

1.6. 分析中の24及び48時間安定性

各濃度の標準添加試料保存前の測定結果の平均値と分析中の安定性24時間あるいは48時間(AP0.5及び200の8~10あるいは11~13)の測定結果の平均値より、求めた残存率は、101.4~104.3%で、いずれも許容範囲内であり、分析中の48時間の安定性が確認された。(Table 6)

Table 6 分析中の24及び48時間安定性測定結果

分析日	測定試料 (略号)	ジアゾキンド ピーク 面積値	IS ピーク 面積値	ピーク 面積比	ピーク 面積比 平均値	標準偏差 (SD)	変動係数 (CV) [%]	残存率 [%]
2004.03.23	AP 0.5-1	4003	432471	0.0093	0.0093	0.0002	2.2	-
	AP 0.5-2	3756	397432	0.0095				
	AP 0.5-3	3692	403745	0.0091				
2004.03.24	AP 0.5-8	4104	432839	0.0095	0.0097	0.0003	3.1	104.3
	AP 0.5-9	4237	436910	0.0097				
	AP 0.5-10	4322	432722	0.0100				
2004.03.25	AP 0.5-11	4115	434919	0.0095	0.0097	0.0002	2.1	104.3
	AP 0.5-12	4310	437592	0.0098				
	AP 0.5-13	4262	431822	0.0099				
2004.03.23	AP 200-1	1607053	443757	3.6215	3.6604	0.0339	0.9	-
	AP 200-2	1605546	436711	3.6764				
	AP 200-3	1637508	444567	3.6834				
2004.03.24	AP 200-8	1660504	439173	3.7810	3.7766	0.0135	0.4	103.2
	AP 200-9	1647478	434997	3.7873				
	AP 200-10	1635966	434941	3.7614				
2004.03.25	AP 200-11	1605596	439047	3.6570	3.7129	0.0515	1.4	101.4
	AP 200-12	1610354	432524	3.7232				
	AP 200-13	1633576	434634	3.7585				

判定基準: 残存率 ≥ 80%

## 2. 結論

ヒト血清中ジアゾキンド濃度測定法バリデーションにおいて、各確認項目（特異性、検量線の濃度範囲と直線性、同時再現性、日間再現性、回収率の測定結果は、すべて許容範囲内であった。

これらの結果より、本法は、ヒト血清中ジアゾキンドのHPLCによる濃度測定法として、信頼できることが確認された。

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

小児科診療における効果的薬剤使用のための母集団薬物動態解析の有用性  
分担研究者 谷川原祐介（慶応義塾大学医学部薬剤部部長・教授）

研究要旨

小児の適切な薬物治療のためには、小児における安全で有効な薬用量について、科学的なエビデンスを得ることが望ましい。本研究では、母集団薬物動態解析法を利用し、小児患者を対象としてエビデンスに基づいた個別投与設計を実現するために、母集団薬物動態解析法の有用性および遺伝的要素を組み込む可能性について調査した。母集団薬物動態解析の重要な利点は、複数の要因の影響を同時に検討することができること、被験者一人当りの採血回数が少数であっても、多数の被験者からデータを得ることによって解析が可能となる点である。また、既承認薬を小児に適用するにあたり、明らかとなっている成人のデータから外挿するためのブリッジングツールとしても期待できる。さらに、遺伝的要素を組み込むことにより、個人間変動を説明できれば、TDMによる1点の測定点から血中濃度を予測でき、年齢層間で特性の異なる小児患者の初期投与設計に役立てることができる。オフラベル問題を解決し、新薬あるいは既承認薬を小児に適用するにあたり安全で有効な使用法を開発するためのモデルケースを作ることができれば、小児医療における適切な薬物治療を実現するための大きな前進と言えるであろう。

研究協力者

田村和代 慶応義塾大学医学部小児科 医師  
佐藤玲子 慶応義塾大学医学部薬剤部 助手

物濃度を測定し薬物動態を検討することは不可欠である<sup>2)</sup>。

そこで本研究では、□新薬あるいは既承認薬を小児に適用するにあたり安全で有効な使用法を開発するためのモデルケースを作ること、さらに、□患者集団における、背景因子、つまり年齢、体重、疾患の種類や重篤度、併用薬物など、薬物動態の個体差の及ぼす影響を検討し、個別化治療を小児科領域へ導入すること、□すでに海外で小児を対象として臨床試験が行われている薬物についても、薬物代謝酵素の遺伝多型に起因する民族差について明らかにすることを目的とした。

A. 研究目的

日常の小児の薬物治療において、その薬物の用量・用法・安全性について明確にされないまま使用されている医薬品が多いことは、問題となっている。小児を対象とした臨床試験のデータが十分でないため、日本では添付文書に小児に対する適応や小児薬用量を記載できないことが主な理由である。このような、既承認医薬品の小児における「オフラベル」使用の実態下で、医師の立場からは自己責任における保険適応外の使用を余儀なくされ、患者の立場からは投与される薬剤の小児における確かな情報を欠いた危険な状態が続いている<sup>1)</sup>。

小児の適切な薬物治療のためには、新薬もしくは既に成人で承認済みの薬物の、小児における安全で有効な薬用量について、科学的なエビデンスを得ることが望ましい。薬物の多くは薬物動態と薬効との間に密接な関連を示すので、用法・用量の合理的な設定を行う上で、血中薬

B. 研究方法

上記の目的を達成するために、本年度は個別治療を実現するための母集団薬物動態解析(PPK)の有用性、小児という特殊集団を対象とした研究におけるPPKの利点、さらにPPKに遺伝的要素を組み込み得る点について調査し、小児科診療における効果的薬剤使用のためのPPKの有用性について検討した。さらに、小児における薬物治療のエビデンスを得るためのモデルケースを作るのにふさわしい薬剤をピック

アップし、PPK 解析をする上で必要なデータの収集法を考察した。

## C. 研究結果

### 1. 個別治療を実現するための母集団薬物動態解析(PPK)の有用性

薬物動態に基づく個別投与設計を行うためには、その前提として、投与量や投与方法と薬物血中濃度との法則性を知るとともに、それら患者間個人差を引き起こす病態生理学的・薬剤学的要因の解明が必要とされる。たとえば、腎機能低下が薬物クリアランスに及ぼす影響、加齢による薬物排泄や体内分布に及ぼす影響、併用薬や剤型の違いによる吸収率の変動等の情報が得られれば、個々の患者に合った投与設計が可能となる。さらに、これらの薬物動態情報を薬物が適用となる患者集団から得ることが、至適投与設計を実現する上で不可欠である。しかし、患者での多数回の採血は困難なことが多く、標準的な薬物動態試験では、得られる情報にも限界が生じる。そこで、この問題を解決する方法論として、PPK が大変有用である<sup>3)</sup>。

PPK とは、個人ごとの薬物動態を論じるのではなく、対象患者の属する母集団の特徴として薬物動態を論じる考え方である。薬剤の適用となる患者群の平均的な薬物動態値、それに影響を及ぼす各要因、および個体間変動や個体内変動の大きさを定量的に評価できる。一人当りの血中濃度測定点数が 1~3 点と少なくとも、多くの患者のデータを集めることにより、集団として十分な情報が得られれば解析可能となる<sup>3)</sup>。

薬物動態の個人差を引き起こす原因は種々考えられるが、影響の度合いを既知のものとして回帰式あるいは場合分け等で層別可能なとき、その影響因子を *fixed effect* (固定効果) と呼ぶ。一方、その機構は特定できないが個人差の大きさだけは捉えることができるものを *random effect* (変量効果) と呼び、両者を含むモデルを *mixed effect model* (混合モデル) と言う。PPK はこの混合モデルの考え方に基づくものである<sup>3)</sup>。

PPK には、標準的薬物動態試験に比べて次のような利点がある<sup>2)</sup>。標準的薬物動態試験で薬物動態に影響を与える要因を検討するためには、関心のある要因以外の背景因子をなるべく揃えて行う必要がある。したがって、腎機能、年齢、性別など検討したい要因がたくさんあるときは、それぞれ個別に試験を組まなければならない。一方 PPK では、これら複数の要因の影響を同

時に検討することが可能である。PPK のもう一つの利点は、被験者一人当りの採血回数が少数であっても、多数の被験者からデータを得ることによって解析が可能となる点である。標準的薬物動態試験では、個々の被験者について薬物動態パラメータを推定するために多数回の採血が必要であるが、PPK では幅広い背景を有する多数の被験者から得られた薬物血中濃度から、直接薬物動態の平均的な値とばらつきの程度を推定するため、一人当りの採血回数が少数でも解析が行える。このため、被験者に対する拘束や負担を軽減でき、薬物治療が行われている患者を対象とする試験に適している。

このようにして得られた患者集団における薬物動態特性値から、ベイジアン法に基づく患者個人ごとの血中濃度推定値が得られ、個別投与設計に活用できる。日常の医療で行われている血中濃度モニタリング(TDM)による個別投与設計は、PPK パラメータに基づいているので対象母集団のパラメータを求めることは重要である。

さらにこのアプローチは、医療現場のニーズから新薬の承認申請へと広がってきた。近年、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH: International Conference on Harmonization) の合意に基づき、一地域で行われた臨床試験データの地域を越えた合理的な相互利用が考えられる。

PPK の結果は、異なる民族間の臨床試験データを橋渡しするブリッジングデータパッケージの一部となり得る。外国で行われた PPK パラメータと日本人の PPK パラメータを比較し、その差異を評価することは、外国の臨床試験結果を日本人へ外挿する際に重要な資料となり得る<sup>2)</sup>。また、このブリッジングツールとしての考え方は、速効性製剤から徐放性製剤の開発、成人におけるデータから小児における適用追加、承認済みの適用から別の適用追加へと移行する際に応用でき、適正な薬物使用を科学的に証明するために期待できる。

### 2. 小児を対象とした研究における PPK の有用性

小児患者に医薬品を適用する場合、成人と同じように、該当患者の年齢ごとに、適切に評価されている医薬品が投与されなければならない。正確で、科学的に証明され、処方に必要な情報をもつ、安全かつ有効な薬品を適切なタイミングで小児患者が使用できるように対応するのが、

医療従事者が果たすべき責務である<sup>4)</sup>。しかし現在までのわが国では、小児での薬物動態の評価は困難であった。その背景には、小児からの採血が、量的にも回数的にも制限があったことがあげられる。ICHのガイドライン<sup>4)</sup>「E11: 小児集団における医薬品の臨床試験」の中にも、小児では採血量をできるだけ最少量にするべきであると規定している。そして、採血量を少なくするためのアプローチとして、鋭敏な手法の解析法やルーチンに行う臨床検査の採血時に薬物動態試験用の資料を採取するなどが考えられるが、採血回数を減らすための最も有用なアプローチは、やはりPPKの活用である。PPKにおいては、回数が少なくても済むだけでなく、採血時間を厳密に決めなくても、まばらなデータ収集(sparse sampling)により解析でき、小児のQOL(Quality of life)の向上を図ることになる。小児を対象としたPPKの中には、このsparse samplingによって、同時にいくつかの代謝物の動態を解析した報告もあった<sup>5)</sup>。ここで、最も重要なのは、採血時刻と投薬時刻の正確な情報収集である。さらに服薬の不遵守は交絡の原因となり試験の結果を誤らせる可能性があるため、服薬の不遵守が極力発生しないように配慮することも重要である<sup>2)</sup>。

複数の要因の影響を同時に検討することが可能であるというPPKの利点は、小児における薬物動態解析においても非常に重要である。小児では、年齢が及ぼす動態への影響が年齢層ごとに異なってくる。各臓器機能の成熟度が年齢ごとに揃っていないことが原因の一つと考えられる<sup>6)</sup>。影響の仕方が線形でないだけでなく、たとえばクリアランス値が成人の値に収束していく過程で一旦増加するという場合もある。そこで、年齢に従ってどのように層別化を試みるかは発達生物学、発達薬理学を考えた上で柔軟性を持ったアプローチが必要であり、PPKが有用なツールとなる。また興味深いことに、小児の肝移植患者におけるタクロリムスのPPKを行った結果、大人から部分肝移植を受けた小児は、子供のドナーから全肝移植を受けた小児に比べクリアランスが7分の1であった<sup>7)</sup>。このように、母集団のサイズが小児ということで小さくなりがちであっても、異なる患者背景が同時に解析できることは大きな利点である。

成人での薬物動態試験は、まず正常ボランティアを対象にして実施されるが、小児では一般に治療を受けている小児患者で実施される。海外の研究の中には、少ない用量で健康な小児に

おける薬物動態を検討し、治療量を投与された小児患者を対象として安全性・有効性を検討していたものもあった<sup>8)</sup>が、そのような試験はかなり限定され、臨床の場では難しい。小児患者を対象とした試験では、大きい個人差を生みやすいがデータは臨床使用をより反映したものになるであろう。実施可能な例数でまず検討を始めることが重要である。

### 3. PPKに遺伝的要素を組み込み得る可能性

いくつかの薬物についてはPPKにおいて薬物代謝酵素CYPの遺伝多型を変動要因とした解析例が報告されている。

#### (1) ノルトリプチリンの場合<sup>9)</sup>

ノルトリプチリンはCYP2D6により水酸化体に代謝されるため、定常状態における体内動態の個人差を、CYP2D6の遺伝子型によりある程度説明できることが知られている。そこで、PPKによりノルトリプチリンの血中濃度やクリアランスの個人間変動にCYP2D6の遺伝子型がどのくらい寄与する

かを定量的にモデル化することにより評価した。CYP2D6\*1, \*2は機能を有する遺伝子としてN=1、CYP2D6\*3, \*4, \*5は機能を有しない遺伝子と数えN=0、CYP2D6\*2×Nを有する場合はN個の遺伝子を有すると数え、N=0, 1, 2, 3, 4, 13

をノルトリプチリンの固定効果として、モデル式に組み込むことで、定量的に評価できた。その結果、機能を有するCYP2D6の数が増えるに従いバイオアベイラビリティが71%(N=0)から17%(N=13)へ減少した。また、クリアランスの個人間変動の21%、血中濃度の34%がCYP2D6の数により説明できた。この結果はTDMで得られる少数の測定点をもとに、血中濃度を予測するに利用でき、ノルトリプチリンの初期投与量の選択を改善できる。さらに使用された方法論は薬物代謝酵素の遺伝多型の役割を研究するために活用できると考えられる。

#### (2) グリベンクラミドの場合<sup>10)</sup>

経口糖尿病薬のグリベンクラミドは、薬物動態の個人間変動が大きく、低血糖のリスクを軽減するため、適切な投与量を設定しなければならない。個人間変動の要因として考えられるものは体重、タンパク結合、性別、年齢、肝機能などに加え、代謝に関わるCYPの遺伝子多型が挙げられる。グリベンクラミドはCYP2C9

によって水酸化体に代謝されるため、CYP2C9\*1, \*2, \*3のアレルにより、グリベンクラミドの血中濃度にどのように影響するかPPKの手法を用いて研究された。その結果、CYP2C9\*3/\*3ホモタイプの人々のクリアランスは、\*1/\*1の人の50%であることが明らかとなり、このパラメータの違いは血中インシュリン濃度と血中グルコース濃度を反映していることが示された。

このように、PPKの手法を用いれば、様々な変動要因に加え、薬物代謝酵素の遺伝多型の影響を同時に見ることができ、遺伝多型の要因を組み込むことにより、より予測性の高いモデルができることが考えられる。

#### D. 考察

試験デザインを立案する上で、過去の試験成績を参考に、目的に対応したデザイン（変動要因として検討する測定項目、採血時点、サンプルサイズの設定など）を立案することは重要であるし、対象とした薬物の薬理学的特性から、薬物動態に影響する要因がわかっている場合は、その検査値を欠測にしないことが望ましい。しかし、小児の場合はまず実施可能な例数で検討を行い、対象とする集団を絞りすぎないことも必要と思われる。

採血時刻と投薬時刻の正確な情報があれば、サンプリング計画は厳格である必要はないが、被験者選択からバイアスを生じる危険性もあるので、注意が必要である。サンプリング計画が漫然としていると、採取時点が最高血中濃度やトラフ値に集中することも考えられるので、推定されるパラメータの影響を正しく評価するためにも、具体的なサンプリング計画は必要であると考えられる。

また、薬剤の投与を継続的に受けている同一被験者から、長い期間隔ててPPKに関わるデータ収集がなされている場合には、被験者の情報（体重、年齢、腎・肝機能、阻害・誘導など）による薬物代謝酵素活性の変化など）が変化するので、変動要因として検討する項目のデータを経時的に複数回収する必要性も考えなければならない<sup>2)</sup>。特に小児の場合は、異なる年齢層間を移動する者も出てくるので、年齢の影響を適切に評価するためには、同一患者でも投与機会毎に個人データとして取り扱う方が良い場合もあり、その場合は、それぞれの年齢群での患者数の変動を伴うことも考慮しておく必要があるだろう。

小児における薬物治療のエビデンスを得るためのモデルケースを作るのにふさわしい薬剤としては、まず、TDM対象薬剤で、血中濃度データと臨床検査値を同時に得やすい薬物、効果のエンドポイントがわかりやすく、短期間で判定できるものがよいであろう。具体的にはワーファリンやバルプロ酸が挙げられる。ワーファリンは、血中動態に遺伝多型が影響することは明らかとなっているので、さらに小児を対象としたモデル化が必要であると考えられる。バルプロ酸の場合は、薬物量に広いスペクトルを持ち、剤型も豊富で血中濃度/投与量の個人差が大きいことが知られているが、治療量の科学的根拠が乏しく、臨床での使用が難しい薬剤の一つであるので、様々な疾患の重篤度に合わせた用法・用量を明らかにすることが望ましい。

小児の適用が海外で先行し、PPKパラメータがすでにわかっているものであっても、そのパラメータが民族間で異なる場合、その理由の一つとして、薬物代謝酵素の遺伝多型が考えられる。さらに、遺伝的要因を加えることで個人間変動を小さくすることができれば、小児における個別治療の実現へ大きく近づくものと思われるので、PPKに遺伝的要因を加えた、小児におけるPPKモデルが構築できれば、科学的エビデンスを得た薬物治療が行えるものと期待できる。

#### E. 結論

正確で、科学的に証明され、処方に必要な情報をもつ、安全かつ有効な薬物を、適切なタイミングで小児患者が使用するために、母集団薬物動態解析法を利用し、小児患者集団における薬物動態を予測するための母集団モデルを構築することが必要である。その第一歩として、正確な投与時点、採血時点および、年齢、体重、性別、身長など共変量として組み込み得る要因についてのデータを集め、さらに必要な場合は遺伝子解析を行って、情報を蓄積していくことが重要である。

#### F. 健康危険情報

該当する内容は無い。

#### G. 研究発表

本研究課題に関する発表はない。

## H. 参考資料

- 1) 辻本豪三, ステファン・スピルバーグ, 中村秀文. 「小児科薬物治療におけるオフラベル使用に関する日米の比較」 *Health Research News*, 24: 1-3 (2000)
- 2) 臨床薬物動態・薬物相互作用ガイドライン研究班編集「医薬品の臨床薬物動態試験」, じほう(2003).
- 3) 谷川原祐介. 「Population Pharmacokinetics 入門 An Introduction to Population Pharmacokinetics」 *TDM 研究*, 13(2): 106-111 (1996).
- 4) ICH ガイドライン「E11: 小児集団における医薬品の臨床試験」 (2000).
- 5) Kerbusch T, de Kraker J, Mathjt RA, Beijne JH. Population pharmacokinetics of ifosfamide and its dechloroethylated and hydroxylated metabolites in children with malignant disease: a sparse sampling approach. *Clin Pharmacokinet*, 40(8): 615-25(2001)
- 6) 市橋治雄. 「小児薬用量の考え方」 *小児科*, 26(12): 1413-1423 (1985).
- 7) Staatz CE, Taylor PJ, Lynch SV, Willis C, Charles BG, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants. *Transplantation*, 72(6): 1056-61(2001)
- 8) Ouellet D, Bockbrader HN, Wesche DL, Shapiro DY, Garofalo E. Population pharmacokinetics of gabapentin in infants and children. *Epilepsy Res*, 47(3): 229-41(2001)
- 9) Kvist EE, Al-Shurbaji A, Dahl ML, Nordin C, Alvan G, Stahle L., Quantitative pharmacogenetics of nortriptyline, *Clin. Pharmacokinet*, 40(11): 869-877 (2001)
- 10) Kirchheiner J, Brockmoller J, Meineke I,

Bauer S, Rohde W, Meisel C, Roots I. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*; 71(4): 286-296 (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

マイクロペニスにおける治療効果関連因子解析

分担研究者 緒方勤 (国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部 部長)

研究要旨 ミクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。われわれは、マイクロペニスにおける男性ホルモンであるテストステロンエナンテート(TE)の筋肉注射の効果を解析している。TEは $5\alpha$ 還元酵素2型によりジヒドロテストステロン(DHT)に変換されたのちにアンドロゲン受容体に結合して作用する。したがって $5\alpha$ 還元酵素2型遺伝子(SRD5A2)変異を有する患者ではTEの治療効果は極めて乏しいと予測され、原因療法としてDHT(軟膏)投与が有効と予測される。

本研究では、マイクロペニス日本人患者81人を対象として、SRD5A2変異解析を行ったあと、変異の有無で層別化して対症療法としてのTE(25 mg/dose)の効果と原因療法としてのDHT軟膏の効果を比較した。変異陰性患者では、TE効果を解析した。その結果、SRD5A2変異は、TE治療に対する反応性を規定する因子であり、変異のある症例では、DHT軟膏という原因治療が可能であることが明らかにされた。

また、TEは、外陰部細胞内においてアロマターゼにより女性ホルモンであるエストラジオールに変換され、エストロゲン受容体に結合することもできる。このエストロゲン効果は、男性化を妨げるため、マイクロペニスにおけるTE治療効果に影響しうる。エストロゲン経路における遺伝子多型の影響を検討するため、エストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子(ESR1)のハプロタイプ構造を決定した。その結果、特定ハプロタイプが、外陰部異常症発症のみならずTEの薬剤応答性に関与しうることを示唆する所見と推測された。

研究協力者

長谷川奉延 慶應義塾大学医学部小児科  
助教授

ロゲン受容体に結合して発現することから、単一遺伝子病としての $5\alpha$ 還元酵素2型遺伝子(SRD5A2)変異やアンドロゲン受容体遺伝子(AR)変異を有する患者では極めて乏しく、多因子疾患としての特発性マイクロペニス患者では有効と考えられる。そして、SRD5A2変異では原因療法としてのDHT軟膏が有効と推測される。

われわれはまず、この可能性を検討した。また、TEは、外陰部細胞内においてアロマターゼにより女性ホルモンであるエストラジオールに変換され、エストロゲン受容体に結合することもできる。このエストロゲン効果は、男性化を妨げるため、マイクロペニスにおけるTE治療効果に影響しうる。

よってこのエストロゲン経路における遺伝子多型の影響を検討するため、エストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子(ESR1)のハプロタイプ構造を決定した。さらに、特定ハプロタイプが外陰部異常症に関与しうる

A.研究目的

マイクロペニスは、最も軽症の外性器異常で、比較的頻度の高い疾患である。マイクロペニスは量的形成異常として捉えられ、その原因には単一遺伝子変異と多因子疾患の両者が関与する。前者では、原因療法がしばしば可能であり、後者では対象療法が主体となる。

マイクロペニスには男性ホルモンであるテストステロンエナンテート(TE)の筋肉注射が広く行われている。TEの効果は、TEが $5\alpha$ 還元酵素2型により変換されたジヒドロテストステロン(DHT)がアンド



か否かを検討した。

## B.研究方法

### ①治療効果の検討

#### <対象>

解析に関して両親いずれかの承諾が得られたマイクロペニス日本人患者 81 人(年齢 0-14 才、中央値 7 才)を対象とした。全ての患者は、(1)伸展陰莖長が日本人同年齢対照の $-2.0$  SD 未満、(2)尿道下裂なし、(3)女性化乳房なし、(4)身長が日本人同年齢対照の $-2.0$  SD 以上かつ $+2.0$  SD 以下、(5)性腺ないし外性器異常を合併する奇型症候群なし、(6)染色体核型 46,XY、(7) AR の変異なし、の条件を満たした。伸展陰莖長は Schonfeld らの方法に従って測定した。すなわち、陰莖を十分に伸展させた状態で、陰莖の背面に定規を当て、恥骨枝から亀頭先端までの距離を測定した。

#### <SRD5A2 変異解析>

SRD5A2 の全翻訳領域を含むようにプライマーを設定し、各領域を PCR で増幅した。その後、

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

#### <治療効果>

SRD5A2 遺伝子変異陽性患者では、対症療法としての TE (25 mg/dose) の効果と原因療法としての DHT 軟膏の効果と比較した。変異陰性患者では、TE 効果を解析した。

### ②ハプロタイプ解析

#### <対象>

コントロール男性 100 例と停留精巣患者 63 例である。ESR1 のゲノム DNA 全長(>300kb)にわたり 6-38kb 間隔で存在し、マイナーアレル頻度 15%以上の SNP15 個(SNP1-SNP15)(図 1)を TaqMan 法で解析し、遺伝統計学的解析によりハプロタイプブロックを決定した。その後、患者\_健康者間において連鎖不平衡領域のハプロタイプ頻度を比較した。

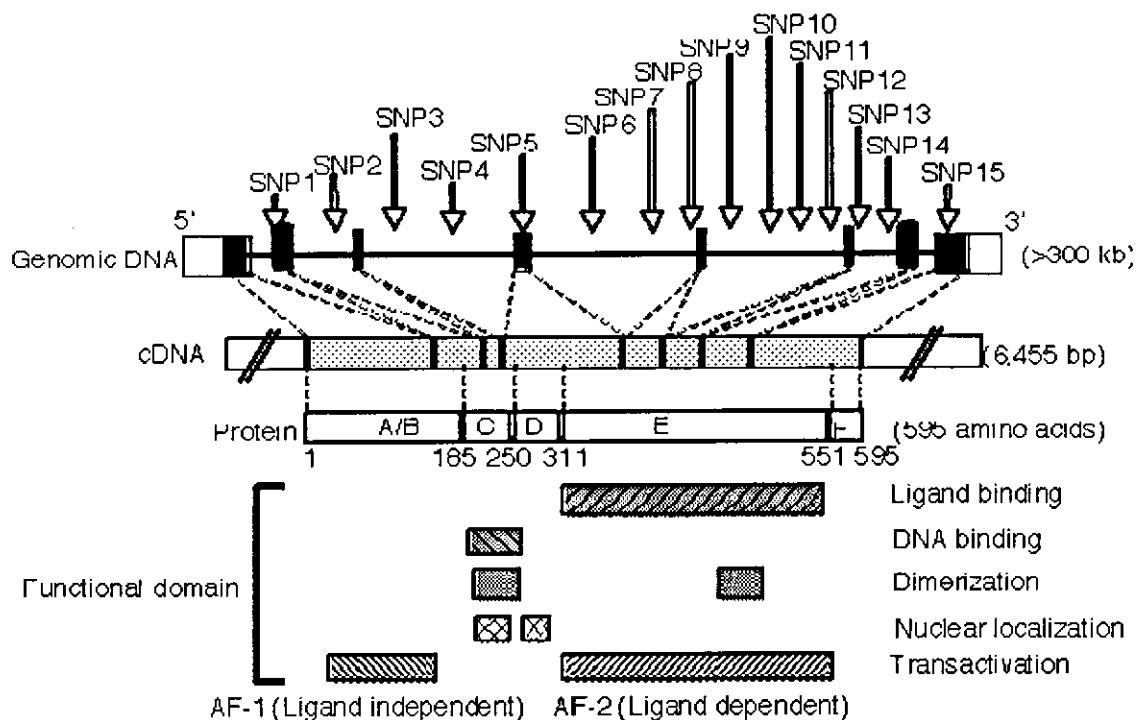


図 1. 解析された 15 個の SNP の位置

### C. 結果

#### ①治療効果の検討

##### <SRD5A2 変異解析>

3症例において変異が同定された。その内容は、Y26X/R227Q、G34R/R227Q、R227Q/R227Q で、全例に R227Q が共有されていた。この R227Q は、正常コントロール 100 名中の 1 例において、ヘテロの状態で見出された。

##### <治療効果>

SRD5A2 遺伝子変異を有する 3 例における TE 効果は乏しかった (0.2 cm/dose 以下)。SRD5A2 遺伝子変異を有する 3 例では、患者・家族の同意のもとに DTH 軟膏塗布を治験として行い、全例陰

茎長は正常範囲内に到達した (2.8→4.5 cm, 2.0→5.0 cm, 2.2→4.2 cm)。

SRD5A2 遺伝子変異陰性例における陰茎長は、TE (25 mg/dose) 1-4 回投与により全例正常範囲内に到達した。初回 TE 25mg あたりの陰茎長増加量 (cm) は、患児の年齢や体表面積に変化はなくほぼ同等であったが、エナルモン 25mg あたりの陰茎長増加量 (SDS/dose) は、患児の年齢および体表面積と逆相関していた (図 2)。また、TE 25mg 初回投与時の陰茎長反応は、治療前マイクロペニス が軽度群 (-2.0~-2.5 SD) と重度群 (-2.5 SD 以下) の患者の間で等しく (P=0.96)、一方、TE 25mg 2 回投与群において 3 回投与群よりも良好であった (P=0.009) (表 1)。

表1. TE 25 mg 初回投与時の陰茎長増加 (cm)

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

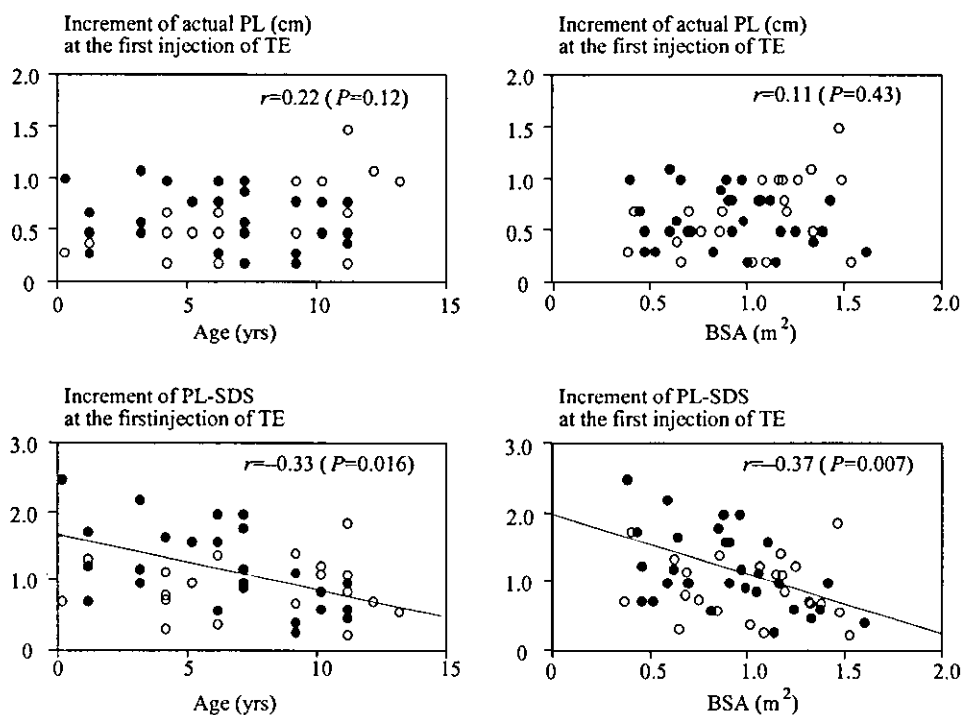


図 2. 初回 TE 25mg あたりの陰茎長増加量 (cm)

## ②ハプロタイプ解析

ハプロタイプブロック(連鎖不平衡係数 0.9 以上)は、コントロール男性 100 例と停留精巣患者 63 例共に 3'側の SNP10-14 を包含する約 50kb 領域で同定された(図 3)。この領域の主要ハプロタイプは 4 個存在し、そのうち、AGATA ハプロタイ

プの推定頻度が、患者と健常者で有意に異なり、この有意差はハプロタイプが劣性効果を有すると仮定すると顕著になった。このハプロタイプのホモ接合体頻度は、患者のみに求められ、その頻度は患者と健常者で顕著に異なった。

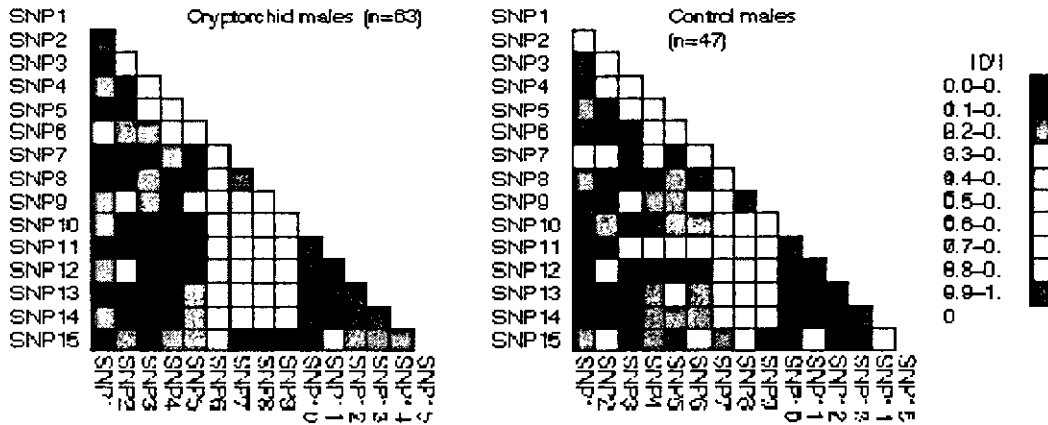


図 3. 今回同定されたハプロタイプブロック

## D. 考察

### ①治療効果の検討

本研究は、小児マイクロペニスにおいて単一遺伝性疾患としての SRD5A2 遺伝子変異が存在することを明らかとした。そして、R227Q という約 5% の残存酵素活性を有することが知られている変異が 3 例に共有され、これは、残存酵素活性と男性化障害の間に相関関係が存在することを示すものである。さらに、SRD5A2 遺伝子変異患者では、ジヒドロテストステロン軟膏という、保険適応にはなっていないが有効な原因治療薬が存在することから、その診断は患者の治療に大きく貢献すると考えられる。

SRD5A2 遺伝子変異陰性例における TE 療法は、全員において有効であった。さらに、TE 25 mg の効果が年齢や体表面積を問わずほぼ一定であることが判明し、これは、本治療法があらゆるマイクロペニス患者において使用しうることを示唆する。さらに、TE 25mg 初回投与時の陰茎長反応が治療前マイクロペニスの程度に無関係であったことは、その効果がマイクロペニスの原因に影響される

ことを示唆する。すなわち、TE 効果は、テストステロン分泌障害によるマイクロペニスでは良好で、外陰部のテストステロンにたいする反応性低下によるマイクロペニスでは不良と推測される。また、TE 25mg 初回投与時の陰茎長反応が 2 回投与群において 3 回投与群よりも良好であったことは、TE 効果が必要注射回数の重要決定因子であることを示唆する。

### ②ハプロタイプ解析

SNP 12 の A アリルはこの特定ハプロタイプに特有であった(表 1)。したがって、この A アリルはハプロタイプ解析の代表として解析に用いようと期待される。

特定ハプロタイプの頻度がコントロール男性と停留精巣患者の間で顕著に異なり、劣性効果を有する ESR1 の特定ハプロタイプが停留精巣の発症に関与することが示唆された。これは、エストロゲン様効果を有する内分泌攪乱物質の影響と解釈され、この特定ハプロタイプが、外陰部異常発症のみならず TE の薬剤応答性に関与しうることを示唆する所見と推測される。

## E. 結論

マイクロペニス患者のうち SRD5A2 変異解析を有する症例では、TE 筋肉注射は無効であるが、DHT 軟膏塗布は有効である。すなわち SRD5A2 遺伝子の遺伝子型を効果的治療法の選択に利用する。

また、特定ハプロタイプが、外陰部異常症発症のみならず TE の薬剤応答性に関与していることを示唆する結果が得られた。ESR1 遺伝子に特定ハプロタイプがハプロタイプブロックが存在することを、今回の結果は世界で初めて示したものである。ESR1 のような巨大な遺伝子では各々の SNP の関連解析は困難であり、今後はハプロタイプ解析を行うことが望まれる。

## F. 健康危険情報

該当する内容はない。

## G. 研究発表

Testosterone enanthate therapy is effective and independent of SRD5A2 and AR gene polymorphisms in boys with micropenis.

Ishii T, Sasaki G, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, Ogata T. J Urol. 2004 Jul;172(1):319-24.

Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene: implication for the susceptibility to dioxins.

Watanabe M, Sueoka K, Sasagawa I, Nakabayashi A, Yoshimura Y, Ogata T. Fertil Steril. 2004 Oct;82 Suppl 3:1067-71.

Testosterone enanthate therapy is effective and independent of SRD5A2 and AR gene polymorphisms in boys with micropenis.

Ishii T, Sasaki G, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, Ogata T. J Urol. 2004 Jul;172(1):319-24.

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

アミノ配糖体抗生物質と難聴

—ミトコンドリア遺伝子変異 1555 検出の臨床検査としての最適化に関する研究—  
分担研究者 奥山 虎之 (国立成育医療センター遺伝診療科 高度先進検査室 医長)

**研究要旨** ミトコンドリア DNA 中に存在する A1555G ホモプラスミー変異は、アミノグリコシド系抗生物質の投与による難聴誘発との関連性が指摘されている。本研究では、アミノグリコシド系抗生物質による副作用を未然に防ぐ為の手段として、ミトコンドリア DNA 変異のスクリーニング検査を実用化するための方法論について検討し、時間的には TaqMan プローブが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。さらに、TaqMan プローブ法を利用して、血縁関係のない正常日本人 200 人のミトコンドリア DNA を解析したところ、A1555G ホモプラスミー変異は検出されなかったことから、頻度は、0.5%以下と結論した。

A. 研究目的

1555 番目の塩基であるアデニンがグアニンに変化したミトコンドリア DNA のホモプラスミー個体は、ゲンタマイシンなどのアミノ配糖体系抗生物質を投与された場合、高頻度に感音性難聴という副作用を呈することが知られている。これは、リボソーム RNA (rRNA) の立体構造に変化が生じ、アミノ配糖体抗生物質に対する親和性が高まり、ミトコンドリアにおけるタンパク合成が阻害され、その結果、ATP 産生が低下し有毛細胞のイオンポンプ機能が傷害されるためであるとされている。

小児科臨床において、アミノグリコシド系抗生剤の投与が考慮されるのは、敗血症、細菌性髄膜炎などの重症感染症の治療にお

いてでありで緊急を要する 경우가少くない。

本研究の目的は、ミトコンドリア A1555G 変異を正確・迅速に解析する方法を開発し、臨床検査としての最適化について検討することである。さらに、もっとも、検討した中で信頼性の高い方法を用いて、正常日本人 200 人を解析し、この遺伝子頻度を推定することである。

B. 研究方法

1. ミトコンドリア A1555G 変異を以下に示す種々の方法での検出を試みた。

(1) PCR-直接塩基配列決定法

(2) PCR-RFLP 法

(3) TaqMan プローブ

(4) 熱変性高速液体クロマトグラフィー

これらを用いた SNP 解析法を試み、おのこの方法の検査にかかる時間費用を比較検討した。

2. 上記の検討の結果、最も短時間で明瞭な結果が得られた TaqMan プローブ法を用いて、血縁関係のない日本人 200 人における遺伝子解析を行い、この遺伝子変異頻度を推定した。

### C. 研究結果

(1) それぞれの検査結果について：

・ PCR-直接塩基配列決定法

結果を図 1 に示す。

1555 番目の塩基を含む 551 塩基対を PCR で増幅し、PCR で用いたプライマーを使ってシーケンス反応を行なった。検査に用いたプライマーの塩基配列は、5'-ccgtcacctcctcaagtat-3'、

および

5'-gcactttccagtacacttacatg-3' である。

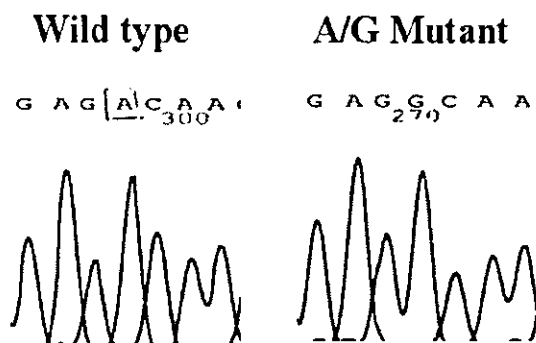


図1. PCR-直接塩基配列法によるミトコンドリアA1555Gの検出

・ PCR-RFLP 法

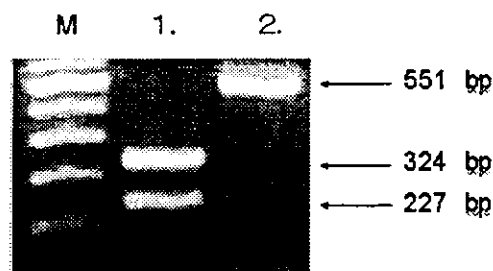


図2. PCR-RFLP法によるミトコンドリアA1555Gの検出

M: マーカー; 1. Wild Type 2. Mutant

結果を図 2 に示す。1555 番を含む部分の塩基配列は制限酵素 *A/w26I* の認識部位を含むので、PCR 産物の同酵素処理により解析が可能である。

・ Taq-Man プローブを用いた解析法  
結果を図 3 に示す。2 種の MGB プローブ (5'-ttatatagaggagAcaagtc-3' および 5'-ttatatagaggagGcaagtc-3') を作成し、Allelic Discrimination Analysis を行なった。その結果は明瞭で、しかも採血から 4 時間以内に結果報告が可能であった。

・ 熱変性高速液体クロマトグラフィー法  
検出結果を図 4 に示す。

1555 番目の塩基を含む塩基対を PCR で増幅し、Heteroduplex 反応後、DHPLC 法での解析を行った。

本検査に用いた DHPLC 用のプライマー配列は、

5'-agtaagcgcaagtaccacgtaaagac-3'、

および

5'-ctattgcccagggttcaatttctatcg-3'

である。

DHPLC 検出条件は

設定温度：58.0℃

TimeSift : -2.0min

であった。

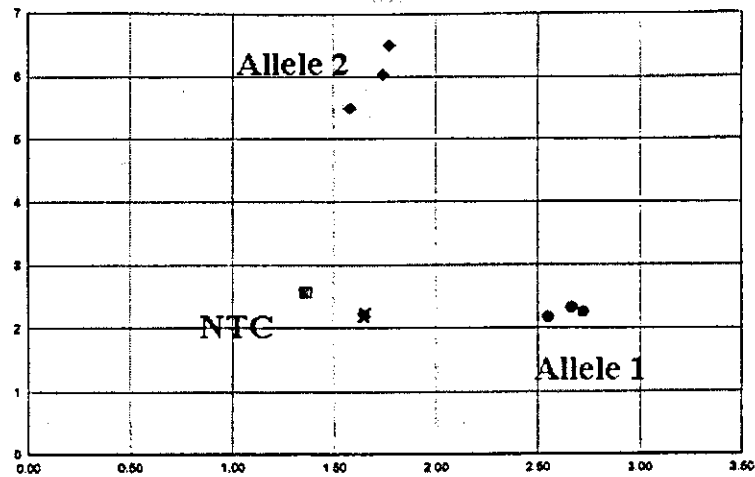


図3. TaqManプローブによるSNPアッセイ法による検出

Allele 1: Wild type; Allele2: A1555G Mutant; NTC: non-template control

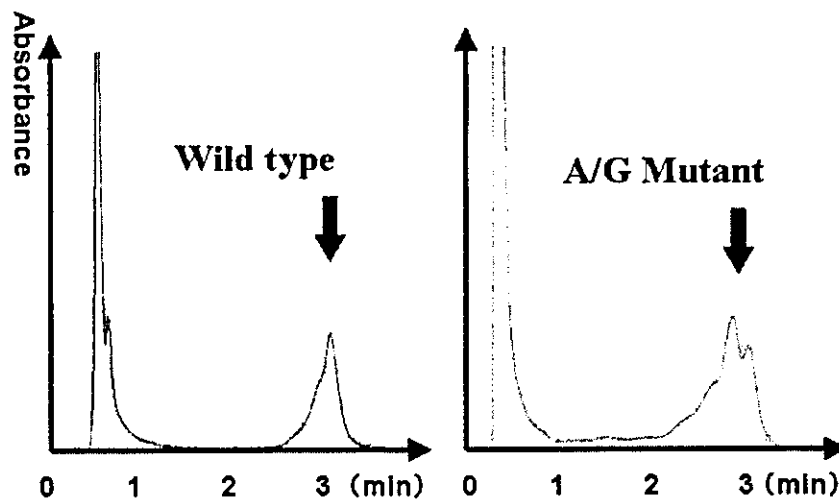


図4. DHPLC法によるミトコンドリアA1555Gの検出

(2) 日本正常集団 200 人の検討では、ミトコンドリア遺伝子のなかに、A1555G ホモプラスミー変異を有する個体は存在しなかった。

#### D. 考案

各種検査法による検査時間と費用比較検査に要する時間と費用について比較検討した結果を、表 1 に示す。

今回の検討により時間的には TaqMan プロープが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。緊急性に依じて両者を使い分けることが理想的であると考えられた。

また、日本人正常集団における変異遺伝子の保有率は、0.5%以下であった。変異保有者は決して多くはないが、検査が迅速、短時間にできること、アミノグリコシド系抗生物質は多種類の抗生物質が使用可能な状況では選択肢の一つであり、リスクがある場合に他の抗生物質を選択することにより、事前にリスクを回避できること、ミトコンドリア遺伝子特有の母系遺伝をすることを考慮すると、理想的には、アミノグリコシド抗生物質の投与前にすべての症例でこの遺伝子検査は実施すべきであり、少なくとも、家族歴（とくに母親の家系）に難聴の既往がある場合は、必ず行うべき検査であると考えられる。

表1. 各種検査法の比較

	分析コスト/検体	分析処理時間
PCR-RFLP	130 円	8 hr
WAVE-DHPLC	65	8 hr
SNP assay	120	3 hr
Seq. Analysis (3100 ABI multi-capillary)	220	2 days

#### E. 結論

今回の検討によりミトコンドリア A1555G 変異スクリーニングのためには時間的には TaqMan プロープが有利で、コストの観点からは熱変性高速液体クロマトグラフィー法が有利であると考えられた。緊

急性に依じて両者を使い分けることが理想的であると考えられた。また、頻度は低いものの、その簡便さ、有用性を考慮すると、アミノグリコシド系抗生物質の投与前には、全例でこの検査を施行すべきであると結論する。



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fujimoto Y, Okuyama T, Iijima M, Tanaka T, Reiko Horikawa R, Yamada K, Ogata T. Genitourinary phenotype in XX patients with distal 9p monosomy. *Molecular Genetics and metabolism* 2004;82:173-9.
2. 奥山虎之、小崎里華、福原康之。わが国における遺伝子医療の現状 日本臨床 2005 ; 63 : 403-407

### 2. 学会発表

1. Fukuhara Y, Okuyama T, et al. Long-term behavioral improvement after intra-cerebral transplantation of neural stem cells into the mice with mucopolysaccharidosis VII. 10<sup>th</sup> annual meeting of the gene therapy 2004, 8月5日、東京

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

薬理遺伝学における倫理 — 諸問題から実際の運用まで —  
分担研究者 菅谷明則 (都立清瀬小児病院 循環器科 医長)

**研究要旨** 薬理遺伝学的研究や薬理遺伝学的検査の診療への応用する際には、幾つかの倫理的問題を考慮する必要がある。遺伝学的検査に関する一般的な倫理的問題とともに遺伝薬理学的検査に特有の問題点もある。本研究では、第1にイギリスのナッフィールド・バイオエシックス評議会 Nuffield Council on Bioethic が刊行した「Pharmacogenetics: ethical issues」について翻訳・検討を行った。薬剤開発において薬理遺伝学が果たす役割と、診療において薬理遺伝学を応用する際に考慮すべき倫理的問題について言及した章である。新薬の開発に対し、薬理遺伝学は一定の役割を果たすことが期待される点、薬理遺伝学の診療への利用において、一般開業医(GP)や薬剤師を含む医療従事者への薬理遺伝学教育と一般人の啓蒙が不可欠である点、遺伝情報を扱うことに必ずしも慣れていない一般開業医または薬剤師が遺伝情報を保管する責務を負う点等が強調されており、これら倫理的諸問題は、継続的に検討すべき重要なテーマであった。第2に、本邦における一般人の薬理遺伝学的研究に対する意識を明らかにする目的で、慶應義塾大学病院小児科一般外来を受診した患者および患者の保護者40名に対しアンケート調査を行った。本研究により、薬理遺伝学検査の結果を実際の診療に役立てるための問題を把握し、進め方を検討し、現実的な運用に近づける基盤を整備することができた。

**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  
田村和代 慶應義塾大学医学部小児科 医師

**A. 研究目的**

薬理遺伝学についての研究を通じて、副作用が少なく有効性の高い新薬が開発されるとの大きな期待がある。研究の方法論、倫理、政府による規制方針のあり方、臨床応用、医学、経済学的、法的な問題について、海外を中心に多角的な検討が行われているが、一般人が薬理遺伝学に対してどのような考え方をもっているかについての研究は少ない。

一般人が薬理遺伝学的研究を支持するか、その背景にある考え方を理解しているのか、自ら研究に参加しても良いと考えているのか、どのような条

件下なら参加しても良いと考えているのか、どのような研究機関が主導する研究に信頼をおくのか、新薬の開発に対して楽観的な考えなのか、薬理遺伝学的研究が公衆の役に立つと期待しているのか、ゲノム研究に関してプライバシーの問題に関して重大な関心を寄せているのかを2002年に米国のNIHの研究グループが検討した。本研究では、大学病院の一般小児科外来に通院する親を対象としてアンケートを行い、本邦における一般人の薬理遺伝学的研究に対する意識調査を行った。

また、我々は、インフォームド・コンセント→検体の匿名化→検体の管理→遺伝子検査→結果の患者へのフィードバックを一貫して行いうるシステムを確立したが、このようなシステムを臨床試験のプロトコルの一部としてあるいは診療のために運用する際には、薬理遺伝学的研究のもつ倫理的・法律・社会的な問題 ELSI について十分な検討が必要である。

英国では、薬理遺伝学に関する倫理学的研究が進められている。本分担研究では、英国のナッフィールド・バイオエシックス評議会が昨年発行した報告書「Pharmacogenetics: ethical issues」の内容について検討し、わが国における状況と比較した。ナッフィールド・バイオエシックス評議会は1991年に設立された独立機関であり、これまでに医学・生物学の分野における倫理的な諸問題について議論を展開し、見解を公表してきた。

## B.研究方法

### <一般人意識調査>

NIH によって行われたアンケート調査票をもとにアンケート票を作成した(添付1)。ただし、以下の点について、改変した。

- ①回答に必要な時間を短縮するため、アンケート項目を削減した。
- ②我が国の実情に合わない質問である民族・人種に関する質問、健康保険に関する質問を割愛した(政府管掌保険のない米国と我が国の国情は異なる)。
- ③米国でのインタビューは電話によるものであったが、本研究では、病院外来でアンケート票を直接に配布する方式を使った。このため、個人を間接的に特定しうる質問内容を削除した。

慶應義塾大学病院小児科一般外来を受診した患者および患者の保護者40名に対してアンケート票(添付)を直接に配布してアンケート調査を行った。診察の受付時に研究協力者(小児科医師)が簡単な趣旨の説明をした後に、アンケート票を配布し、診察順番を待つ間に回答していただいた。最初に配布した医師がアンケートを直接に回収した。

### <Pharmacogenetics: ethical issues>

「Pharmacogenetics: ethical issues」は近年の生物学的・医学的進展によりもたらされた倫理的な問題を

明らかにし、定義することを目的として英国MRC(Medical Research Council)からの資金により編纂された。「Pharmacogenetics: Ethical issues」編集委員会の議長は、ケンブリッジ大学の歴史学・哲学科科長 リプトン教授であり、委員は、ヨーク大学政策学部教授、ケンブリッジ医学研究所医科遺伝学科主任、リバプール大学医学部長、ロシュ社副社長、ニューキャッスル大学臨床薬理学教授、ロンドン大学経済・政治学部生物学・生物医学・バイオテクノロジー・社会研究所 所長、ダービー大学 プライマリケア・センター所長、エッセックス大学政治学教授である。

本分担研究では、「Pharmacogenetics: ethical issues」のうち特に本研究事業に関連が深いと考えられる、第3章「治療および診療における倫理的諸問題」、補遺「付録4: 一般との協議」および、を翻訳し、我が国における薬理遺伝学的研究における意味づけを検討した。

#### ① アンケート調査

ナッフィールド・バイオエシックス評議会のワーキンググループが英国を中心に文書による意見調査を行い、大学(25件)、企業(12件)、職業団体(12件)、開業医(9件)、一般人(6件)、患者団体(4件)他をから得た回答を分析しPharmacogenetics ethical issuesの補遺補遺「付録4: 一般との協議」として出版している。本分担研究では、この文書を翻訳した。

#### ② 薬理遺伝学を診療に応用する場合の倫理学的問題についての考察

ナッフィールド・バイオエシックス評議会のワーキンググループがPharmacogenetics ethical issuesの第5章「Ethical issues in treatment and clinical practice」に薬理遺伝学を診療に応用する場合に起こりうる倫理学的問題について取り上げている。

本分担研究では、この文書を翻訳した(添付2)。

## C. 研究結果

### <一般人意識調査>

アンケート票を配布した全員から回答を得ることができた。次ページに問いに対する答えをグラフ表示する。

3名の回答者がアンケート票の自由記載欄に意見を寄せた。以下に原文のまま、引用する。

「成人の場合は、体格によらず投薬量が同じであることが、何かおかしいと思っていました。また、副作用についても人それぞれだと思います。わかってくれない医師が多いのが現状というのが悲しいところです。ぜひ、このような研究を進め、今後の医学発展に役立たせてください。」

「研究費用を支援するのが製薬会社の場合、その会社の薬が有利にならなければいいとおもう。」

「子供に処方されて薬で合わないものがあり、医療機関を受診するたびに説明しなくてはならない。検査で合う、合わないがはっきり示され、証明書のようなものを提示すればわかってもらえるようなシステムが確立するとういと思う」

### <Pharmacogenetics: ethical issues>

日本語への翻訳を行った。本報告書の添付文書を参照。

翻訳を許諾したナッフィールド・バイオエシックス評議会に深謝する。著作権は同評議会にあり、翻訳に関する責任は当研究班にある。

## D. 考察

### <一般人意識調査について>

回答者の72%が母親、17%が父親で、以下の回答は、主に親の意見を反映していると考えられる。

大部分の回答者がオーダーメイド医療の実現がよりよい医療に貢献すると表明した。「貢献する」

と回答した人が87%をしめた。「全く貢献しない」と回答した人は1名のみであり、他は全員貢献すると回答した。

遺伝子検査により最も良く効く薬を予測することや最適な投薬量を予測することは「良いことである」と回答した人が67%を占め「どちらかいうと良い」と答えた人が27%であり、全体として95%の人が肯定的な意見を表明した。

遺伝子検査により最適な投与量を予測することについても同様の傾向が認められた。

このように、オーダーメイド医療全体に関しては肯定的な傾向が認められた。

研究への参加については、積極的な意見は少なくなり、「参加したい」と回答した人は30%にとどまった。「どちらかというとなら参加したくない」人は23%に上った。

遺伝子検査の結果は「知りたい」と述べた人が92%をしめ、多くの人々が individual feedback を求めることが明らかにされた。今回のアンケート結果は、相当数の人間が「連結可能匿名化」の研究スタイルを是認している可能性を示唆している。米国の検討結果でも、今回の検討でも、検査の結果が、参加者に戻されない「連結不能匿名化」された研究よりも、個人に検査結果が報告される研究形態を望むことが明らかにされた。Nuffield Council on Bioethics（英国）が実施した、薬理遺伝学に対する、個人や様々の組織（製薬企業・研究者等）に対するアンケートによれば、「研究者達は薬理遺伝学の研究から得られた遺伝情報を個人にフィードバックする必要があると考えますか？」という質問に対する回答の解析は以下の通りであった。「回答者の大部分は、研究参加者（訳注：=患者）が希望する場合には遺伝情報（訳注：=遺伝子検査結果）を個人に返す individual feedback を行うべきであると考えて