

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

ミトコンドリア DNA 遺伝子変異による  
高頻度薬剤性難聴発症の回避に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水柿 道直

平成16（2004）年4月

目 次

I. 総括研究報告		
ミトコンドリアDNA遺伝子変異による高頻度薬剤性難聴発症の回避に関する研究	-----	1
II. 分担研究報告		
ミトコンドリアDNA A1555G変異のベッドサイド遺伝子診断法の開発	-----	6
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11

ミトコンドリアDNA遺伝子変異による高頻度薬剤性難聴発症の回避に関する研究

主任研究者 水柿 道直 東北薬科大学教授

研究要旨

アミノグリコシド系抗生物質の標準用量投与にもかかわらず不可逆的感音性難聴を誘発する患者群がある。本研究は、その原因遺伝子の一つであるミトコンドリア DNA の A1555G 変異を簡易迅速に遺伝子診断する系および既存のアミノグリコシド系抗生物質の毒性をスクリーニングする細胞評価系を確立し、感覚器障害研究の成果を効果的かつ安全な薬物療法に応用するために立案した。平成 15 年度は、感音性難聴患者検体およびボランティア患者（疾患名は連結不可能匿名化のため不明）検体 750 名分よりミトコンドリア DNA A1555G 変異を有する検体をスクリーニングし、ミトコンドリア DNA A1555G 変異を有する 5 名の患者を見いだした。次に、その患者検体を用い、診療現場やベッドサイドで簡易、迅速、精確、低コストでミトコンドリア DNA A1555G 変異の同定が可能な遺伝子診断法を構築した。ここではまず PCR を用いた方法について検討を行った。つまり、野生型対立遺伝子増幅プライマーと変異型対立遺伝子増幅プライマーを用いた対立遺伝子特異的遺伝子増幅法を行い、その際に共通プライマーの 5' 端をビオチンでラベルし、ジゴキシゲン (DIG) -dUTP を用いたミックス中で PCR を行った。鋳型 DNA とプライマー配列が一致すれば、PCR 産物が増幅され、その産物はビオチンと DIG のダブルラベル化体となる。鋳型 DNA とプライマー配列が一致しない場合は、ラベル化 PCR 産物は得られない。次に得られた反応物をイムノクロマトグラフィ-DNA 検出ストリップ（ロシュ・ダイアグノスティックス）にアプライし展開した。ストリップ上には、金コロイドラベルされた抗 DIG 抗体が塗布されたパッドとストレプトアビジンが塗布されたラインが存在し、PCR 産物はサンプルパッド上に滴下され緩衝液により展開される。PCR 産物が増幅されていればストレプトアビジンにビオチンがトラップされ、さらに DIG に結合した金コロイドラベル抗 DIG 抗体が凝集し、紫色のバンドを形成する。つまりストリップを 2 本用意し、一方には野生型プライマーを用いた時の反応液を、もう一方には変異型プライマーを用いた時の反応液をアプライすることによって遺伝子型を視覚的に判別することができる。今回、検出に用いるプライマー配列や反応条件の検討により、PCR 終了後、約 5 分でミトコンドリア DNA A1555G 変異の検出が可能な遺伝子診断法の確立に成功した。また、同法は煩雑な抽出操作を必要とする末梢血から抽出した DNA だけでなく、乾燥ろ紙（Isocode カード）上の血液を直接 DNA 増幅しても診断可能であり、遺伝子診断の時間を大幅に短縮することができる。今後、ミトコンドリア DNA A1555G 遺伝子診断を臨床現場で積極的に応用することで、アミノグリコシド系抗生物質投与による聴覚障害の発生や QOL の低下を回避することが期待できる。

分担研究者： 平塚 真弘

所属機関・職名：東北薬科大学・講師

#### A. 研究目的

ミトコンドリアDNAの1555番目のA→G変異を有する人は、ストレプトマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質による不可逆的な感音性難聴の副作用を高頻度で発現することが報告されている。したがって、薬物療法を行う前にミトコンドリアDNAの遺伝子情報を迅速に得ることにより、このような不幸な副作用を回避することが可能になると考えられる。しかし現在、臨床現場において、患者個々における副作用発現を予測するために遺伝子診断を行い、適正な個別薬物療法を実施している施設はほとんどない。この原因としては、臨床レベルで対応できるだけの簡易、迅速、低コスト、精確な遺伝子診断法が開発されていないことがその一因と言える。そこで本研究では、ミトコンドリアDNAのA1555G変異を、ベッドサイドや診療現場で簡易に検出できる系を開発し、外来患者の遺伝子診断に対応できるシステムを構築することを目的とする（平成15年度実施）。また、ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する患者における感音性難聴発症の原因薬物としてはストレプトマイシン、ゲンタマイシン、イセパマイシンが同定されているが、アミカシンをはじめとする他のアミノグリコシド系抗生物質の関与は報告がない。ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する患者のリンパ芽球を樹立することで、様々な薬物の副作用発現の可能性を予測できるスクリーニング系の構築が期待できる（平成16年度に実施予定）。これらの検討を行うことにより、感覚器障害研究の成果を効果的かつより安全な薬物療法に応用することを目的とした。

#### B. 研究方法

感音性難聴患者検体およびボランティア患者（疾患名は連結不可能匿名化のため不明）検体計750検体より、ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する検体を、以前報告者らが開発したAllele-Specific Real-Time PCR法を用いて、ハイスループットスクリーニングした。次に、ここで得られたミトコンドリアDNA A1555G変異を有する検体を陽性対象として、PCR法とイムノクロマトグラフィー法を組み合わせた遺伝子診断法を構築した。つまり、図1に示すように、変異部位が3'端になるような野生型対立遺伝子増幅プライマーあるいは変異型対立遺伝子増幅プライマーおよび両方の遺伝子を増幅する共通プライマーをそれぞれ設計した。その際に対立遺伝子特異的プライマーの3'端から-2位に位置に人為的なミスマッチを導入し、プライマーの特異性を向上させた。次に2本のPCRチューブ中で、それぞれのプライマーを用いた対立遺伝子特異的遺伝子増幅を行った。その際に共通プライマーの5'端をビオチン(B)でラベルし、反応系にはジゴキゲニン(DIG)-dUTPを取り込ませた。鋳型DNAとプライマー配列が一致すればPCR産物が増幅され、その産物はBとDIGのダブルラベル化体となる（図2）。反応系は図3に示した。次に得られた反応物をDNA検出テストストリップ（ロシュダイアグノスティクス、#1-965-484）（図4）に5 $\mu$ Lスポットし、キット付属のBufferで展開した。ストリップ上には、金コロイドラベルされた抗DIG抗体が塗布されたパッドとストレプトアビジンが塗布されたラインが存在し、PCR産物が増幅されていれば紫色の金コロイド凝集バンドが形成され、遺伝子型を視覚的に判別することができる（図5）。

また、総合的な検出時間の短縮を図るため、血液を特殊な乾燥ろ紙血（Isocodeカード）に滴下

し乾燥後、その小片（穴空けパンチを使用）をマイクロチューブに移し、ミリ Q 水を加え、100°C で5分間煮沸し、その上清を用いることで直接DNA増幅を試みた。

（倫理面への配慮）

今回の研究プロトコールは本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、東北薬科大学・大学院倫理委員会および東北大学医学部倫理委員会に申請・承認された同名課題「薬剤反応性遺伝子の多型性が薬効及び薬物動態に与える影響に関する研究」に従って実施された（承認済）。

（サンプルの入手と取り扱い）

今回使用したサンプルは、東北大学医学部附属病院受診の患者に対し、研究内容の十分な説明と書面による同意（インフォームドコンセント）が得られたものを用いた。説明と同意は東北大学医学部附属病院における研究協力者の医師又は薬剤師によって行われた。これらのサンプル採取に際しては、強制的な圧力がかからぬように十分留意し、完全な自由意志のもとで行われた。また、研究対象者に対する人権擁護上の配慮をするにあたり、すべてのサンプルは連結可能匿名化あるいは連結不可能匿名化を行った後、取り扱うこととし、一切の個人情報漏洩されないようにした。よって、研究対象者に対する不利益は生じにくいと考えられた。ただし、細心の注意を払い、研究対象者の不利益につながる行為等を回避することを前提とした。

（危険性の排除や説明と理解に関わる状況）

サンプル採取に際して、その対象が末梢血である場合は採血操作の熟練した医師、看護師あるいは臨床検査技師に依頼し、それに関わる事故発生の可能性を最小限にした。研究計画の説明は医師、薬剤師あるいは研究協力者が行い、患者がその主旨を完全に理解し同意した後にはじめて実施されることを確認した。

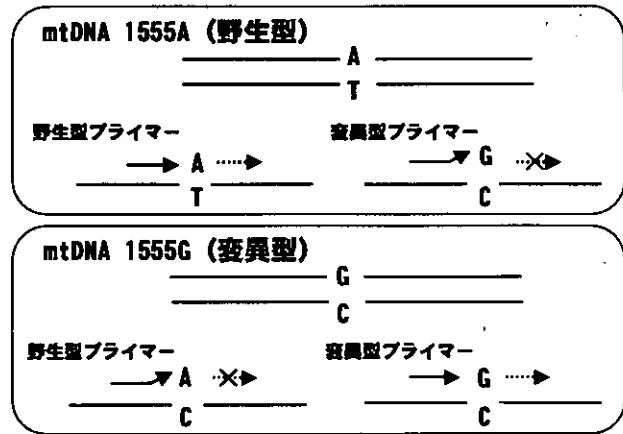


図1. 対立遺伝子特異的PCR

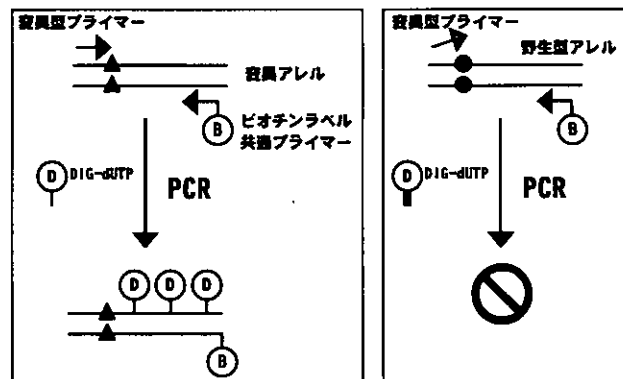


図2. ダブルラベル化PCR

H <sub>2</sub> O	14.5 (μL)
10x Ex Taq Buffer (TaKaRa)	2.0
PCR DIG Labeling Mix (Roche)	2.0
10 μM Allele-specific primer (wt or mt)	0.2
10 μM Common primer (Biotin-labeled)	0.2
Ex Taq (TaKaRa)	0.1
DNA (10-30 ng/μL)	1.0
	20.0

↓

95°C	5 min	
95°C	30 sec	25 cycles
55°C	10 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	

図3. 反応条件

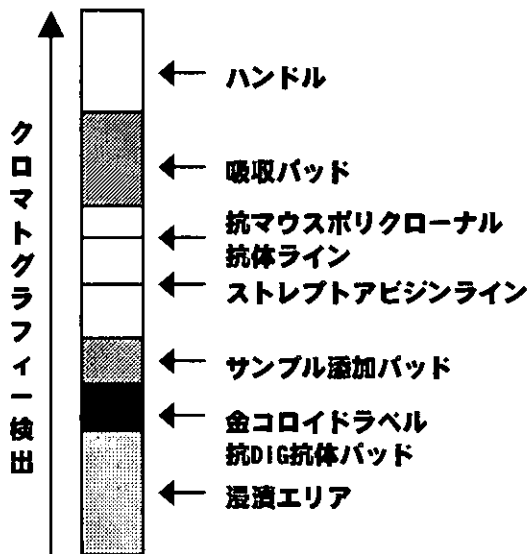


図4. DNA検出ストリップの構造

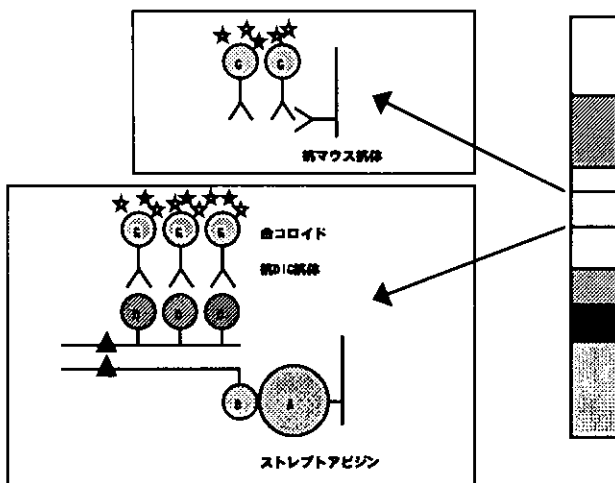
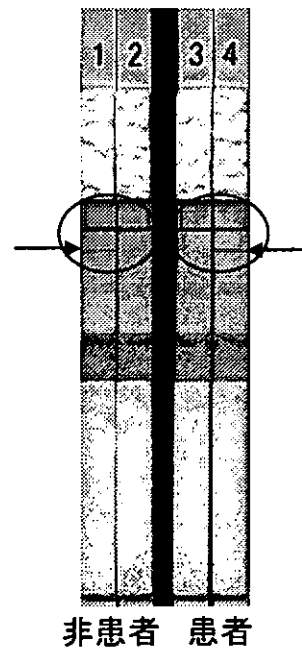


図5. DNA検出ストリップ上でのバンドの形成

### C. 研究結果

感音性難聴患者検体およびボランティア患者（疾患名は連結不可能匿名化のため不明）検体よりミトコンドリアDNA A1555G変異を有する検体をスクリーニングした。その結果、ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する5名の患者を見いだした。次に、その患者検体を用いPCRとイムノクロマトグラフィーを組み合わせた遺伝子診断法を構築した。上記の方法に基づき、プライマーの配列および反応条件を検討することによって、DNA検出ストリップ上でミトコンドリアDNA A1555G変異の有無を検出できる系が確立できた。つまり、ストリップを2本用意し、一方には野生

型プライマーを用いた時のPCR反応液を、もう一方には変異型プライマーを用いた時のPCR反応液をアプライすることによって、個人の遺伝子型を視覚的に判別することができた（図6）。PCR後の操作から、わずか5分で結果の判別が可能であった。また、通常の末梢血から抽出したDNAだけでなく、乾燥ろ紙（Isocodeカード）上の血液を直接DNA増幅しても、遺伝子診断が可能であることを確認できた。



- 1, 3: 野生型プライマー
- 2, 4: 変異型プライマー

図6. DNA検出ストリップを用いた遺伝子診断結果

### D. 考察

今回開発したDNA検出ストリップを利用した遺伝子診断法は簡便迅速であり、ゲル電気泳動等の煩雑な操作を必要としない。同法は工程的に①DNA抽出、②PCR、③ストリップ上での変異検出が必要になる。しかし、臨床の現場では、さらに短時間、精確、低コストでSNP検出できることが求められている。今回DNA抽出に関しては血液を乾燥ろ紙に滴下乾燥し、その小片を少量の水で煮沸することによりDNA源として利用することが可能

であり、診断時間の大幅な短縮に成功した。

#### E. 結論

アミノグリコシド系抗生物質の標準的投与にもかかわらず不可逆的感音性難聴を誘発する原因遺伝子の一つであるミトコンドリアDNAのA1555G変異を、ベッドサイドや診療現場で簡易迅速に検出することができる遺伝子診断法を確立した。同法はPCR法とイムノクロマトグラフィー法を組み合わせたこれまでにない方法であり、ミトコンドリアDNA A1555G変異の存在を簡易に視覚化することで判別を容易にした優れた方法である。操作はイメージ的に妊娠検査薬に近い。

ミトコンドリアDNAは母系遺伝で子孫に伝搬するため、患者一人を遺伝子診断することで多くの近親者（兄弟姉妹、子供、母親等）のミトコンドリアDNA遺伝子型が予測でき、効率的に医薬品による副作用を未然に回避することができると思われる。感音性難聴の障害を有する患者の約6%がミトコンドリアDNA A1555Gを有することが報告されていることから、この遺伝子情報を早急に臨床現場で利用することが必要である。今後さらなる検討を加えることにより、ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する人におけるアミノグリコシド系抗生物質投与による高頻度な不可逆的感音性難聴発現に関する有益な知見が得られ、薬害による聴覚障害の発生およびQOLの低下を回避することに大きく貢献できると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Influencing Drug Response by Competitive Allele-Specific Short Oligonucleotide Hybridization (CASSOH) with Immunochromatographic Strip. Masahiro Hiratsuka, Aiko Ebisawa, Yoichi Matsubara, Shigeo Kure, Yumiko Konno, Michinao Mizugaki. Anal. Biochem., submitted.

##### 2. 学会発表

・ミトコンドリアDNA遺伝子診断によるアミノグリコシド系抗生物質由来の感音性難聴発現回避、平塚真弘、池田勝久、佐藤利徳、小林俊光、呉繁夫、松原洋一、金野由美子、斉藤友美、水柿道直、医療薬学フォーラム2003/第11回クリニカルフォーマシーシンポジウム、広島県広島市、平成15年7月5日

・血液直接PCR試薬及びSNP検出ストリップを用いた薬剤反応性遺伝子のジェノタイピング、平塚真弘、海老澤愛子、松原洋一、呉繁夫、金野由美子、斉藤友美、水柿道直、第18回日本薬物動態学会、北海道札幌市、平成15年10月8日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ミトコンドリアDNA A1555G変異のベッドサイド遺伝子診断法の開発

分担研究者 平塚 真弘 東北薬科大学講師

研究要旨

アミノグリコシド系抗生物質の標準用量投与にもかかわらず不可逆的感音性難聴を誘発する患者群がある。本研究は、その原因遺伝子の一つであるミトコンドリア DNA の A1555G 変異を簡易迅速に遺伝子診断する系および既存のアミノグリコシド系抗生物質の毒性をスクリーニングする細胞評価系を確立し、感覚器障害研究の成果を効果的かつ安全な薬物療法に応用するために立案した。平成 15 年度は、感音性難聴患者検体およびボランティア患者（疾患名は連結不可能匿名化のため不明）検体 750 名分よりミトコンドリア DNA A1555G 変異を有する検体をスクリーニングし、ミトコンドリア DNA A1555G 変異を有する 5 名の患者を見いだした。次に、その患者検体を用い、診療現場やベッドサイドで簡易、迅速、精確、低コストでミトコンドリア DNA A1555G 変異の同定が可能な遺伝子診断法を構築した。ここではまず PCR を用いた方法について検討を行った。つまり、野生型対立遺伝子増幅プライマーと変異型対立遺伝子増幅プライマーを用いた対立遺伝子特異的遺伝子増幅法を行い、その際に共通プライマーの 5' 端をビオチンでラベルし、ジゴキシゲン (DIG) -dUTP を用いたミックス中で PCR を行った。鋳型 DNA とプライマー配列が一致すれば、PCR 産物が増幅され、その産物はビオチンと DIG のダブルラベル化体となる。鋳型 DNA とプライマー配列が一致しない場合は、ラベル化 PCR 産物は得られない。次に得られた反応物をイムノクロマトグラフィ-DNA 検出ストリップ（ロシュ・ダイアグノスティックス）にアプライし展開した。ストリップ上には、金コロイドラベルされた抗 DIG 抗体が塗布されたパッドとストレプトアビジンが塗布されたラインが存在し、PCR 産物はサンプルパッド上に滴下され緩衝液により展開される。PCR 産物が増幅されていればストレプトアビジンにビオチンがトラップされ、さらに DIG に結合した金コロイドラベル抗 DIG 抗体が凝集し、紫色のバンドを形成する。つまりストリップを 2 本用意し、一方には野生型プライマーを用いた時の反応液を、もう一方には変異型プライマーを用いた時の反応液をアプライすることによって遺伝子型を視覚的に判別することができる。今回、検出に用いるプライマー配列や反応条件の検討により、PCR 終了後、約 5 分でミトコンドリア DNA A1555G 変異の検出が可能な遺伝子診断法の確立に成功した。また、同法は煩雑な抽出操作を必要とする末梢血から抽出した DNA だけでなく、乾燥ろ紙（Isocode カード）上の血液を直接 DNA 増幅しても診断可能であり、遺伝子診断の時間を大幅に短縮することができている。今後、ミトコンドリア DNA A1555G 遺伝子診断を臨床現場で積極的に応用することで、アミノグリコシド系抗生物質投与による聴覚障害の発生や QOL の低下を回避することが期待できる。



## A. 研究目的

ミトコンドリアDNA の1555番目のA→G変異を有する人は、ストレプトマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質による不可逆的な感音性難聴の副作用を高頻度で発現することが報告されている。したがって、薬物療法を行う前にミトコンドリアDNAの遺伝子情報を迅速に得ることにより、このような不幸な副作用を回避することが可能になると考えられる。しかし現在、臨床現場において、患者個々における副作用発現を予測するために遺伝子診断を行い、適正な個別薬物療法を実施している施設はほとんどない。この原因としては、臨床レベルで対応できるだけの簡易、迅速、低コスト、精確な遺伝子診断法が開発されていないことがその一因と言える。そこで本研究では、ミトコンドリアDNA のA1555G変異を、ベッドサイドや診療現場で簡易に検出できる系を開発し、外来患者の遺伝子診断に対応できるシステムを構築することを目的とする（平成15年度実施）。また、ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する患者における感音性難聴発症の原因薬物としてはストレプトマイシン、ゲンタマイシン、イセパマイシンが同定されているが、アミカシンをはじめとする他のアミノグリコシド系抗生物質の関与は報告がない。ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する患者のリンパ芽球を樹立することで、様々な薬物の副作用発現の可能性を予測できるスクリーニング系の構築が期待できる（平成16年度に実施予定）。これらの検討を行うことにより、感覚器障害研究の成果を効果的かつより安全な薬物療法に応用することを目的とした。

## B. 研究方法

感音性難聴患者検体およびボランティア患者（疾患名は連結不可能匿名化のため不明）検体計750検体より、ミトコンドリアDNA A1555G変異

を有する検体を、以前報告者らが開発したAllele-Specific Real-Time PCR法を用いて、ハイスループットスクリーニングした。次に、ここで得られたミトコンドリアDNA A1555G変異を有する検体を陽性対象として、PCR法とイムノクロマトグラフィ法を組み合わせた遺伝子診断法を構築した。つまり、図1に示すように、変異部位が3'端になるような野生型対立遺伝子増幅プライマーあるいは変異型対立遺伝子増幅プライマーおよび両方の遺伝子を増幅する共通プライマーをそれぞれ設計した。その際に対立遺伝子特異的プライマーの3'端から-2位に位置に人為的なミスマッチを導入し、プライマーの特異性を向上させた。次に2本のPCRチューブ中で、それぞれのプライマーを用いた対立遺伝子特異的遺伝子増幅を行った。その際に共通プライマーの5'端をビオチン(B)でラベルし、反応系にはジゴキシゲニン(DIG)-dUTPを取り込ませた。鋳型DNAとプライマー配列が一致すればPCR産物が増幅され、その産物はBとDIGのダブルラベル化体となる（図2）。反応系は図3に示した。次に得られた反応物をDNA検出テストストリップ（ロシュダイアグノスティクス、#1-965-484）（図4）に5 $\mu$ Lスポットし、キット付属のBufferで展開した。ストリップ上には、金コロイドラベルされた抗DIG抗体が塗布されたパッドとストレプトアビジンが塗布されたラインが存在し、PCR産物が増幅されていれば紫色の金コロイド凝集バンドが形成され、遺伝子型を視覚的に判別することができる（図5）。

また、総合的な検出時間の短縮を図るため、血液を特殊な乾燥ろ紙血（Isocodeカード）に滴下し乾燥後、その小片（穴空けパンチを使用）をマイクロチューブに移し、ミリQ水を加え、100°Cで5分間煮沸し、その上清を用いることで直接DNA増幅を試みた。

(倫理面への配慮)

今回の研究プロトコルは本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、東北薬科大学・大学院倫理委員会および東北大学医学部倫理委員会に申請・承認された同名課題「薬剤反応性遺伝子の多型性が薬効及び薬物動態に与える影響に関する研究」に従って実施された(承認済)。

(サンプルの入手と取り扱い)

今回使用したサンプルは、東北大学医学部附属病院受診の患者に対し、研究内容の十分な説明と書面による同意(インフォームドコンセント)が得られたものを用いた。説明と同意は東北大学医学部附属病院における研究協力者の医師又は薬剤師によって行われた。これらのサンプル採取に際しては、強制的な圧力がかからぬように十分留意し、完全な自由意志のもとで行われた。また、研究対象者に対する人権擁護上の配慮をすることあたり、すべてのサンプルは連結可能匿名化あるいは連結不可能匿名化を行った後、取り扱うこととし、一切の個人情報漏洩されないようにした。よって、研究対象者に対する不利益は生じにくいと考えられた。ただし、細心の注意を払い、研究対象者の不利益につながる行為等を回避することを前提とした。

(危険性の排除や説明と理解に関わる状況)

サンプル採取に際して、その対象が末梢血である場合は採血操作の熟練した医師、看護師あるいは臨床検査技師に依頼し、それに関わる事故発生の可能性を最小限にした。研究計画の説明は医師、薬剤師あるいは研究協力者が行い、患者がその主旨を完全に理解し同意した後はじめて実施されることを確認した。

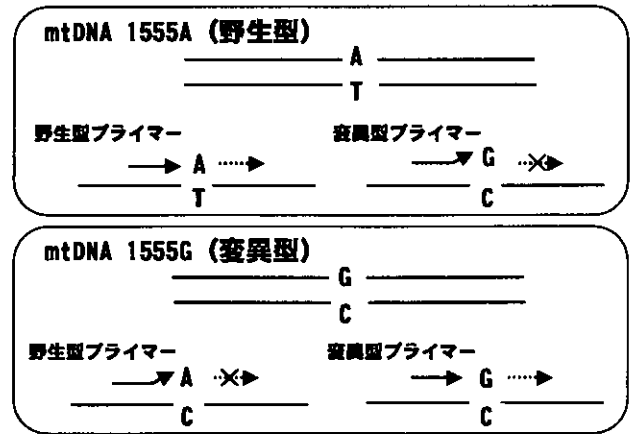


図1. 対立遺伝子特異的PCR

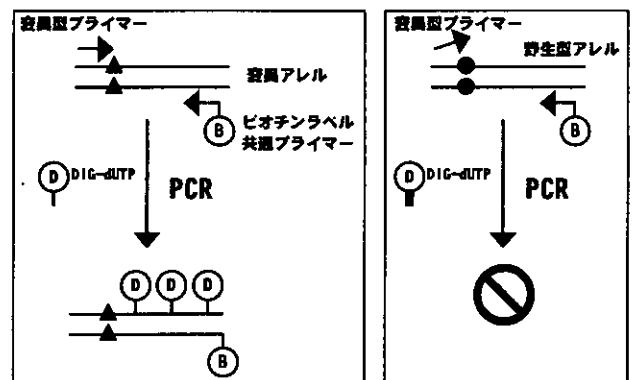


図2. ダブルラベル化PCR

H <sub>2</sub> O	14.5(μL)
10x Ex Taq Buffer(TaKaRa)	2.0
PCR DIG Labeling Mix(Roche)	2.0
10μM Allele-specific primer(wt or mt)	0.2
10μM Common primer(Biotin-labeled)	0.2
Ex Taq (TaKaRa)	0.1
DNA(10-30 ng/μL)	1.0
	20.0



95°C	5 min	
95°C	30 sec	25 cycles
55°C	10 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	

図3. 反応条件

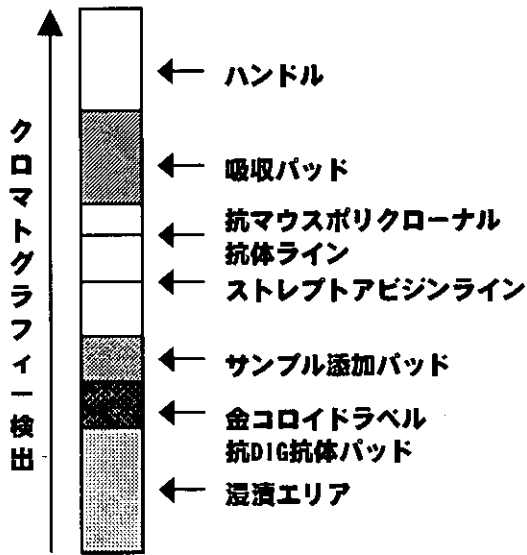


図4. DNA検出ストリップの構造

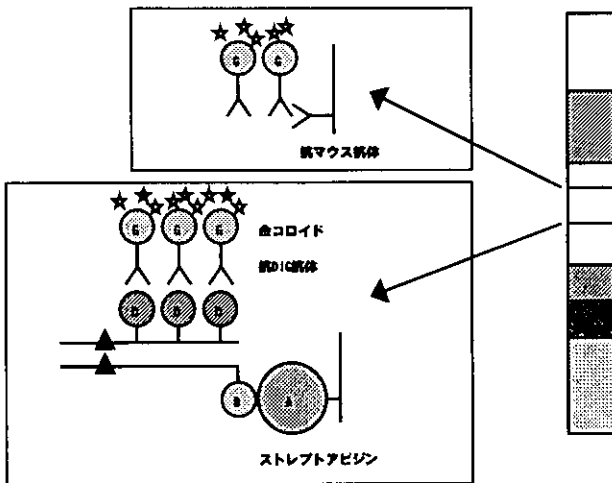
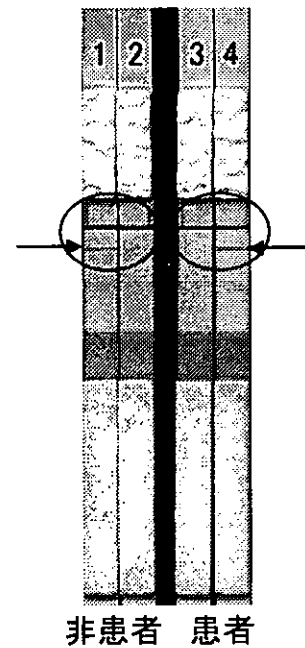


図5. DNA検出ストリップ上でのバンドの形成

### C. 研究結果

感音性難聴患者検体およびボランティア患者（疾患名は連結不可能匿名化のため不明）検体よりミトコンドリアDNA A1555G変異を有する検体をスクリーニングした。その結果、ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する5名の患者を見いだした。次に、その患者検体を用いPCRとイムノクロマトグラフィーを組み合わせた遺伝子診断法を構築した。上記の方法に基づき、プライマーの配列および反応条件を検討することによって、DNA検出ストリップ上でミトコンドリアDNA A1555G変異の有無を検出できる系が確立できた。つまり、ストリップを2本用意し、一方には野生

型プライマーを用いた時のPCR反応液を、もう一方には変異型プライマーを用いた時のPCR反応液をアプライすることによって、個人の遺伝子型を視覚的に判別することができた（図6）。PCR後の操作から、わずか5分で結果の判別が可能であった。また、通常の末梢血から抽出したDNAだけでなく、乾燥ろ紙（Isocodeカード）上の血液を直接DNA増幅しても、遺伝子診断が可能であることを確認できた。



- 1, 3: 野生型プライマー
- 2, 4: 変異型プライマー

図6. DNA検出ストリップを用いた遺伝子診断結果

### D. 考察

今回開発したDNA検出ストリップを利用した遺伝子診断法は簡便迅速であり、ゲル電気泳動等の煩雑な操作を必要としない。同法は工程的に①DNA抽出、②PCR、③ストリップ上での変異検出が必要になる。しかし、臨床の現場では、さらに短時間、精確、低コストでSNP検出できることが求められている。今回DNA抽出に関しては血液を乾燥ろ紙に滴下乾燥し、その小片を少量の水で煮沸することによりDNA源として利用することが可能

であり、診断時間の大幅な短縮に成功した。

#### E. 結論

アミノグリコシド系抗生物質の標準的投与にもかかわらず不可逆的感音性難聴を誘発する原因遺伝子の一つであるミトコンドリアDNAのA1555G変異を、ベッドサイドや診療現場で簡易迅速に検出することができる遺伝子診断法を確立した。同法はPCR法とイムノクロマトグラフィー法を組み合わせたこれまでにない方法であり、ミトコンドリアDNA A1555G変異の存在を簡易に視覚化することで判別を容易にした優れた方法である。操作はイメージ的に妊娠検査薬に近い。

ミトコンドリアDNAは母系遺伝で子孫に伝搬するため、患者一人を遺伝子診断することで多くの近親者（兄弟姉妹、子供、母親等）のミトコンドリアDNA遺伝子型が予測でき、効率的に医薬品による副作用を未然に回避することができると考えられる。感音性難聴の障害を有する患者の約6%がミトコンドリアDNA A1555Gを有することが報告されていることから、この遺伝子情報を早急に臨床現場で利用することが必要である。今後さらなる検討を加えることにより、ミトコンドリアDNA A1555G変異を有する人におけるアミノグリコシド系抗生物質投与による高頻度な不可逆的感音性難聴発現に関する有益な知見が得られ、薬害による聴覚障害の発生およびQOLの低下を回避することに大きく貢献できると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Influencing Drug Response by Competitive Allele-Specific Short Oligonucleotide Hybridization (CASSOH) with Immunochromatographic Strip. Masahiro Hiratsuka, Aiko Ebisawa, Yoichi Matsubara, Shigeo Kure, Yumiko Konno, Michinao Mizugaki. Anal. Biochem., submitted.

##### 2. 学会発表

・ミトコンドリアDNA遺伝子診断によるアミノグリコシド系抗生物質由来の感音性難聴発現回避、平塚真弘、池田勝久、佐藤利徳、小林俊光、呉繁夫、松原洋一、金野由美子、斉藤友美、水柿道直、医療薬学フォーラム2003/第11回クリニカルフォーラムシンポジウム、広島県広島市、平成15年7月5日

・血液直接PCR試薬及びSNP検出ストリップを用いた薬剤反応性遺伝子のジェノタイピング、平塚真弘、海老澤愛子、松原洋一、呉繁夫、金野由美子、斉藤友美、水柿道直、第18回日本薬物動態学会、北海道札幌市、平成15年10月8日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masahiro Hiratsuka, Aiko Ebisawa, Yoichi Matsubara, Shigeo Kure, Yumiko Konno, Michinao Mizugaki	Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) influencing drug response by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip	Anal. Biochem.	submitted		