

Extension: 68°C, 0:30 mins

Cycles: 26

<ハプロタイプ解析>

Schaidらが開発した、ハプロタイプ解析プログラム haplo.score プログラムを、WindowsXPオペレーティング・システム上で使用した。Haplo.scoreプログラムは、対象となる患者集団の中に存在するハプロタイプを最尤法により推定し、頻度の高いハプロタイプと被説明変数との関連を分析する。推定されたハプロタイプの頻度が0.5%未満であるハプロタイプをを1群に纏めて検討した。本研究ではワーファリン投与量を被説明変数、CYP2C9座位のハプロタイプ(上記SNPの組み合わせ)を説明変数とし、INR値について補正して解析した。

(解析のためのコンピュータプログラムは16年度総括研究報告書「CYP2C9ハプロタイプとワーファリン維持量の関連解析」参照のこと。)

C. 研究結果

1.メタ解析

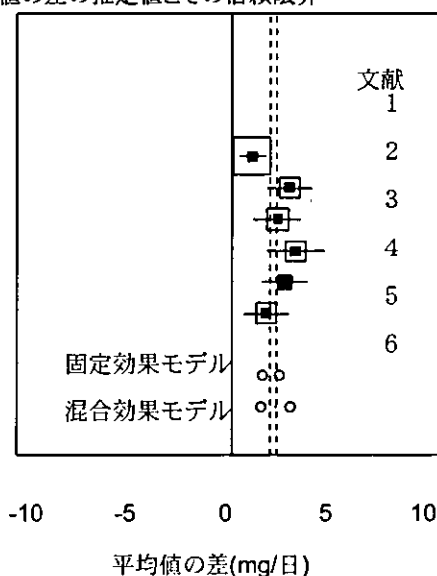
上記6研究、*1*1群(野生)876名、*1*3群156名を解析した。固定効果モデルによれば、*1*1ホモ接合体(野生)と*1*3ヘテロ接合体におけるワーファリンの平均投与量の差の推定値は1.94mg/日(95%信頼限界1.52~2.36)であった。同質性の検定によれば、Cochran Q(ChiSq)値は14.34 自由度5で p値は0.0136であり、均質性は否定され、混合効果モデルの適用が望ましいと判定された。

混合効果モデル(DerSimonian-Laird法)によれば、*1*1ホモ接合体(野生)と*1*3ヘテロ接合体におけるワーファリンの平均投与量の差の推定値は2.20mg/日(95%信頼限界1.46~2.96)であった。バイズの原理にもとづくREML法によれば、*1*1ホモ接合体(野

生)と*1*3ヘテロ接合体におけるワーファリンの平均投与量の差の推定値は2.20mg/日(95%信頼限界1.49~2.90)であった。

右にメタアナリシスに含めた、各研究における平均値の差の推定範囲(95%信頼限界)を示した。白い長方形は、それぞれの研究に含まれる患者の総数の相対的な割合を示す。水平線はそれぞれの研究における平均値の差の推定値を示す。白い○は6つの研究成績のメタアナリシスを行って得られた平均値の差の推定範囲(95%信頼限界)を示す。固定効果モデルにより得られた範囲(上)および混合効果モデルにより得られた範囲(下)を示す。

図2 *1*1と*1*3群におけるワーファリン一日投与量の平均値の差の推定値とその信頼限界



2.CYP2C9 遺伝子ハプロタイプ解析

日本人におけるCYP2C9ハプロタイプ構造は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	G	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検討した。(図 3) また CYP2C9 ハプロタイプとワーファリン投

与量の相関を haploscore プログラムによりさらに検討した。しかしいずれのモデルにお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。

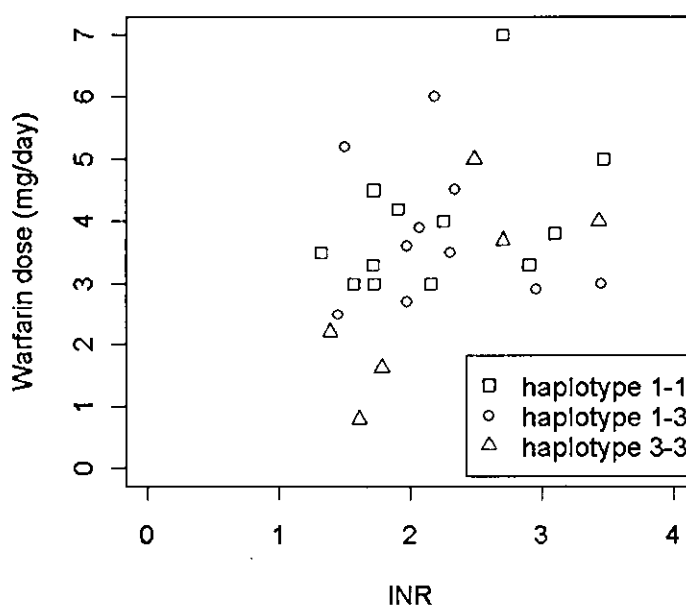


図3. 各群における INR とワーファリン維持投与量の関係

D. 考察

メタ解析によって、*1*3 多型ヘテロ接合体の成人患者群と*1*1 ホモ接合体の患者群における一日投与量の平均値の差は 2.20mg (95%信頼限界 1.46~2.97 mg)と推定された。ワーファリンの常用量が 5~6mg であることを考慮すると、30%から 40%の減量である。*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いうエビデンスが得られた。

しかし、日本人において CYP2C9*2 および*3 頻度は欧米に比して低いにも拘わらず、ワーファリンの投与量-効果 (INR) の関係には大きな個人差があることから、CYP2C9*3 以外に日本人に特有な多型が存在すると考えられた。

そこで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。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。

E. 結論

6論文のメタ解析によりCYP2C9遺伝子の*1*3多型ヘテロ接合体の成人患者群と*1*1ホモ接合体の患者群における一日投与量の平均値の差は2.20mg (95%信頼限界1.46~2.97)と推定された。

しかしながら日本人においては、ワーファリン投与後のINR値の個人差が大きく、*2および*3多型のみでは説明できない。ワーファリン反応性とCYP2C9ハプロタイプとの関連を認めなかったことから、日本人におけるワーファリン反応性は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

特になし

G.研究発表

本研究課題に関する発表はない。

H. 参考文献

Cochran WG (1954) The combination of estimates from different experiments
Biometrics 10:101-129.

Dickersin A, Berlin JA (1992) Meta-analysis: state of the science. *Epidemiol Rev* 14:154-176.

Greenland S (1987) Quantitative methods in the review of epidemiological literature. *Epidemiol Rev.* 9:1-30.

Gailbraith RF (1988) A note on graphical presentation of estimated Odds Ratios from several clinical trials. *Stat. Med.*7:889-894.

Cochran WG (1937) Problems arising in the analysis of a series of similar experiments *J. Roy. Stat. Soc.* 4(supp)102-118.

DerSimonian R Laird N (1986) Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clin. Trials* 7:177-188.

Duval S and Tweedie R (2000) A nonparametric Trim and Fill method of accounting for publication bias in meta-analysis. *J. Amer. Stat. Ass.* 95:449 p 89-98.

Duval S Tweedie R (2000) Trim and Fill: A simple funnel plot based method of testing and

adjusting for publication bias in meta-analysis.
Biometrics 56:455-463.

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 Jan;37(1):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)
総合研究報告書

VKORC1 遺伝子多型とワーファリン維持量の関連性の検討
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の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 SNPs を同定して、この SNPs 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。1 歳から 33 歳まで (中央値 20 歳) の患者 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 40kg を超えていた。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 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
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

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、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の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。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

1) 日本人における多型の検出

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。

1.白人で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)

2.各エクソン部位、およびその近傍の未報告 SNPs の検出

・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

GGTGCGGCTCGCTCTTTGCCTGACGGGCTT

AGTGCTCTCGCTCTACGCGCTGCACGTGAA

GGCGGCGCGCGCCCGGACCGGGATTACC

GCGCGCTCTGCGACGTGGGCACCGCCATC

AGCTGTTGCGCGCTTCTCCTCCAG

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

TATCACCACCTATGCTATCAACGTGAGCCTG

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

2) 患者検体を用いた検討

1歳から33歳まで(中央値20歳)の患者31名が、慶應大学病院の小児心臓外来においてリクルートされた。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40kg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

Genome 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 -AAACTTTATTGCTCAGAACCCTTCC
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群間に差がアイかどうかを、マンホイットニー検定(Mann-WhitneyU-test)により評価した。

C.実験結果

1) 日本人における多型の検出

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多型についてその頻度を認めることができた。

	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から引用して併記した。

2) 患者検体を用いた検討

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いなかった。

・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いうことを見ると、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治験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と言うことは、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、実際に生物学的発生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

特になし

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, McDonell 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, Lappegard 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, Santacrose 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)
総合研究報告書

メソトレキセート投与後の副作用の発症と薬物代謝関連遺伝子多型解析
分担研究者 熊谷昌明 (国立成育医療センター血液腫瘍科 医師)

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。本研究では、MTX による副作用発症と 3 つの薬物代謝関連遺伝子の多型の関連について検討した。・葉酸代謝酵素 Methylene tetrahydrofolate reductase (以下 MTHFR) 677C/T ・葉酸を細胞内にとりこむ輸送蛋白 Reduced folate carrier 1 80G/A 多型 ・ABC トランスポーターC5 (ABCC5) これら 3 遺伝子の多型と大量 MTX 療法に伴う毒性発症の関連を後方視的に解析した。1992 年から 2003 年の間に慶應義塾大学病院で治療が行われた ALL、またはリンパ芽球性リンパ腫例で、他の細胞障害性薬剤の全身投与による併用なく大量 MTX (3g/m²) の投与が行われた症例を研究対象とし、毒性を National Cancer Institute Common Toxicity Criteria によりスコア化した。因子の統計解析には generalized estimating equations 法 (以下 GEE 法) を用いた。15 例における 43 回の MTX 投与を解析対象とした。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 (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た。また ABCC5 多型が毒性発症に関する個体差に寄与している可能性が示唆された。

研究協力者

森 鉄也 慶應義塾大学医学部小児科 専任講師
島崎紀子 慶應義塾大学医学部小児科 助手

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 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⁽¹⁾。大量 MTX 療法はロイコポリン救済 (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^(2,3)。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^(4,5)。

MTX 代謝関連遺伝子の多型が 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 投与方法」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、以下の3遺伝子多型と大量MTX療法に伴う毒性発症の関連を後方視的に解析した。

MTHFR

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⁽⁶⁾。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ている^(5,7,8)。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ている⁽⁹⁾。

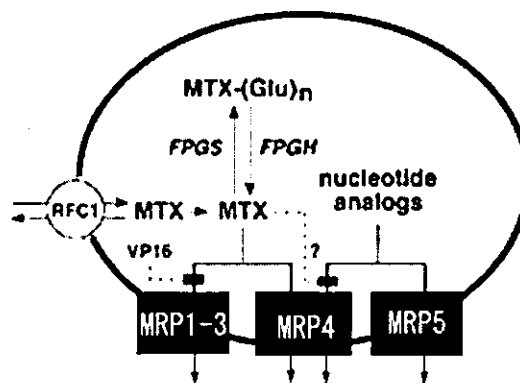
RFC1

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⁽¹⁰⁾。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ている⁽¹¹⁾。

ABCC5

右に細胞内におけるMTXの取り込みと汲み出しの機構を図示する。MTXの細胞内への取り込みには主にRFC1が関与する。MTXは、主にABCC4(左図のMRP4)により細胞外に汲み出される。ABCC1、ABCC2、ABCC3も副次的に汲み出しに関わる可能性が示唆されている。また、ABCC4(左図のMRP4)とABCC5(右図のMRP5)は核酸誘導体の汲み出しにかかわる。メソトレキセート耐性ががん細胞において、ABCC4やABCC5の発現増多や機能獲得性変異

が認められている(Chen, et al 2002)。同様にABCG2もメソトレキセート耐性ががん細胞において、発現増多や機能獲得性変異が認められている。



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/m²)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ルがインフォームドコンセントを得た後に用いられた⁽¹²⁾。すべてのプロトコルのStandard Risk群、およびL92-13, L99-15, NHL-T9604プロトコルの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/m²)の投与が行われた。いずれのプロトコ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/m²)の投与が髄腔内投与療法とともに行われた。MTXの投与方法は、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/m²)が併用された。MTX血中濃度遷延例ではプロトコ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を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。

PCR condition（全遺伝子共通）

Buffer Parameters

Template DNA: 50 ng Genomic DNA

Polymerase: 0.5 U Platinum Taq Polymerase
High Fidelity, Invitrogen

PCR Buffer: 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

MTHFR 677C>T Primer

Foward -CTCTCCTGACTGTCATCCCTATTG

Reverse -GAACTCAGCGAACTCAGCACTC

RFC1 80G>A Primer

Foward -CTGCAGACCATCTTCCAAGGTG

Reverse -GTAGGGGGTGATGAAGCTCTC

Cycle program

Initial Denaturation

Denaturation: 95 C, 10:00 mins

Denaturation: 95 C, 0:30 mins

Anneal : 63 C, 0:30 mins

Extension : 68 C, 0:30 mins

Cycles: 35

Last Extension : 68 C, 10:00 mins

ABCC5 多型 primer

rs562

Foward -TTCCACAAGGTGTTTCAGCAA

Reverse -TGTGTGGTTTGGTGTGTTCC

rs9858774

Foward -CTAGAAGCCCCCATTTCACA

Reverse -gcctggcTCTTCCCATAAAT

rs939336

Foward -CTGGCCTAAAATGGCTGAAA

Reverse -AACAGGTAAGTGGCCTGCTG

rs939337

Foward -ACAGGACATCATCAAACCATT

Reverse -TTGCAAATGCACTTCTCACTC

rs4148571

Foward -CACATTCATAGACACCTCTGGTATG

Reverse -GAACAACCTTGGTTGAATCCTCAG

rs9876143

Foward -CACCACCACACCTCACTAATTT

Reverse

-ACAGGGAATATAAAGCCAATTAAGC

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

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/m²) 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)。

・ ABCC5, ABCC2, ABCG2 多型と毒性の関連

ABCC5, ABCC2, ABCG2 多型と毒性発症の関連を GEE 法で解析した。下記の多型について各リスクアレルのアレル数の増加と NCI-CTC Grade 2 以上の嘔吐発症に有意な関連を認めた。ABCC5 rs9858774(G/A)については、Aアレルは Gアレルに対して 9.7 倍(95%信頼限界 1.85-50.6, p 値=0.006)

ABCC5 rs939336(G/A)については G アレルは A アレルに対して 5.71 倍(95%信頼限界 1.09-30.0, p 値=0.03)

ABCC5 rs939337(C/G)については C アレルのものは G アレルを有するのに対して 5.71 倍(95%信頼限界 1.09-30.0, p 値=0.03)であった。

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關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^(5,7,8,11,14)。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⁽⁹⁾。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³⁾。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關与する因子であり、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關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 180G/A多型と毒性発症の関連についての解析の結果、RFC180G/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(5,7,8,14)。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RFC180G/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RFC180G/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RFC180G/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。ABCC5はbrain capillary endothelial cells (BCEC) forming the blood-brain barrier (BBB)で一様に発現していることが報告されている。脳脊髄液への移行ないし汲み出しにおいて、ABCC5多型が、嘔吐の発症をに影響を与える可能性が示唆された。

ただし今回検討した多型は、いずれもタンパクの

機能に直接的な影響をあたえることが示されていない多型である。ABCC5遺伝子のほぼ全領域にわたり、嘔吐発症との関連が示されたことから、ABCC5座位の特定のハプロタイプが、嘔吐の発症と関連している可能性があり、プロモーター領域を含めて、各ハプロタイプの機能解析を進める必要がある。

「患者個人に最適なMTX投与法」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 180G/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。RFC180G>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(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。また、脳脊髄液への移行ないし汲み出しにおいて、ABCC5多型が、嘔吐の発症をに影響を与える可能性が示唆された。

F.健康危険情報

特になし

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) 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 G₈₀A 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。)

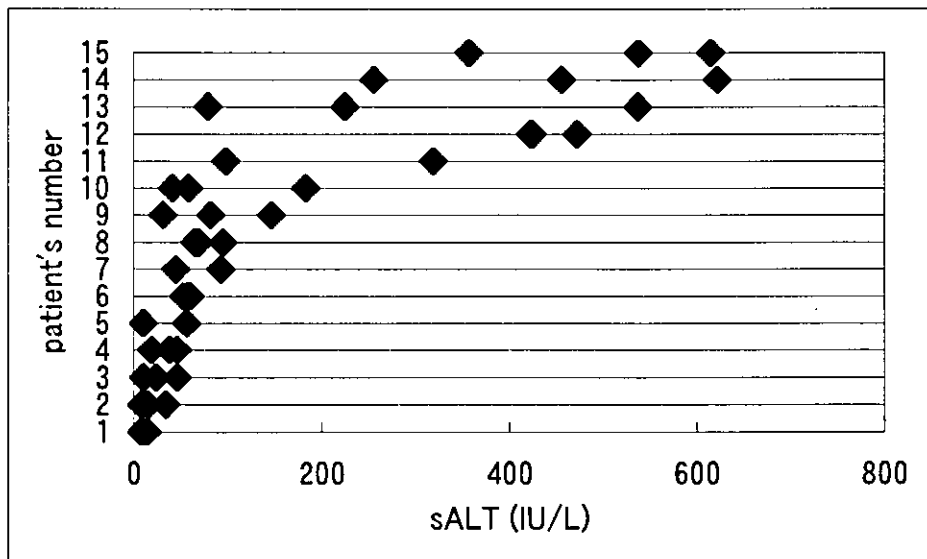


表 1

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	Courses	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	1.144-3.9	0.166	11.2	1.594-79.321	0.086
Vomiting(□Gr.2)	6(40%)	6(14%)	1.46	0.830-2.4	0.361	3.39	0.506-22.749	0.281
Creatinine(□Gr.1)	1(7%)	1(2%)	2.02	1.379-2.8	0.312	NE	NE	NE
sAST or sALT(□Gr.2)	7(47%)	14(33%)	0.83	0.707-0.991	0.106	1.04	0.356-3.042	0.945
Hgb or WBC or Plt (□Gr.3)	13(87%)	22(51%)	2.89	0.692-12.8	0.056	3.56	0.590-21.501	0.153
Hgb or WBC or Plt (□Gr.4)	6(40%)	8(19%)	1.59	1.025-2.493	0.100	8.31	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