

- 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.
- [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 characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics* 2002;12:703-711.
- [24] 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 ;32(11):1279-86.
- [25] 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 ;19(2):155-8.
- [26] 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 ;58(6):417-21.
- [27] 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;11(5):399-415.
- [28] 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;307(3):906-22.
- [29] 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 ;31(4):398-403.
- [30] 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 ;19(6):444-52.
- [31] 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.
- [32] 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+heiy
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)
```

<付図>

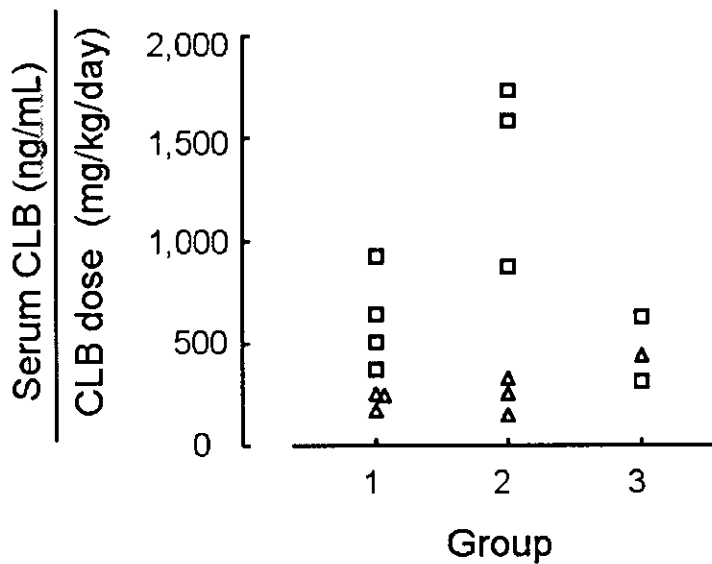


図 1-A(上)  
血中クロバザム(CLB)濃度 / クロバザム投与量比 に与える CYP2C19 多型の遺伝子量効果

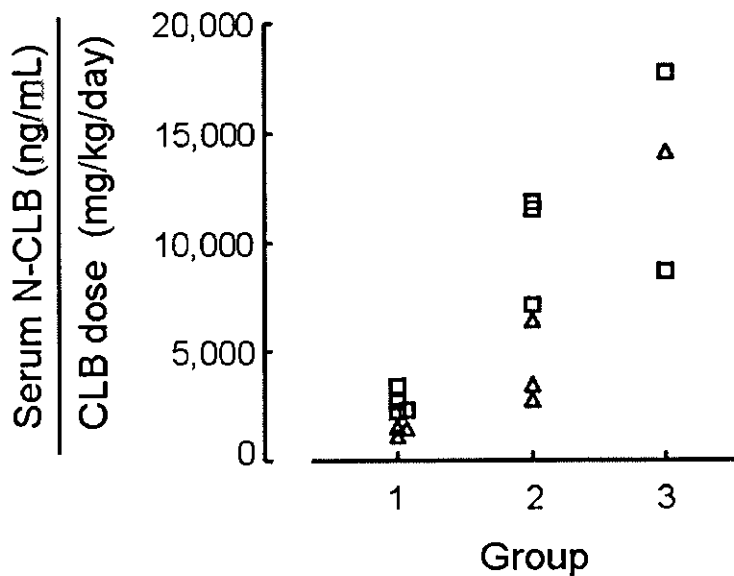


図 1-B(下)  
血中 N-デスマチルクロバザム(N-CLB)濃度/ クロバザム投与量比に与える CYP2C19 多型の遺伝子量効果

※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

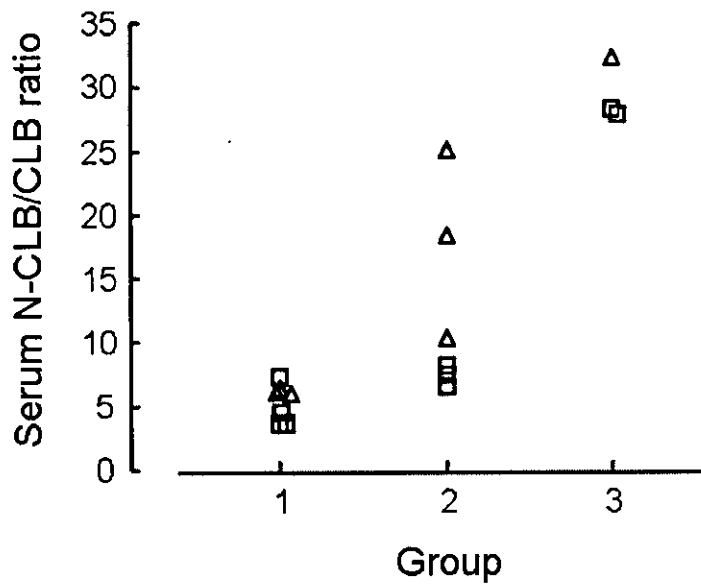


図2 血中 N-デスメチルクロバザム濃度 / 血中クロバザム濃度比に与える CYP2C10 多型の遺伝子量効果

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

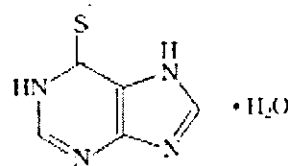
厚生労働科学研究費補助金  
(小児疾患臨床研究：小児疾患臨床研究分野)  
総合研究報告書

熱変成高速液体クロマトグラフィー法を用いた遺伝子多型スクリーニングシステム解析法の最適化  
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 薬物代謝酵素の遺伝子検査を、臨床応用するためには、迅速・正確・低コストに、遺伝子検査を実施しうるシステムを構築する必要があるが、現在、使用されているRFLP法や直接シーケンシング法はこれらの要件を満たしていない。本研究では、TPMT 遺伝子多型検査を診療に応用するために熱変性高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)を用いて、高感度・高効率・低コストな遺伝子診断プロトコルを策定した。DHPLC法による検査手法は、遺伝子上に存在する既知の多型のみならず、非常に頻度の低い多型や未知の多型を解析することが可能である。本研究では、チオプリンメチル転移酵素(以下 TPMT) 遺伝子スクリーニング検査プロトタイプとして、臨床検査に供しうる遺伝子診断システムの開発を行った TPMT は白血病治療の中心的薬剤である 6-メルカプトプリン(以下 6MP)を不活化される。TPMT 機能の低下する多型を有する患者では 6MP 投与時に強い骨髄抑制が生じる。TPMT 遺伝子検査により副作用を事前回避する試みが行われているが、臨床検査として TPMT 遺伝子診断を行っている施設は少ない。この原因の一つとして高感度・高効率・低コストな遺伝子診断プロトコルがまだ確立していないことが問題であった。3年間の研究を通じて、検査プロトコルを確立し、多施設共同研究としてシステムの運用を開始した。

研究協力者

森 鉄也 慶應義塾大学医学部小児科  
専任講師  
熊谷昌明 国立成育医療センター  
血液腫瘍科 医員  
島崎紀子 慶應義塾大学医学部小児科 助手  
荒巻道彦 慶應義塾大学医学部小児科 医師  
鳥居千春 慶應義塾大学医学部小児科 研究員



6-メルカプトプリン

6-MP は 急性白血病・慢性骨髄性白血病にたいして保険適応が認められており、小児期において最も頻度の高い悪性腫瘍である ALL の治療において、維持療法の中心的薬剤である。維持療法の 2~3 年間の期間中、患者は 6MP とメソトレキセートの組み合わせを内服する。この期間中、患者の骨髄は人工的に抑制された状況に置かれ、その程度を参照しつつ薬剤投与のスケジュールが決定される。

小児期の ALL は治療可能な疾患と考えられているものの、1/3 の症例は完治しない。治療成績の

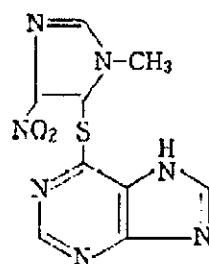
A. 研究目的

6-メルカプトプリン(以下、6-MP、商品名ロイケリン)はプリン体の類似体である。

向上を目指すためには、6MP の複雑な薬理学的特性を理解する必要がある。特に 80% の ALL の再発例は造血組織内で起こっており、骨髄において 6MP が十分に効果を発揮することが重要である。6MP はいわゆるプロドラッグで薬効を発現する前に代謝される必要があり、その抗腫瘍活性は投与量ばかりでなく、6MP から活性中間体への変換効率によっても大きな影響を受ける。まず 6MP は 6-thioinosine monophosphate に変換され、その後、6-thioguanine triphosphate nucleotide (6-TGN) に変換される。6-TGN が DNA に取り込まれることにより、DNA リガーゼ・エンドヌクレアーゼ・ポリメラーゼの阻害により 6-MP の抗腫瘍活性が発揮される。

6-MP は主として肝臓でキサンチンオキシダーゼ(XO)によってチオ尿素(thiouric acid)に代謝されて尿中に排出される。XO は小腸・肝臓に発現しているが、血球細胞にはほとんど存在しない。また 6-MP は標的臓器である造血細胞中で、ヒポキサンチングアニンホスホリボシル転移酵素(HGPRT)によりチオグアニン化合物に変換され、薬効と細胞毒性を発揮する。一部の 6-MP はチオグアニン化合物に変換されることなくチオプリン転移酵素(TPMT)によりメチル化され、不活化される。メチル化した 6MP と 6-TIMP はプリンサルベージ経路を阻害する作用を有するが、毒性効果としては、6-TGN 程重要ではない。結果として TPMT は 6-TGN 産生量を調節しており、その活性は 6MP の抗腫瘍効果の主たる決定因子となる。

アザチオプリン(商品名: イムラン・アザニン)は体内で非酵素的に 6-メルカプトプリンに変換される。アザチオプリンは腎移植、肝移植、心移植、肺移植の移植における拒絶反応の抑制に保険適応が認められている。



アザチオプリン

TPMT を欠損する患者では 6MP 投与時に強い骨髄抑制が生じる。臨床的経験からは、TPMT 欠損ホモ接合体患者に対する 6MP の至適投与量は常用量の 5~10% 程度である。赤血球のライゼームを用いて、活性を測定し、標的臓器における代謝活性の参照値とすることが行われている。赤血球 TPMT 活性には民族間差が存在する。例えば北ノルウェーの研究によれば、Saami という民族における赤血球の TPMT 活性は同地域に住む白人に比べて、29% 高値であった。アメリカの白人に比べて黒人の TPMT 活性は 17-33% 低かった。アメリカの黒人や白人の TPMT 活性は 119 人の中国人に比べて、有意に低い。

6MP やアザチオプリンの投与前に赤血球 TPMT 活性を測定して副作用を事前回避する試みが行われているが、輸血すると患者自身の TPMT 酵素活性を測定することが出来なくなる。そこで 6-MP 投与前に遺伝子検査を行ってリスクの高い患者を同定することが出来れば、低用量で治療を開始することにより副作用の発症を防止できると期待される。TPMT 遺伝子は第 6 染色体 6p22.3 に存在し、大きさは 28kb で 10 エクソン・9 イントロンからなっている。cDNA の翻訳領域内・スプライス部位のいくつかの SNP を持つ患者の TPMT は有意に低下している。これまでに、8 箇所の TPMT の SNP が\*同定されており(表 1)、そのうちの\*2、\*3A、\*3C の 3 カ所の SNP は白人においては TPMT 活性が低いし中間値である者の 80~95% を占める。



型	Exon	塩基置換	アミノ酸置換	
*2	5	G238C	Ala80Pro	代謝能低下
*3A	7/10	G460A/ A719G	Ala154Thr/ Tyr240Cys	代謝能低下
*3B	7	G460A	Ala154Thr	代謝能低下
*3C	10	A719G	Tyr240Cys	代謝能低下
*4	(-1)10	G→A	—	
*5	4	T146C	Leu495Ser	代謝能低下
*6	8	A539T	Tyr180Phe	代謝能低下
*7	10	T681G	His227Glu	代謝能低下
*8	10	G644A	Arg215His	代謝能低下

Table. 1 TPMT 遺伝子既知多型一覧

TPMT 遺伝子の変異アレルの種類と頻度は民族間で異なっている。たとえば、\*2 アレル (G238C) は欧米白人における変異アレルの 6-9%をしめるが、アフリカ人やアジア人においては同定されていない。これらのことから、非白人においては\*2 アレルの頻度は非常に低いと考えられる。日本人健康人ボランティアでは、TPMT\*3C のみが検出されており、アレル頻度は 0.8%であった。TPMT\*3C のホモ接合体は 4000 人に 1人と試算される。欧米において\*3A アレルと\*3C アレルが強い骨髄抑制の発症に関連することが報告されている。日本人における\*3C 頻度は低いがアレルヘテロ接合体が強い骨髄抑制の発症に関連することが報告されている。

ジェノタイプが野生型の患者の間でも TPMT 活性には 5 倍程度の差違があり、発現レベルでの個人差を規定する要因がある可能性がある。6MP の薬理学特性をさらに解明する上で、「野生型」と考えられている人間における 6-MP の血中濃度の個人差を説明する遺伝学的メカニズムを明らかにする必要がある。以前に TPMT のプロモータに存在する VNTR の多型が TPMT の活性を調節する可能性が提唱されたが、野生

型の患者間の TPMT 活性の差を説明することは難しいと考えられている。最近、新たに\*4-\*8 の多型が同定されており、個人差に寄与している可能性があるが、日本人を含めた他の民族集団における頻度は未検討である。

#### TPMT の遺伝子検査

チオプリン類を投与する前に TPMT 遺伝子のジェノタイピングを行うことが、メイヨー医科大学やセント・ジュード小児病院でルチーンに行われている。しかしながら、臨床検査として TPMT 遺伝子診断を行っている施設は少ない。この原因の一つとして高感度・高効率・低コストな遺伝子診断プロトコルがまだ確立していない、ということがあげられる。TPMT 遺伝子多型検査を診療に応用するためにはこれらの条件を満たす検査システムを構築する必要があると考えられる。遺伝子多型の解析法には、直接シーケンシングする方法とスクリーニング後にシーケンシングする方法がある。またスクリーニングにも SSCP (single strand conformation polymorphism) など電気泳動に基づくものや、ASO (allele specific oligonucleotide)、heteroduplex などハイブリダイゼーションに基

づくものなど、原理が異なる方法が数多くある。また heteroduplex 解析後の検出法として DHPLC (Denaturing High Performance liquid Chromatography)、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)、TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) といった方法がある。

DHPLC はイオンペア逆層クロマトグラフィーの原理に基づくヘテロデュプレックス法の変法で、DNA を親水・疎水基を併せもつトリエチ

ルアンモニウムと結合させた後に、カラムに吸着させアセトニトリルの濃度勾配をかけることで極性の変化により溶出させ、DNA 断片の分離およびホモ 2 本鎖 (homoduplex) とヘテロ 2 本鎖 (heteroduplex) の分離を行う手法である (Fig1)。

本研究では DHPLC を用い、TPMT 遺伝子の遺伝子多型について効率的にスクリーニングする方法を構築し、同時に既知多型以外の領域についても全域を分析しうるシステムを確立した。

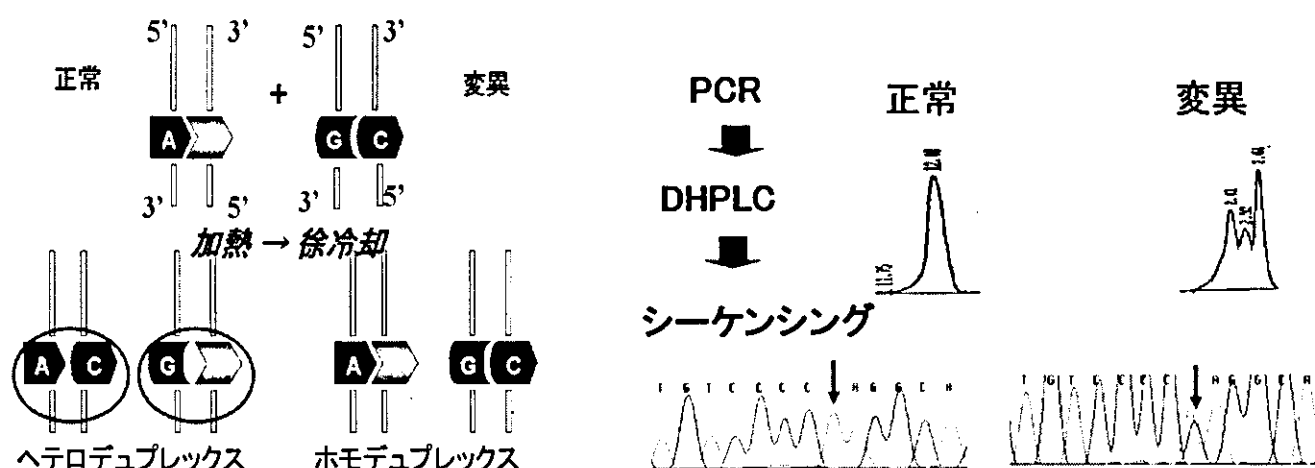


Fig1. Denaturing High Performance liquid Chromatography: Best separation of homoduplex and heteroduplex can be achieved at a specific column oven temperature and with an optimal acetonitrile gradient.

## B. 研究方法

### <全エクソンの PCR 同条件増幅>

TPMT 遺伝子における翻訳領域、第3エクソンから第10エクソンを増幅する PCR プライマー対を設計し、同条件下ですべての標的配列が増幅出来ていることを確認した (Fig2)。

このように PCR 条件を均一にすることにより、96well プレートに予め PCR に必要な試薬とプライマーを仕込み、患者 DNA を一括で投入後、プレートごと解析にかかる効率化を計ることができる。(Fig.3)

PCR 各条件、プライマーに関しては Table2 にまとめた。

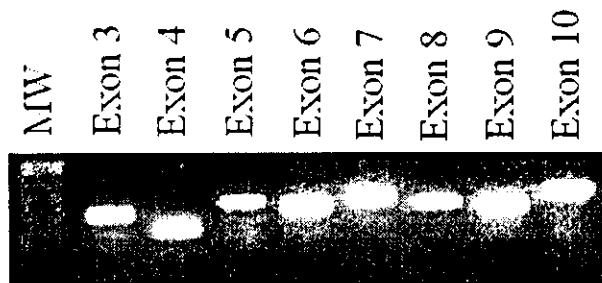


Fig. 2. PCR amplification of all coding exons of TPMT under a single condition, as shown in Table 2. The leftmost lane (MW) represents the 1-kb ladder marker showing 100-, 200-, 300-, 400-, 500-, 650-, 850-, and 1000-bp fragments; the other 8 lanes were loaded with 3  $\mu$ L of PCR products.

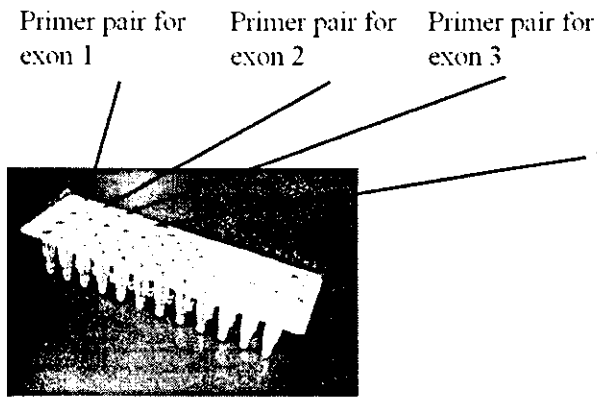


Fig. 3.

We shall refer to the 96-well plate with primer pairs and the corresponding computer file as the COPPER plate, “Condition-Oriented-PCR primer-Embedded-Reactor”

#### <既知 SNP の解析・Mutagenesis>

これまでに既報告の TPMT 各多型のヘテロ接合体について、DHPLC 法による判別が可能であるかどうか検討した。

検出対象とする既知 SNP は必ずしも頻度が高くなく、ヘテロ接合体 DNA をテンプレートに用いることは難しい。このため、Mutation のはいつた相補的な Primer を使用し、PCR 増幅産物に変異を導入する SOE-PCR の手法を用いて、各 SNP が導入されたサンプルを作成し、DHPLC 法により解析した。変異導入用の Primer 一覧は、Table3 にまとめた。

#### C. 研究結果

各エクソン中に存在する既知多型を DHPLC 法により解析したクロマトグラムを、一覧にした (Fig4)。

すべての変異導入テンプレートで、WT(野生型)との明確なピークの差異が認められた。同エクソン中であっても、変異場所が異なれば異なる波形を確認することができる。

#### D. 考察

DHPLC 法は、その原理から非常に高感度に PCR 増幅産物中の変異を検出することが可能である。結果から、同エクソン中であっても変異場所が異なれば異なる波形が確認されたが、すなわち多型のみならず、エクソン中にアミノ酸変異を引き起こしうる塩基置換等があった場合にも、上図パターン外の波形をもって検出されると考えられる。

昨今、我が国においても、TPMT 欠損の臨床的意義が認識されつつある。

たとえば、「イムラン錠・アザニン錠 (アザチオプリン錠)」の添付文書の「その他の注意」欄には、「チオプリンメチルトランスフェラーゼ (TPMT) が遺伝的に欠損している患者においては、骨髄抑制があらわれやすいとの報告がある。」と記載されている。しかしながら、我が国において、文書中にこのような記載があっても、TPMT の活性や遺伝子検査を実施しうる体制が存在せず、このような「注意事項」の記載には実質的な意味がない。早急な検査体制の整備が望まれる。

米国において 6MP の投与前に TPMT 遺伝子のスクリーニングを義務づけようという動きがあるが、反対する意見の根拠として 300 ドル前後かかる費用を上げるグループがある (Children's Oncology Group)。本研究で確立した TPMT 遺伝子スクリーニング法を利用すれば、主たる遺伝子多型である \*2、\*3 をスクリーニングするための費用は 1 サンプル 1000 円以下に抑えることが可能であり、投与前検査が普及に寄与すると期待される。アザチオプリンは日本でまだ保険適応外であるが、米国や欧米などでは関節リュウマチ・潰瘍性大腸炎・ネフローゼの治療に用いられている。米国においては、6MP 投与症例の白血病患者の 10 倍以上の数の潰瘍性大腸炎の患者にアザチオプリンが投与されていると云われている。我が国における白血病以外の疾患にたいするアザチオプリン

の使用実態を明らかにし、これらの使用に際して 考えられる。  
 TPMT 検査を行う得失についても検討が必要と

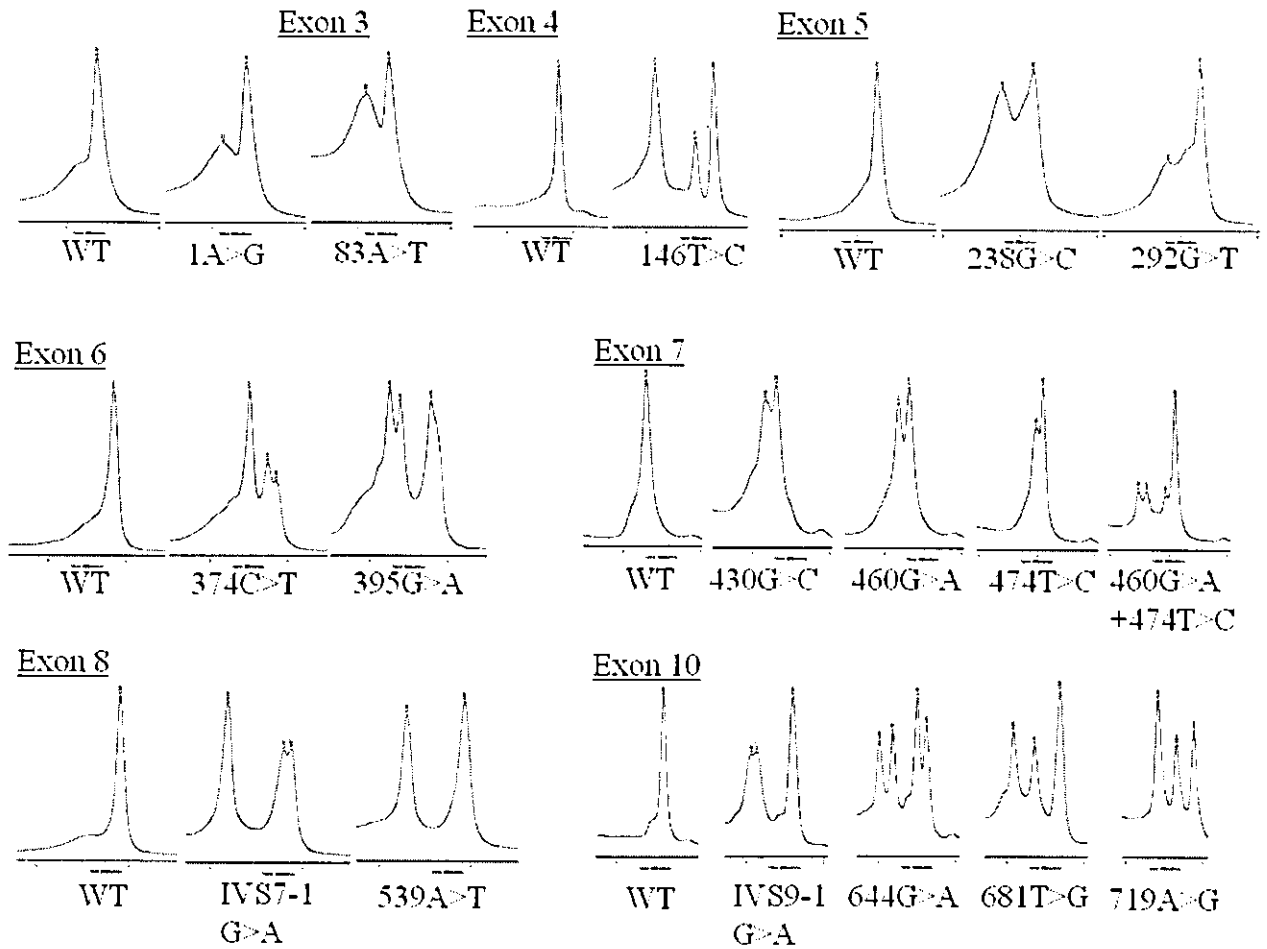


Fig. 4. DHPLC elution profiles previously reported TPMT polymorphisms within the coding region. The column temperatures were at 59.1 ° C, 56.2 ° C, 57.0 ° C, 56.4 ° C, 55.8 ° C, 56.5 ° C, and 55.2 ° C for exons 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 10, respectively. Exons 3, 4 and 10 were analyzed at two different temperatures (Table 2); only the chromatogram with the best resolution of the heteroduplex peaks was shown for each polymorphism. WT: wildtype homozygote.

Table 2 PCR primer sequences, PCR annealing temperature, and DHPLC analysis conditions for TPMT mutation screening

Exon	Primer sequence (5'-3') *1	PCR annealing temperature (°C)	DHPLC temperature (°C)	DHPLC Gradient (%B*3/ 4.5min)
3	3F GGGCCGGCCGGCCCGGGGgagacatatgctgtgaga	Touchdown*2	54.7	54-63
	3R tgtgaagaataaatgcatcc	63-58	59.1	50-59
4	4F taaaaccttttttttctcttc	Touchdown	56.2	49-58
4	4R GCGGCCCCCGCCCGttcatcattaaggaagataattctg	63-58	57.8	48-57
5	5F tctgtttctcgtcatgttctt	Touchdown	57.0	53-62
5	5R GCGGCCCCCGCCCGgctgtaataaggaaccatcg	63-58		
6	6F ctggccctttctctgac	Touchdown	56.4	54-63
6	6R cccatagttggagactaacc	63-58		
7	7F aaacgcagacgtgagatcct	Touchdown	55.8	54-63
7	7R gccttacaccaggctctg	63-58		
8	8F tggaccaattcccagcttag	Touchdown	56.5	55-64
8	8R agaaaaaaaaaaccacaact	63-58		
9	9F aacatgccacatcacct	Touchdown	56.4	53-62
9	9R ggtgatcgtcccaccttg	63-58		
10	10F ccaccatacccagctcattt	Touchdown	53.3	57-66
10	10R cctcaaaaacatgtaagtgtga	63-58	55.2	56-65

\*1 For exons 3, 4 and 5, non-template GC-clamp was added to the primers (shown in uppercase) to detect mutations within the higher melting temperature domain.

\*2 Touchdown protocol: The annealing temperature was decreased by 0.5°C every second cycle beginning at 63°C and decreasing to a 'touchdown' (Don et al., 1991) annealing temperature of 58°C, which was then used for 30 cycles.

\*3 Buffer A: 0.1 mol/L triethylammonium acetate; buffer B: 0.1 mol/L triethylammonium acetate containing 250 mL/L acetonitrile. "54-63" indicates that the gradient consists of 54% B: 46% A through to 63% B: 37% A.

Table 3 PCR primer sequences for site-directed mutagenesis of known TPMT polymorphisms

Known polymorphism	Outer forward primer <sup>1</sup>	Inner reverse primer sequence (5'-3') <sup>2</sup>	Inner forward primer sequence (5'-3') <sup>2</sup>	Outer reverse primer <sup>1</sup>
1A>G	3F	CCATCCACAGTTTCAGAGACACCT	CAAAGGTGTCTCTGAAACCTGTGGA	3R
83A>T	3F	CTTGCCATACITCCAGAGTTAGTA	TACTAACTCTGGAAGTATGGCAAG	3R
146T>C	4F	GTATCTAAATGCTTCTTTGATAGCCTGAAGAGG	CCTCTTCAGGCTATCAAAGAAAGCATTTAGATAC	4R
238G>C	5F	CGGTCTGGAAACCTGCATAAAATCATAC	GTATGATTTTATGCAGGTTTCCAGACCG	5R
292G>T	5F	GCTCTGTAAAAAATAATTATTGTATCCC	GGGATACAATAAATTTTTCACAGAGC	5R
374C>T	6F	AAATGTTCCCCAAAGAACTCTGT	ACAGAGTTCTTTGGGGAAACAATTT	6R
395G>A	6F	TCAAAAATACTGGCAATAGTACAATGA	TCAATGTACTATTGGCAGTATTTTGA	6R
430G>C	7F	GTCAAATTTGGGAATATTTGTCTTACC	GCTAGGACAAATATTTGGCAAATTTGAC	7R
460G>A	7F	GCAACTAATGTTCTCTATCCCAAATC	GATTTGGGATAGAGGAA <del>C</del> CAITTAGTTGC	7R
IVS7-1G>A	8F	GAAAACATTGTATCTGCATAGTTACAA	TTGTA <del>A</del> CTATGCAGATACAATGTGTTTC	8R
539A>T	8F	CACAGGAGAAAACCTGAAACTTCTTTCCC	GGGAAAAGAAAGTTTCAGTTCCTCCTGTG	8R
IVS9-1G>A	10F	TTGCATATTTTACTTTGAAACAAGA	TCTTGTTTCAA <del>A</del> GTAATAATATGCAA	10R
644G>A	10F	CTCAAGACAAAGTATATTTGCCAATTTT	AAATATGCAATATACATTTGCTCTTGAG	10R
681T>G	10F	CCAACTTTTCTGTGGTCTTTC <del>AA</del>	TTGAAGAACGCACAGAAAAAGTTGG	10R
719A>G	10F	GTAGACATAACTTTTCAAAAAGACAGCTCAATTTCCC	GGGGAATTGACTGCTCTTTTGGAAAAAGTTATGCTCTAC	10R

\*1 See Table 2 for primer sequence

\*2 Underlined nucleotide shows mismatch position

## E. 結論

TPMT 遺伝子多型検査を診療に応用するために熱変性高速液体クロマトグラフィー法を用いて、高感度・高効率・低コストな遺伝子診断プロトコルを策定した。主たる遺伝子多型である\*2、\*3 をスクリーニングするための費用は1サンプル 1000 円以下に抑えることが可能であり、投与前検査が普及に寄与すると期待される。

## 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>

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-desmethylclobazam. *Brain and Development*, 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

## H. 参考文献

Schaeffeler E, Lang T, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M. High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clin Chem*. 2001 Mar;47(3):548-55.

Seki T, Tanaka T, Nakamura Y. Genomic structure and multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene.

*J Hum Genet*. 2000;45(5):299-302.

Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans.

*Hum Mol Genet*. 1999 Feb;8(2):371-6.

Hall AG, Hamilton P, Minto L, Coulthard SA. The use of denaturing high-pressure liquid chromatography for the detection of mutations in thiopurine methyltransferase.

*J Biochem Biophys Methods*. 2001 Jan 30;47(1-2):65-71

Frueh FW, Noyer-Weidner M.

The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics.

*Clin Chem Lab Med*. 2003 Apr;41(4):452-61.

Yan L, Zhang S, Eiff B, Szumlanski CL, Powers M, O'Brien JF, et al.

Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:210-219.

Loennechen T, Yates CR, Fessing MY, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Isolation of a human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) DNA with a single nucleotide transition A719G (TPMT\*3C) and its

association with loss of TPMT protein and catalytic activity in humans. Clin Pharmacol Ther 1998;64:46-51

Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). Am J Hum Genet 1995;57(Suppl):A266.

Liu W, Smith DI, Rechtzigel KJ, Thibodeau SN, James CD. Denaturing high performance

liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations. Nucleic Acids Res 1998;26:1396-1400

Spiegelman JI, Mindrinos MN, Oefner PJ. High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. Biotechniques 2000;29:1084-1092



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)  
総合研究報告書

CYP2C9 遺伝子とワーファリン維持量の関連解析  
分担研究者 百々 秀心(国立成育医療センター 循環器科 医長)

研究要旨 ワーファリンはビタミン K 依存性血液凝固因子の産生の阻害を通じて、血液凝固能を低下させる抗凝固剤として高頻度に使われている薬剤である。心臓手術を含む外科手術後に、血栓が形成されやすい病態の時に投与される。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、臨床上問題視されている。現在、ワーファリンの効果を定める重要な要素として P450 酵素 CYP2C9 が知られている。CYP2C9 遺伝子の \*1\*3 多型ヘテロ接合体の成人患者群におけるワーファリンの一日投与量は \*1\*1 ホモ接合体の患者群における一日投与量に比して低値であることが 6 論文報告されている。本研究ではこれらの報告のメタ解析を行い、\*1\*3 多型ヘテロ接合体患者に対しては、初期投与量を減量することが合理的であると考えられた。しかし CYP2C9 に存在する多型性のあるアレル、\*2 は日本人においては頻度が極端に低く、\*3 の頻度は約 20-30 人に 1 人の割合である。これまでの研究班の研究でも 2 名の \*3 患者を同定しているが、日本人におけるワーファリンの効果を説明する上で、\*3 の頻度は低いため他の要因を検索する必要があった。このため、ワーファリン反応性を定める因子を新規に同定するため、更に CYP2C9 遺伝子のハプロタイプ解析を行い、4ヶ所の SNPs についてハプロタイプ構造を決定した(平成 16 年度総括研究報告「CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析」参照)。しかしワーファリン反応性と CYP2C9 遺伝子ハプロタイプとの関連を認めず、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。この検討結果を受けて、他の候補遺伝子座位として VKORC1 多型について検討を行い、同座位の多型とワーファリンの維持用量の間に相関を示した。

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  
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

A. 研究目的

ワーファリンはビタミン K 依存性血液凝固因子の産生の阻害を通じて、血液凝固能を低下させる抗凝固剤として高頻度に使われている薬剤である。心臓手術を含む外科手術後に、血栓が形成されや

すい病態の時に投与される。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、臨床上問題視されている。

現在、ワーファリンの効果を定める重要な要素として P450 酵素 CYP2C9 が知られている。CYP2C9 には多型性のある 2 つのアレル、\*2 と \*3 が存在し、日本人において比較的頻度が高い変異遺伝子は \*3 多型である。\*3 はアデニンからチトシンへの一塩基置換 (1075A>C) によるアミノ酸置換 (Ile359Leu) である。

この置換は酵素が基質薬物の形状を認識する部位に近いアミノ酸におきるSNPであり、酵素活性を減少させる。また、\*3ホモ接合体の患者のワーファリン必要投与量は\*1ホモ接合体の患者(野生型)の10分の1程度であることが示されている。ワーファリンは高頻度で使用される薬剤であり、また患者による初期投与量のさじ加減が難しい面がある。CYP2C9遺伝子多型がワーファリン維持量の個体差に関与するとすれば、これら多型解析は「患者個人に最適な薬剤投与方法」の確立に貢献すると考えられる。

## B.研究方法

### 1.メタ解析

CYP2C9遺伝子多型とワーファリンの一日投与量の関連について報告している各研究においては、対照患者の数が十分に多くないために、平均値の差の推定区間は大きく、ヘテロ群における一日投与量の予定投与量を設定する根拠となる十分なデータは得られていない。そこで、6論文のデータを統合したメタ解析を行った。

ワーファリンの遺伝子多型と臨床的エンドポイントの関連についての研究を網羅的に文献検索し、\*1\*3 多型と平均投与量、標準偏差に関するデータを抽出し、メタ解析の方法により、統合した。以下の6論文について検討した。各論文の要旨を補遺欄に要約した。出版年は2000年から2002年で、欧米成人患者を対象とした研究である。

以下に検討対象とした論文とその要約を示す。

・Taube, J., D. Halsall, et al. (2000).

Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment." *Blood* 96(5): 1816-9.

Taube らは INR 測定のために検査センターに

送付された匿名化された検体のうち標的 INR が 2.5 である患者 561 人について遺伝子型を決定し、平均ワーファリン投与量と遺伝子型が関連することを明らかにした。

遺伝子型	症例数	平均投与量 (mg/日)	標準偏差 (mg/日)
*1*1	392 名	5.01	2.43
*1*2	107 名	4.31	1.94
*2*2	3 名	3.04	1.29
*1*3	53 名	3.97	1.79
*3*3	0 名	—	—
*2*3	6 名	4.09	2.09

・Loebstein, R., H. Yonath, et al. (2001).

Interindividual variability in sensitivity to warfarin--Nature or nurture?

*Clin Pharmacol Ther* 70(2): 159-64.

Lobstein らは 156 名の患者のデータをもとに、体表面積で補正した一日投与量を非説明変数、年齢、2C9 遺伝子型(\*1、\*2、\*3の3群)、血中ワーファリン濃度、血中ビタミン K 濃度、併用薬を説明変数として、多重回帰分析を用いた統計モデルを作成した。

・Higashi, M. K., D. L. Veenstra, et al. (2002).

Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy: Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications.

*JAMA* 287(13): 1690-8.

Higashi らは標的 INR が 2.0-3.0 である患者 185 人(弁置換術後の者は標的 INR2.5-3.5)について遺伝子型を決定し、まず、これまでの研究と同様、遺伝子型と平均一日投与量の関係を検討している。

遺伝子型	症例数	平均 投与量 (mg/日)	標準偏差 (mg/日)
*1*1	127名	5.63	2.56
*1*2	28名	4.88	2.57
*2*2	4名	4.07	1.48
*1*3	18名	3.32	0.94
*3*3	5名	1.60	0.81
*2*3	3名	2.34	0.35

・Margaglione, M., D. Colaizzo, et al. (2000).  
Genetic modulation of oral anticoagulation with  
warfarin

Thromb Haemost 84(5): 775-8.

Margaglioneらは標的INRが2.5である患者180人(年齢中央値40.5歳、範囲15-84歳)について遺伝子型を決定し、平均ワーファリン投与量と遺伝子型が関連することを明らかにした(Kruskal-Wallis, p=0.001)

遺伝子型	症例数	平均投与量 (mg/日)	標準偏差 (mg/日)
*1*1	88名	6.7	2.9
*1*2	62名	5.2	2.2
*1*3	28名	3.8	2.0
*2*3	2名	1.8	0.1
*3*3	2名	-	-

・Tabrizi, A. R., B. A. Zehnauer, et al. (2002).

\*1\*1群 876名、\*1\*3群 156名

	標的 INR	*1*1			*1*3		
		N	投与量 mg/日	SD	N	投与量 mg/日	SD
Taube		392	5.01	2.43	53	3.97	1.79
Margaglione	2.5	88	6.7	2.9	28	3.8	2
Higashi	2.0-3.0	127	5.63	2.56	18	3.32	0.94
Loebstein		108	6.5	3.2	20	3.3	2
Scordo	2.0-3.0	54	5.59	2.21	16	2.94	1.02
Tabrizi	1.8-3.5	107	5.73	2.51	21	3.99	1.57

The frequency and effects of cytochrome P450  
(CYP) 2C9 polymorphisms in patients receiving  
warfarin

J Am Coll Surg 194(3): 267-73.

Tabriziらは論文の中で上記のような表を提示していないが、各群の標準誤差を記載している。

\*1\*1 40.1 +/- 1.7 mg/wk N=107

\*1\*3 27.9 +/- 2.4 mg/wk N= 21

・Scordo, M. G., V. Pengo, et al. (2002).

Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic  
polymorphisms on warfarin maintenance dose  
and metabolic clearance

Clin Pharmacol Ther 72(6): 702-10.

国立公衆衛生院の丹後俊郎博士著「メタアナリシス」(朝倉書店)に記載されているS言語によるプログラムをR言語環境下で、実行し、メタ解析を行った。固定効果モデル、混合効果モデル(DerSimonian-Laird法およびベイズ推定法)により、2群における平均値の差について推定を行った。

以上の6研究を集計し、以下の結果を得た。

## 2.CYP2C9 遺伝子ハプロタイプ解析

CYP2C9 遺伝子\*3 は、日本人において多型頻度が低い。このため他のワーファリン反応性因子も検索する必要がある。因子を新規に同定するために、CYP2C9 遺伝子ハプロタイプ解析を行った。

Ahmadi らの論文中に公表された CYP2C9 遺伝子の SNPs のうち、日本人において minor allele frequencies (MAFs) が 0.4 以上のものの中から4か所の SNPs を選出した。(図 1)

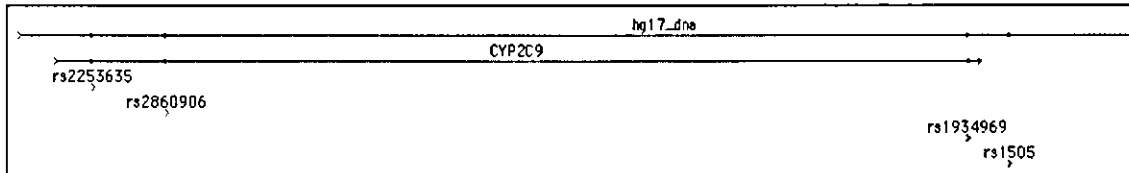


図 1. CYP2C9 遺伝子と選出した SNP の位置

次に、選出した各 SNPs を含む領域を増幅するプライマーを設計し、ワーファリン投与を受けている 35 名について、各プライマー対を用いて PCR 増幅を行い直接シーケンシング法によりジェノタイプングを行った。

患者群は、小児循環器外来に受診しワーファリンの単剤投与を受けている患者のうち内服用量が 3 ヶ月以上不変である 3 から 33 歳の 31 名について診療録から INR 値、投与量、体重を抽出した。抽出した SNPs およびその解析の条件は以下の通りである。

### PCR amplicon および primer sequence

rs2253635

forward GTATGGTTTGGCTGTGAACTC

reverse GCAATTGCCAGGTCAATAGTCC

rs2860906

forward GGGTATTCAAATGGGAAGAGAA

reverse

CGCTTGTAAGTTGTGTAAGTAGGC

rs1934969

forward CAGTTGCCTATACATCCATCCA

reverse TCTCCCACACAAATCCGTTT

rs1505

forward TTGGGCTCATATCACACATCTT

reverse GCATTTCCCAATGAAGAAGG

### 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 °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