインターネット上に閉鎖的なネットワークを確保できるので、研究班に参加している 3 施設 (慶應義塾大学医学部・国立成育医療センター・東京都立清瀬小児病院) 間で匿名化エンジンを共有することが可能であると期待される。

薬理遺伝学に対する患者の親の考え方についてのアンケート調査 山岸敬幸

大学病院の一般小児科外来受診者 (主として両親) が薬理遺伝学的研究に対してもっているイメージをアンケートにより調査した。

① 回答者の大部分 (97%) が、テーラーメイド医療に興味を持ち、研究の推進にたいしても肯定的な意見をもっていることが明らかにされた。自身 (あるいは子) が研究に参加しても良いと考える人が約 3/4 存在した。

② 回答者の大部分 (90%以上) が遺伝子検査結果について、individual feedback を希望した。

③ 私企業を主体とする研究の推進には抵抗のある意見もあり、公的な病院 (大学病院・国立病院等) を研究対象の場とし、政府補助金を財源として検討を進めることが望ましいと考えられた。

薬理遺伝学検査に関する FDA ガイドライン (案) の検討 百々秀心

新薬申請における薬理遺伝学的データ (当該文書では薬理ゲノム学的データ) の取り扱いについてのガイドライン (案) Guidance for

Industry Pharmacogenomic Data Submissions [draft] によれば、FDA は薬理ゲノム学的データを、医薬品の承認の判断材料に用いる立場ではなく、薬理ゲノム学的データと医薬品の有効性・副作用の関係に関するデータを積極的に収集したいという立場にある。

薬理遺伝学的研究のもつ倫理的問題に関する考察 菅谷明則

ナッフィールド・バイオエシックス評議会の遺伝薬理学に対する見解を要約した。新薬の開発に対して薬理遺伝学が一定の役割を果たすことが期待された。薬理遺伝学の診療への利用においては、一般開業医(GP)や薬剤師を含む医療従事者への薬理遺伝学教育と一般人の啓蒙が不可欠であることが強調された。遺伝情報を扱うことに必ずしもなれていない一般開業医または薬剤師が遺伝情報を保管する責務を負うこと、保険業者による遺伝学的情報の利用の可能性が生ずることについて十分な議論が必要である。

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15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 助教授)

(分担研究課題) CYP2C19 の遺伝子型がエヌデスメチルクロバザムの血中濃度に与える影響についての検討

(分担研究者) 小崎健次郎 (慶應義塾大学医学部小児科 助教授)

研究要旨

Desmethyl N-clobazam (以下 N-CLB) は、clobazam (以下 CLB) の主たる代謝産物であって、CLB の治療効果および副作用の発症に大きな影響をもたらすと考えられている。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比に大きな個人差が存在することが以前から知られていた。本研究によりわれわれは CYP2C19 の多型とこれらの比率の間に遺伝子表現型の関連が存在することを示した。CYP2C19 の変異アレルを2コピー持つ患者においては、これらの比率は野生型を持つ患者に比べて著明に高くなり、1コピーのみ変異アレルを持つ患者は中間的な表現型を示した。すなわちこれらの値の上昇の程度は CYP2C19 の変異アレルのコピー数に依存していた(遺伝子量効果)。N-CLB/CLB の血中濃度比は変異アレルを2コピー持つ患者においては、野生型の患者と比べて6倍の値をとっていた。したがって血中濃度の中の N-CLB/CLB の比率は、副作用の発症の可能性のある患者をスクリーニングする上で良い臨床的な指標となる。変異アレルの頻度が高い民族(例えばアジア人では35%)に臨床的に有用と考えられる。CYP3A4 誘導性の抗痙攣薬併用例においては、CLB 血中濃度・CLB 投与量の比率は低めになり、また N-CLB・CLB の血中濃度比は高めとなった。しかしながら CYP3A4 誘導性の抗てんかん薬の N-CLB の代謝に対する影響は小さく、我々は CYP2C19 の遺伝子型が N-CLB の血中濃度の主たる決定因子であると判断した。

研究協力者

高橋孝雄 慶應大学医学部小児科 教授
佐藤玲子 慶應大学医学部薬剤部 助手
田村和代 慶應大学医学部小児科 若手医師
鮫島葉月 慶應大学医学部小児科研究室
研究員

は CLB の主たる代謝産物であり、血中濃度が長く、定常状態における血中濃度はその親化合物である CLB に比べても極めて高いので、CLB 治療における効果や副作用の発症に大きな影響を与える。したがって親化合物である CLB だけではなく、この代謝産物である N-CLB の血中濃度も合わせて常に測定すべきであると推奨されている。この点において N-CLB の血中濃度と体重当たりの CLB 投与量の比率に非常に大きな個人差があることは特記すべきことである。同じように N-CLB/CLB 血中濃度比にも大きな個人差が認

A. 研究目的

CLB はベンゾジアゼピン系の抗痙攣薬であり、しばしば他の抗痙攣剤と併用されている。N-CLB

められている。

N-CLB 濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比の個人差は、部分的に併用薬の影響として説明されている。特にフェノバルビタール・カルバマゼピン・フェニトインといった薬を併用している患者でこの影響が認められている。これらの薬を併用すると CYP3A4 が誘導される。CYP3A4 は CLB を N-CLB に代謝する薬であるので、N-CLB/CLB 比は上昇する。しかしながら CYP3A4 を誘導する効果のある薬を併用していない症例においても、血中の CLB の初期投与量から N-CLB 濃度を予測することは難しい。

最近、CYP2C19 の阻害剤であるフェルバメート併用患者において N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度の比が上昇することが示され、N-CLB の代謝に CYP2C19 が関与する可能性が示唆された。また N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比が上昇しているイタリア人 2 症例が報告され、2 名のうちの 1 名は CYP2C9 の変異アレルホモ接合体、1 人はヘテロ接合体であった。

CYP2C19 の第 5 エクソン内のグアニンからアデニンへの単塩基置換はスプライス部位の変化を起こし mRNA の reading frame をシフトされる。この結果、第 215 番目アミノ酸以降から読み枠がずれて 20 アミノ酸後方においてストップコドンが精製する。この変異を P450 変異アレルの国際記名法では*2 アレルと称する。CYP2C19 の第 4 エクソン内の第 636 塩基におけるグアニンからアデニンへの単塩基置換もストップコドンを生成する。この変異を*3 アレルと称する。CYP2C19 の*2 および*3 アレルはともに機能を持たないタンパクを生成する。*2 および*3 の変異アレルの頻度には人種間差が存在することが知られている。

*2*アレルと 3 アレルを組み合わせたアレル頻度は日本人において 35%と特に高い上、*2 と*3 アレルにより日本人における低代謝能者 poor

metabolizer のほとんど全員を説明しうる。これに対して、*2 アレルと*3 アレルを組み合わせたアレル頻度は白人においては 20%である。本研究では、上掲のごとき日本人の特殊な人口構成に着目し、CYP2C19 の遺伝子型の N-CLB および CLB の代謝に対する影響を検討した。

B.研究方法

慶應義塾大学病院小児神経外来に通院中の 1.5 歳から 33 歳（中央値 7 歳）の 16 名のてんかん患者を対象とした（表 1）。全ての患者は CLB 錠剤ないし顆粒製剤（大日本製薬マイスタン）を経口投与されていた。少なくとも 4 週間、処方量に変化のない患者を対象とした。6 名中 16 名は基礎神経疾患（硬膜下血腫、脳内出血、髄膜脳炎、巨脳症、神経線維腫症、脳膿瘍）を有していた。全ての患者は CLB の他の抗痙攣薬を併用していた。7 名の患者は少なくとも 1 剤の CYP3A4 誘導性抗痙攣薬（フェノバルビタール・カルバマゼピン・フェニトイン）を内服しており、一方 9 名の患者は CYP3A4 非誘導性の抗痙攣薬（バルプロ酸・エドサクシミド・ゾミサミド）を内服していた。

CLB と N-CLB の血中濃度はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー法によって測定された。本研究では 1 点において採血した血中濃度を定常状態の血中濃度であると仮定した。というのは CLB の投与後、4 日以内に CLB の血中濃度は定常状態に達し、10 日以内に N-CLB の血中濃度も定常状態に達することが以前の研究で知られているからである。この研究プロトコルは院内の倫理委員会により承認され、全ての参加患者あるいはその両親は書面にてインフォームド・コンセントを提出している。キアゲン社の脱塩カラムを用いて全血からゲノム DNA を抽出した。CYP2C19 の*2 および*3 アレルを PCR 法により増幅し、PCR 産物は自動シーケンサー（ABI3100）または熱変成高速液体クロマトグラフィー（トラ

ンスジェノミック社 WAVE)法を用いて解析した。CYP2C19 の*2 アレルと*3 アレルはともに蛋白の機能を消失させることから両者のプアメタボライザ表現型に対する寄与は同程度であると判断した。そこで患者を変異アレルの総数によって以下のごとくに分類した。

グループ 1 : CYP2C19*1*1

グループ 2 : CYP2C19*1*2 または

CYP2C19*1*3

グループ 3 : CYP2C19*2*2, CYP2C19 *3*3,

CYP2C19*2*3

さらに患者を CYP3A4 誘導性の抗癌薬の併用の有無によっても分類した。反応変数として CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB 血中濃度/CLB 血中濃度比を採用し、二元配置分散分析法によってその差を比較した。

C. 研究結果

各遺伝子型に属した患者数は以下の通りであった。

CYP2C19*1*1 : 7 名、CYP2C19*1*2 : 4 名、

CYP2C19*1*3 : 2 名、CYP2C19*2*2 : 2 名、

CYP2C19*3*3 : 0 名、CYP2C19*2*3 : 1 名

よってグループ 1 に属する患者は 7 名、グループ 2 に属する患者は 6 名、グループ 3 に属する患者は 3 名であった。

3 グループにおいて患者の背景因子 (年齢、性別、体重、投与量、体重の比率) に有意な差を認めなかった (表 1)。CLB 濃度と N-CLB の濃度を CLB の体重当たりの投与量によって平準化した (図 1)。CLB 血中濃度/CLB 投与量比の平均値はグループ 1、2、3 においてそれぞれ 443, 819, and 457 ng/ml/mg/kg/day であった (図 1A)。N-CLB の血中濃度/CLB 投与量比の各グループの値は 2111, 7156, 13504 ng/ml/mg/kg/day であった。したがって CYP2C19 変異アレルの数は

N-CLB の血中濃度・CLB 投与量比に影響を与えていた。CYP2C19 変異アレル数は CLB 血中濃度/CLB 投与量比に影響を与えていなかった。N-CLB/CLB 血中濃度比は変異アレル数に依存して増加していた。これらの成績は遺伝子量効果 gene dosage effect を示していた (図 2)。

グループ 1~3 において CYP3A4 誘導性の抗癌薬の併用患者は CLB 血中濃度/CLB 投与量比が低めであり N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比が低めであり、N-CLB/CLB 血中濃度比が高い傾向が認められた (図 2)。そこで CYP3A4 誘導性併用薬併用患者と非併用患者の間における CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比、N-CLB/CLB 血中濃度比の差を 2 次元配置分散分析により比較した。CLB 血中濃度/CLB 投与量比は変異アレル数によらず、不変であったが ($p=0.63$)、3A4 誘導性抗癌薬の併用群において有意に低下していた ($p=0.005$)。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比は変異アレル数に大きく依存しており ($p<0.0001$)、CYP3A4 誘導性薬剤の併用群において著明に低下していた ($p=0.001$)。N-CLB/CLB 血中濃度比も変異アレル数に依存しており ($p<0.0001$)、CYP3A4 誘導性の抗癌薬の併用群において著明に増加していた ($p=0.004$)。

D. 考察

本研究においてわれわれは CYP2C19 の多型 (*2 多型と*3 多型) と N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比について遺伝子型と表現型の関連を示した。変異アレルを 2 コピー持つ患者では野生型の患者に比べて N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および N-CLB/CLB 血中濃度比はともに著明に上昇していた。変異アレルを 1 コピー持つ患者群は両者の中間的な性質を示していた。これらの成績は CYP2C19 が N-CLB の分解に関わることを示唆する所見であった。