

```

="gaussian", offset=NA, x.adj=NA,
skip.haplo=0.02,locus.label=locus.label,mis
s.val=0, n.sim=0)
hap.warf
# global-stat = 1.22857, df = 2, p-val =
0.54103
# 補正項を定義、INRで補正
x.ma<-cbind(INR)
hap.warf.adj<-haplo.score(resp,geno,trait.t
ype="gaussian", offset=NA, x.adj=x.ma,
skip.haplo=0.02,locus.label=locus.label,mis
s.val=0, n.sim=0)
hap.warf.adj
global-stat = 1.18183, df = 2, p-val =
0.55382
#総投与量そのもので評価
resp<-dose
hap.warf.dose<-haplo.score(resp,geno,trait.
type="gaussian", offset=NA, x.adj=NA,
skip.haplo=0.02,locus.label=locus.label,mis
s.val=0, n.sim=0)
hap.warf.dose
# global-stat = 1.85409, df = 2, p-val =

```

```

0.39572
# 補正項を定義、体重・INRで補正
x.ma<-cbind(INR,weight)
hap.warf.dose.adj<-haplo.score(resp,geno,tr
ait.type="gaussian", offset=NA, x.adj=x.ma,
skip.haplo=0.02,locus.label=locus.label,mis
s.val=0, n.sim=0)
hap.warf.dose.adj
# global-stat = 1.75424, df = 2, p-val =
0.41598

```

C. 研究結果

<日本人におけるCYP2C9ハプロタイプ構造>

以下のハプロタイプパターンに分類され、各ハプロタイプの頻度は下方に示す通りである。

日本人においては95%以上が上記ハプロタイプ1またはハプロタイプ3のいずれかのパターンを呈することが明らかにされた。

rs2253635 rs2253635 rs2253635 rs1505 ハプロタイプ頻度

| | | | | | |
|----------|---|---|---|---|-------|
| ハプロタイプ 1 | C | A | A | G | 57.4% |
| ハプロタイプ 2 | T | A | A | G | 2.9% |
| ハプロタイプ 3 | T | G | T | C | 38.2% |
| ハプロタイプ 4 | T | G | T | G | 1.5% |

<ハプロタイプとワーファリン維持投与量の相関>

上記の結果にもとづき、患者群をハプロタイプ1-1, 1-3, 3-3の3群に分類し、各群におけるINRとワーファリン維持投与量の関係について図示した。(図3)

- ① 従属変数： 体重あたりのワーファリン投与量
 独立変数： ハプロタイプ
 共役変数 (補正項)： INR
 global-stat = 1.18183, df = 2, p-val = 0.55382

② 従属変数：ワーファリン総投与量
 独立変数： ハプロタイプ
 共役変数（補正項）： なし
 global-stat = 1.85409, df = 2, p-val = 0.39572

global-stat = 1.75424, df = 2, p-val = 0.41598

③ 従属変数： 体重あたりのワーファリン投与量
 独立変数： ハプロタイプ
 共役変数（補正項）： INR、体重

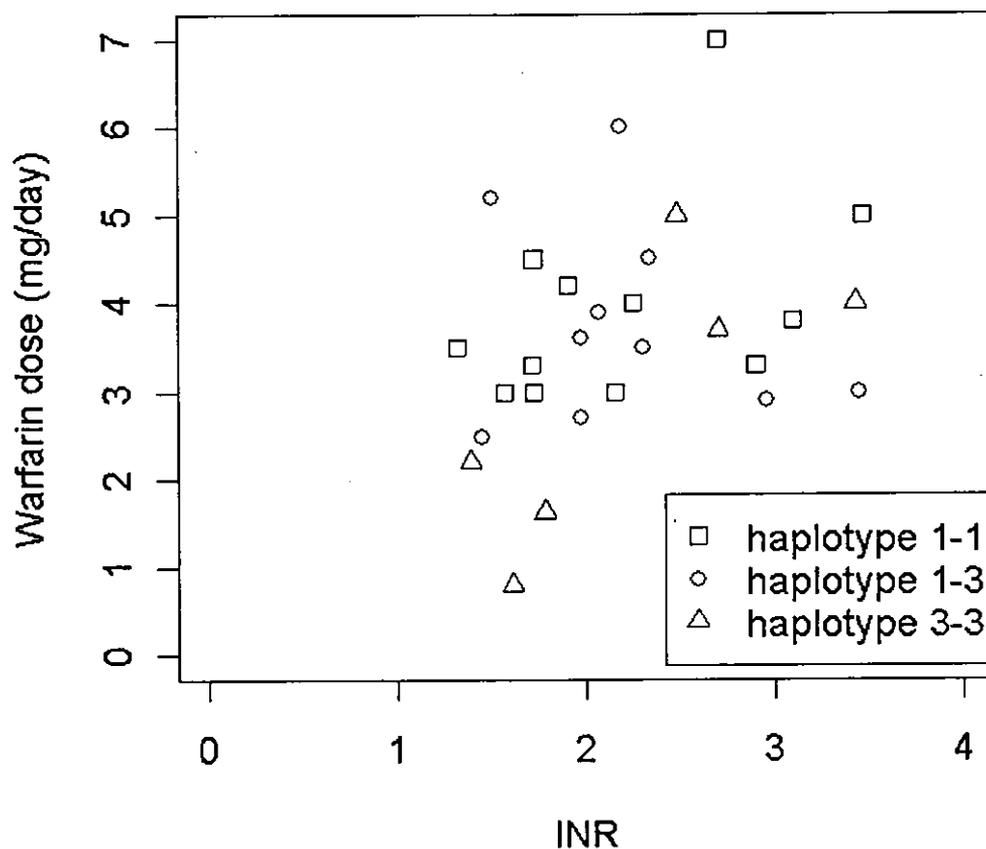


図3. 各群における INR とワーファリン維持投与量の関係

D. 考察

いずれのモデルについても、各ハプロタイプとワーファリン投与量との相関には統計的に有意ではなかった。このため、ハプロタイプ特異的 p 値を評価することは出来なかった。

日本人におけるワーファリン反応性の個人差が、CYP2C9遺伝子座位の遺伝子多型で説明できるかどうかを検討した。4ヶ所のSNPsについてハプロタイプ構造を決定したところ、95%以上のハプロタイプが2つのパターンで代表されること

が明らかにされた。両者のハプロタイプの頻度は、57%（当報告書ハプロタイプ1）および38%（当報告書ハプロタイプ3）であり、日本人を大きく3群に分類しうる。これら3群におけるワーファリン反応性をhaploscore法で評価したが、ハプロタイプとの関連を認めなかった。

E. 結論

日本人におけるワーファリンへの反応性はCYP2C9 以外の遺伝子座位によって規定されることが示唆された。

本年度の研究では、CYP2C9 遺伝子座位のハプロタイプの他に、VKORC1(ビタミン K オキサイド還元酵素)のハプロタイプとワーファリン反応性を評価した。この検討によれば、VKORC1 は日本人におけるワーファリン反応性の一部を規定している。今後、遺伝子検査によりワーファリン反応性を予測する場合には、VKORC1 座位を含め、CYP2C9 以外の座位に注目した検討が必要である。

F.健康危険情報

特記すべきことなし。

G.研究発表

本研究課題に関する発表はない。

H.参考文献

Ahmadi KR, Weale ME, Xue ZY, Soranzo N, Yarnall DP, Briley JD, Maruyama Y, Kobayashi M, Wood NW, Spurr NK, Burns DK, Roses AD, Saunders AM, Goldstein DB.:A single-nucleotide polymorphism tagging set for human drug metabolism and transport. *Nat Genet.* 2005;37:84-9. Epub 2004 Dec 19.

Schaid D, Rowland C, Tines D, Jacobson R, Poland G.

Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet.* 70:425-434, 2002

厚生労働科学研究費補助金
(小児疾患臨床研究：小児疾患臨床研究分野)

VKORC1 座位における日本人遺伝子多型とワーファリン必要量の解析
分担研究者 山岸 敬幸(慶應義塾大学医学部小児科 専任講師)

研究要旨 昨年イギリスのグループが VKORC1 (ビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1) の遺伝子変異によって出血傾向をきたすことを証明した。これを受けて VKORC1 の多型とワーファリンの効果についての研究が行われている。また 2005 年 1 月には、VKORC1 の多型がワーファリンの投与量と関連があるのではないかと報告がイタリアのグループから成された。日本人において VKORC1 の多型の臨床的な意義は未だ検討が行われていない。本研究においては VKORC1 遺伝子座位の多型性を検討した後、2カ所の完全に連鎖する SNP s を同定して、この SNP s とワーファリンの維持量との関連性について検討を行った。VKORC1 多型におけるジェノタイプが、ワーファリン必要量に影響を与えるかどうかについて、INR を共役変数として共分散分析を行った。31 名のワーファリンの投与を受けている患者 (適応：人工弁・人工血管・心房細動) を対象とした。31 名の患者は思春期ないし成人の患者であり、その体重は 40 kg を超えていた。1173 C>T 多型における CT ヘテロ接合体群と TT ホモ接合体群のワーファリン維持量の関係を検討した結果、両者の間に有意差を認めた (TT ホモ接合体群：3.44g/日、CT ヘテロ接合体群：5.06 g/日)。INR で補正して検討したところ、1173 C>T 多型における TT ホモ接合体と CT ヘテロ接合体との差がさらに明確となった (P=0.003)。

研究協力者

山岸敬幸 慶應義塾大学医学部小児科 専任講師
山岸千尋 慶應義塾大学医学部小児科 医師
菅谷明則 東京都立清瀬小児病院循環器科 医長
西田光宏 慶應義塾大学医学部小児科 医師
鮫島葉月 慶應義塾大学医学部小児科 研究員
鳥居千春 慶應義塾大学医学部小児科 研究員

量の最適化は困難である。ワーファリンの効果を決める重要な要素として P450 酵素、CYP2C9 が知られ欧米において*2 と*3 の頻度が比較的高い。日本人においては*2 の頻度は極端に低く、*3 の頻度は約 20-30 人に一人である。これまでの研究班の研究で同定された*3 患者は 2 名である。日本人におけるワーファリンの効果の説明する上で、*3 以外の要因を検討する必要がある。

昨年イギリスのグループが VKORC1 (ビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1) の遺伝子変異によって出血傾向をきたすことを証明した。これを受けて VKORC1 の多型とワーファリンの効果についての研究が行われている。また、2005 年 1 月に、VKORC1 の多型がワーファリンの投与量と関連があるのではないかと報告がイタリアのグループから成された。日本人において

A. 研究目的

ワーファリンは血栓形成性の疾患に対して用いられる抗凝固薬である。ワーファリンの最も重要な合併症は出血傾向である。出血傾向を防ぐために様々な計算式が作成されているが、その投与量あたりの効果には大きな個人差があり、初期投与

VKORC1 の多型の臨床的な意義は未だ検討が行われていない。このため、本研究においては VKORC1 遺伝子座位の多型性を検討した後、2カ所の完全連鎖する SNPs を同定して、この SNPs とワーファリンの維持量の検討を行った。

B. 研究方法

・患者群

受診中の患者 31 名（中央値 20 歳）に慶應大学病院の小児心臓外来に対して研究参加を呼びかけた。研究プロトコルは施設内倫理委員会によって認められ、すべての患者および患者の両親が同意書を提出している。全ての患者はワーファリンを処方されており、検討時点において投与量は4週間にわたって不変であった。すべての 31 名の患者は思春期ないし成人の患者であり、その体重は 40 kg を超えていた。ワーファリンの適応は人工弁・人工血管・心房細動であった。

・検討した SNPs

ワーファリンの投与量との関連がイタリアのグループから示唆されている2つの VKORC1 多型、rs9934438(C1173T)、および rs7294(G3730A) について解析を行った。

・遺伝子多型解析

ゲノム DNA をキアゲン QIAamp®脱塩カラムによって全血から抽出し、CYP2C9*2 および*3 多型と、VKORC1 遺伝子、1173 C>T 多型および 3730G>A 多型について PCR 増幅したのち、直接シーケンシング法によりジェノタイピングを行った。増幅・解析の各条件は以下の通りである。

rs9934438(C1173T)

Primer:

Foward ·GGAACCAGGTTAGGACTGTCAA

Reverse ·GATAGGGTCAGTGACATGGAATC

rs7294(G3730A)

Primer:

Foward ·AAACTTTATTGCTCAGAACCTTCC

Reverse ·GTCCCTAGAAGGCCCTAGATGT

PCR condition

Buffer Parameters

Template DNA: 50 ng Genomic DNA

Polymerase: 0.5 U Platinum Taq Polymerase

High Fidelity, Invitrogen

PCRBuffer: Invitrogen attached buffer

Reaction Vol.: 20.0 ul

Primer 1 conc.: 0.5 uM (dried up in each vial)

Primer 2 conc.: 0.5 uM (dried up in each vial)

MgSO4 conc.: 2mM

dNTPs conc.: 0.2 mM

Other Reagents: None

Cycle program

Initial Denaturation

Denaturation: 95 C, 5:00 mins

TouchDown Cycles

Denaturation: 95 C, 0:30 mins

TD Anneal Start: 63 C, 0:30 mins

Decrement: 0.5 C

Extension: 68 C, 0:30 mins

Cycles: 10

Cycling Conditions

Denaturation: 95 C, 0:30 mins

Anneal: 58 C, 0:30 mins

Extension: 68 C, 0:30 mins

Cycles: 30

Final Extension: 68 C, 10:00 mins

・統計

それぞれの患者について、処方されている1日量のワーファリンと INR について平均値を得た。1173C>T 多型について、TT ホモ接合体群と CT 接合体群の2群に分け、平均 INR を共役変数とした共分散分析を行い、1173 C>T ジェノタイプとワーファリン投与量の関係を検討した。患者背景について2群間に差があるかどうかを、マンホイットニー検定(Mann-Whitney U-test)により評価した。

C. 実験結果

・VKORC1 遺伝子の多型解析

1173 C>T 多型および 3730G>A 多型についてジェノタイピングをおこなった結果、26 名の患者（84%）が 1173 C>T 多型について TT ホモ接合体であり、5 名の患者（16%）が CT ヘテロ接合体であった。C のホモ接合体の者はいなかった。計算されたアレル頻度は T アレルが 91.2%、C アレルが 8.8%であった。1173 C>T 多型について TT ジェノタイプであったものは、3730G>A 多型についてはすべて GG ジェノタイプであり、また 1173 C>T 多型について CT ヘテロ接合体であったものは、3730G>A 多型についてすべて AG ヘテロ接合体である。つまりすべての患者は 1173 C>T 多型および 3730G>A 多型について完全な連鎖不平衡を呈していた。

・CYP2C9 遺伝子の多型解析

2名の患者が*3ハプロタイプについてヘテロ接合体であった。*2に関してはヘテロ接合体ないしホモ接合体であるものはなかった。

・VKORC1 多型とワーファリン維持量の関連

VKORC1 多型におけるジェノタイプが、ワーファリン必要量に影響を与えるかどうかについて、INR を共役変数として共分散分析を行った。1173 C>T 多型における CT ヘテロ接合態群と TT ホモ接合体群のワーファリン維持量の依存性を検討した結果、両者の間に有意差を認めた（TT ホモ接合体群：3.44g/日、CT ヘテロ接合態群：5.06 日）。INR で補正したワーファリンの投与量との間を検討したところ、1173 C>T 多型における TT ホモ接合体と CT ヘテロ接合体との差は有意であった（ $p=0.003$ ）

D. 考察

われわれは VKORC1 の 1173 C>T 多型における TT ホモ接合体群と CT ヘテロ接合体群との間でワーファリン所要量との間に有意な差があることを示した。CT ヘテロ接合体は TT ホモ接合体に比べて、より多量のワーファリンを必要とするということが明らかになった。この成績はイタリアの研究結果において CT ヘテロ接合体が TT ホモ接合体より多量のワーファリンを必要とすることと合致するものであった。

1173 C>T 多型について、日本人とイタリア人との間では、そのジェノタイプの分布に差があった。日本人における 1173 TT ホモ接合体の頻度は 90%であるが、イタリアからの報告によれば 16%である。1173 TT ホモ接合体群が他の多型の患者に比べて必要なワーファリン量が少ないと言うことを考えると、1173 C>T 多型における T アレルの頻度が低いと言うことが、日本人において白人患者と比べ、ワーファリンの必要量が少ないというこれまでに知られている知見を説明できる可能性が示唆された。

本研究の限界は 2 点にある。まず患者のサンプル数が少ないために、過去にワーファリンの必要量に関係があると知られている年齢・性別・体重・ワーファリン投与適応症などの項目について補正を行えなかったことであり、今後の検討課題である。さらに我々は日本人における 1173 CC ホモ接合体の表現型について検討することができなかった。ハーディワインバークの公式によれば、CC ホモ接合体の頻度は約 1/100 である。より大規模な研究において、CC ホモ接合体のワーファリン必要量がどのように変化するか検討する必要がある。このような欠点のある研究であるが、白人に置いて認められた観察結果が、本研究によってアジア人においても認められたことは、VKORC1 がワーファリンの反応性に対する個人差を説明できる可能性を強く示唆する成績と考えられる。

現在のところ、1173 C>T 多型の生物学的な意義というのは証明されていない。というのは、

1173 C>T 多型はイントロンに存在し、また mRNA のスプライシングに影響を与えないことが、過去の研究により明らかにされているからである。VKORC1 遺伝子の大きさは 3Kbp 程度であり、3'UTR にある 3730G>A 多型と、第 1 イントロン上にある 1173 C>T 多型が完全な連鎖不平衡にあったことから、VKORC1 遺伝子座位内に、実際に生物学的活性に変化を与えるような多型が潜在している可能性が考えられる。

今後、invitro の研究と疫学的研究の両面から VKORC1 多型がワーファリンへの反応性を定義する機構が明らかにされると期待され、またそのようなアプローチによって VKORC1 多型に基づくワーファリンの用量設定が可能になると期待される。

E. 結論

1173 C>T 多型における CT ヘテロ接合体群と TT ホモ接合体群のワーファリン維持量の依存性を検討した結果、両者の間に有意差を認めた (TT ホモ接合体群 : 3.44g/日、CT ヘテロ接合体群 : 5.06日)。INR で補正したワーファリンの投与量との関係を検討したところ、1173 C>T 多型における TT ホモ接合体と CT ヘテロ接合体との差がさらに明確となった ($P=0.003$)。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

本研究課題に関する発表はない。

H. 参考文献

- 1 Fihn SD, Callahan CM, Martin DC, McDonnell MB, Henikoff JG, White RH. The risk for and severity of bleeding complications in elderly patients treated with warfarin. The National Consortium of Anticoagulation Clinics. *Ann Intern Med* 1996;124:970-9.
- 2 Haematology BCfSi. Guidelines on oral anticoagulation: third edition. *Br J Haematol* 1998;101:34.
- 3 Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000;356:1667-71.
- 4 Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* 1994;4:39-42.
- 5 Steward DJ, Haining RL, Henne KR, Davis G, Rushmore TH, Trager WF, Rettie AE. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics* 1997;7:361-7.
- 6 Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-9.
- 7 Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000;96:1816-9.
- 8 Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996;6:429-39.
- 9 Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y, Muszkat M, Kim RB, Kashima T, Kimura S, Echizen H. Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:253-63.
- 10 Harrington DJ, Underwood S, Morse C, Shearer MJ, Tuddenham EG, Mumford AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost* 2005;93:23-6.
- 11 Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappégard K, Seifried E, Scharrer I,

- Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004;427:537-41.
- 12 D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005;105:645-9.
- 13 Chenhsu RY, Chiang SC, Chou MH, Lin MF. Long-term treatment with warfarin in Chinese population. *Ann Pharmacother* 2000;34:1395-401.
- 14 Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, Mayo G, Kashima T, Kimura S, Otsubo K, Echizen H. 5'-Flanking region polymorphisms of CYP2C9 and their relationship to S-warfarin metabolism in white and Japanese patients. *Blood* 2004;103:3055-7.
- 15 James AH, Britt RP, Raskino CL, Thompson SG. Factors affecting the maintenance dose of warfarin. *J Clin Pathol* 1992;45:704-6.

厚生労働科学研究費補助金
(小児疾患臨床研究：小児疾患臨床研究分野)

VKORC1 座位における日本人遺伝子多型の解析
分担研究者 菅谷明則 (東京都立清瀬小児病院循環器科 医長)

研究要旨 ワーファリンは血栓形成性の疾患に対して用いられる抗凝固薬である。ワーファリンの最も重要な合併症は出血傾向である。出血傾向を防ぐために様々な計算式が作成されているが、その投与量あたりの効果には大きな個人差があり、初期投与量の最適化は困難である。ワーファリンの効果を決める重要な要素として P450 酵素、CYP2C9 が知られ欧米において*2 と*3 の頻度が比較的高い。日本人においては*2 の頻度は極端に低く、*3 の頻度は約 20-30 人に一人である。これまでの研究班の研究で同定された*3 患者は 2 名である。日本人におけるワーファリンの効果を説明する上で、*3 以外の要因を検討する必要がある。昨年イギリスのグループが VKORC1 (ビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1) の遺伝子変異によって出血傾向をきたすことを証明した。これを受けて VKORC1 の多型とワーファリンの効果についての研究が行われている。また 2005 年 1 月には、VKORC1 の多型がワーファリンの投与量と関連があるのではないかと報告がイタリアのグループから成された。日本人において VKORC1 の多型の臨床的な意義は未だ検討が行われていず、着目すべき多型や、その頻度は検討されていない。本研究では、VKORC1 座位の日本人における遺伝子多型を同定し各多型のアレル頻度を明らかにした。

研究協力者

山岸敬幸 慶應義塾大学医学部小児科専任講師
山岸千尋 慶應義塾大学医学部小児科 医師
菅谷明則 東京都立清瀬小児病院循環器科 医長
鮫島葉月 慶應義塾大学医学部小児科 研究員
鳥居千春 慶應義塾大学医学部小児科 研究員
高橋大輔 慶應義塾大学医学部小児科 研究員

A.研究目的

ワーファリンは血栓形成性の疾患に対して用いられる抗凝固薬である。ワーファリンの最も重要な合併症は出血傾向である。出血傾向を防ぐために様々な計算式が作成されているが、その投与量あたりの効果には大きな個人差があり、初期投与

量の最適化は困難である。ワーファリンの効果を決める重要な要素として P450 酵素、CYP2C9 が知られ欧米において*2 と*3 の頻度が比較的高い。日本人においては*2 の頻度は極端に低く、*3 の頻度は約 20-30 人に 1 人である。これまでの研究班の研究で同定された*3 患者は 2 名である。日本人におけるワーファリンの効果を説明する上で、*3 以外の要因を検討する必要がある。昨年イギリスのグループが VKORC1 (ビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1) の遺伝子変異によって出血傾向をきたすことを証明した。

VKORC1 (vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1) 遺伝子における多型については、2005 年 1 月にワーファリンの投与量と関連があるのではないかと報告がイタリアのグループからなされた。

現在、VKORC1 遺伝子座位については日本

人において着目すべき多型や、頻度も不明である。われわれは、ワーファリン投与量の調節を目的としたこれまでの CYP2C9 遺伝子解析の際に

VKORC1 の多型データを新たな検討項目としてくわえるために、VKORC1 遺伝子座位における多型マーカーを解析した。

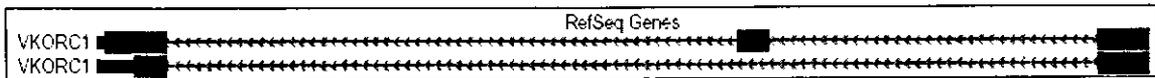


図1・VKORC1 遺伝子 遺伝子構造

VKORC1 は3つのエクソンから成り立ち、全長で約 3.6kbp と比較的小さい遺伝子である。本研究では、以下の検討を行った。

・白人において一定以上の頻度が認められるとされる、以下の SNPs の日本人における頻度の算出
<翻訳領域内>

rs17881770 (129C>T at Cys43)

rs7200749 (3462C>T Leu120)

<非翻訳領域>

rs9934438(C1173T)

rs7294(G3730A)

・各エクソン部位、およびその近傍の未報告 SNPs の検出

B.研究方法

・検体

連結不能匿名化された日本人正常対照検体 100 サンプルを用いて検討した。

・遺伝子多型解析

キアゲン QIAamp®脱塩カラムによって全血からゲノム DNA を抽出し、PCR 増幅を行い、直接シーケンシング法によりジェノタイピングを行った。

各領域を PCR 増幅する際のプライマー

、および PCR 条件は以下の通りである。なお、PCR 条件はすべての PCR 産物について共通である。

rs9934438(C1173T)

プライマー

GGAACCAGGTTAGGACTGTCAA

GATAGGGTCAGTGACATGGAATC

rs7294(G3730A)

プライマー

AAACTTTATTGCTCAGAACCTTCC

GTCCCTAGAAGGCCCTAGATGT

VKORC1 Exon1

標的配列

ATGGGCAGCACCTGGGGGAGCCCTGGCTG

GGTGC GGCTCGCTCTTTGCCTGACGGGCTT

AGTGCTCTCGCTCTACGCGCTGCACGTGAA

GGCGGCGCGCGCCCGGGACCGGGATTACC

GCGCGCTCTGCGACGTGGGCACCGCCATC

AGCTGTTTCGCGCGTCTTCTCCTCCAG

プライマー

CAGAATAATCATCTGGCATCCTG

CTTGACTAGCGCCCTGGAAC

VKORC1 Exon2

標的配列

GTGGGGCAGGGGTTTCGGGCTGGTGGAGC

ATGTGCTGGGACAGGACAGCATCCTCAATC

AATCCAACAGCATATTCGGTTGCATCTTCTA

CACACTACAGCTATTGTTAG

プライマー

TCAGCCTCTAACAGTACTTAAACCAA

GACAGTCCTAACCTGGTTCCAC

VKORC1 Exon3

標的配列

GTTGCCTGCGGACACGCTGGGCCTCTGTCC
TGATGCTGCTGAGCTCCCTGGTGTCTCTCG
CTGGTTCTGTCTACCTGGCCTGGATCCTGT
TCTTCGTGCTCTATGATTTCTGCATTGTTG
TATCACCACTATGCTATCAACGTGAGCCTG
ATGTGGCTCAGTTTCCGGAAGGTCCAAGAA
CCCCAGGGCAAGGCTAAGAGGCACTGA

プライマー

CACATCTAGGGCCTTCTAGGG
CATCTAGGTAGTGCAGTGACATCAT

PCR 反応条件

Buffer Parameters

Template DNA: 50 ng Genomic DNA
Polymerase: 0.5 U Platinum Taq Polymerase
High Fidelity, Invitrogen
PCRBuffer: Invitrogen attached buffer
Reaction Vol.: 20.0 ul
Primer 1 conc.: 0.5 uM (dried up in each vial)
Primer 2 conc.: 0.5 uM (dried up in each vial)
MgSO4 conc.: 2mM
dNTPs conc.: 0.2 mM
Other Reagents: None

Cycle program

Initial Denaturation

Denaturation: 95 C, 5:00 mins

TouchDown Cycles

Denaturation: 95 C, 0:30 mins
TD Anneal Start: 63 C, 0:30 mins
Decrement: 0.5 C
Extension: 68 C, 0:30 mins
Cycles: 10

Cycling Conditions

Denaturation: 95 C, 0:30 mins
Anneal: 58 C, 0:30 mins
Extension: 68 C, 0:30 mins
Cycles: 30
Final Extension: 68 C, 10:00 mins

C.実験結果

日本人においては VKORC1 の翻訳領域内（エクソン 1~3）において遺伝子多型は検出されず、イントロン内の 2 多型について

| | NCBI | EUC | 日本人 |
|--|------|-----|------|
| rs17881770 (129C>T at Cys43) (N=100) | | | |
| C/C | 81% | NA | 100% |
| T/T | 2% | NA | 0% |
| C/T | 17% | NA | 0% |
| rs7200749 (3462C>T Leu120) (N=100) | | | |
| C/C | 88% | NA | 100% |
| T/T | 2% | NA | 0% |
| T/C | 11% | NA | 0% |
| rs9934438(1173 C>T) (N=50) | | | |
| C/C | 40% | 50% | 0% |
| T/T | 28% | 21% | 71% |
| T/C | 33% | 29% | 19% |
| rs7294(3730 G>A) (N=50) | | | |
| G/G | 44% | 33% | 71% |
| A/A | 9% | 8% | 0% |
| A/G | 48% | 58% | 19% |

表 1・VKORC1 各遺伝子多型のジェノタイプ頻度
本研究により検討した日本人の解析結果を灰色のカラムに示した。白人における解析結果を NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) および HapMap データベース EUC セクションから引用して併記した。

D. 考察

翻訳領域内の多型 rs17881770 (129C>T at Cys43)、rs7200749 (3462C>T Leu120) は、日本人においてはその頻度は極端に低いことが示された。ヨーロッパのグループより VKORC1 の 112G>T Asp38Tyr、3556G>A Arg151Gln などが報告されているが、日本人では検出されなかった。

非翻訳領域の rs9934438(C1173T)、rs7294(G3730A)の2 SNPs は、多型性が高いことが示された。(ワーファリン維持量との関連性については山岸分担研究者の研究報告書を参照)。rs9934438(C1173T)、rs7294(G3730A)の2 SNPs について日本人とイタリア人の間でアレル頻度に差を認めた。1173 C>T 多型の CC ホモ接合体は、ヨーロッパ人種の頻度と大きく異なり、本研究では検出されなかった。

また、1173 C>T 多型について TT ホモ接合体であったものは、3730G>A 多型についてはすべて GG ホモ接合体であり、また 1173 C>T 多型について CT ヘテロ接合体であったものは、3730G>A 多型についてすべて AG ヘテロ接合体であった。すなわち完全な連鎖不平衡を認めた。

E. 結論

遺伝子解析を行う上で、その遺伝子上に存在する多型の位置や頻度といった基礎的なデータは、以降の研究プロトコルを作成する際に不可欠な情報である。今回、未だ情報の少ないVKORC1遺伝子の日本人多型に関する情報を得た。

本研究においては、1173T>C 多型における CC ホモ接合体が同定されなかった。サンプル数を増すことにより、日本人における頻度を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

本研究課題に関する発表はない。

H. 参考文献

D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005;105:645-9.

Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappégard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004;427:537-41.

厚生労働科学研究費補助金
(小児疾患臨床研究：小児疾患臨床研究分野)

クロバザムおよびデスメチルクロバザムの血中濃度予測

—CYP2B6 の遺伝子多型の影響の評価—

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 クロバザム (CLB) の活性代謝物である N-デスメチルクロバザム (N-CLB) は、血中半減期が長く、定常状態における血中濃度が親化合物に比べ極めて高いことから、CLB 治療における効果や副作用の発症に重要な影響を与える事が知られている。しかし、血中 N-CLB/CLB 濃度比には大きな個人差が認められるため、至適投与量の設定が困難な状況である。これまでの研究により N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および血中 N-CLB/CLB 濃度比に存在する大きな個人差は CYP2C19 の遺伝子多型により説明できることを示した。しかし、CYP2C19 の多型によっても CLB の薬物動態の個人差を完全に説明することはできない。最近の *in vitro* の研究により CLB から NCLB への変換は CYP3A4 や CYP2B6 が担うことが明らかにされた。したがって、CLB の薬物動態の個人差を CYP3A4 や CYP2B6 多型により説明できる可能性が予測される。本研究では、日本人において多型性の高い CYP2B6 の遺伝子多型部位 3 カ所について、簡便にタイピングしうる方法を開発し、クロバザム所要量との関連を評価した。体重あたりのクロバザム投与量により標準化した CLB 濃度に CYP2B6 多型が与える影響は小さく、クロバザム所要量の主たる決定因子は CYP3A4 誘導薬の併用の有無であった。

研究協力者

| | |
|-------|------------------|
| 小崎健次郎 | 慶應義塾大学医学部小児科 助教授 |
| 田村和代 | 慶應義塾大学医学部小児科 医師 |
| 荒巻道彦 | 慶應義塾大学医学部小児科 医師 |
| 鮫島葉月 | 慶應義塾大学医学部小児科 研究員 |
| 鳥居千春 | 慶應義塾大学医学部小児科 研究員 |
| 高橋大輔 | 慶應義塾大学医学部小児科 研究員 |

A. 研究目的

クロバザム (CLB) の活性代謝物である N-デスメチルクロバザム (N-CLB) は、血中半減期が長く、定常状態血中濃度が親化合物に比べ極めて高いことから、CLB 治療における効果や副作用の発症に重要な影響を与える。しかし、血中 N-CLB/CLB 濃度比には大きな個人差が認められるため、治療域の設定が困難である。

本研究班ではこれまでの研究により CYP2C19 遺伝子多型が N-CLB・CLB 代謝に及ぼす影響について検討した。1.5~33 歳の 22 名のてんかん患者を対象とし、CLB・N-CLB の定常状態血中濃度を測定した。CYP2C19 の遺伝子型により、対象患者を第 1 群 (*1/*1: 7 名)、第 2 群 (*1/*2 または *1/*3: 10 名)、第 3 群 (*2/*2 または *2/*3: 5 名) に分け、二元配置分散分析法にて検討した。血中 N-CLB/CLB 濃度比は、第 1 群: 5.4、第 2 群 10.9、第 3 群 32.6 となり、CYP2C19 遺伝子型の影響が顕著であった ($P < 0.0001$)。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比 [(ng/mL)/(mg/kg/day)] は各群でそれぞれ 2111、5396、12836 となり、やはり変異アレル数に依存していた ($P = 0.0001$)。N-CLB 血中濃度/CLB 投与量比および血中 N-CLB/CLB 濃度比に存在する大きな個人差は CYP2C19 の遺伝子多型により説明できることを示した。

しかしながら、CYP2C19 の多型によっても CLB の薬物動態の個人差を説明することはできない。最近の研究において、CLB から N-CLB に代謝される過程に関わる酵素として CYP3A4 遺伝子の他に CYP2B6 遺伝子が関与していることが報告された。(Giraud et. al., 2004)。CYP3A4 や CYP2B6 の多型によって CLB の薬物動態の個人差を説明できる可能性が予想される。

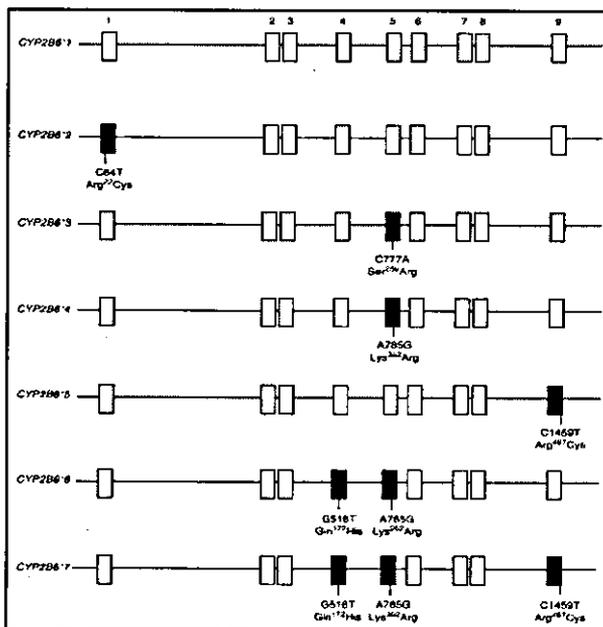


図 1. CYP2B6 遺伝子の遺伝子多型

CYP2B6 遺伝子は約 27kb、9つのエクソンから構成されている。この遺伝子中には多くの遺伝子多型が存在する（図 2 および <http://www.imm.ki.se/CYPallels/> 参照）。最近の Iwasaki らの報告によれば、CYP2B6 タンパクの第 172 アミノ酸グルタミンがヒスチジンに置換されている場合 (Gln172His) は、酵素活性が約 2 倍に上昇している。また、Jinnno らの報告によれば、第 262 アミノ酸リジンがアルギニンに置換されている場合 Lys262Arg 多型について、Lys262 多型の活性は上昇している。

そこで、本研究では、日本人において多型性

の高い多型部位 3カ所について、タイピングを行う方法を開発し、クロバザム所要量との関連を評価した。

B. 研究方法

・患者群

慶應義塾大学大学病院の小児神経外来に通院中でてんかん患者を対象とした。CLB 錠剤ないし顆粒製剤（大日本製薬マイスタン）を経口投与されており、処方量が 4 週間にわたって不変である患者を解析対象とした。

1) SNP 多型解析

慶應義塾大学医学部倫理審査委員会の審査・承認を得て遺伝子解析を実施した。QIAGEN 社の脱塩カラムにより全血からゲノム DNA を抽出、PCR 増幅を行い、直接シーケンシング法によりジェノタイピングを行った。

<CYP2B6>

CYP2B6 遺伝子多型*2、*4、*6 はそれぞれ CYP2B6 遺伝子のエクソン 1、4、5 に位置している。CYP2B6 遺伝子は CYP2B7 遺伝子のゲノム配列ときわめて相同性が高いため、exon 1、4 に関しては論文に記載されているプライマー (Lamba.et.al., 2003) を使い、exon5 に関しては UCSC ゲノム・ブラウザー (<http://genome.cse.ucsc.edu/>) から CYP2B6 および CYP2B7 遺伝子のゲノム配列を入手し、BLAT

(<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) において相同性検索を行い、exon 5 を特異的に増幅する PCR プライマーを設計した。

解析の条件は以下の通りである。

PCR amplicon 及び primer sequence
exon1 449bp

GCTAATGCTCCTGGATGATGATGAAAAAG
GAGGTGGGGAATGGATGAAATTTTATAAC
AGGGTGCAGAGGCAGGGTCAGGATAAAA
GGCCCAGTTGGAGGCTGCAGCAGGGTGC
AGGGCAGTCAGACCAGGACCATGGAAC
CAGCGTCCTCCTCCTTGCCTTGCCTCCTCA
CAGGACTCTTGCTACTCCTGGTTCAGCGC
CACCTAACACCCATGACCGCCTCCCACC
AGGGCCCCGCCCTCTGCCCTTTTGGGA
AACCTTCTGCAGATGGATAGAAGAGGCCT
ACTCAAATCCTTTCTGAGGGTAAGACACA
GACGAATGGGGTCTGAGGGTGAGCTGCT
TCTTGCCTTGGTACTTGGGGAAGCTTAC
CAAACAGAATGAGGCAGACTTCCAGAGT
CAGGGGTGGCACGGGCATGGTTGGTGAG
TACGGAGCATGCTGAAGCATG

forward GCTAATGCTCCTGGATGATG
reverse CATGCTTCACCATGCTCC

exon4 526bp

GGTCTGCCCATCTATAAACTGGAGCTAAT
AATCAAATTGCATCTGCCTCACATTGTTG
TAGTGAGAGTTCAATGGAATTACGCGTGA
CGTGCTGGTACATAATTAGCTGTTACGGT
TATTCTCATGTTTACCATTACTGAGTGATG
GCAGACAATCACACAGAGATAGGTGACA
GCCTGATGTTCCCCAGGCACTTCAGTCTG
TGTCCTTGACCTGCTGCTTCTTCCTAGGG
GCCCTCATGGACCCACCTTCTTCCA
GTCCATTACCGCCAACATCATCTGCTCCA
TCGTCTTTGGAAAACGATTCCACTACCAA
GATCAAGAGTTCTGAAGATGCTGAACTT
GTTCTACCAGACTTTTTCACTCATCAGCT
CTGTATTCCGGCCAGGTCAGGGAGACGGA
GAGGGACAGGGGGTGTGGGGGTGAGGT
GAACACCCAGAACACACGAGAAAAGGAT
GACCTGTCTTGGGGGCTCAGAAATGCAG

CTTATCCTTGGAAGAAACGCAGACATGTG
AAGAATCAG

forward GGTCTGCCCATCTATAAAC
reverse CTGATTCTTCACATGTCTGCG

exon5 969bp

GAAGGAAATTTACATCTGACTATATATGTT
TGCATTTTTGCAATTATTTGCAATAAATTA
GGCATTCCATTCTTCATCAAAGTAATAGA
AATAACCTCCAAAATACGTAGTCCTAACAT
GTCAGCAGGCTTATCTTGTGTAAGAATCA
TTTTATTAATATCTGACACAGCAAGGGAG
ATGAGGAGAGGTGGGAAGAGGGAGAGAA
AAGTATGAGAAAGACAAATAAACAGGCTG
AGGTAGACAATGGGTGACACAGAAAGGA
AGTGAGACAGAGACTAAGAGAGATAGAA
AGGAGAGAGGCAGGGAGATGGGGCAGAG
GCCAAGAAAAGACAGAAGGATGAGGGA
GGAAGATGCAGAAAGAGGTAAATGTGAG
ATAGATCAAAGGAGATATAGAGTCAGTGA
GTGAGGGGTTTCAGAGGCAGAGGGGAGTG
GGGAAGTGGGGTTCCTATGGAGGGATTG
GGGCCAGGAGGCGCTCTCTCCCTGTGA
CCTGCTAGCTCAGCCCTAGGCAAACCTCA
CCACCCCTTCTTTCTTGCAGCTGTTTGAG
CTCTTCTCTGGCTTCTTGAAATACTTTCT
GGGGCACACAGGCAAGTTTACAAAACC
TGCAGGAAATCAATGCTTACATTGGCCAC
AGTGTGGAGAAGCACCGTGAACCCCTGG
ACCCAGCGCCCCAAGGACCTCATCGA
CACCTACCTGCTCCACATGGAAAAAGTGG
GGTCTGGGAGAGGAAAAAGGGAAGGGAG
GGGAGGGAGGGCAAGATGGAGAGGTGAG
AAGAGGGAGGGAAAAGGGTAGGGGAAGG
GGAAGATGGGGAGGGAAGAAGAAAGACT
AGGGAGGGGAGAATAGGGAAAAGGGAGGA
GAGAACATGAGGAAGGAAAGAAAGATGA

GGTCAAAGGAGGGAGAAAATAGGGAGGA
GGAAGTGAAGACAGGGAGAGAGGGGAGGT
GGGAAGACAGAATGAAAGACAGAGGGAG

forward GAAGGAAATTTACATCTGAC
reverse CTCCCTCTGTCTTTTCATTCTG

PCR反応条件

Template DNA : 50 ng Genomic DNA
Polymerase : 0.5 U Platinum Taq
Polymerase High Fidelity, Invitrogen
PCRBuffer : Invitrogen attached buffer
Reaction Vol. : 20.0 l
Primer 1 conc.: 0.5 M (dried up in each vial)
Primer 2 conc.: 0.5 M (dried up in each vial)
MgSO4 conc. : 2mM
dNTPs conc. : 0.2 mM

Cycle program

Initial Denaturation

Denaturation: 95 °, 5:00 mins

TouchDown Cycles

Denaturation: 95 °, 0:30 mins
TD Anneal Start: 63 °, 0:30 mins
Decrement: 0.5 °
Extension: 68 °, 1:00 mins
Cycles: 10

Cycling Conditions

Denaturation: 95 °, 0:30 mins
Anneal: 58 °, 0:30 mins
Extension: 68 °, 1:00 mins
Cycles: 26

<CYP2C19>

平成 15 年度の報告以降研究を継続、34 名中
18 人について新たにジェノタイピングを行っ

た。

CYP2C19*2(681G>A)

forward AATTACAACCAGAGCTTGGC
reverse CTTCTCCATTTTGATCAGGA

Initial Denaturation

Denaturation: 95 °, 5:00 mins

Cycling Conditions

Denaturation: 95 °, 0:30 mins
Anneal: 58 °, 0:30 mins
Extension: 68 °, 0:30 mins
Cycles: 35
Final Extension: 68 °, 10:00 mins

CYP2C19*3(636G>A)

forward
TATTATTATCTGTAACTAATATGA
reverse ACTTCAGGGCTTGGTCAATA

Initial Denaturation

Denaturation: 95 °, 5:00 mins

Cycling Conditions

Denaturation: 95 °, 0:30 mins
Anneal: 52 °, 1:00 mins
Extension: 68 °, 1:00 mins
Cycles: 40
Final Extension: 68 °, 10:00 mins

2) CYP2B6 多型と

クロバザム血中濃度の関連

多重回帰モデルにより変異アレルの個数と
CLB 血中濃度の関係の評価した。この際に、体
重あたりのクロバザム投与量で補正をおこなっ
た。使用したプログラムについては補遺参照。

C. 研究結果

解析の結果、exon 1、4、5 それぞれを増幅する Primer 対を設計し、実際に設計した Primer 対で標的配列が増幅出来ていることを確認した。また各 exon を同一条件下で増幅することが可能であった。

また、これらの検討から、日本人における各ハプロタイプのアレル頻度および、各遺伝子型の頻度は表 1 に示す如くとなった。

表 1・CYP2B6 におけるジェノタイプ及びハプロタイプ頻度

| genotype | No.of individuals (total 34) |
|----------|------------------------------|
| *1/*1 | 19 |
| *1/*2 | 1 |
| *1/*4 | 2 |
| *1/*6 | 7 |
| *2/*4 | 2 |
| *2/*6 | 1 |
| *4/*4 | 1 |
| *6/*6 | 1 |

| haplotype | allele (total 34) | % |
|-----------|-------------------|-----|
| 1 | CGA | 75% |
| 2 | CTG | 13% |
| 3 | CGG | 5% |
| 4 | TTG | 1% |
| 5 | TGG | 3% |
| 6 | TGA | 3% |

<クロバザム投与量と

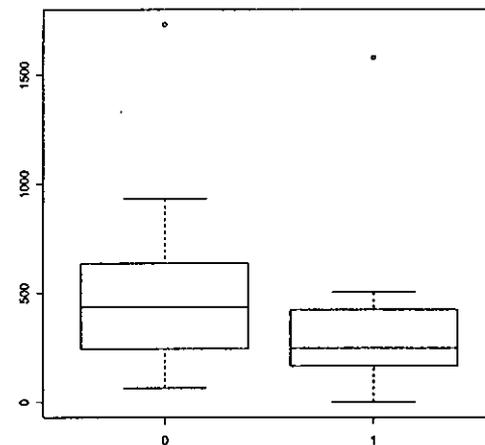
クロバザム血中濃度の関連>

多重回帰モデルにより変異アレルの個数と

CLB 血中濃度の関係性を評価した Gln172His、Lys262Arg のいずれの多型についても、CLB の定常状態の血中濃度に大きな影響を与えないことが示された。

1) Gln172His

横軸に His172 アレル数、縦軸に体重あたりのクロバザム投与量により標準化した clb 濃度をプロットした。



His172 を 1 個持つ群 (すなわち Gln/His ヘテロ接合体) の方が、Gln/Gln ホモ接合体群に比して、体重あたりのクロバザム投与量により標準化した clb 濃度が低い傾向が認められたが統計的には有意ではなかった。2 名の outlier がいたが、その原因は不明であった。outlier を除いた解析結果は不変であった。

統計モデル：

体重あたりのクロバザム投与量により標準化した clb 濃度 ~ His アレル数 + CYP3A4 誘導薬の併用の有無

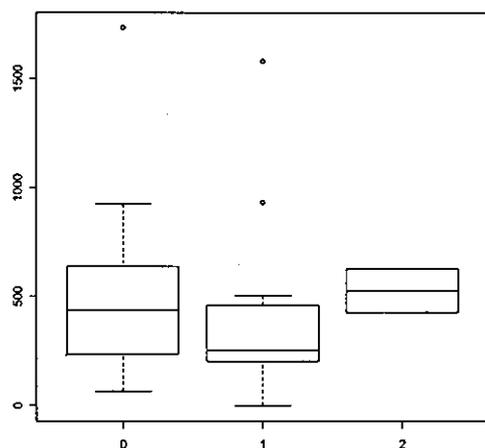
His アレル数： p 値

CYP3A4 誘導薬の併用の有無：

2) Lys262Arg

横軸に Arg262 アレル数、縦軸に体重あたりの

clb 濃度をプロットした。



Arg262 アレル数と体重あたりのクロバザム投与量により標準化した clb 濃度に関連を認めなかった。3名の outlier がいたが、その原因は不明であった。outlier を除いた解析結果は不変であった。

D. 考察

日本人において比較的頻度の高い CYP2B6 の遺伝子型を簡便にタイピングする方法を開発した。体重あたりのクロバザム投与量により標準化した CLB 濃度を比較すると、Gln172His 多型について、His172 を 1 個持つ群 (すなわち Gln/His ヘテロ接合体) では 410、Gln/Gln ホモ接合体群では 520 と、前者が後者に比して低い傾向を認めた。CYP2B6 タンパクの第 172 アミノ酸グルタミンがヒスチジンに置換されている場合 (Gln172His) は、酵素活性が約 2 倍に上昇しているという *in vitro* の報告に合致する傾向であった。しかし、上記の傾向は統計学的には有意と云えず、3A4 誘導性抗けいれん薬の併用のほうが CLB 血中濃度に大きな影響を与える ($p=0.0002$) ことが示された。

Lys262Arg のいずれの多型についても、CLB の定常状態の血中濃度に大きな影響を与えないことが示された。

E. 結論

クロバザム所要量と CYP2B6 多型・CYP3A4 誘導薬の併用の有無の関連を評価した。体重あたりのクロバザム投与量により標準化した CLB 濃度に CYP2B6 多型が与える影響は小さく、クロバザム所要量の主たる決定因子は CYP3A4 誘導薬の併用の有無であった。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethyleclobazam.

Kosaki K, Tamura K, Sato R, Samejima H, Tanigawara Y, Takahashi T. *Brain Dev.* 2004 Dec;26(8):530-4.

H.参考文献

1) Giraud C, Tran A, Rey E, Vincent J, Treluyer JM, Pons G.: *In vitro* characterization of clobazam metabolism by recombinant cytochrome P450 enzymes: importance of CYP2C19. *Drug Metab Dispos.* 2004 Nov;32(11):1279-86.

2) Hiratsuka M, Hinai Y, Konno Y, Nozawa H, Konno S, Mizugaki M.: Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2B6 gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004 Apr;19(2):155-8.

3) Hiratsuka M, Takekuma Y, Endo N, Narahara K, Hamdy SI, Kishikawa Y, Matsuura M, Agatsuma Y, Inoue T, Mizugaki M.: Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and

CYP3A5 in the Japanese population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2002 Sep;58(6):417-21. Epub 2002 Aug 14.

4) Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM.: Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*. 2001 Jul;11(5):399-415.

5) Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD,

Rogan PK, Ring B, Wrighton SA, Schuetz EG.: Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Dec;307(3):906-22. Epub 2003 Oct 09.

6) Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, Makino Y, Matsushima E, Hanioka N, Ando M.: Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug Metab Dispos*. 2003 Apr;31(4):398-403.

7) Iwasaki M, Yoshimura Y, Asahi S, Saito K, Sakai S, Morita S, Takenaka O, Inoda T, Kashiwama E, Aoyama A, Nakabayashi T, Omori S, Kuwabara T, Izumi T, Nakamura K, Takanaka K, Nakayama Y, Takeuchi M, Nakamura H, Kametani S, Terauchi Y, Hashizume T, Nagayama S, Kume T, Achira M, Kawai H, Kawashiro T, Nakamura A, Nakai Y, Kagayama A, Shiraga T, Niwa T,

Yoshimura T, Morita J, Ohsawa F, Tani M, Osawa N, Ida K, Noguchi K.: Functional characterization of single nucleotide polymorphisms with amino acid substitution in CYP1A2, CYP2A6, and CYP2B6 found in the Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2004 Dec;19(6):444-52.

8) Ariyoshi N, Miyazaki M, Toide K, Sawamura Yi, Kamataki T.: A single nucleotide polymorphism of CYP2b6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Mar;281(5):1256-60.

9) Xie HJ, Yasar U, Lundgren S, Griskevicius L, Terelius Y, Hassan M, Rane A.: Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(1):53-61.

補遺：多変量解析のためのプログラム
(統計解析言語 R による)

クロバザム血中濃度と CYP2B6 多型の関連の
検討のためのスクリプト

```
# データの読み込み
clb<-read.csv("clb30_His.csv")
attach(clb)

# 変異アレル数を読み込み factor とする
# His172 を評価するとき
mut.factor<-as.factor(His172)
# Arg262 を評価するときは
# mut.factor<-as.factor(Arg262)

library(survival)
library(Hmisc)
library(Design)

# 体重あたりのクロバザム投与量により標準
化した CLB・NCLB 濃度
clb.dosage<-CLBconc/dose.kg
nclb.dosage<-NCLBconc/dose.kg

ddist<-datadist(pid, wt, dose.body ,dose.kg,
```

CLBconc, clb.dosage,nclb.dosage, NCLBconc,
mut.factor, mut, X2C19allele)

```
options(datadist="ddist")
```

```
#体重あたりのクロバザム投与量により標準化
した CLBb・NCLB 濃度に対する、His172 ア
レル数の影響
```

```
plot(mut.factor, clb.dosage)
```

```
# 体重あたりのクロバザムと CLB 血中濃度の
関係を mut.factor 数により分類し、しかも
cyp3a4 誘導薬の併用の有無についても同時に
評価する。
```

```
f.clb.dosage<-ols(clb.dosage~mut.factor+hei
o)
```

```
anova(f.clb.dosage)
```

```
mean(clb.dosage[mut.factor==0])
```

```
mean(clb.dosage[mut.factor==1])
```

```
#####
```

```
NCLB についても評価
```

```
f.nclb.dosage<-ols(nclb.dosage~mut.factor+he
iyo+ X2C19allele)
```

```
anova(f.nclb.dosage)
```