

各グループの患者が CYP3A4 を誘導する薬を併用していたがどうかによって区分した際には、併用患者において CLB 血中濃度/CLB 投与量比は低値である、N-CLB/CLB 血中濃度比は高値であった。これらの変動は併用薬により CYP3A4 が誘導された結果、CLB から N-CLB への代謝が亢進したためであると理解される。しかし CYP2C19 の多型の方が、CYP3A4 誘導性の薬剤よりも、N-CLB 代謝に大きな影響を与えていた。以上の成績から、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関わらず、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 の副作用を起こしやすいかどうか、さらなる検討が必要である。血中の N-CLB/CLB の投与量比は CYP2C19 の多型を推定する上で有用なパラメーターになりうると考えられた。変異アレルを 2 コピー有していた 3 人の N-CLB/CLB 血中濃度比は全て 25 以上であった。CLB 治療の投与開始直後において CLB 投与量比を測定すれば、副作用を発症する可能性のある人間を予測することができるかと期待できる。このような注意はアジア人のように CYP2C19 変異アレルの頻度が高い人口集団においては特に臨床的に意味があると考えられる。ただし CYP3A4 誘導性の抗痙攣剤を併用している者においては変異アレル数が 1 コピーの患者でも N-CLB/CLB 血中濃度比が上昇

しうることを考慮するべきである。

N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比の上昇の程度と N-CLB/CLB 血中濃度比の上昇の程度は CYP2C19 の変異アレル数に依存していた。このような遺伝子量効果は、クロバザムと同様に CYP2C19 によって代謝されるオンペラゾール（プロトンポンプ阻害剤）の研究成績とよく類似している。オンペラゾールによってヘリコバクター・ピロリ感染症を随伴する胃潰瘍を治療する際に、CYP2C19 の変異アレルを 2 コピー有する患者あるいは 1 コピー有する患者においてより治療効果が高いことが示されている。このような治療効果の増大は血中濃度の上昇と関連していると考えられている。CLB 治療においても、オンペラゾールのように、CYP2C19 の変異アレル数と治療効果の関連についても、遺伝子量効果が認められるかどうか検証する必要がある。

本研究について検討を要する事項が 2 点ある。まず、CLB と N-CLB の血中濃度は単点測定の結果であった、複数の測定点によって検証されたものではない点が上げられる。より正式な母集団薬物動態学的な検討によって患者の CYP2C19 の遺伝子型が N-CLB の血中濃度にどのような影響を与えるか評価が必要である。次に患者は\*2\*3 アレルについてのみ検討を行われ、その他の CYP2C19 の変異があったかどうかについては検討していない点があげられる。したがって本研究において\*2 あるいは\*3 のヘテロ接合体であると判断された者が実際には他の変異アレルも持っている複合ヘテロ接合体であるという可能性も理論的には考えられる。しかし日本人以外の\*2\*3 アレル頻度が非常に低いという結果を参考にすればこのような心配は主に理論的なものであると考えられる。

本研究で示されたように、新しい抗痙攣薬の評価を行う際には薬物代謝酵素の遺伝子多型が重要な攪乱因子であることを認識すべきであり、当該薬剤ばかりでなく当該薬剤の代謝産物が多型性のある薬物代謝酵素により代謝される場合に

も十分な注意が必要である。また、薬物代謝酵素の多型に大きな民族差が存在しうることを勘案すると、特定の民族集団において得られた薬物臨床試験の成績を他の地域に外挿して承認申請する場合に、十分な注意が必要である。最後に我々はてんかんやその他の慢性疾患の薬物療法をより良いものとするためには CYP 酵素の多型と当該薬剤の薬物代謝および薬物動力学についての関係を十分に確立することが重要であるという点を強調したい。

#### E. 結論

Desmethyl N-clobazam は、抗てんかん薬 clobazam の主たる代謝産物であって、clobazam の治療効果および副作用の発現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。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### <論文発表>

Kosaki K, Tamura K, Sato R, Samejima H, Tanigawara Y, Takahashi T. A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethyloclobazam. *Brain and Development*, in press.

Yahagi N, Kosaki R, Ito T, Mitsuhashi T,

Shimada H, Tomita M, Takahashi T, Kosaki K. Position-specific expression of Hox genes along the gastrointestinal tract. *Congenital Anomalies* 2004; 44:18-26

Shimada H, Mori T, Shimasaki N, Shimizu K, Takahashi T, Kosaki K. Somatic PTPN11 mutation with a heterogeneous clonal origin in children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*, in press.

##### <学会発表>

Kosaki K, Utaka T, Samejima H, Fujita H, Yahagi N, Takahashi T. The COPPER plate system: Effective use of DHPLC for clinical genetics and pharmacogenetics.

American College of Medical Genetics Annual Clinical Genetics Meeting, March 2004 Orlando, FL, USA

小崎健次郎、前山克宏、菅谷明則、百々秀心、山岸敬幸、高橋孝雄

CYP2C19\*3 ヘテロ接合体患者におけるワーファリン投与量のメタ解析

第107回日本小児科学会学術集会、平成16年4月、岡山

#### H. 参考文献

- [1] Bun H, Coassolo P, Gouezo F, Serrandimigni A, Cano JP. Time-dependence of clobazam and N-demethylclobazam kinetics in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1986;24:287-293.
- [2] Shorvon SD. Benzodiazepines: Clobazam. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, editors. *Antiepileptic drugs*. New York:

- Raven Press; 1995. p. 763-777.
- [3] Nakamura F, Suzuki S, Nishimura S, Yagi K, Seino M. Effects of clobazam and its active metabolite on GABA-activated currents in rat cerebral neurons in culture. *Epilepsia* 1996;37:728-735.
- [4] Bun H, Monjanel-Mouterde S, Noel F, Durand A, Cano JP. Effects of age and antiepileptic drugs on plasma levels and kinetics of clobazam and N-desmethyloclobazam. *Pharmacol Toxcol* 1990;67:136-140.
- [5] Sennoune S, Mesdjian E, Bonneton J, Genton P, Dravet C, Roger J. Interactions between clobazam and standard antiepileptic drugs in patients with epilepsy. *Ther Drug Monit* 1992;14:269-274.
- [6] Contin M, Riva R, Albani F, Baruzzi AA. Effect of felbamate on clobazam and its metabolite kinetics in patients with epilepsy. *Ther Drug Monit* 1999;21:604-608.
- [7] Riva R, Albani F, Contin M, Baruzzi A. Pharmacokinetic interactions between antiepileptic drugs. *Clinical considerations. Clin Pharmacokinet* 1996;31:470-493.
- [8] Goldstein JA, Faletto MB, Romkes-Sparks M, Sullivan T, Kitareewan S, Raucy JL, et al. Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry* 1994;33:1743-1752.
- [9] Andersson T, Regardh CG, Dahl-Puustinen ML, Bertilsson L. Slow omeprazole metabolizers are also poor S-mephenytoin hydroxylators. *Ther Drug Monit* 1990;12:415-416.
- [10] Contin M, Sangiorgi S, Riva R, Parmeggiani A, Albani F, Baruzzi A. Evidence of polymorphic CYP2C19 involvement in the human metabolism of N-desmethyloclobazam. *Ther Drug Monit* 2002;24:737-741.
- [11] Parmeggiani A, Posar A, Sangiorgi S, Giovanardi-Rossi P. Unusual side-effects due to clobazam: A case report with genetic study of CYP2C19. *Brain Dev* 2003;26:63-66.
- [12] Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:349-355.
- [13] Ingelman-Sundberg M. Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* 2002;181-182:447-452.
- [14] de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* 1994;269:15419-15422.
- [15] de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 1994;46:594-598.
- [16] Drouet-Coassolo C, Aubert C, Coassolo P, Cano JP. Capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for the identification and quantification of some benzodiazepines and their unconjugated metabolites in plasma. *J Chromatogr* 1989;487:295-311.
- [17] Itoh K, Inoue K, Nakao H, Yanagiwara S, Tada H, Suzuki T. Polymerase chain reaction-single-strand conformation

polymorphism based determination of two major genetic defects responsible for a phenotypic polymorphism of cytochrome P450 (CYP) 2C19 in the Japanese population. *Anal Biochem* 2000;284:160-162.

characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics* 2002;12:703-711.

- [18] Kosaki K, Suzuki T, Muroya K, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, et al. PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3529-3533.
- [19] Fielding S, Hoffman I. Pharmacology of antianxiolytic drugs with special reference to clobazam. *Br J Clin Pharmacol* 1979;7 supplement:7-15.
- [20] Haigh JR, Pullar T, Gent JP, Dailley C, Feely M. N-desmethyl-clobazam: a possible alternative to clobazam in the treatment of refractory epilepsy. *Br J Clin Pharmacol* 1987;23:213-218.
- [21] Furuta T, Ohashi K, Kamata T, Takashima M, Kosuge K, Kawasaki T, et al. Effect of genetic differences in omeprazole metabolism on cure rates for *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer. *Ann Intern Med* 1998;129:1027-1030.
- [22] Mamiya K, Hadama A, Yukawa E, Ieiri I, Otsubo K, Ninomiya H, et al. CYP2C19 polymorphism effect on phenobarbitone. Pharmacokinetics in Japanese patients with epilepsy: analysis by population pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;55:821-825.
- [23] Blaisdell J, Mohrenweiser H, Jackson J, Ferguson S, Coulter S, Chanas B, et al. Identification and functional

<付図>

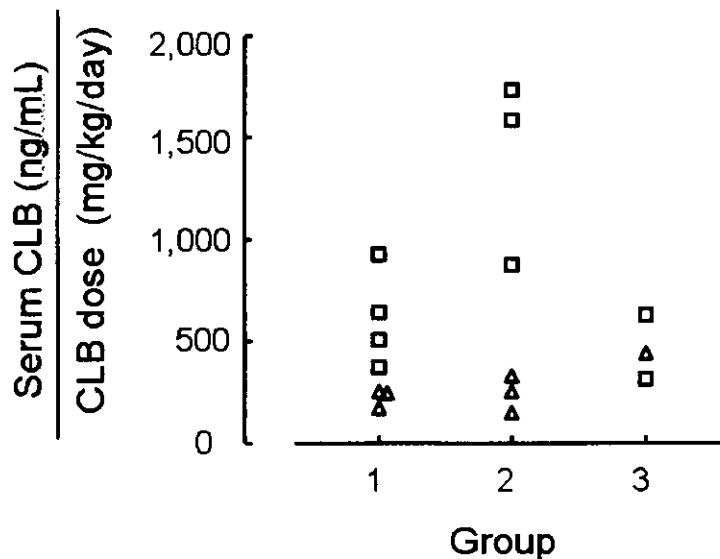


図 1-A(上)

血中クロバザム(CLB)濃度 / クロバザム投与量比 に与える CYP2C10 多型の遺伝子量効果

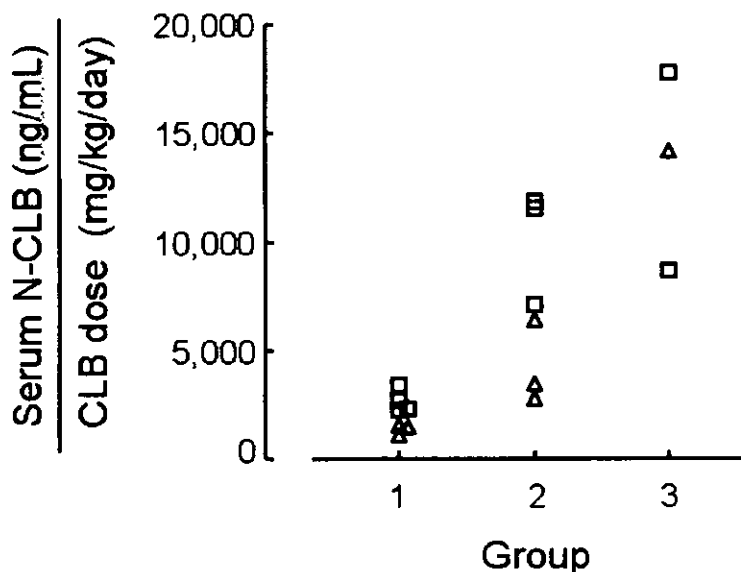


図 1-B(下)

血中 N-デスメチルクロバザム(N-CLB)濃度 / クロバザム投与量比に与える CYP2C10 多型の遺伝子量効果

※患者は変異アレルの総数により3グループに分類された。

(横軸): group 1, CYP2C19 \*1/\*1;

group 2, CYP2C19 \*1/\*2 or

CYP2C19 \*1/\*3;

group 3, CYP2C19 \*2/\*2, CYP2C19 \*3/\*3, or CYP2C19 \*2/\*3.

△: CYP3A4 誘導性の抗けいれん剤併用患者,

□: CYP3A4 非誘導性の抗けいれん剤併用患者

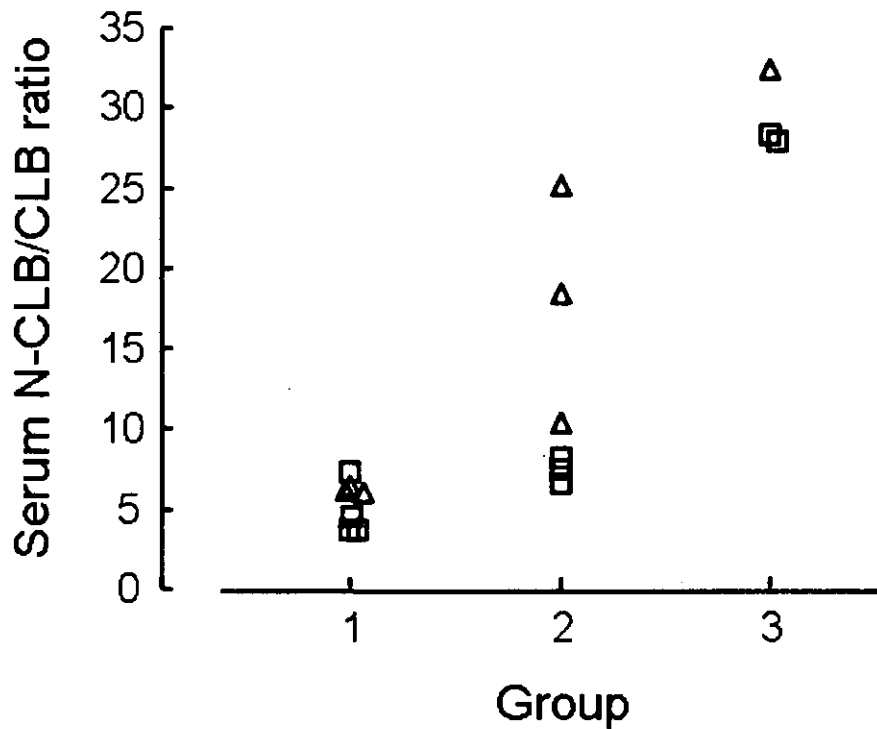


図2 血中N-デスメチルクロバザム濃度 / 血中クロバザム濃度比に与える CYP2C19 多型の遺伝子量効果

※患者は変異アレルの総数により3グループに分類された。

(横軸): group 1, CYP2C19 \*1/\*1;

group 2, CYP2C19 \*1/\*2 or CYP2C19 \*1/\*3;

group 3, CYP2C19 \*2/\*2, CYP2C19 \*3/\*3, or CYP2C19 \*2/\*3.

△: CYP3A4 誘導性の抗けいれん剤併用患者,

□: CYP3A4 非誘導性の抗けいれん剤併用患者

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 (慶應義塾大学医学部小児科 助教授)

(分担研究課題) 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

(分担研究者) 熊谷昌明 (国立成育医療センター血液腫瘍科 医員)

研究要旨

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/m<sup>2</sup>) 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。15 例における 43 回の MTX 投与を解析対象とした。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。

研究協力者

森 鉄也 慶應義塾大学医学部小児科 助手  
島崎紀子 慶應義塾大学医学部小児科 助手  
矢作尚久 慶應義塾大学医学部小児科  
若手医師

leukemia: 以下 ALL) やリンパ腫など小児リンパ系腫瘍の治療において key drug として使用されている薬剤であり、葉酸に対する拮抗作用によりその効果を発揮する<sup>(1)</sup>。大量 MTX 療法はロイコボリン救済 (calciumfolinate rescue: 以下 CFR) と併用して小児 ALL に対する中枢神経浸潤予防療法として広く用いられているが、一方で時に深刻な毒性を伴う。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。毒性

A. 研究目的

メソトレキセート (methotrexate:以下 MTX) は急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic

発症の危険因子のひとつとしてMTXの体内薬物動態(血中濃度, area under the curve: AUCなど)が報告されている<sup>(2,3)</sup>。しかし一方で、一部の症例における毒性発症の予測は困難であり、患者間の個体差が毒性発症に関与している可能性が示されている<sup>(4,5)</sup>。

Methylenetetrahydrofolate reductase (以下MTHFR)は葉酸およびメチオニン代謝に重要な役割を担う酵素であり、

5,10-methylenetetrahydrofolateを5,10-methyltetrahydrofolateに変換する。高頻度に認められる多型であるMTHFR 677C/Tにおいて、変異アレル(T)数の増加はMTHFR活性の低下を生じる<sup>(6)</sup>。近年、低用量MTX投与に伴う消化管、または肝毒性はMTHFR 677T変異例において、より高頻度に認められることが報告された<sup>(5,7,8)</sup>。一方、Kishiらは大量MTX投与後の中枢神経毒性の発症はMTHFR 677C/T多型と明らかな関連がないことを報告した<sup>(9)</sup>。

Reduced folate carrier 1 (以下RFC1)はMTXを細胞内に取り込む主要なtransporter分子であり、RFC1 80G/A多型を高頻度で認める<sup>(10)</sup>。近年、RFC1 80A変異を有するALL例はRFC1 80GG遺伝子型例よりも予後不良であること、RFC1 80AA遺伝子型例は他の遺伝子型例よりもMTX血中濃度が高値を示すことが報告された<sup>(11)</sup>。

MTHFRおよびRFC1の多型がMTX関連毒性発症の個体差に関与するとすれば、これらの分子の多型解析は「患者個人に最適なMTX投与法」の確立に貢献すると考えられる。我々は、小児ALLあるいはリンパ芽球性リンパ腫症例において、MTHFR 677C/T、およびRFC1 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。

## B. 研究方法

### ・患者および治療

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/m<sup>2</sup>)の投与が行われた症例を研究対象とした。化学療法には東京小児がん研究グループ(Tokyo Children's Cancer Study Group: TCCSG)によるTCCSG L92-13, L95-14, L99-15, NHL-T9604のいずれかのプロトコールがインフォームドコンセントを得た後に用いられた<sup>(12)</sup>。すべてのプロトコールのStandard Risk群、およびL92-13, L99-15, NHL-T9604プロトコールのHigh Risk群において他の細胞障害性薬剤の全身投与の併用なく大量MTX (3g/m<sup>2</sup>)の投与が行われた。いずれのプロトコールにおいても寛解導入療法、および早期強化療法後に、各症例に対し2回または3回のMTX (3g/m<sup>2</sup>)の投与が髄腔内投与療法とともに行われた。MTXの投与法は、初回は12時間、2回目以降は24時間の持続点滴静注で、MTX投与開始30時間後から6時間毎に6回のロイコボリン救済(15mg/m<sup>2</sup>)が併用された。MTX血中濃度遷延例ではプロトコールの指示に従いロイコボリン救済が増量された。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

MTX投与開始から次の細胞障害性薬剤の全身投与までの期間(プロトコールの指示)に生じた毒性を「MTXによる毒性」と評価した。身体理学所見、血液・尿検査、必要に応じ放射線検査を用いて評価を行った。血清中のMTX濃度はMTX投与開始後48時間、72時間値(必要に応じて以降も)を測定した。毒性の評価は

National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (以下NCI-CTC) version 2.0

(<http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>で入手可能)に基づいた。

### ・遺伝子多型解析

本研究における遺伝子多型解析は慶應義塾大学医学部倫理審査委員会の審査・承認を得たもの



である。患者あるいは代諾者からの同意取得後、解析を行った。全血ないし腫瘍細胞からゲノムDNAを抽出し、以下のプライマーを用いて、PCR増幅を行い、直接シーケンシング法および熱変性高速液体クロマトグラフィー法によりジェノタイプングを行った。

解析の各条件は以下の通りである。

#### MTHFR 677C/T

Foward -CTCTCCTGACTGTCATCCCTATTG

Reverse -GAACTCAGCGAACTCAGCACTC

#### RFC1 80G/A

Foward -CTGCAGACCATCTTCCAAGGTG

Reverse -GTAGGGGGTGATGAAGCTCTC

#### PCR 条件 (反応液量 20.0 $\mu$ L)

テンプレートゲノム DNA: 50 ng 0.5 U

High Fidelity Platinum Taq ポリメラーゼ (インビトロジェン)

MgSO<sub>4</sub> 濃度: 2mM、dNTP 濃度: 0.2 mM

アニール温度: 60 °C、35 回

#### DHPLC 条件

##### MTHFR 677C/T

カラム温度: 61.5 °C

タイム・シフト: +2.0 分

##### RFC1 80G/A

カラム温度: 63.7 °C

タイム・シフト: -1.0 分

#### ・統計

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。同一患者における複数の投与に対する解析が検定結果に影響することを補正する目的で、毒性発症に関与する因子の統計解析には generalized estimating equations 法 (以下 GEE 法) を用いた

(13)。 (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。統計処理には SAS program software を使用した。p 値<0.05 を有意と判定した。

#### C. 実験結果

##### ・対象患者

1992 年から 2003 年の間に 21 例の対象疾患に対して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/m<sup>2</sup>) の投与が行われた。このうち 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。対象患者情報を表 1 に示す。すべての症例は生存中で寛解を維持していた。年齢の中央値は 6 歳 (1-14 歳)、性別は男 6 例、女 9 例であった。43 回の MTX 投与のうち 10 回の投与で CFR の増量が行われた。葉酸代謝関連遺伝子の多型解析の結果は、MTHFR 677C/T : CC 8 例 (53%)、CT 6 例 (40%)、TT 1 例 (7%)、および RFC1 80G/A : GG 4 例 (27%)、GA 7 例 (47%)、AA 4 例 (27%) であった。

##### ・MTX 関連毒性の種類と頻度

2 例に重大な毒性を認めた。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。その他の観察された毒性の頻度を表 2 左列に示す。頻度の高い毒性は嘔吐、口内炎、肝逸脱酵素

値の上昇(以下、肝機能障害)、血球減少であった。最も高い頻度で観察された毒性は NCI-CTC Grade3 以上の血球減少であり、13/15 例(87%)、22/43 投与(51%)の頻度であった。非血液毒性では NCI-CTC Grade2 以上の肝機能障害が最も高い頻度であった(7/15 例:47%、15/43 投与:33%)。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。図1に各症例の大量 MTX 投与後の血清 ALT の最高値を示す。その他の毒性で同様の傾向は明らかでなかった。

#### ・MTX 血中濃度と毒性の関連

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を GEE 法により解析した(表2 左列)。投与開始 48 時間後の MTX 血中濃度と毒性発症の間に有意な関連を認めなかった。CFR 増量の有無と毒性発症の関連を同様に GEE 法で解析した(表2 右列)。CFR 増量例では、NCI-CTC Grade4 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, MTHFR 677C/T 多型と毒性の関連

RFC1 80G/A における A アレル数と毒性発症の関連を GEE 法で解析した(表3 左列)。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(表3 右列)。RFC1 80G/A における A アレル数、および MTHFR 677C/T における T アレル数の増加と CFR 増量の関連を GEE 法で解析したが、いずれも有意な関連を認めなかった(表4)。

#### D. 考察

大量 MTX 療法は、今日の小児 ALL、およびリン

パ腫治療において重要な役割を担っているが、予測できない毒性発症により治療スケジュールの遅延、薬剤の減量を余儀なくされることも稀ではない。さらに、これらの治療スケジュールの遅延、薬剤の減量は、治療成績に悪影響をもたらす可能性が推測される。したがって毒性発症に関与する因子の検索は、「患者個人に最適な治療」の確立を目指す上で重要な課題と考えられる。近年、MTHFR あるいは RFC 1 多型と低用量 MTX の長期投与に伴う毒性発症の関連を検討した報告を散見する<sup>(5,7,8,11,14)</sup>。一方、より重大な毒性を発症し得る大量 MTX 療法に伴う毒性についての解析は、中枢神経毒性との関連を解析した Kishi らの報告のみである<sup>(9)</sup>。MTHFR あるいは RFC 1 多型と MTX 関連毒性発症の関係には、いまだ一定の見解は得られていない。

大量 MTX 療法による口内炎や肝機能障害発症に MTX 血中濃度、AUC が関連することが報告されている<sup>3)</sup>。今回の解析では、投与開始 48 時間後の MTX 血中濃度と、各種毒性の発症に有意な関連を認めなかった。一方、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。

大量 MTX 投与後の肝機能障害は特定の症例に繰り返し発症する傾向が認められた。今回の解析において他の毒性に同様の傾向は認められなかった。また、肝機能障害発症と MTX 血中濃度、および CFR 増量に明らかな関連を認めなかった。これらの結果から、大量 MTX 投与後の肝機能障害発症

に個体差が関与する可能性が示唆された。今回の解析は少数例を対象とした後方視的解析であり、対象症例数を増加することにより他の毒性にも同様の傾向が生じる可能性も考えられる。

MTHFR 677C/TあるいはRFC 1 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。他の毒性発症とMTHFRあるいはRFC1多型の関連は明らかでなかった。これまでに低用量MTX投与に伴う消化管、または肝毒性は、MTHFR 677T変異例において発症頻度が高いことが報告されている<sup>(5,7,8,14)</sup>。今回の解析でMTHFR 677C/T多型と毒性発症に有意な関連を認めなかった原因として、MTX関連毒性の発症はMTXの用量や期間により関与する因子が異なる可能性、今回の解析対象のうちTT遺伝子型は1例のみであったことから症例数を増加すると異なる結果につながる可能性が考えられる。

大量MTX投与後の血中濃度とMTHFR 677C/TあるいはRFC 1 80G/A多型の関連は明らかでない。今回の解析でMTHFR 677C/TおよびRFC1 80G/A多型とCFRの増量に有意な関連を認めなかった。CFR増量がMTXの排泄遅延を反映する因子であると考えれば、MTHFR 677C/TおよびRFC1 80G/A多型は大量MTX投与後のMTX排泄遅延に関与しないと考えられる。MTX投与による各臓器における毒性発症の詳細な機序は明らかでない。それぞれの毒性発症がMTX自体の標的臓器への直接作用であるのか、間接的な作用が主体であるのかも明確ではない。「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。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

### <論文発表>

Shimada H, Mori T, Shimasaki N, Shimizu K, Takahashi T, Kosaki K. Somatic PTPN11 mutation with a heterogeneous clonal origin in children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*, in press.

### <学会発表>

Kosaki K, Utaka T, Samejima H, Fujita H, Yahagi N, Takahashi T.

The COPPER plate system: Effective use of DHPLC for clinical genetics and pharmacogenetics American College of Medical Genetics Annual Clinical Genetics Meeting, March 2004 Orlando, FL, USA

メトトレキセート関連急性毒性と薬物血中濃

## 度・個体差の関連

島崎紀子, 森鉄也, 嶋田博之, 木下明俊, 小崎健次郎, 高橋孝雄

第45回日本小児血液学会、金沢、2003

造血幹細胞移植後に生じる低身長の予後改善に関する検討 成長曲線を用いた追跡調査

嶋海覚志(慶応義塾大学 医学部 小児科), 森鉄也, 嶋田博之, 島崎紀子, 木下明俊, 長谷川奉延, 高橋孝雄

第45回日本小児血液学会、金沢、2003

## H. 参考文献

(1) Jonsson G, Kamen A. Methotrexate and childhood leukemia. *Cancer Invest* 9:53-60, 1991

(2) Relling V, Fairclough D, Ayers D, Crom R, Rodman H, Pui H, Evans E. Patient characteristics associated with high-risk methotrexate concentrations and toxicity. *J Clin Oncol* 12:1667-1672, 1994

(3) Rask C, Albertioni F, Bentzen S, Schroeder H, Peterson C. Clinical and pharmacokinetic risk factors for high-dose methotrexate-induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Oncologica* 37:277-284, 1998

(4) Balis F, Holcenberg J, Polack D, Ge J, Sather H, Murphy R, Ames M, Waskerwitz M, Tubergen D, Zimm S, Gilchrist G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate and mercaptopurine in children with lower risk acute lymphoblastic leukemia: a joint children's cancer group and pediatric oncology branch study. *Blood* 92:3569-3577, 1998

(5) Chiusolo P, Reddicono G, Laurenti C, Mele F, Annino L, Leone G, Sica S. Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Annals of Oncology* 13:1915-1918, 2002

(6) Frosst P, Blom J, Milos R, Goyette P, Sheppard A, Matthews G, Boers J, den Heijer M, Kluijtmans A, Heuvel P. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113, 1995

(7) Ulrich C, Yasui Y, Storb R, Schubert M, Wagner J, Bigler J, Ariail K, Keener C, Li S, Liu H, Farin F, Potter J. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 98:231-234, 2001

(8) Ede A, Laan R, Blom H, Boers G, Haagsma C, Thomas C, Boo T, Putte L. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 41:658-665, 2002

(9) Kishi S, Giener J, Cheng C, Das S, Cook E, Pei D, Hudson M, Rubnitz J, Sandlund J, Pui C, Relling M. Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *J Clin Oncol* 21:3084-3091, 2003

(10) Chango A, Emery-Fillon N, Courcy P, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt D, Nicolas J. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Molecular Genetics and Metabolism* 70:310-315, 2000

(11) Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajinovic M. Polymorphism G<sub>80</sub>A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and

outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 15:3832-3834, 2002

(12) Tsuchida M, Ikuta K, Hanada R, Saito T, Isoyama K, Sugita K, Toyoda Y, Manabe A, Koike K, Kinoshita A, Maeda M, Ishimoto K, Sato T, Okimoto Y, Kaneko T, Kajiwara M, Sotomatsu M, Hayashi Y, Yabe H, Hosoya R, Hoshi Y, Ohira M, Bessho F, Tsunematsu Y, Tsukimoto I, Nakazawa S. Long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukemia in Tokyo Children's Cancer Study Group 1981-1995. *Leukemia* 14:2295-2306, 2000

(13) Hanley JA, Negassa A, Edwardes MD, Forrester JE. Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation. *Am J Epidemiol* 157:364-375, 2003

(14) Toffoli G, Russon A, Innocenti F, Corona G, Tumolo S, Sartor F, Mini E, Boilocchi M. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 103:294-299, 2003

図の説明

図1

大量MTX投与後の血清ALTの最高値

(縦軸は患者ID、横軸は血清ALT値を示す。各患者毎2-3回の大量MTX投与後の血清ALTの最高値を表示。)

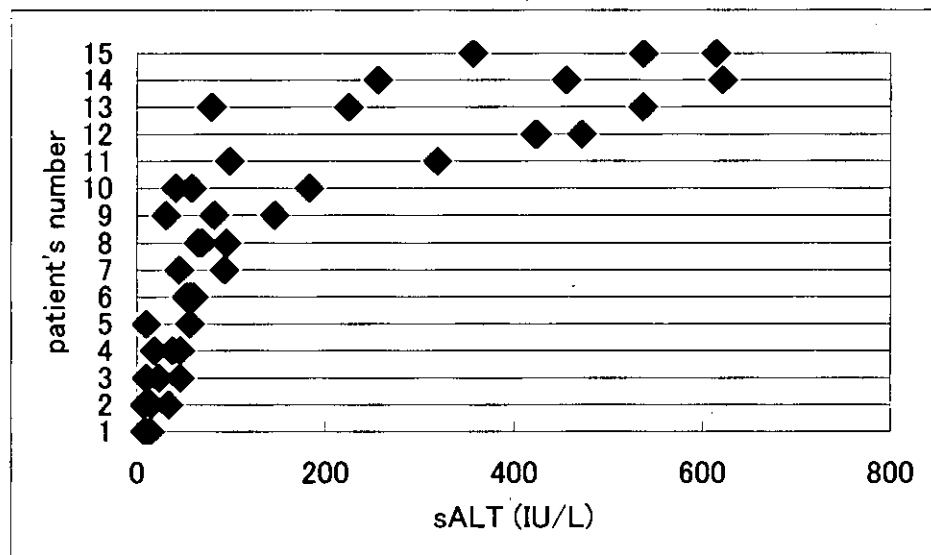


表1

Characteristics of patients

Total number of patients	15
Age at diagnosis (years)	1~14 (median 6)
Sex (male / female)	6 / 9
Number of high-dose MTX courses	43
Number of courses with delayed elimination of MTX†	10
MTHFR 677T/C genotype	
Number of examined patients	15
CC	8 (53%)
CT	6 (40%)
TT	1 (7%)
RFC1 80G/A genotype	
Number of examined patients	15
GG	4 (27%)
GA	7 (47%)
AA	4 (27%)

† The courses in which calciumfolinate rescues were increased because of delayed elimination of MTX  
Abbreviations MTX: methotrexate, MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase, RFC1: reduced folate carrier 1

表 2

GEE estimation analysis between the toxicity and serum MTX concentration at 48 hr

Toxicity	Patients	Cases	Toxicity and MTX concentration at 48hr			Toxicity and increased CFR		
			OR	95% C.I.	p value	OR	95% C.I.	p value
Total number	15	43						
Oral mucositis(≥ Gr.2)	3(20%)	4(9%)	1.96 9	1.144-3. 389	0.166	11.2 44	1.594-7 9.321	0.086
Vomiting(≥ Gr.2)	6(40%)	6(14%)	1.46 4	0.830-2. 582	0.361	3.39 2	0.506-22 .749	0.281
Creatinine(≥ Gr.1)	1(7%)	1(2%)	2.02 8	1.379-2. 986	0.312	NE	NE	NE
sAST or sALT(≥ Gr.2)	7(47%)	14(33%)	0.83 7	0.707-0. 991	0.106	1.04 0	0.356-3. 042	0.945
Hgb or WBC or Plt (≥ Gr.3)	13(87%)	22(51%)	2.89 8	0.692-12 .145	0.056	3.56 2	0.590-2 1.501	0.153
Hgb or WBC or Plt (≥ Gr.4)	6(40%)	8(19%)	1.59 9	1.025-2. 493	0.100	8.31 9	2.355-29 .391	0.032

Abbreviations MTX: methotrexate, sAST: serum aspartate aminotransferase, sALT: serum alanine aminotransferase, Hgb: hemoglobin, WBC: white blood cell, Plt: platelet, Gr.: toxicity grade according to the National Cancer Institute common toxicity criteria version 2.0, NE: not evaluated

表 3

GEE estimation analysis between the toxicity and polymorphism of MTHFR 677C/T, and RFC1 80G/A

Toxicity	Toxicity and number of A alleles in RFC1 80G/A			Toxicity and number of T alleles in MTHFR 677C/T		
	OR	95% C.I.	p value	OR	95% C.I.	p value
Oral mucositis (≥ Gr.2)	3.323	0.707-15.624	0.274	2.052	0.450-8.422	0.385
Vomiting (≥ Gr.2)	0.319	0.141-0.722	0.034	0.588	0.161-2.151	0.401
sAST or sALT (≥ Gr.2)	1.319	0.382-4.554	0.660	1.711	0.355-8.250	0.566
Hgb or WBC or Plt (≥ Gr.3)	0.634	0.271-1.486	0.336	0.811	0.344-1.916	0.635
Hgb or WBC or Plt (≥ Gr.4)	0.594	0.195-1.809	0.394	1.031	0.286-3.723	0.963

Abbreviations MTX: methotrexate, sAST: serum aspartate aminotransferase, sALT: serum alanine aminotransferase, Hgb: hemoglobin, WBC: white blood cell, Plt: platelet, Gr.: toxicity grade according to the National Cancer Institute common toxicity criteria version 2.0, MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase, RFC1: reduced folate carrier 1, OR: Odds ratio, 95% C.I.: 95% confidence interval

表 4

GEE estimation analysis between delayed elimination of MTX and polymorphism of MTHFR 677C/T, and RFC1 80G/A

	Toxicity and number of A alleles in RFC1 80G/A			Toxicity and number of T alleles in MTHFR 677C/T		
	OR	95% C.I.	p value	OR	95% C.I.	p value
Delayed elimination of MTX†	0.637	0.358-1.133	0.145	2.020	0.733-5.566	0.136

Abbreviations MTX: methotrexate, MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase, RFC1: reduced folate carrier 1, OR: Odds ratio, 95% C.I.: 95% confidence interval

† The courses in which calciumfolinate rescues were increased because of delayed elimination of MTX



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) ミ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

(臨床研究指導者) 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

ミクロペニスの治療としてテストステロンエンタート (TE) の筋肉注射が行われている。TE は $5\alpha$ 還元酵素2型によりジヒドロテストステロン (DHT) 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 $5\alpha$ 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DHT (軟膏) 投与が有効と予測される。本研究では、ミ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DHT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DHT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、DHT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。

研究協力者

吉田理恵

慶應義塾大学医学部小児科 助手

では極めて乏しく、多因子疾患としての特発性ミ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DHT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。

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。

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ンタート (TE) の筋肉注射が広く行われている。TE の効果は、TE が $5\alpha$ 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 (DHT) 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 $5\alpha$ 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

B. 研究方法

<対象>

解析に関して両親いずれかの承諾が得られたミクロペニス日本人患者81人(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+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) ARの変異なし、の条件を満たした。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 変異解析>

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、PCR産物をheteroduplex法によるdenaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)法で解析し、遺伝子変異の有無をスクリーニングし、DHPLCの波形がwild typeと異なるPCR産物に対して、直接シーケンス法で塩基配列を決定した。

#### <治療効果>

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DHT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。

### C. 結果

#### <SRD5A2 変異解析>

3症例において変異が同定された。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、ヘテロの状態で検出された。

#### <治療効果>

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軟膏塗布を治験として行い、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

エナンテート 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)。

### D. 考察

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 25mg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。さらに、TE 25mg初回投与時の陰茎長反応が治療前マイクロペニスの程度に無関係であったことは、その効果がマイクロペニスの原因に影響されることを示唆する。すなわち、TE効果は、テストステロン分泌障害によるマイクロペニスでは良好で、外陰部のテストステロンにたいする反応性低下によるマイクロペニスでは不良と推測される。また、TE 25mg初回投与時の陰茎長反応が2回投与群において3回投与群よりも良好であったことは、TE効果が必要注射回数的重要決定因子であることを示唆する。

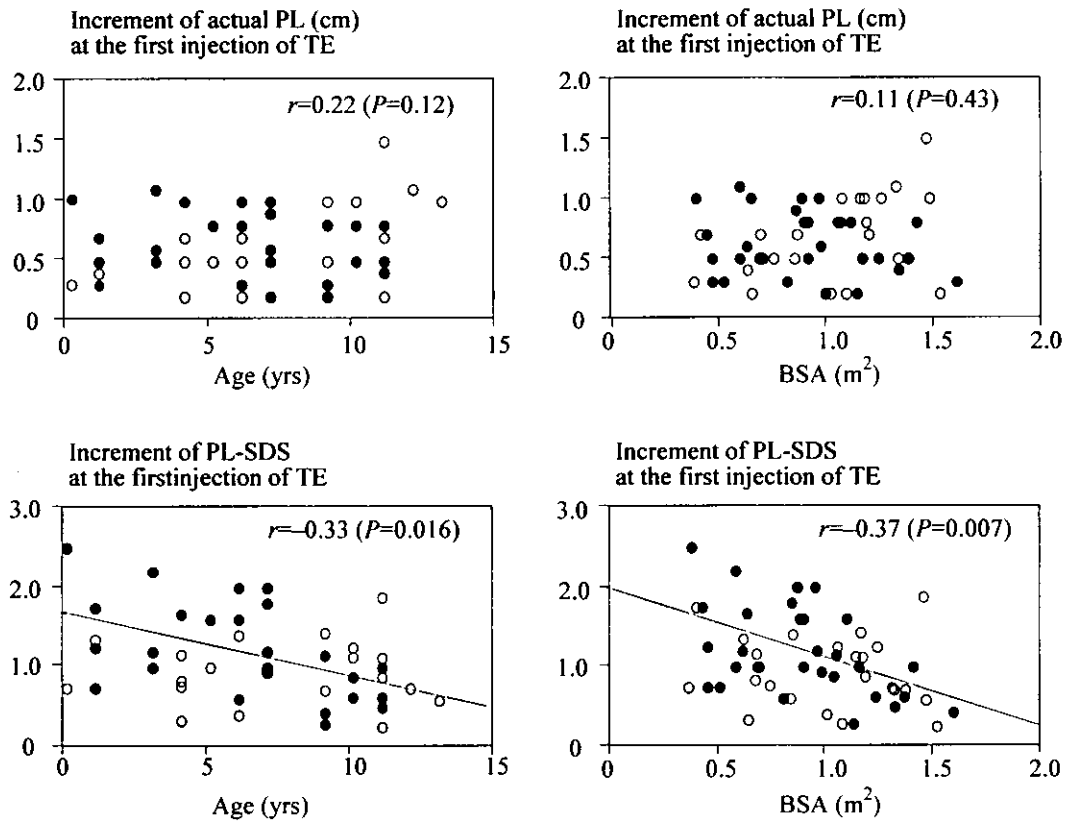


図1. 初回 TE 25mg あたりの陰茎長増加量 (cm)

表1. TE 25 mg 初回投与時の陰茎長増加 (cm)

	軽度群	重度群	2回投与群	3回投与群
Mean±SE	0.65±0.07	0.63±0.05	0.74±0.05	0.51±0.06
Median	0.6	0.6	0.7	0.5
Range	0.2~1.5	0.2~1.1	0.3~1.5	0.2~1.0
患者数	24	29	28	19

E. 結論

マイ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。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

Sasaki G, Ogata T, Ishii T, Kosaki K, Sato S, Homma K, Takahashi T, Hasegawa T, Matsuo N. Related Articles, Links Micropenis and the 5alpha-reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. J Clin Endocrinol Metab:88(7)2003.

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) 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—

(分担研究者) 奥山 虎之 (国立成育医療センター遺伝診療科 高度先進検査室 医長)

#### 研究要旨

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 プローブ、(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。

#### A. 研究の目的

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。これは、リボソーム RNA (rRNA) の立体構造に変化が生じ、アミノ配糖体抗生物質に対する親和性が高まり、ミトコンドリアにおけるタンパク合成が阻害され、その結果、ATP

産生が低下し有毛細胞のイオンポンプ機能が傷害されるためであるとされている。

小児科臨床において、アミノグリコシド系抗生物質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。