

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 ghanaiian populations. *Hum Mol Genet* 8:367-370, 1999.
- Armstrong VW, Shipkova M, von Ahsen 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.

- Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: Radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 85:323-333, 1978.
- Weinshilboum RM and Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 32:651-662, 1980.
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T *et al.* Molecular diagnosis of thiopurine *s*-methyltransferase deficiency: Genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 126:608-614, 1997.

FIGURE LEGENDS

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

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

Fig. 3. DHPLC elution profiles and sequencing chromatograms of heterozygotes for novel TPMT variants identified in the present study. (A) Arg163Cys substitution caused by a nucleotide substitution 487C>T in exon 7. The column temperatures were at 55.8 °C.

(B) Arg226Gln substitution caused by a nucleotide substitution 677C>A in exon 10. The column temperatures were at 55.2 °C. WT: wildtype homozygote.

Table 1 PCR primer sequences for site-directed mutagenesis of known TPMT polymorphisms

Known polymorphism	Outer forward primer ^{*1}	Inner reverse primer sequence (5'-3') ^{*1}	Inner forward primer sequence (5'-3') ^{*2}	Outer reverse primer ^{*1}
1A>G	3F	CCATCCACAGTTTCAGAGACACCT	CAAAGGTGCTCTGAAACTGTGGGA	3R
83A>T	3F	CTTGGCATACTCCAGAGTTAGTA	TACTAACTCTGGAAAGTATGGCAAG	3R
146T>C	4F	GTATCTAAATGCTTCTTTGATAGCCCTGAAGAGG	CCTCTTCAGGCTATCAAAAGAAAGCAITTTAGATAC	4R
238G>C	5F	CGGCTGGAAACCCTGCATAAAAATCATAAC	GTATGATTTTATGCAGGTTTCCAGACCCG	5R
292G>T	5F	GCTCTGTAAAAAATAATTGTTATCCC	GGGATACAATAAATTTTTTACAGAGC	5R
374C>T	6F	AAATGTTCCCCAAAGAACTCTGT	ACAGAGTCTTTGGGGAAACATTT	6R
395G>A	6F	TCAAAAATACTGCAATAGTACAATGA	TCATTTCTACTATTGACAGTATTTTTGA	6R
430G>C	7F	GTCAAATTTGGGAATATTTGTCCTACC	GGTAGGACAAATATTTGGCAAATTTGAC	7R
460G>A	7F	GCAAATAATGTTCTCTATCCCAAATC	GATTTGGGATAGAGGAAACATTAGTTGC	7R
IVS7-1G>A	8F	GAAAAATTTGTTATCTGCATAGTTACAA	TTGTA A CTATGCAGATACAAATGTTTTTC	8R
539A>T	8F	CACAGGAGAAACTGAAACTTCTTTCCC	GGGAAAGAAGTTTCAGTTTCTCTCTGTG	8R
IVS9-1G>A	10F	TTGCATATTTTACTTTGAAACAAGA	TCITTTTCAAGTAAATAATATGCAA	10R
644G>A	10F	CTCAAAGACAATGTATATTTGCATATTT	AAATATGCAATATACATTTGTTCTTGAG	10R
681T>G	10F	CCAACTTTTCTGTCGTTCTTCAA	TTGAAGAACCGACAGAAAAAGTTGG	10R
719A>G	10F	GTAGACATAACITTTTCAAAAAGACAGTCAATTTCCC	GGGGAATTGACTGCTCTTTTGGAAAAGTTATCTCTAC	10R

*1 See Table 2 for primer sequence

*2 Underlined nucleotide shows mismatch position

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

Exon	Primer sequence (5'-3') *1	PCR annealing temperature (°C)	DHPLC temperature (°C)	DHPLC Gradient (%B*/ 4.5 min)
3	3F GGGCCCGCCCGCCCGCCGCGgaagacatagtctgtgaga	Touchdown*2	54.7	54-63
	3R tgtgaagaattaaatgcatcc	63-58	59.1	50-59
4	4F taaacctttttttctcttc	Touchdown	56.2	49-58
4R	GCCCGCCCGCCCGCCCGGttcatcattaagcaagataattctg	63-58	57.8	48-57
5	5F tctgtttcctgcatgtctt	Touchdown	57.0	53-62
5R	GCCGCCCCCGCCCGCGgtgctaataaggaaacctcg	63-58		
6	6F ctggcccttctccttgac	Touchdown	56.4	54-63
6R	cccatagttgggagctaacc	63-58		
7	7F aaacgcagacgtagatcct	Touchdown	55.8	54-63
7R	gccttacccccaggctctctg	63-58		
8	8F tggaccaattcccagcttag	Touchdown	56.5	55-64
8R	agaaaaaaaccccccaact	63-58		
9	9F aacatgccacatcatcact	Touchdown	56.4	53-62
9R	eggatctgcccccttg	63-58		
10	10F ccaccataccagctcattt	Touchdown	53.3	57-66
10R	ctctaaaaacatgctagtgga	63-58	55.2	56-65

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

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

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

Table 3. TPMT genotype among 288 control individuals

Genotype	Exon with polymorphism	Nucleotide substitution	Amino acid Substitution	No. of Subject
*1/*1	N.A.	N.A.	N.A.	240
*1/*1S	5	339C>T	Silent	1
*1/*1S	7	474T>C	Silent	4
*1S/*1S	7	474T>C	Silent	14
*1/*2	5	238G>C	Ala80Pro	1
*1S/*3A	7	460G>A,	Ala154Thr	2
	7	474T>C	Silent	
	10	719A>G	Tyr240Cys	
*3A/*3A	7	460G>A	Ala154Thr	1
	10	719A>G	Tyr240Cys	
*1/*3C	10	719A>G	Tyr240Cys	14
*1/*8	10	644G>A	Arg215His	9
Novel 1/*8	7	487C>T	Arg163Cys	1
	10	644G>A	Arg215His	
Novel 2/*1	10	677G>A	Arg226Gln	1

N.A.: Not applicable

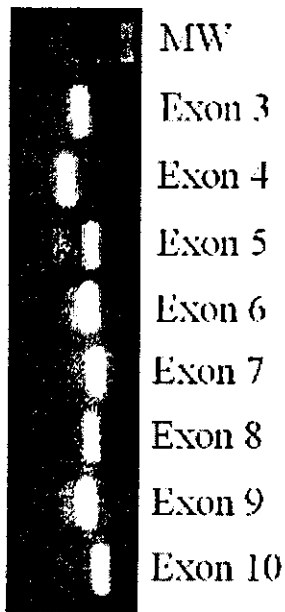


Fig. 1

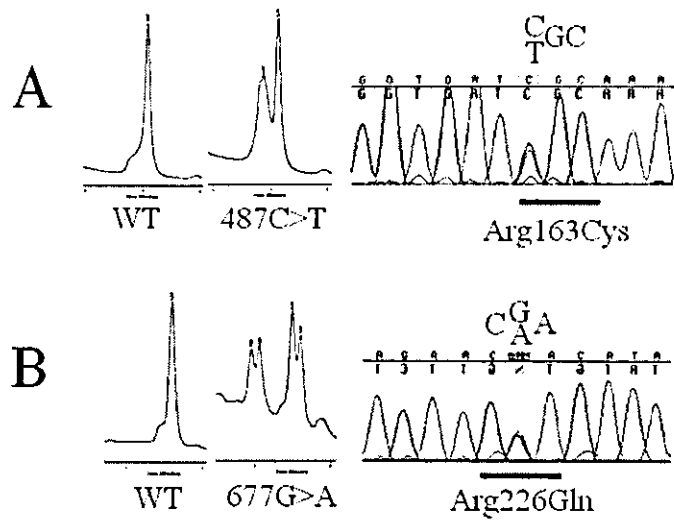


Fig. 3

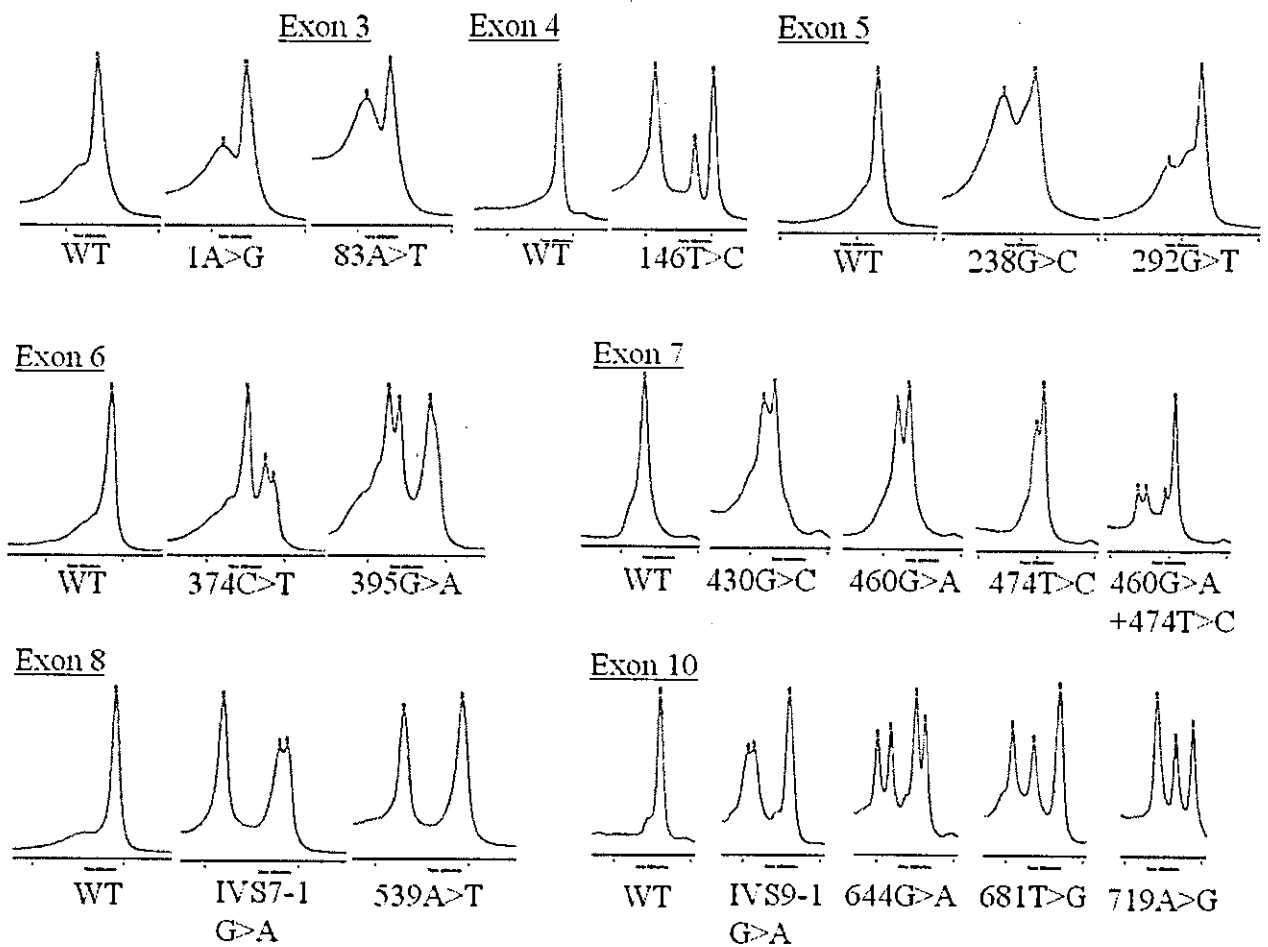


Fig. 2

(資料)

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 若手医師・協力者活用等に要する研究チーム)

薬理遺伝学検査用マイクロプレートの最適化
山岸 敬幸 (慶應義塾大学医学部 専任講師)

研究要旨 薬物代謝酵素の遺伝子検査を、臨床応用するためには、迅速・正確・低コストに、遺伝子検査を実施しうるシステムを構築する必要があるが、現在、使用されているRFLP法や直接シーケンシング法はこれらの要件を満たしていない。本研究では、TPMT 遺伝子多型検査を診療に応用するために熱変性高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)を用いて、高感度・高効率・低コストな遺伝子診断プロトコルを策定した。DHPLC法による検査手法は、遺伝子上に存在する既知の多型のみならず、非常に頻度の低い多型や未知の多型を解析することが可能である。本研究では、DHPLC法による遺伝子検査に於いて用いる「COPPER (Condition-Oriented-PCR primer-Embedded-Reactor) Plate」の作成について報告する。これは遺伝子上の多岐にわたる範囲を対象として迅速な検査を行うため、また数多くのサンプルに対応するために我々が考案したものである。

研究協力者

小崎健次郎 慶應義塾大学医学部小児科 助教授
西田 光宏 慶應義塾大学医学部小児科 医師

A.目的

薬物代謝酵素の遺伝子検査を、臨床応用するためには、迅速・正確・低コストに、遺伝子検査を実施しうるシステムを構築する必要がある。遺伝子多型の解析法には、直接シーケンシングする方法とスクリーニング後にシーケンシングする方法がある。またスクリーニングにも SSCP(single strand conformation polymorphism)など電気泳動に基づくものや、ASO (allele specific oligonucleotide)、heteroduplex などハイブリダイゼーションに基づくものなど、原理が異なる方法が数多くある。また heteroduplex 解析後の検出法として DHPLC (Denaturing High Performance liquid Chromatography)、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)、TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)とといった方法がある。

DHPLCはイオンペア逆層クロマトグラフィーの原

理に基づくヘテロデュプレックス法の変法で、DNAを親水・疎水基を併せもつトリエチルアンモニウムと結合させた後に、カラムに吸着させアセトニトリルの濃度勾配をかけることで極性の変化により溶出させ、DNA断片の分離およびホモ2本鎖(homoduplex)とヘテロ2本鎖(heteroduplex)の分離を行う手法である(Fig1)。DHPLC法は、その原理から非常に高感度にPCR増幅産物中の変異を検出することが可能である。

本研究ではDHPLC機器(Transgenomic社Wave system®)を用い、臨床応用可能な遺伝子検査体制を整備することを目的とし、「Copper (Condition-Oriented-PCR primer Embedded Reactor) Plate」を作成した。

Copper Plateは

1. 解析する遺伝子の解析対象範囲すべてを増幅できるプライマーが96Well Plate 1枚に納められている
2. 全エクソンのPCR同条件増幅が可能
3. 増幅産物はプレートのままDHPLCで解析

などの特徴を持ち、遺伝子上の多岐にわたる範囲を対象として迅速な検査を行うため、また数

多くのサンプルに対応するために我々が考案したものである。

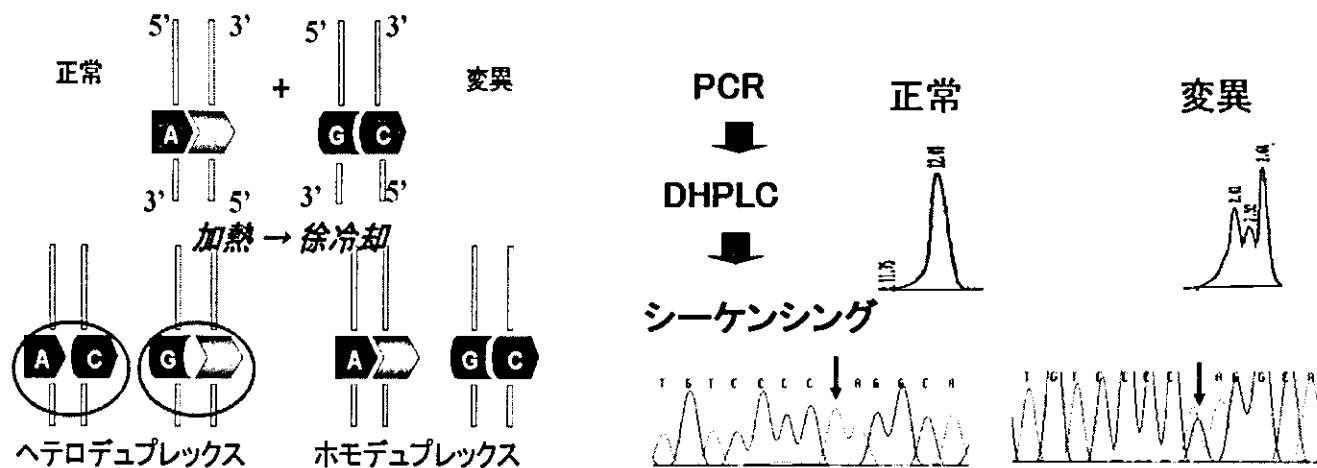


Fig1. Denaturing High Performance liquid Chromatography: Best separation of homoduplex and heteroduplex can be achieved at a specific column oven temperature and with an optimal acetonitrile gradient.

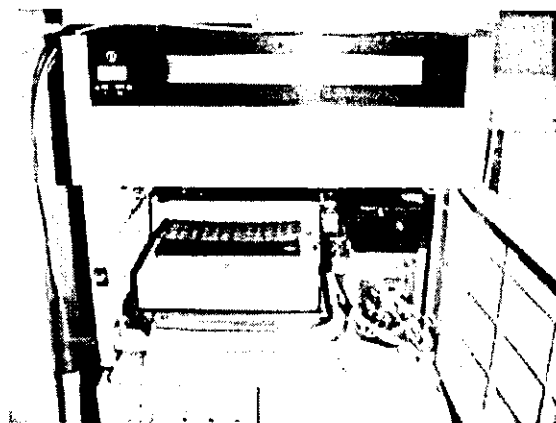


Fig2. DHPLC Transgenomic co Wave system®

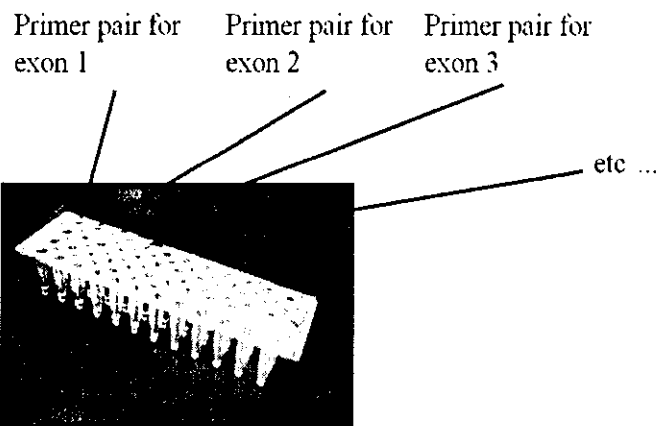


Fig. 3. We shall refer to the 96-well plate with primer pairs and the corresponding computer file as the COPPER plate, "Condition-Oriented-PCR primer-Embedded-Reactor"

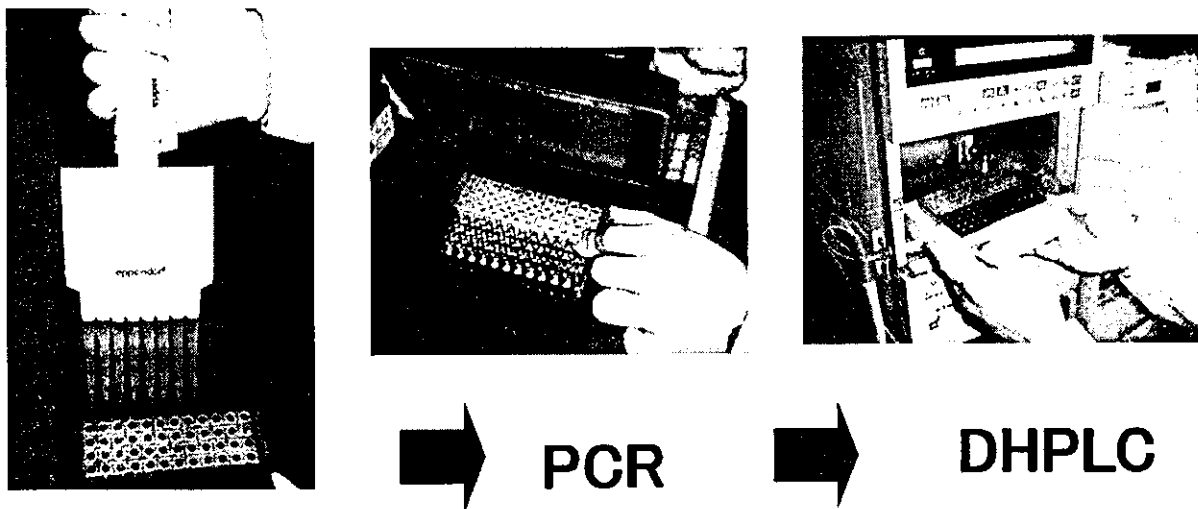


Fig4. DHPLC 解析の流れ

B.方法

薬物代謝遺伝子に属する、エクソン内すべての翻訳領域数に対する PCR 正逆プライマーを合成し、精製、濃度調整の後マイクロプレートウェルへ分注し、それを乾燥することによって、遺伝子検査用マイクロプレートを作成した。

1. 合成

DNA シンセサイザーを稼働させ、表 1：プロダクトデータにおける Oligo Name, Sequence で規定されるプライマーを合成した。DNA シンセサイザーはβ-シアノエチルホスホロアミダイト法に基く全自動機で Dr. Oligo BLP-192 (Biolytic Lab Performance, Inc. U.S.A) を用いた。β-シアノエチルホスホロアミダイト法では、塩基が付加されるごとの遊離トリチル基を定量することによって、結合効率をもとめることができる。表 2：合成モニターに塩基の伸張度に応じて、結合効率変動する模様を示している。このデータによれば、合成は順調であり、良い生産を予見させる。原料として通称アミダイト (Transgenomics, Ltd.

U.S.A) , CPG Universal (BioSearch Technologies, Inc. U.S.A)などが用いられた。

2. 精製と収量測定

合成後のプライマーを OPC カラムカートリッジで精製し、キャブラリー電気泳動法で純度を測定したところ、いずれも 85%以上のものが得られた。精製品を乾燥後、収量測定のため、分光機で 260nm 吸光度 (ABS) を測り、それから O.D, 収量 nmol などを算出した。

この間の ABS, O.D, 収量 nmol などのデータを表 1 に収めている。

以上にある OPC カラムカートリッジ精製、収量測定などのプロトコル、キャブラリー電気泳動装置、分光機などの使用機器を下に記す：

1 OPC カラムカートリッジ精製プロトコル

使用機器：吸引マニホールドシステム ((株) ジーエルサイエンス、埼玉県)

カードリッジ：Sep-Pak Cartridges (Waters Corporation, USA)

手順：カードリッジをアセトニトリル 3 ml で洗淨

0.1 M TEAA (triethylammonium acetate) 1 ml で洗淨

2 M TEAA 1 ml で洗淨

合成したオリゴの重層 (2 回行う)

10%アンモニア水 5 ml で洗淨

純水 5 ml で洗淨

2% TFA (trifluoro acetic acid) 1 ml を入れて、5 分間放置

0.1M TEAA 2 ml で洗淨

純水 5 ml で洗淨

10% アセトニトリル・水 溶液 400 μ l で溶出

遠心濃縮器で乾燥

2 収量測定プロトコル

使用機器：Ultramak マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, USA)

手順：乾燥したものを、50 μ l の純水によく溶かす

96 ウェルプレートに純水 198 μ l を入れて、プレートリーダーでブランクを測定

サンプル 2 μ l を取り、ABS を三回測定し、平均を求める(希釈倍率 100)

測定した ABS より、OD を算出

OD 算出用計算式

$$((\text{ABS} \times 6.9116) + 0.0204) \div 4 \times \text{希釈倍率}(100) \times \text{液量}(0.05 \text{ ml})$$

3 キャプラリー電気泳動装置

P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter, Inc. USA)

4. 分光機

Ultramak マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, USA)

3. 濃度調整

収量 nmol が定まったが、これを純水何 μ l で希釈すれば、100 μ M 濃度にする事ができるかは計算で出すことができる。それを表 1 の「100 μ M 濃度のために必要な純水 μ l」に示している。この方法で各プライマーとも同じ 100 μ M 濃度の液をつくる事ができる。

4. マイクロプレートへの分注

100 μ M 濃度に調整された各プライマー液の 10 倍希釈液の間で、正逆プライマー等量を合わせ、その混合液を自動分注機により、マイクロプレートウエルの指定場所へ 2 μ l 分注した。マイクロプレートは Eppendorftwin.tec PCR plate 96 (Eppendorf AG, Germany) 自動分注機は Biomek 2000 (Beckman Coulter, Inc. USA)、マイクロプレートウエルの指定場所は図 1 : 15 プライマーのマイクロプレートへの配置に示した。

5. 乾燥

マイクロプレートウエルに分注された各プライマーは室温放置4時間で乾燥できる。これを粘着フィルムでシールして、PTPN11 検査用マイクロプレートとした。これを5枚作成した。

分注されたプライマー量は微量であり、乾燥後に剥がれ落ちることが懸念される。分注後にマイクロプレートを遠心機にかけながら乾燥し、粘着性のないキャップをはめたものも試みに作成した。

C. 結論

Copper Plate システムでは、全てのエキソンは個々に最適化された方法によって分析される。そのため一度オペレーターがプレートをセットして、解析対象遺伝子に特有の分析プログラムを開始すれば、以降の解析はほぼ自動化される。臨床応用が有望視される薬剤代謝遺伝子の迅速なスクリーニングに向け、Copper Plate システムによる分析プログラムをセッティングしていく必要がある。

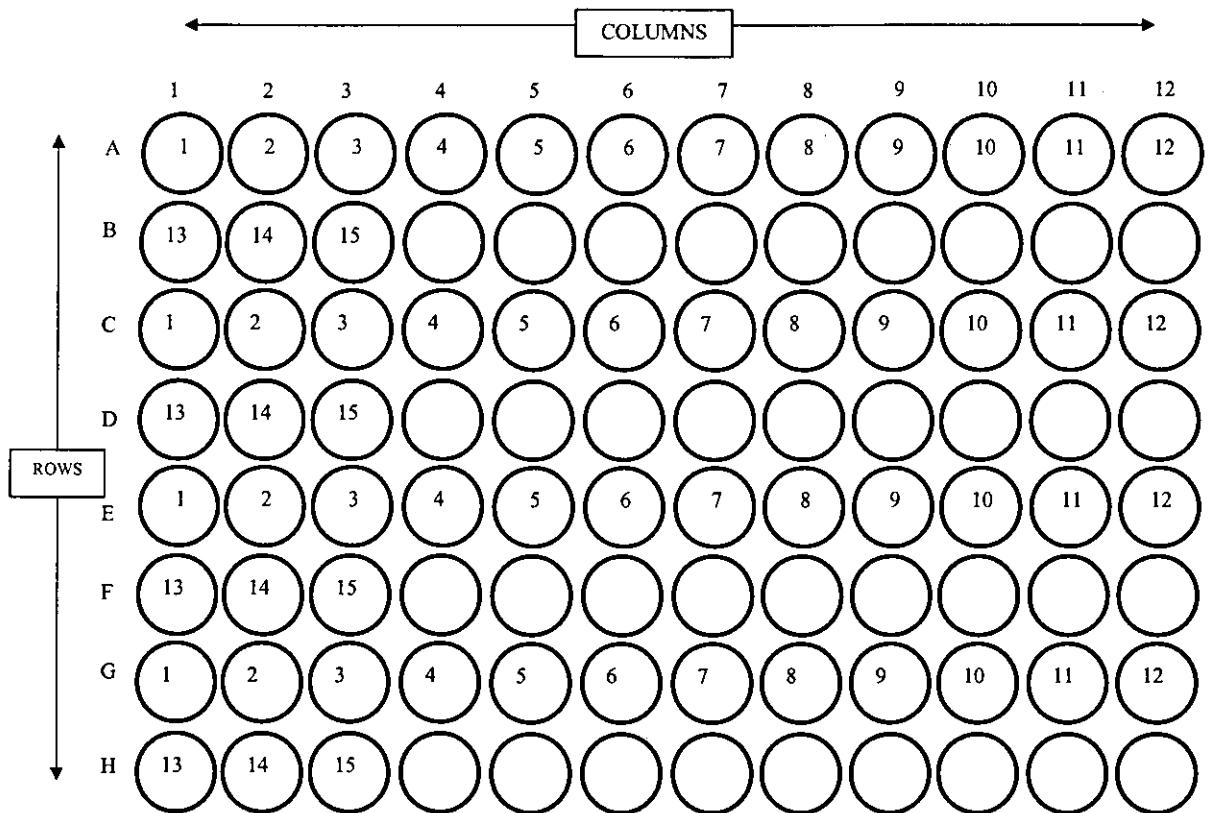
表1:プロダクトデータ

Product No.	Oligo Name	Sequence	A	T	C	G	Length	MW	Tm C	精製	ABS	OD	収量nmol	100uM濃度のため に必要な純水量
P088102	H07	CGGAGCCTGAGCAAGGAG	5	1	4	8	18	5599	66.3	opc	0.771	6.7	31.9	319
P088103	F09	GGAGGCAGGAATGAATGG	7	2	1	9	19	5991	64.3	opc	0.689	6.0	25.0	250
P088104	G04	ACTCTGCTCATAATGCGTCTTAGCTG	5	9	7	5	26	7912	67.3	opc	1.104	9.6	35.3	353
P088105	D06	GAAATGCAGGCAGCAAGCTATCC	8	3	6	6	23	7067	69.6	opc	1.068	9.3	34.8	348
P088106	C07	CTTGCCCTCCCTTCCAAATGGAC	3	7	9	3	22	6597	69.6	opc	0.944	8.2	38.4	384
P088107	D07	GCAATTTCTGACACTCAGGGCAC	5	5	7	5	22	6695	68.1	opc	0.962	8.3	35.6	356
P088108	H03	GAAAGAACAACATGAACCCATAGTAGAGC	14	3	6	6	29	8946	67.2	opc	1.238	10.7	29.9	299
P088109	B06	CACCCAAAGGTAACATCTTGCCAG	8	4	8	4	24	7291	69.1	opc	1.097	9.5	35.6	356
P088110	E06	CTGCACCCAGCCTATTATCTGTC	4	7	9	3	23	6911	65.6	opc	1.048	9.1	39.7	397
P088111	F02	CTACCTCTGTATGTTTGCANAATCTCTATTAGG	8	14	7	5	34	10373	67.4	opc	1.371	11.9	32.7	327
P088112	F06	GCATTAACACCCGTTTTCTGTAAT	6	9	5	3	23	6989	60.6	opc	1.047	9.1	36.6	366
P088113	001	GTTTCAAGTCTCTCAGGTCCAAATTC	5	9	8	4	26	7872	67.7	opc	1.227	10.6	39.9	399
P088114	F04	CCTTAAAGAAGTAATGCTGATCCAGGC	9	6	6	6	27	8292	68.1	opc	1.150	10.0	32.2	322
P088115	B07	CCCTGAGGAAAGGTACAGAGG	7	2	4	8	21	6529	63.8	opc	0.818	7.1	28.4	284
P088116	C07	CCCTGAGGAAAGGTACAGAGG	5	4	3	9	21	6551	61.6	opc	0.910	7.9	32.6	326
P088117	G02	GACTAGGCTGGGAGTAACCTG	15	7	7	5	34	10436	70.1	opc	1.429	12.4	30.4	304
P088118	B04	GCTAGAAATTTAGGAAGAAAATCCTTCAAACACC	6	11	8	4	29	8794	67.9	opc	1.233	10.7	35.5	355
P088119	B05	CAGTGTTTTCTGACCATACATTTCTAGCC	7	7	7	5	26	7930	69.1	opc	0.941	8.2	28.8	288
P088120	C04	CATGGCCAAATCTGACATGCTGATAC	5	12	5	7	29	8905	71.8	opc	1.282	11.1	36.2	362
P088121	002	GCCATTTTCCATGTTGGTGTATTAAGC	9	9	7	5	30	9165	66.2	opc	1.038	9.0	27.1	271
P088122	E07	GTTTCAACAATGTACCAGTACTGCTTAAACTG	4	6	6	6	22	6726	66.7	opc	0.972	8.4	36.3	363
P088123	F05	GCTTAGAACCCGGTGATTCCTC	8	5	3	9	25	7795	62.2	opc	1.251	10.8	36.5	365
P088124	D07	CTACAGTTAAAGAGCTAGGAGTGGG	5	4	8	4	21	6351	67.0	opc	0.931	8.1	36.6	366
P088125	F07	GCTGACTCCAAAGCCCTATGC	4	6	7	5	22	6686	68.0	opc	1.052	9.1	40.0	400
P088126	C05	CCCAGACTGTTTTCTGAGCAC	6	8	6	6	26	7961	65.1	opc	1.208	10.5	37.2	372
P088127	E07	GTCCTGAGTCCACTAAAAGTTGTGC	6	3	6	6	21	6440	65.5	opc	0.935	8.1	34.5	345
P088128	D04	AGCGTATCCAAGAGCCCTAGC	7	9	8	4	28	8499	67.1	opc	1.182	10.2	34.4	344
P088129	G06	GTCAAATGTATCAGTATCTCAACCCGTC	7	4	6	6	23	7058	67.6	opc	1.089	9.4	36.3	363
P088130	D05	CACAGTGAAGGCATGTGCTAC	8	6	6	6	26	7979	68.7	opc	1.085	9.4	32.0	320
P088131	E04	CCATATCTGGTCCCAAGAAATGTAG	8	8	9	3	28	8468	73.0	opc	1.118	9.7	32.3	323
P088131	E04	CTAAACATTTCCCAATTTGCCTGTC	8	8	9	3	28	8468	73.0	opc	1.118	9.7	32.3	323

表2:合成モーター(各塩基目における塩基結合効率)

DMT	Product column	Plate	5塩基目	10塩基目	15塩基目	17塩基目	18塩基目	19塩基目	20塩基目	21塩基目	22塩基目	23塩基目	24塩基目	25塩基目	26塩基目	27塩基目	28塩基目	29塩基目	33塩基目	34塩基目
	0 P088086	3	29	97.4	99.7	100.3	99.9	100	100	100	100	99.3	99.6	99.5						
	0 P088087	C06	65	97.9	100	99.9	99	99.9	99.9	99.9	100.2	100.2	99.6	99.5						
	0 P088088	E05	65	97.9	100	99.9	99	99.9	99.9	99.9	100.2	100.2	99.6	99.5						
	0 P088089		29																	
	0 P088090	G06	62	99.3	99.7	99.2	100.1	99.3	100.2	100.2	99.8	99.9	100.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088091	D02	65	98.2	100.2	100.5	98.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088092	F08	62	98.8	100.3	99	100.2	100	99.7	99.8	99.8	99.9	100.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088093	H06	62	100.9	98.1	99	99.8	100.2	99.5	100.3	100.3	99.9	100.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088094	G08	62	99.5	99.9	99	100	100.8	99.4	100.3	100.3	99.9	100.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088095	B09	62	98.6	100.3	99.8	99.7	99.9	99.7	99.7	99.8	99.9	100.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088096	C09	62	98.6	100	99.3	100.7	99.1	99.7	100	100	100.2	99.4	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	2 P088097	G05	65	98.4	101	97.8	99.3	100	100	100	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088098	D09	62	99.8	99.6	99	100	99.8	99.6	100	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	1 P088099	G07	65	101.5	99.1	98.4	100.6	100.6	99.6	100	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088100	E09	62	100	99	100.1	99.2	100.1	99.8	100	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088101	B07	65	98.1	99.8	99.8	99.6	100	100	100	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088102	H07	65	99.2	99.2	99.2	98.8	98.8	99.8	100	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	1 P088103	F09	62	99.4	100.2	98.2	100.8	99.8	99.8	100	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	1 P088104	G04	65	98	99.1	100.9	98.4	100	100	100	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088105	D06	65	97.8	99.5	99.7	99.7	99.9	99.9	99.9	100.3	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088106	C07	65	98.4	100	100.2	99.6	99.8	99.8	99.8	100.3	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088107	D07	65	98.8	99.4	98.8	100.7	99.6	99.6	99.6	100.2	99.4	99.6	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088108	H03	65	99.4	99.3	100.1	99.2	100.3	100.3	100.2	100.2	99.4	99.4	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	3.1 P088109	B06	65	97	100.2	100.5	99	99	100	100	100.2	99.4	99.4	99.3	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088110	E06	65	99.3	99.5	100.3	98.8	100.2	100.2	100.2	100.2	99.2	99.2	99.2	100.6	99.4	100	100.2	99.5	100.4
	0 P088111	F02	65	99.2	100	99.8	99.7	100.1	100.1	100.1	100.1	99.9	98.5	101.3	99	100.3	99.2	99.6	100.6	99.8
	0 P088112	F06	65	98.5	99.3	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	100.4	100.4	99.5	101.3	99	100.3	99.2	99.6	100.6	99.8
	0 P088113		36																	
	0 P088114	F04	65	98.7	98.7	100	99.2	99.9	99.9	99.9	101	101	99.2	99.8	99.8	100.2				
	0 P088115	B07	62	99.2	99.6	99.4	99.8	100.6	99.4	99.8	99.9	101	99.2	99.8	99.8	100.2				
	0 P088116	C07	62	99.4	99.5	99.6	101.2	99.2	99.2	100.6	100.3	100.3	100.8	99.8	99.6	99.7	101	99.1	100.6	
	0 P088117	G02	65	99	98.7	99.7	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	100	99.3	100.8	99.8	99.7	101	98.5		
	0 P088118	B04	65	98	99.8	99.9	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	100.2	100.3	99.2	99.9	99.7	101	98.5		
	0 P088119	B05	65	96.9	100.4	99.6	100.3	98.9	99.9	99.9	100	99.8	99.4	99.4	99.9	99.8	99.8	99.8		
	0 P088120	C04	65	97.9	99.9	100.5	99	100.2	100.2	100.2	99.8	99.8	100.9	98.8	100.5	99.5	99.8	99.8		
	0 P088121		36																	
	0 P088122	E07	65	98.8	100.1	99.5	98.6	100	100	100	100	99.9	99.5	99.7						
	0 P088123	F05	65	99.1	99.8	100.3	98.9	100.1	100.1	100.1	99.9	99.9	99.5	99.7						
	0 P088124	D07	62	99.4	99.4	99.1	100.3	100.7	99.6	99.9	99.9	99.9	99.5	99.7						
	0 P088125	F07	65	99.3	98.5	100.3	99	100	100	100	100	99.8	100.9	99	100.1					
	0 P088126	C05	65	98.4	100.4	100.4	99	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100.9	99	100.1					
	0 P088127	E07	62	99.6	99.8	99.9	99.4	99.7	99.3	100	99.9	99.9	100.9	99.4	99.7	99.9	99.6			
	0 P088128	D04	65	97.7	99.9	99.9	99.1	99.9	99.9	99.9	99.9	100.2	100.6	99.4	99.7	99.9	99.6			
	0 P088129	G06	65	98.9	99.2	100.2	99.4	100	100	100	100	101.6	100.8	98	101.1					
	2 P088130	D05	65	97.6	100.3	99.4	100.3	99.8	99.8	99.8	99.8	100.3	100.8	98	101.1					
	0 P088131	E04	65	98.3	99.2	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	101.2	99.1	101.1	98.5	100			

図1：15プライマーのマイクロプレートへの配置



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
Udaka T, Torii C, Takahashi D, Mori T, Aramaki M, Kosaki R, Tanigawara Y, Takahashi T, Kosaki K.	Comprehensive screening of the thiopurine methyltransferase polymorphisms by using denaturing high-performance liquid chromatography.	Genetic Testing	印刷中		
Kosaki K, Tamura K, Sato R, Samejima H, Tanigawara Y, Takahashi T	A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethyliclobazam.	Brain Dev	26(8)	2004	530-4.
Tatami S, Sarashina A, Yamamura N, Igarashi T, Tanigawara Y.	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 Pharmacokinet	19(1)	2004	24-32
Tatami S, Yamamura N, Sarashina A, Yong CL, Igarashi T, Tanigawara Y.	Pharmacokinetic comparison of an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan, in Japanese and western hypertensive patients using population pharmacokinetic method.	Drug Metab Pharmacokinet	19(1)	2004	15-23
Yahagi N, Kosaki R, Ito T, Mitsuhashi T, Shimada H, Tomita M, Takahashi T, Kosaki K	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, Takahashi T, Hasegawa T	Multiple polypoid masses in the gastrointestinal tract in patient with Menkes disease on copper-histidininate therapy	Eur J Pediatr	163(12)	2004	745-6
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 巻 2 号	2004	66-69
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業期間と TPMT, MTHFR 多型の関連	日本小児血液学会雑誌	18 巻 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-デスマメチルクロバザム)定常状態血中濃度の変動	脳と発達	36 卷	2004	SI71
島崎紀子, 森鉄也, 鳴田博之, 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, 菅谷明則, 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ファリン投与量のメタ解析	日本小児科学会雑誌	108 卷 2 号	2004	183
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

慶應義塾大学医学部小児科
若手医師・協力者活用等に要する研究チーム
構成員名簿

慶應義塾大学医学部小児科
若手医師・協力者等に要する研究チーム構成員名簿

	若手医師及び臨床研究 協力者に対する指導者	若手医師	臨床研究協力者
--	--------------------------	------	---------

(a組)

	小崎 健次郎	荒巻 道彦	鮫島 葉月
分担する研究項目	総括・人類遺伝学・ 遺伝薬理学	薬物代謝酵素のハプロタ イプ構造の決定	薬物代謝酵素のハプロ タイプ構造の決定

(b組)

	谷川原 祐介	田村 和代	佐藤 玲子
分担する研究項目	母集団薬物動態学	母集団薬物動態学	母集団薬物動態学

(c組)

	高橋 孝雄	泉 幸佑・西田 光宏	鳥居 千春
分担する研究項目	遺伝子多型と薬理効果の 関連 (抗てんかん薬・抗 腫瘍薬)	遺伝子多型と薬理効果の 関連 (抗てんかん薬・抗 腫瘍薬)	薬物代謝酵素のハプロタ イプ構造の決定

(d組)

	山岸 敬幸	山岸 千尋	高橋 大輔
分担する研究項目	遺伝子多型と薬理効果の 関連 (抗凝固薬)	遺伝子多型と薬理効果の 関連 (抗凝固薬)	薬物代謝酵素のハプロタ イプ構造の決定