

5.13 薬理遺伝学検査から得られる情報の性質は、その検査が病変組織の遺伝的特性を調べるのか、それとも遺伝した DNA における遺伝的多様性を調べるのかによって異なるであろう。我々は 5.10 節で、乳癌治療におけるハーセプチンの使用と関連して、前者の種類の検査は倫理的問題を生じさせないとみなされていることに注目した。この場合、検査からは、問題の特異的治療と疾患という状況以外では関連性がない癌性腫瘍である病変組織における変異型 DNA に関する情報が得られる。後者の場合、遺伝的情報は疾患の因果関係に無関係であることが多いが、他の薬剤に対して生じる反応や他の状況に対する感受性のような事柄との関連を持つ場合もある。繰り返すが、現時点の診療においては、これらの薬理遺伝学検査のための書面による同意とカウンセリングは、その薬剤が偶々特別に重大な有害反応を起こす可能性がある場合でないかぎり、求められることはないであろう。

5.14 薬理遺伝学検査の心理学的な影響も考慮する必要がある。検査によって、その患者の症状のための薬剤は全て無効または受容しがたい副作用があるために、その患者に効果的な治療ができないことが明らかになる場合もある。そのような情報は、ある病気にかかりやすいという情報と同じように悲惨であろう。また、患者が、利用できる治療法が限定される診断情報を突き付けられたと感じ選択肢が少なくなったという印象を持つ場合には、他の問題も生じると思われる。薬理遺伝学情報の利用は、患者を全人的に考慮するのではなく、ゲノムのみを考慮するアプローチとみなされる。しかし、選択肢の限定に関わる同様の結果を持つ非遺伝的検査は、乳癌におけるエストロゲン受容体検査のように、長年臨床現場で利用されている。

5.15 薬理遺伝学検査の場合、これらのどのような考察によって、我々は書面による同意と遺伝カウンセリングの必要について考えるに至るのか？患者に特別な注意が払われぬまま、薬理遺伝学

検査により得られる情報と似た性質の情報を受け取ることについての議論が可能である。患者は、ある形態の悪性脳腫瘍のように、薬理遺伝学検査に頼らずとも、自分の症状に効果的な治療法がないことを知らされる場合がある。同様に、治療法はあるが NHS では利用できないと告知される場合もある。情報の解釈において、これは治療の多くの面に影響する問題である。薬理遺伝学情報は、非遺伝学的検査後に主治医から患者にルーチンとして伝えられるべき情報と異なるという点については明らかではない。

5.16 医学検査の重要な特徴は、それによって得られる情報の内容であって、その情報が遺伝的性質のものかどうかではないことは既に述べた。遺伝的例外論 genetic exceptionism の罠に陥らず、例えば治療を指示するだけでなく将来的な罹患の確率に関する情報をも示す高血圧の検査のように、その検査に関連して同様のリスクが生じることがある非遺伝検査と比較して、薬理遺伝学検査にはより高い水準の同意を求めることが重要である。しかし、よく知られているように、遺伝学的データの重要な特徴の一つは、当該疾患に無関係またはいかなる疾患にさえも無関係な情報が明らかになり得ること、この付加的情報は遺伝学的標本の採取時点では判明していない可能性があるということである。このことは検査に対するインフォームドコンセントの取得を困難にしている。3.29 節で、倫理的に重要な同意の要件は、それが完璧であることではなく真実であること、十分なインフォームドコンセントを達成することは不可能なことでありと述べた。この点について再度述べておこう。いかなる同意書でも、その時点において判明していない不測の事態について患者に伝えておくことはできない。しかし、同意書は場合によっては必要である。2 つの例を挙げる：(i) 標本または検査結果が、処方に役立るという本来の目的とは実質的に異なる目的のために利用される有意な機会、または患者に関し当該薬に無関係な情報が明らかになると

いう有意な機会が存在する場合；(ii)検査結果が患者の健康または生活様式に特に深刻な影響をもたらし得る場合。両例とも、非遺伝検査の提案時にも生じ得ることに留意する必要がある。

- 5.17 我々は、臨床現場で行われる薬理遺伝学検査に対し、書面による同意を要求すること、各検査はその検査によって得られる情報の性質に従って判断すべきであることを勧告する。無関係な薬剤または疾患に関する情報が得られる可能性がある場合、または検査結果が患者の健康または生活様式に有意な影響をもたらし得る場合に、書面による同意が適切と思われる。我々は多くの場合、書面による形式は不要と考える。しかし、特に検査によって複雑で確率的な情報が明らかになる場合、患者に対し書面による情報を提供すべきである。そのような情報源を開発する際には、関連機関は同様に複雑な非遺伝学的検査についても開発すべきかどうかを考察しなければならない。

検査と治療に対する責任

- 5.18 薬理遺伝学に基づく患者の薬剤治療に関する決定に対し誰が責任を負うべきか？少なくとも次に述べる異なる3種の決定を区別する必要がある：検査を行うべきかどうかの決定、検査後に薬を使用するかどうかの決定、患者が関連検査を望まない場合に薬を使用するかどうかの決定。
- 5.19 ほとんどの人々は、どの薬でも処方箋無しで市販されたりインターネットで市販されたりして良い訳ではないことは認めている。しかし、薬理遺伝学検査はどうだろうか？検査は薬剤ほど直接的な身体リスクを課すものではないという根拠に基づき、より広範囲な患者管理に関して一応成立する事例がある。しかし、状況は複雑である。公衆衛生システム内では、健康に対するリスクは治療に対する専門的管理を維持する唯一の理由ではなく、患者が国家に薬理遺伝学検査の費用負担を期待する限りにおいては、患者はその使用に関するある種の制約に従わなければな

らない。さらに、既に述べたとおり、薬理遺伝学検査の結果はマイナスの心理的作用をもたらすこともあり、このことは検査利用を管理するシステムの正当性を提供することになるだろう。この議論は、検査が自由に行われるだけでなく、これらの検査の多くが信頼性が低いか解釈が困難なシステムに関連する場合に最も激しくなるだろう。しかし、患者が自らの情報を入手することについて相当な管理を行うことに関する説得力のある論拠が存在する。例えば、我々は妊娠検査薬を処方箋無しで購入することを認めており、これらの検査結果が精神的にどれほど影響を及ぼすかを知っており、また検査が100%信頼できるものではないことも知っている。しかしこれらの検査は有用で解釈しやすく、薬理遺伝学検査が同様の状況である限りにおいては、患者の選択という主張は強力であろう。

- 5.20 近年、遺伝検査を消費者に直接提供することに関して議論が行われている。⁸「人類遺伝学評議会」(HGC)は、直接的遺伝検査はより厳密に管理すべきであり、標本採取や検査を患者が自宅で行う予測的検査を推進すべきではないと勧告している。⁹ HGCは主に疾患の予測または診断のための検査に焦点を当てているが、薬理遺伝学の発展が重要な関連問題であることには気付いていた。HGCが提案した管理の枠組みは、直接的な遺伝検査の安全性規範の責任を英国医薬品庁(MHRA)に課し、検査の有効性をレビューする責任を英国遺伝検査ネットワークに課した。HGCは結論として、遺伝検査によって得られる情報の複雑性と感受性から見て、それらの検査は医療従事者によって提供され解釈されるものと推定されると述べた。しかし、直接的な遺伝検査は、企業が以下のような説得力のある主張を提示することができれば承認されるだろう：
‘検査の有効性が十分に証明され、検査の提供に関与する者全てが正しい研修を受けた熟練者であり、高い質の助言を消費者に提供することができる。例えば、我々は、薬剤

処方指針となるある種の遺伝検査は、ある種の薬剤師によって適切に提供され得ると認識している。¹⁰

5.21 我々の公開諮問に対する回答者の多くは、薬理遺伝学検査によってもたらされ得る情報の性質が複雑であること、そのような情報はどの薬剤を処方すべきかという決定の一部に過ぎないことから、医療従事者の関与に賛成する推定を広く支持している。処方箋無し検査を利用できることは、たとえ付加的利益がわずかでも、医師がより高価な薬剤を処方するための圧力となり、NHS 予算の負担となる。さらに、医師は、結果を確認するため、私企業が実施した検査を再度実施したがるであろう。特殊な薬剤の販促キャンペーンの一部として検査がまったく無料で行われることがないように管理しなければ、そのようになることは容易に想像できる。治療が比較的困難な症状の患者は特に、違いは比較的わずかでのどの薬剤にも大した効果はないと思われるにも関わらず、高価な薬剤は安価な代替薬よりも効果がありそうに思わせるアプローチの対象となりやすい。

5.22 我々は結論として、一部の薬理遺伝学検査は、処方箋なしで購入できる薬または処方箋に基づいて入手できる薬に関して、明白ですぐに解釈可能な情報を提供できると考える。そのような検査が英国医薬品庁(MHRA)によって承認されれば、その検査が直接消費者に提供されることを妨げる理由は何もない。しかし、薬理遺伝学検査の大半はより複雑になるだろうし、より確実性の低い予測しか提供されないであろう。このような場合、検査の前後において専門的助言が求められると思われ、検査の直接的な商業的提供は不適切であると考えられる。英国医薬品庁(MHRA)は検査の臨床的有効性と質の評価に責任をもつことになるだろう(4.3 節)。我々は、英国遺伝検査ネットワークは消費者に薬理遺伝学検査を直接販売することに関する助言に責任を負い、ケース・バイ・ケースのアプ

ローチを行うべきであると勧告する。我々は、患者に直接販売されるべきでない薬理遺伝学検査は患者に宣伝すべきではないと考える。

5.23 関連する薬理遺伝学検査を受けずに治療を受けるという選択肢はどうか？患者が、検査に同意すれば救命の可能性がある薬剤の処方を受ける唯一の機会が存在することを知っている場合、検査に対する患者の同意はどのようにして自発的とみなされるか？しかし、薬理遺伝学検査がないという状況で、救命の可能性がある薬剤そのものを使用するかどうかという決定との類似性を考えてみよう。この場合も、決定が真に自発的とみなされるかという重大な問題は存在する；しかし、道徳的に許容されると思われることは同じく明らかで、実際、薬剤を提供することは道徳的には義務でさえある。我々の考えでは、同じことは、検査せずにその薬剤が投与された場合に、明白で実質的で検査すれば回避できるリスクが存在する限りにおいて、治療条件としての薬理遺伝学検査を提供することに当てはまる。

5.24 患者は薬理遺伝学検査によって安全で効果的な治療を受ける確率が増大する場合でも、その検査を熱望するとは推測できない。そのような嫌悪感是非合理的であるが、検査によって得られる情報が保険の取得を困難にするか、有効な治療ができない医学的状況に関する情報が間接的に明らかになるのではないかという正当な恐怖感に基づくものであろう。我々の諮問に対する回答者の多くは、治療に関する決定の最終的責任は処方箋を書く者に在るという見地に立っていた。それにも関わらず、回答者の多くは、患者が薬理遺伝学検査を受けるように助言されても拒絶することができ、そしてそれでもその薬の投与を受けることができなければならないとも感じていた。回答では、自分の治療に関して決定する際の患者の責任と、患者に十分な情報伝達を保証する際の医療従事者の責任が強調されていた：

‘患者は、十分な情報に基づく選択肢がある限り、[薬理遺伝学検査を拒絶することができ、それでもその薬の投与を受けることができなければならない。]’(遺伝学に関わる看護師とカウンセラーの協会)

‘当学会は、患者は薬剤に対する反応を明らかにするための遺伝学検査を拒絶することができ、それでも処方を受けることを期待できなければならないという見地を支持する。患者には有害な副作用に関する全情報が伝えられなければならない、患者はそれに基づいて決定を下す必要がある’。(アルツハイマー学会)

これらの見解は、遺伝的情報を他の医学的情報とは別に扱うべきであるのかという問題を提起する。患者は、医師がある薬剤の有効性を判断することに関連して患者の非遺伝的情報を知ることが拒絶できるが、それでもその薬剤の投与を期待できるという見地も支持されるのだろうか？

5.25 状況は複雑である。医療従事者は、薬剤に承認されている特徴がみられない患者にもその薬剤を処方できるが、結果として生じる問題の責任もかかってくる。これは‘認可外’処方と呼ばれる。薬理遺伝学検査がある薬剤の認可条件の一部であれば、特にそれが患者を有害反応のリスクにさらすことや、わずかな効果しかない可能性もある薬剤を処方することを意味する場合、医療従事者がその検査なしでその薬剤の処方を望むとは考えられない。しかし、検査が認可条件の一部ではない場合、検査によって得られる情報はまさにその薬剤を処方すべきかどうかを決定する際の多くの因子の一つである。ある患者の反応率は低い代替の治療法がなく、その薬剤に関連する有害事象が実質的でない場合、その薬剤は検査なしで処方することができるだろう。

5.26 法的責任に関しては、医師の責任は、あらゆることを考慮して、その薬剤を患者に処方すれば

効果的である可能性が高いことを保証することである。医師には、仮に患者が薬理遺伝学検査を受けないことを選択する場合でも、その検査が利用可能であると患者に伝えることが求められる。これは場合によって、患者に NHS ではその検査を利用できない場合でも検査の存在を伝えることにつながると考えられる。医師は患者に検査の拒絶が意味する内容を伝えることも求められるだろう。患者が関連情報を考察した後に検査を拒否する場合、医師はその薬剤を処方しない決定を下すことができる。法は医師が臨床判断に背いて行動することを要求しないが、微妙なバランスの上に立つ決定が関与し相反する意見が存在する場合、患者の意見を重視するべきである。

5.27 我々は4.16~4.17節において、NICEのような機関は薬剤が供給される状況に関する指針を提供し、これにはハーセプチンの事例のような薬理遺伝学検査の結果への言及が含まれると述べた。そのような指針は医療従事者を正式に拘束する訳ではないが、患者と医師の間の全ての論争において言及されるだろう。このように医師は、関連する薬理遺伝学検査を受けそのような指針に設定された必要な基準に適合する患者に対して、処方制限を強制されていると感じるかも知れず、事実、医療提供者はそのような要件を課している。これらの状況において、自分にとって効果があると思われる治療を不当に排除されていると感じる患者は、司法審査によりその決定に異議を申し立てることができるだろう。

5.28 我々は、薬理遺伝学が進歩し、ある種の亜群に薬剤がもたらす重大な危険のため、関連検査が行われなければ認可されないと思われる薬剤が認可されるようになることを期待できると考えている。そのような場合、検査を行わずに処方を認めることは正しくないと思われる。また別の場合では、薬理遺伝学検査は薬剤の認可条件の一部でないこともある。医療従事者は従

って、規制機関または専門機関による指針に関心を持つ各患者の治療に関して決定を下すように求められる。実際、これは患者が関連薬理遺伝学検査を受けなければ特殊な薬剤が処方される可能性は低いことを意味する。

- 5.29 自分の治療について決定を下すことができないと判断される精神疾患がある患者、または精神衛生法の下で拘束され同意なしに薬剤投与を受けている患者の場合、薬理遺伝学検査は患者の最大の関心であろうという根拠に基づき、医師によりそのような検査が要求される。精神疾患を持つ患者の強制治療はデリケートな問題で、この領域における薬理遺伝学の適用は特殊な懸念を生じさせる。薬理遺伝学検査は、精神疾患または行動障害の薬理的治療、または有罪判決を受けた犯罪者の治療を要求するために利用されることがあり、精神衛生分野において医学的方法を適用するという既存の傾向に拍車をかけている。

発展途上国における認可外の使用

- 5.30 単に薬理遺伝学検査施設がないという国では、認可外処方の可能性も存在する。薬理遺伝学検査と併せて使用するように開発された薬剤が購入され、検査を経ずに処方される国もあると思われる。そのような施設の不足は、薬理遺伝学検査によって薬剤の重篤な有害反応を被る患者を高い確率で予測できる場合に、特に懸念される。このジレンマは新しいものではない：より貧しい国々では潜在的な有害反応の監視と治療に必要な機器が高額なために、多くの医学的治療が安全に適用されていない。しかし、医学における種々の開発の中で薬理遺伝学はそうした状況の拡大をもたらし得る。我々は、特殊な国において薬剤の処方を許可する決定はその国における薬剤規制機関の責任であると考え。決定は、状況の重大性や代替治療の利用可能性、そして薬理遺伝学検査によって得られる情報の性質を考慮して、ケース・

バイ・ケースで下されると思われる。

プライバシーと薬理遺伝学的情報の秘密性

- 5.31 薬理遺伝学検査が数年以内にルーチンの臨床行為において大部分を占めるようになるとは考えられない。従って、この状況において薬理遺伝学的データがどのように入手され保存されるのかを予測することは困難である。アプローチの範囲は、処方に際して行われる遺伝検査を可能にする組織構造の確立から、各患者の遺伝的多様性に関するデータを含み、必要に応じてアクセスできる大規模なデータベースの提供まで多岐にわたる。これら 2 つのアプローチは、まったく異なる論理的問題および倫理的問題を提起する。少なくとも短期間では、国民の大半は薬理遺伝学検査を受けたことがないため、大規模なデータベースの使用が望ましいとも実際的であるとも考えられない。多くのクラスのアプローチは、臨床的に重要な反応を決定する比較的限られた数の遺伝子の存在が明らかになれば、特殊な範囲の予測因子に関する情報を得るため、前もって行うルーチン検査が有効である可能性について議論できるだろう。しかし、必要が生じた時に検査を実施する方が費用効率が優れていると思われる。
- 5.32 一般開業医または薬剤師による遺伝情報の保管は、他の全ての医学的データの保管と同様に、そのような情報のプライバシーに関する問題を提起する。情報の濫用または誤用の可能性を低減する方法の一つは、薬理遺伝学検査を当該の正確な遺伝的変異に制約することであり、それぞれの患者の遺伝子型に関する付加的データが取得されないことを保証することであろう。検査結果も、特異的な遺伝的変異については述べずに患者の医療記録に保存することができると思われる。しかし、薬理遺伝学の適用は、遺伝情報が臨床情報の形式においてのみ存在するのではないことを意味する。患者が遺伝的変異を考慮する特異的な薬剤投

与を受ければ、その薬剤は間接的に患者の遺伝子型を示すことになる。これは、多くの薬剤の代謝に異常機能を持つ酵素が関与する患者に薬剤を投与する際に重要となる。薬剤それぞれの投与は間接的に、投与されている患者が他のいくつかの薬剤にも特殊な反応を示すと推測されることを意味する。

- 5.33 シェフィールド大学の研究者らは英国保健省に代わり、保健データの保管と利用に対する国民の姿勢に関する調査を実施した。これによりほとんどの国民は、自分の治療に直接責任を持つ医療チームとその情報を共有することに同意しているが、ソーシャルワーカーや理学療法士のような他のグループが情報に接近することに関しては懸念を抱いていることが分かった。文書による記録に比較して電子的保管に対しては特に懸念しているようには思われなかった。しかし、一般的に匿名化という処理は信頼できないと思われているため、情報の匿名化については懸念を表明した。¹¹我々は、NHS 内部における遺伝情報の保管という問題は HGC によって考察済みと考え、下記の HGC の結論に同意する：

‘我々は、保健サービスの中で遺伝情報の保管に関して個別の処理が容易であるとは考えていないが、それにも関わらず、潜在的にデリケートな性質をもつこの情報は、患者の医学的情報全般における秘密保護の重要性を強調していることを指摘する。’¹²

第三者による使用

家族

- 5.34 重大な疾患に関する遺伝検査は、それにより他の家族も当該疾患にかかる可能性が高いかどうかという情報が明らかになるため、検査を受ける本人だけではなく家族にも大きな意味を持つと思われる。しかし、患者が家族に検査結果を進んで知らせたいと思うかについては推測で

きない。同様の緊張は薬理遺伝学検査に関連して生じるだろうか？緊急の状況で使われる薬剤への有害反応に関する情報が分かる薬理遺伝学検査が開発されれば、家族はリスクの存在する可能性について知り、用心のための検査を受けることに関心を持つであろう。薬理遺伝学検査が他の疾患に対する感受性も明らかにする場合、家族も伝えてもらいたいと考えるであろう。（家族への情報開示に関するデータ保護法の意味合いについては 3.40～3.43 節に述べている。）

- 5.35 しかし、先に述べたとおり、薬理遺伝学的データが家族に関連性を有する確率は低い。例えば、家族にとって家族的問題として知っておく価値があるペニシリンに対するアレルギー反応のような例もあるが、この情報は家族と医療従事者の間でルーチンとして共有されている。同様に、患者の家族に関して得られた薬理遺伝学検査の結果が、医療従事者にその検査を患者にも実施した方が良いと思わせることがあるかもしれない。しかし、一般的に、検査が臨床的に適用される場合、家族に関して得られた検査結果とは無関係に、問題の個人毎に実施されると考えられる。例えば乳癌患者の姉妹 2 人は、姉妹のうち 1 人の結果がもう 1 人に当てはまるとは想定できないため、HER2 発現検査を 2 人も受けることになる。患者に対する医療従事者の義務が他者に対する義務と相対立する状況や、そのために患者に薬理遺伝学的情報を家族に伝えるよう勧めたいという状況があり得る。我々は、この可能性は医学的情報の共有に関する既存の業務により対応が可能と考える。

保険業者

- 5.36 保険業者による遺伝学的情報の利用に関しては相当議論されている。¹³ 薬理遺伝学という背景において、各自が‘治療困難’と分類され、既存の薬剤が無効であるため治療は特別に高額になるという根拠に基づき、保険を拒否され

ることがあるのではないかという特有の心配がある。このようなことは、英国などの公的医療システムでは私的医療の場合より少ないと思われる。「薬理遺伝学連絡協議会」は以下の仮説を提唱している：

‘ある者が、その者の重篤な症状のために有効な唯一の薬剤(または薬剤群)がその者にとっては効果的でないか、またはその者にとって安全な使用ができないことを意味する遺伝子型を有している場合、その者は保険業者または雇用主から治療不能な重症疾患であるとみなされてよい。このリスクは、(a)当該症状に有効な代替治療が無い場合、または代替治療がはるかに高額である場合、または(b)保険業者または雇用主が懸念するに足るほど症状が重篤である場合、および保険業者および/または雇用主が決定を下す際にこの種の情報を考慮することができる場合にのみ生じる。’¹⁴

5.37 薬理遺伝学情報は、生命保険だけではなく私的医療保険や重症疾患保険、収入保護保険、長期療養保険を含む種々のタイプの健康保険を提供する保険業者にとって重大な意味を持ちうる。そのような情報は、保険証書申し込み者の掛け金査定時と、保険証書保持者への支払いに関する決定を下すための請求審査時という異なる2つの段階で利用されることになる。

5.38 請求審査の段階では、薬理遺伝学的情報は、どの治療を保険適用とするかを決定する際の公的医療システムにとって重要であるのと同じく、私的医療保険を提供する保険業者にとっても重要である。そのような情報は既に、薬剤の処方決定が薬理遺伝学検査を利用して測定される予測的有効性に基づいて行われるハーセプチンのような事例で利用されている。疾患ではなく個人の遺伝学的特徴を検討する新しい検査は同様に有効であろう。しかし、有効と予測されない薬剤が一番に処方されるとは到底考

えられないため、患者が後に私的健康保険が適用されないかもしれない治療を受けると言っているのではない。

5.39 掛け金の設定に関しては、薬理遺伝学検査の予測値は比較的低く、単一遺伝子による疾患の遺伝学的検査やその個人が喫煙者であるかどうかのような非遺伝的情報に比較してはるかに低いため、薬理遺伝学的情報が保険業者に広く利用されるとは考えられない。その情報入手して処理する管理費はリスク評価におけるその価値をはるかに上回る。我々の諮問に対する回答において英国保険業協会は次のような見解を表明した：

‘薬理遺伝学的情報が[重症疾患保険、長期療養保険および収入保護保険]にとってある程度重要と思われる唯一の領域は、薬剤に対する保険受給者の反応により引き起こされた疾患に対して請求がなされた場合であろう。その疾患が、当該保険受給者が例えば特殊な薬剤に対する有害反応を起こす可能性がきわめて高いことを示す薬理遺伝学検査に従うことを拒絶したために発生した場合、このことはその請求を支払うかどうかに関して保険業者側が考察する際に重要となろう。しかし、薬理遺伝学的情報は、そのような場合、議論の場における確認的エビデンスの作用を果たすに過ぎない。請求が棄却される実際の理由—‘医学的助言への不服従’—は多くの健康保険証書における標準的な免責事項である。’

これは保険業者が、薬理遺伝学検査の内容に対し、その患者の健康にとってその情報が持つ間接的な意味合いより低い関心しか抱かないことを意味している。

5.40 我々は、遺伝検査の結果が保険業者に提供されない場合でも、患者が特殊な薬剤の投与を受けるとはまたはいかなる薬剤投与も受けないという事実は、他の一般的に使用される薬剤が適

切でないことを意味する以上、関連する薬理遺伝学的情報は間接的に公表されるものと考えられる。私的保険の申し込み者は、情報が一般開業医(GP)により医学的既往に基づいて提供されることを承諾している。この情報は現時点の処方も含む。そのような情報は、申し込み者の特殊な DNA 配列の知見として保険業者にとってははるかに有用であることがある。ある個人の医学的既往は薬理遺伝学的情報を間接的に保険業者に提供するという事実は重要である。遺伝学と保険に関する既存の議論において、保険業者が遺伝学的情報を入手しようとするのが認められていないのに家族歴の入手が認められているのは矛盾するのではないかという問題が問われている。遺伝学的情報入手に反対する主張がある以上、提唱された選択肢の一つは家族歴の入手も制限することである。薬理遺伝学の場合、同じ議論は、保険業者は保険を申し込んだ特殊な患者に関する情報を入手してはならないということになる。しかしそのような禁止は私的保険システムの基本的前提と矛盾する。従って、薬理遺伝学的情報の場合、リスクの累積というよりもむしろ共有に重きを置く保険システムに利がある議論を重視するとみなされる。

- 5.41 英国は、掛け金設定における生命保険業者による遺伝学的情報の利用に関して2006年まで期限付き禁止としている(50万ポンドを超える生命保険証書におけるハンチントン舞踏病の検査結果を除く)。この状況が変更される場合、患者は自分にとって大きな価値がある薬理遺伝学検査を、保険が適用されなくなるのではないかと恐れるため、この怖れが真実であれ思い込みであれ、薬理遺伝学検査を受けようという気をそがれる危険性がある。我々は、薬理遺伝学的情報は英国における現時点の期限付き禁止事項に該当すると考え、保険会社が掛け金設定における薬理遺伝学的情報の利用は価値がないと思われると表明していることに注目

している。これらの状況に照らし、我々は期限付き禁止を継続すべきであると勧告する。

脚注

- 7 薬剤代謝に影響する遺伝的変異は環境中有毒物質の体内における処理にも影響する。その結果、これらの遺伝的変異は癌などの疾患の感受性に影響する可能性がある。報告されている一つの例は、発癌物質の代謝不良をもたらす酵素 N-アセチルトランスフェラーゼ 2 の変異がある場合、膀胱癌のリスクがやや上昇することである。この酵素は多くの薬剤代謝にも重要である。Green J ら、(2000)N-アセチルトランスフェラーゼ 2 と膀胱癌: 遺伝子と環境の相互作用のエビデンスに関する概観および考察、*Br J Cancer* 83:412-17
- 11 研究主導者はシェフィールド大学の Dr. Darren Shickle。調査に関するその後の情報は www.shef.ac.uk にて入手可能。いくらか異なる結果が得られた類似の研究は英国郊外の患者 39 例という小規模群の面接により行われた。この調査では、一部の患者が自分の治療に直接的な責任がない医師や看護師が自分の記録を入手することへの懸念を表明した。この調査で面接を受けた患者は全て文書記録に対して電子的医療記録の利用に懸念を示した。(German D と Britten N(1995)医療記録の秘密性: 患者の視点、*Br J Gen Pract* 45:485-8.)
- 13 生命倫理に関するナフィールド会議(1993)遺伝スクリーニング: 倫理的問題(ロンドン: 生命倫理に関するナフィールド会議); ヒト遺伝学諮問委員会(1997)保険にとっての遺伝検査の意味合い(ロンドン: 保健省); 下院の科学技術専門委員会(2001)遺伝と保健、第 5 報告(ブリッジ: The Stationery Office); 人類遺伝学会議(2001)保健における遺伝情報の利用: 人類遺伝学会議の中間勧告。HGC は保健と遺伝学について論じる種々の会議を開催し、関連議事録は <http://www.hgc.gov.uk/topics.htm#ins> で入手できる。2002年7月19日開設。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	出版年	ページ
<u>Udaka T</u> , <u>Torii C</u> , <u>Takahashi D</u> , <u>Mori T</u> , <u>Aramaki M</u> , <u>Kosaki R</u> , <u>Tanigawara Y</u> , <u>Takahashi T</u> , <u>Kosaki K</u> .	Comprehensive screening of the thiopurine methyltransferase polymorphisms by using denaturing high-performance liquid chromatography.	Genetic Testing	印刷中		
<u>Kosaki K</u> , <u>Tamura K</u> , <u>Sato R</u> , <u>Samejima H</u> , <u>Tanigawara Y</u> , <u>Takahashi T</u>	A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethyloclobazam.	Brain Dev	26(8)	2004	530-4.
<u>Soneda S</u> , <u>Fukami M</u> , <u>Fujimoto M</u> , <u>Hasegawa T</u> , <u>Koitabashi Y</u> , <u>Ogata T</u> .	Association of Micropenis with Pro185Ala Polymorphism of the Gene for Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Involved in Dioxin Signaling.	Endocr J	52(1)	2005	83-8
<u>Sasaki G</u> , <u>Ogata T</u> , <u>Ishii T</u> , <u>Kosaki K</u> , <u>Sato S</u> , <u>Homma K</u> , <u>Takahashi T</u> , <u>Hasegawa T</u> , <u>Matsuo N</u>	Micropenis and the 5 α -reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients.	J Clin Endocrinol Metab	88(7)	2003	3431-6
<u>Ishii T</u> , <u>Sasaki G</u> , <u>Hasegawa T</u> , <u>Sato S</u> , <u>Matsuo N</u> , <u>Ogata T</u> .	Testosterone enanthate therapy is effective and independent of SRD5A2 and AR gene polymorphisms in boys with micropenis.	J Urol	172(1)	2004	319-24
<u>Tatami S</u> , <u>Sarashina A</u> , <u>Yamamura N</u> , <u>Igarashi T</u> , <u>Tanigawara Y</u>	Population Pharmacokinetics of an Angiotensin II Receptor Antagonist, Telmisartan, in Healthy Volunteers and Hypertensive Patients.	Drug Metab Pharmacokin	18(3)	2003	203-11
<u>Tatami S</u> , <u>Sarashina A</u> , <u>Yamamura N</u> , <u>Igarashi T</u> , <u>Tanigawara Y</u> .	Relationship between pharmacokinetic parameters and occurrence of adverse events in clinical trials performed in Europe and United States for an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan.	Drug Metab Pharmacokin	19(1)	2004	24-32
<u>Tatami S</u> , <u>Yamamura N</u> , <u>Sarashina A</u> , <u>Yong CL</u> , <u>Igarashi T</u> , <u>Tanigawara Y</u> .	Pharmacokinetic comparison of an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan, in Japanese and western hypertensive patients using population pharmacokinetic method.	Drug Metab Pharmacokin	19(1)	2004	15-23

Yahagi N, Kosaki R, Ito T, Mitsuhashi T, Shimada H, Tomita M, <u>Takahashi T, Kosaki K</u>	Position-specific expression of Hox genes along the gastrointestinal tract.	Congenit Anom	44(1)	2004	18-26
Sasaki G, Ishii T, Sato S, Hoshino K, Morikawa Y, Kodama H, Matsuo N, <u>Takahashi T, Hasegawa T</u>	Multiple polypoid masses in the gastrointestinal tract in patient with Menkes disease on copper-histidinase therapy	Eur J Pediatr	163(12)	2004	745-6
Homma K, Hasegawa T, Masumoto M, Takeshita E, Watanabe K, Chiba H, Kurosawa T, <u>Takahashi T, Matsuo N</u>	Reference values for urinary steroids in Japanese newborn infants: gas chromatography/mass spectrometry in selected ion monitoring.	Endocr J	50(6)	2003	783-92
Fukami M, Horikawa R, Nagai T, Tanaka T, Naiki Y, Sato N, <u>Okuyama T, Nakai H, Soneda S, Tachibana K, Matsuo N, Sato S, Homma K, Nishimura G, Hasegawa T, Ogata T</u>	POR (P450 oxidoreductase) mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients	J Clin Endocrinol Metab	90(1)	2005	414-26
Watanabe M, Sueoka K, Sasagawa I, Nakabayashi A, Yoshimura Y, <u>Ogata T</u>	Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene: implication for the susceptibility to dioxins	Fertil Steril	82 Suppl 3	2004	1067-71
小崎健次郎	【遺伝子診療の現状と方向性】 各遺伝子診療部の取り組み 慶応義塾大学における取り組み	SRL 宝函	28 卷 2 号	2004	66-69
小崎健次郎	【遺伝学はゲノム情報でどう変わるか ポストゲノム時代を展望する】 ゲノム情報と医療 ゲノム情報で医療はどう変わるのか	生物の科学 遺伝	別冊 15 号	2002	158-164
小崎健次郎, 佐藤玲子, 谷川原祐介	【小児薬物療法に関する最近の話題】 安全で効果的な小児薬物療法の展望	小児科	44 卷 9 号	2003	1321-1326
島崎紀子, 森鉄也, 吉原宏樹, 嶋田博之, 小崎健次郎, 高橋孝雄	6MP, MTX による ALL 維持療法における休薬期間と TPMT, MTHFR 多型の関連	日本小児血液学会雑誌	18 卷 4 号	2004	454

小崎健次郎, 田村和代, 佐藤玲子, 谷川原祐介, 高橋孝雄	CYP2C19 変異によるクロバザム活性中間体(N-デスマスチルクロバザム)定常状態血中濃度の変動	脳と発達	36 卷	2004	S171
島崎紀子, 森鉄也, 嶋田博之, 小崎健次郎, 高橋孝雄	メトトレキサート関連肝障害と MTHFR C677T 多型	日本小児科学会雑誌	108 卷 2 号	2004	214
小崎健次郎, 前山克博, 萱谷明則, 百々秀心, 山岸敬幸, 高橋孝雄	CYP2C9*3 ヘテロ接合体患者におけるワーファリン投与尿のメタ解析	日本小児科学会雑誌	108 卷 2 号	2004	183
島崎紀子, 森鉄也, 嶋田博之, 木下明俊, 小崎健次郎, 高橋孝雄	メトトレキサート関連急性毒性と薬物血中濃度・個体差の関連	日本小児血液学会雑誌	17 卷 4 号	2003	239
佐藤玲子, 谷川原祐介	【臨床に活かす PK/PD 薬物の体内動態と薬効・毒性】 抗菌薬の PK/PD	医薬ジャーナル	41 卷 1 号	2005	67-74
古道一樹, 林拓也, 仲澤麻紀, 土橋隆俊, 福島裕之, 山岸敬幸	ワーファリン内服中, 止血困難な鼻出血を呈した CYP2C9*3 ヘテロ保因者	日本小児循環器学会雑誌	20 卷 3 号	2004	253
曾根田瞬, 藤本昌敏, 佐々木理恵, 長谷川奉延, 松尾宣武, 深見真紀, 緒方勤	男児外陰部異常症とダイオキシン アリールハイドロカーボン受容体(AHR)遺伝子と AHR 抑制因子遺伝子多型の相関解析	日本小児科学会雑誌	108 卷 4 号	2004	686
古山順一, 黒木良和, 千代豪昭, 藤田潤, 福嶋義光, 左合治彦, 松原洋一, 奥山虎之	遺伝子医療の基盤整備に関する研究(II)	日本遺伝カウンセリング学会誌	25 卷 1 号	2004	47
三原喜美恵, 田村智英子, 斉藤理恵子, 奥山虎之	国立成育医療センターにおける遺伝カウンセリング	医療	57 卷増刊	2003	69
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	63	2005	403-407

(Genetic Testing, in press)

Comprehensive Screening of the Thiopurine Methyltransferase Polymorphisms

by Using Denaturing High-performance Liquid Chromatography

TORU UDAKA,¹ CHIHARU TORII,¹ DAISUKE TAKAHASHI,¹ TETSUYA MORI,¹

MICHIHIKO ARAMAKI,¹ RIKA KOSAKI,¹ YUSUKE TANIGAWARA,²

TAKAO TAKAHASHI,¹ KENJIRO KOSAKI¹

¹Departments of Pediatrics and ²Pharmacy, Keio University School of Medicine

Running title: DHPLC-BASED SCREENING OF TPMT POLYMORPHISMS

*Correspondence to: Kenjiro Kosaki, M.D., Ph.D., F.A.C.M.G.

Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine,

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.

Tel: +81-3-3353-1211 ext 62368; Fax: +81-3-5379-1978; E-mail:

kkosaki@sc.itc.keio.ac.jp

ABSTRACT

The drug-metabolizing enzyme thiopurine S-methyltransferase (TPMT) catalyzes the S-methylation of thiopurines like 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, and azathiopurine, which are used as immunosuppressants and in the treatment of acute lymphoblastic leukemia and rheumatoid arthritis. TPMT enzymatic activity is a polymorphic trait and poor metabolizers may develop life-threatening bone marrow failure. To avoid such adverse effects, the TPMT enzymatic activity in patients' RBCs is routinely measured prior to thiopurine administration in a limited number of oncology clinics. In the present study, we took advantage of a highly sensitive and specific automated DHPLC technique that not only detects known polymorphic alleles, but also identifies previously uncharacterized sequence variants. We developed a DHPLC-based protocol to analyze the entire coding region and validated the protocol by detecting all 16 previously described variant alleles. We further analyzed the entire coding region of the TPMT gene in 288 control samples collected worldwide and identified two novel amino acid substitutions Arg163Cys (487C>T) and Arg226Gln (677G>A) within exons 7 and 10, respectively. The clinical application of this comprehensive screening system for examining the entire TPMT gene would help to identify patients at risk for bone marrow failure prior to 6-mercaptopurine therapy.

INTRODUCTION

The drug-metabolizing enzyme thiopurine S-methyltransferase (TPMT) (Weinshilboum and Sladek, 1980) catalyzes the S-methylation of thiopurines like 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, and azathiopurine, which are used as immunosuppressants (3) and in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (Lennard et al., 1989) and rheumatoid arthritis. TPMT enzymatic activity is a polymorphic trait (Lennard et al., 1987). One in 300 Caucasians are poor metabolizers of thiopurines, as defined by a low red blood cell [RBC] TPMT activity level (Lennard et al., 1987). Poor metabolizers of thiopurines who exhibit reduced TPMT activities may develop life-threatening bone marrow failure (e.g., pancytopenia) after being treated with standard dosages of thiopurines because of the accumulation of cytotoxic metabolites of thiopurines (McLeod et al., 1993; Schutz et al., 1993). To avoid such adverse effects, the TPMT enzymatic activity in patients' RBCs is routinely measured prior to thiopurine administration in a limited number of oncology clinics (Weinshilboum et al., 1978; McLeod et al., 1995). At present, however, RBC-based enzymatic assays are not commonly applied in clinical settings because the assay protocol is technically demanding and requires rigorous quality control procedures (Armstrong et al., 2004).

The human TPMT locus is relatively polymorphic with 16 known polymorphic alleles, including null and hypomorphic alleles (Krynetski et al., 1995; Szumlanski et

al., 1996; Tai et al., 1996; Otterness et al., 1997; Tai et al., 1997; Loennechen et al., 1998; Otterness et al., 1998; Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Hon et al., 1999; Colombel et al., 2000; Hamdan-Khalil et al., 2003; Schaeffeler et al., 2003; Lindqvist et al., 2004). Most Caucasian poor metabolizers have the TPMT*3A (gene frequency of 3.2-5.7%), TPMT*2 (0.2-0.5%) or TPMT*3C (0.2- 0.8%) allele (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Ameyaw et al., 1999; McLeod et al., 1999). The *3C allele is the most frequent variant allele in Asian and African poor metabolizers. Genotyping results for the *2, *3A, and *3C alleles concord with the results of RBC enzymatic assays (Yates et al., 1997; Coulthard et al., 1998). Therefore, genotyping for the hypomorphic alleles of TPMT is considered promising approach for predicting individual response, potentially replacing the RBC TPMT activity assay (Balis and Adamson, 1999; McLeod et al., 2000). Several methods, including PCR-RFLP, allele-specific PCR (Tai et al., 1996; Yates et al., 1997), pyrosequencing (Lindqvist et al., 2004), and direct sequencing have been used to screen for relatively prevalent polymorphic alleles, including the *2, *3A, and *3C alleles. Schaeffeler et al. demonstrated the usefulness of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of exons 5, 7 and 10 of TPMT to discriminate the *2, *3A, and *3C alleles (Schaeffeler et al., 2001).

Recent studies have identified novel mutant alleles of TPMT in Caucasian and non-Caucasian populations (Krynetski et al., 1995; Szumlanski et al., 1996; Otterness et al., 1997; Otterness et al., 1998; Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Hon et al., 1999; Colombel et al., 2000; Hamdan-Khalil et al., 2003; Schaeffeler et al., 2003; Lindqvist et al., 2004). Therefore, comprehensive screening of the entire coding region is preferable to a limited screening of previously known variant alleles. In the present study, we took advantage of a highly sensitive and specific automated DHPLC technique (Harvey and Sampson, 2004) that not only detects known polymorphic alleles, but also identifies previously uncharacterized sequence variants. The purposes of the present study are threefold. First, we developed a DHPLC-based protocol to analyze the entire coding region. Second, we tested whether the optimized protocol could detect all 16 previously described variant alleles. Lastly, we analyzed the entire coding region of the TPMT gene in 288 control samples collected worldwide and obtained from the DNA Polymorphism Discovery Resource (Collins et al., 1998).

MATERIALS AND METHODS

Site-directed mutagenesis

PCR amplicons containing all previously described polymorphic alleles of TPMT (Krynetski et al., 1995; Szumlanski et al., 1996; Otterness et al., 1997; Otterness et al.,

1998;Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998;Hon et al., 1999 ;Colombel et al., 2000;Hamdan-Khalil et al., 2003;Schaeffeler et al., 2003) were generated using the 'splicing by overlap extension' PCR method (Horton et al., 1990;Horton et al., 1993). Briefly, two segments of a gene were independently amplified by PCR and then fused together in a subsequent reaction. Mutations were introduced into a targeted region using mutant primers containing mismatches in their central region. Because the mutant primers were complementary, the two overlapping fragments could be fused together in a subsequent extension reaction. Two PCR steps were performed to amplify two separate products using appropriate outer and inner mutated primers. PCR conditions for the primary PCR were 30 cycles of 95°C for 30s, 58°C for 30s and 72°C for 60s using outer forward-inner reverse and inner forward-outer reverse primer pairs (Table 1), respectively. Then, PCR products were purified by desalting column (Qiagen). Secondary PCR was performed using the outer forward and outer reverse primers and an appropriate amount of two primary PCR products as a template, using the same conditions as for the primary PCR. The PCR products were purified using a desalting column (Qiagen), sequence-verified, and used as the positive controls for the DHPLC assay (see below).

Study population

The DNA Polymorphism Discovery Resource (Collins et al., 1998), developed by the National Human Genome Research Institute (NHGRI) in collaboration with the National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) and its Human Genetic Cell Repository, contains cell lines and DNA samples from 450 unrelated individuals (120 European-Americans, 120 African-Americans, 60 Mexican-Americans, 30 Native Americans, and 120 Asian-Americans). Since we planned to use a 96-well PCR plate and wanted to utilize a sample number that was a multiple of 96, we analyzed 288 samples selected randomly from the 450 samples (No. 0108-0187, 0189-0396) in the DNA polymorphism discovery resource panel. The study protocol was approved by the local ethics committee.

PCR amplification of the mutagenesis product and genomic DNA

PCR fragments generated by site-directed mutagenesis or genomic DNA from the control individuals were amplified using the primers. The primer sequences and the specific PCR conditions are listed in Table 2. The primers were designed so that the primer pairs used to amplify each exon would have the same cycling conditions. For exons 3, 4 and 5, non-template GC-clamp was added to the primers (Table 2, shown in uppercase) to detect mutations within the higher melting temperature domain. PCRs

were performed in a volume of 20 μ L containing 30 ng of genomic DNA, 10 pmol of forward and reverse primer, 0.2 mM of dNTPs, 0.5 U of Optimase polymerase (Transgenomic), and the buffer supplied by the manufacturer.

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. When analyzing the population control samples, the primer pairs were aliquoted on a 96-well format PCR plate. In this manner, all the exons were amplified simultaneously using a single PCR machine. The PCR products were directly sequenced using the dideoxy sequencing method (BigDye Dideoxy sequencing kit; Applied Biosystems) and an automated sequencer (ABI3100; Applied Biosystems). The sequence-verification primers were the same as the PCR primers.

DHPLC analysis

PCR amplicons from human genomic DNA or PCR amplicons with mutations generated by site-directed mutagenesis were analyzed by DHPLC according to the method developed by Oefner and Underhill (Harvey and Sampson, 2004) using an analysis system purchased from Transgenomic (Omaha, Nebraska). The PCR products were denatured at 95°C for 5min and reannealed by cooling to 25°C with a temperature change of -1.5°C/min. All DHPLC conditions, including the melting temperatures and buffer gradients specific to each PCR amplicon, were determined using melting temperature prediction software (Transgenomic WAVEMAKER). A single temperature condition was used except for exons 3, 4 and 10. Because software predicted these fragments to consist of two different melting temperature domains, two analysis temperatures were needed to scan the entire exon sequence. The samples were applied to a preheated reversed-phase column. The elution gradient was generated by mixing buffer A (0.1 mol/L triethylammonium acetate) and buffer B (0.1 mol/L triethylammonium acetate containing 250 mL/L acetonitrile) in a linear gradient from start to the final %B over a period of 4.5 minutes, as shown in Table 2. Amplicons were then run on the DHPLC at three different temperatures (predicted temperature and 1°C above and 1°C below). When screening the samples, the DHPLC profiles were visually compared with the previously determined profiles of known mutation controls. All the samples with abnormal elution profiles were confirmed to have mutations by direct DNA sequencing.

RESULTS

Optimization of the PCR conditions and DHPLC analysis

The optimized sets of PCR primers are shown in Table 2. All the exons were successfully amplified under a single condition without any artifacts resulting from mispriming or primer-dimer formation (Fig. 1).

Site-directed mutagenesis of known variant alleles and their analysis by DHPLC

PCR amplicons flanking the previously described polymorphic alleles of TPMT were generated using the 'SOE' (splicing by overlap extension) PCR method, and direct sequencing of the mutagenesis products confirmed that the desired mutant fragments had been successfully generated (data not shown). Equimolar quantities of reference wild-type PCR product and mutant PCR product were mixed, re-annealed, and analyzed by DHPLC. Representative DHPLC elution profiles are shown in Fig. 2. The chromatograms of the PCR products generated by site-directed mutagenesis exhibited multiple peaks, whereas those of the PCR products amplified from known wild-type homozygotes exhibited a sharp, single peak. The optimized DHPLC analytic conditions are shown in Table 2.

DHPLC analysis of 288 DNA samples collected worldwide

The genotype distribution is summarized in Table 3. Two novel sequence variants were found within the coding region (Fig. 3): Arg163Cys (487C>T) and Arg226Gln (677G>A) amino acid substitutions within exons 7 and 10, respectively. These sequence variants were only observed once each: one of the 288 individuals from whom a DNA sample was examined was heterozygous for the Arg163Cys (487C>T) variant, whereas another individual was heterozygous for both the newly identified Arg226Gln polymorphism and the previously known Arg115His polymorphism.

DISCUSSION

In the present study, we developed a DHPLC-based method that allows the entire coding region of the TPMT gene to be screened. The ability of the DHPLC-based method to detect all previously described variant alleles supports the notion that the DHPLC protocol described herein is a highly sensitive and specific genotyping method. Furthermore, the identification of two novel polymorphisms, Arg163Cys and Arg226Gln, among 288 control individuals collected world-wide demonstrates the effectiveness of the DHPLC-based TPMT mutation analysis. Whether the new amino acid substitutions result in altered enzymatic activity has yet

to be determined.

Nine of the 288 samples that were examined were found to be from individuals heterozygous for the *8 allele. The *8 allele frequency in this series was 1.4%, which is higher than the previously reported figure. Unfortunately, ethnic information regarding the individual samples in the DNA Polymorphism Discovery Resource is not available because of ethical concerns regarding potential genetic discrimination based on polymorphisms. Thus, we were unable to determine the ethnic origin of the individuals possessing the *8 alleles. Further analysis of ethnically homogeneous panels of control samples is warranted to clarify whether the incidence of the * 8 allele is higher in some ethnic group than in others.

We propose that DHPLC-based screening of the entire TPMT gene may be useful alternative to the RBC-based TPMT assay for assessing the inherent capacity of an individual to metabolize thiopurines. First, DHPLC is a very sensitive mutation detection method (O'Donovan et al., 1998). Second, the DHPLC assay can be performed in a relatively short period of time (10 hours), with minimal human labor. Third, the results of the DHPLC assay are not affected by blood transfusions. In contrast, TPMT activity cannot be reliably determined within 30-60 days after transfusion if a deficient or heterozygous patient has received red blood cell transfusions from a homozygous wild-type individual (Yates et al., 1997). In summary, the clinical application of this comprehensive screening system for examining the entire TPMT gene would help to identify patients at risk for bone marrow failure prior to 6MP therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by a Grant-in-Aid from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science & Technology and the Ministry of Health, Labour and Welfare. We thank Ms. S. Hashii for secretarial assistance.

REFERENCES

- Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH *et al.* Thiopurine methyltransferase alleles in british and ghanaian populations. *Hum Mol Genet* 8:367-370, 1999.
- Armstrong VW, Shipkova M, von Ahnen N *et al.* Analytic aspects of monitoring therapy with thiopurine medications. *Ther Drug Monit* 26:220-226, 2004.
- Balis FM and Adamson PC. Application of pharmacogenetics to optimization of mercaptopurine dosing. *J Natl Cancer Inst* 91:1983-1985, 1999.
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 8:1229-1231, 1998.

- Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H *et al.* Genotypic analysis of thiopurine s-methyltransferase in patients with crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 118:1025-1030, 2000.
- Coulthard SA, Howell C, Robson J *et al.* The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* 92:2856-2862, 1998.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ *et al.* 'touchdown' pcr to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19:4008, 1991.
- Hamdan-Khalil R, Allorge D, Lo-Guidice JM *et al.* In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine s-methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 309:1005-1010, 2003.
- Harvey JF and Sampson JR. Mutation scanning for the clinical laboratory: Dhplc. *Methods Mol Med* 92:45-66, 2004.
- Hon YY, Fessing MY, Pui CH *et al.* Polymorphism of the thiopurine s-methyltransferase gene in african-americans. *Hum Mol Genet* 8:371-376, 1999.
- Horton RM, Cai ZL, Ho SN *et al.* Gene splicing by overlap extension: Tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8:528-535, 1990.
- Horton RM, Ho SN, Pullen JK *et al.* Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol* 217:270-279, 1993.
- Krynetski EY, Krynetskaia NF, Yanishevski Y *et al.* Methylation of mercaptopurine, thioguanine, and their nucleotide metabolites by heterologously expressed human thiopurine s-methyltransferase. *Mol Pharmacol* 47:1141-1147, 1995.
- Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS *et al.* Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: Correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 41:18-25, 1987.
- Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: Relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 46:149-154, 1989.
- Lindqvist M, Haglund S, Almer S *et al.* Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics* 14:261-265, 2004.
- Loennechen T, Yates CR, Fessing MY *et al.* Isolation of a human thiopurine s-methyltransferase (tpmt) complementary 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* 64:46-51, 1998.
- McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV *et al.* Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic

- leukemia. *Leukemia* 14:567-572, 2000.
- McLeod HL, Miller DR, Evans WE. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet* 341:1151, 1993.
- McLeod HL, Pritchard SC, Githang'a J *et al.* Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Evidence for allele specificity in caucasian and kenyan individuals. *Pharmacogenetics* 9:773-776, 1999.
- McLeod HL, Relling MV, Liu Q *et al.* Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85:1897-1902, 1995.
- O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC *et al.* Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 52:44-49, 1998.
- Otterness D, Szumlanski C, Lennard L *et al.* Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 62:60-73, 1997.
- Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC *et al.* Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J Clin Invest* 101:1036-1044, 1998.
- Schaeffeler E, Lang T, Zanger UM *et al.* High-throughput genotyping of thiopurine s-methyltransferase by denaturing hplc. *Clin Chem* 47:548-555, 2001.
- Schaeffeler E, Stanulla M, Greil J *et al.* A novel tpmt missense mutation associated with tpmt deficiency in a 5-year-old boy with ALL. *Leukemia* 17:1422-1424, 2003.
- Schutz E, Gummert J, Mohr F *et al.* Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet* 341:436, 1993.
- Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine s-methyltransferase gene (tpmt) in a european population. *Br J Pharmacol* 125:879-887, 1998.
- Szumlanski C, Otterness D, Her C *et al.* Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 15:17-30, 1996.
- Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG *et al.* Enhanced proteolysis of thiopurine s-methyltransferase (tpmt) encoded by mutant alleles in humans (tpmt*3a, tpmt*2): Mechanisms for the genetic polymorphism of tpmt activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6444-6449, 1997.
- Tai HL, Krynetski EY, Yates CR *et al.* Thiopurine s-methyltransferase deficiency: Two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in caucasians. *Am J Hum Genet* 58:694-702, 1996.