

- 25) Saito M., Matsufuji H., Chino M., Hyashi M., Honma M., and Yamagata K. : Antioxidant activity and potential genotoxicity of flavonoid by using human lymphoblastoid TK6 cells. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)
- 26) Arai S., Saito M., Takashima Y., Honma M., and Kojima H. : A new trial for in vitro Comet assay using 3-dimensional human epidermal model. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)
- 27) Kimura A., Sakamoto H., Hayashi M., Saigo K., Tokado H., and Honma M. : Establishment of a robust in vitro Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)
- 28) Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Honma M. : Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)
- 29) Suzuki T., Koizumi T., Prabha D., Luan Y., Honma M., Hamada S., Nakajima M., Watanabe T., and Furihata C. : Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput qPCR analysis by TaqMan low density array. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)
- 30) Honma M. : Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)
- 31) Nohmi, T. Development of bacteria genotoxicity assays: past, present and future perspective, VIII Congresso Brasileiro de Mutagenese Carcinogenese e Teratogenese Ambiental (SBMCTA 2007), in Angra dos Reis, Brazil (October 2007)
- 32) Nohmi, T. The role of Y-family DNA polymerase in oxidative mutagenesis, 38<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA, October 2007.
- 33) Totsuka, Y., Nishigaki, R., Takamura-Enya, T., Nohmi, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Formation of RNA adduct with a novel endogenous mutagen and carcinogen, aminophenylnorharman, 38<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA, October 2007.
- 34) 大西真理子, 大森雅子, 魏民, 増村健一, 能美健彦, 鰐淵英機, 福島昭治, Existence of thresholds for carcinogenicity and in vivo mutagenicity of 1,4-dioxane in liver of rats, 第66回日本癌学会学術総会 (2007, 10)
- 35) Honma M. : Genomic instability caused through breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8<sup>th</sup> International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007, 10)
- 36) Suzuki T., Luan Y., Prabha D., Kogi M., Honma M., Koizumi T., Tanabe S., Sato Y., Suzuki K., and Yamaguchi T. : CGH and SNP arrays; as new tools for detailed analysis of chromosome. The 8<sup>th</sup> International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007, 10)
- 37) Honma M. : The new ICH guideline on Genotoxicity. 2007 Korean National Institute of Toxicological Research International Symposium (2007, 10)
- 38) Honma M. : Validation of a humanized in vitro genotoxicity test system. 2007 Korean NTP Workshop (2007, 10)
- 39) Nohmi, T. DNA repair as a constituent of thresholds of genotoxicity, 37<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society, Basel, Switzerland, September 2007.
- 40) Honma M., Takashima Y., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H.,

- Sugimoto K., and Hayashi M.: Tracing Micronuclei by Fluorescent Live Cell Imaging Analysis. 37<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society (2007, 9)
- 41) 山田雅巳, 日高勝彦, 紙谷浩之, 益谷央豪, 原島秀吉, 花岡 文雄, 能美健彦、ヒトDNAポリメラーゼ $\eta$ が酸化dNTPを取り込むことで誘発される突然変異の特異性について、日本遺伝学会第79回大会 (2007, 9)
- 42) Nohmi, T. Validity of in vivo genotoxicology, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, in Tokyo, Japan, August 2007.
- 43) Honma M.: Genotoxic assessment of drug metabolite and ICH guideline. Chinese National Conference on Drug Toxicology 2007 (2007, 8)
- 44) Honma M.: A multi-endpoints in vitro genotoxicity test system consisting of Comet, micronuclei, and gene mutation assays. 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007, 8)
- 45) Honma M.: DNA double strand breaks inducing genomic instability in human cells. 13<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (2007, 7)
- 46) Yatagai F., Suzuki M., Ishioka N., Ohmori H., and Honma M.: Repair of dsb at a specific site of chromosome: influence of low-dose/low-dose-rate gamma-rays. 13<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (2007. 7)
- 47) Ono, T., Okudaira, N., Uehara, Y., Matsumoto, T., Oghiso, Y., Tanaka, K., Ichinohe, K., Nakamura, S., Tanaka, S., Kagawa, N., Fujikawa, K., Ootsuyama, A., Norimura, T. and Nohmi, T. Dose and dose rate dependency in radiation-induced mutation in liver and spleen of gpt-delta mice, 13th International Congress of Radiation Research (ICRP) in San Francisco, USA, July 2007.
- 48) 本間正充: 代謝物の遺伝毒性評価 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 (2007. 6)
- 49) 黒岩有一、山田雅巳、松井恵子、増村健一、岡村俊也、田崎雅子、梅村隆志、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄、アスコルビン酸と亜硝酸ナトリウム複合影響による変異原性ならびにラット前胃発がんイニシエーション作用の検索、第34回日本トキシコロジー学会学術年会 (2007, 6)
- 50) Nohmi, T. Asbestos and other environmental toxic chemicals, The 5<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations in Antalya, Turkey, May 2007.
- 51) Nohmi, T. Roles of Y-family DNA polymerases in mutagenesis via the misincorporation of oxidized dNTPs, The 3<sup>rd</sup> Japan US DNA repair meeting in Sendai, Japan, May 2007.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## ファーマコゲノミクス情報に基づいた医薬品の有効性及び安全性評価系の開発と医薬品開発への応用

所属 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部  
研究者 黒瀬 光一

研究要旨 有用多型の同定及び詳細な解析のためのインビトロ機能解析の対象として選定した4種の薬物代謝酵素につき、野生型及び変異型酵素の発現系を構築した。また、多くの医薬品の薬物動態に関与する2種の薬物トランスポーターの有用多型につき、タイピング系を開発した。加えて、薬物代謝酵素に関する有用多型の一覧を作成した。一方、網羅的遺伝子多型解析の基盤整備を行い、抗うつ薬 SSRI の副作用と関連のある SNP 候補を見出した。また、候補遺伝子多型解析を行い、SSRI の薬剤反応性に影響を及ぼす多型を見出した。

### 分担研究者

- 1)国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 斎藤嘉朗
- 2)第一化学薬品(株) 診断薬研究所 森 篤雄
- 3)田辺三菱製薬(株) 薬物動態研究所 丹羽 卓朗
- 4)ファイザー(株) 中央研究所 岩崎 一秀
- 5)大阪大学大学院 薬学研究科 東 純一
- 6)岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 埴岡 伸光
- 7)関西医科大学 精神神経科 奥川 学
- 8)明治製菓(株) 医薬総合研究所 平塚 一幸
- 9)薬効ゲノム情報(株) 伊藤 継孝

### A. 研究目的

医薬品の薬効及び副作用の発現等、薬物応答性に関しては、個人差や人種差のあることがよく知られている。この「差」は、薬物動態関連および薬効・副作用関連分子(以下、薬物応答性分子)の遺伝子多型に基づく機能の差異に起因し、それにより薬物体内動態や受容体の量的・質的变化がもたらされることが、近年明らかになってきた。本研究では、まず薬物動態関連分子の機能変化を引き起こし得る比較的頻度の高い多型について、その機能影響を、基質特異性を含めて評価し、医薬品開発において考慮すべき重要多型を明らかにし一覧を作成する。さらにこれらに関しては、臨床試験における評価が可能となるよう迅速タイピング系をあわせて開発する。他方、遺伝子の違いに起因する個人差を幅広く検索するためには、対象遺伝子を限定せず、ゲノム網羅的に調べることも必要であると考えられる。そこで、近年投与患者が増加している向精神薬を例として、薬物動態関連分子の遺伝子多型に加えて、全ゲノムに渡り網羅的に多型解析し、薬効や副作用の発現と相関する薬物応答性分子の遺伝子多型を事象発症群

と対照群、有効例と無効例とで比較・解析して、その有用性を検討する。また、PGx 臨床試験の実施に必要な支援・評価システムも併せて構築する。

今年度は、1) 有用多型の同定及び詳細な解析のためのインビトロ機能解析の対象として、多くの医薬品の代謝に関与する CYP3A4 及び CYP2C9 を選定し、野生型及び変異型酵素を大量発現した。また第一相酵素と第二相酵素との相互作用モデルとして、CYP2D6 と UGT1A9 の共発現系の構築を試みた。2) 多くの医薬品の薬物動態に関与する薬物トランスポーター MRP2 をコードする *ABCC2* 遺伝子及び *OATP1B1* をコードする *SLCO1B1* 遺伝子のハプロタイプタグ多型につき、タイピング系の開発を行った。3) シトクロム P450 (CYP) 及び UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 等の薬物代謝酵素に関して、機能変化を有する多型の一覧を作成した。4) 網羅的遺伝子多型解析の為の基盤整備を行った。5) 向精神薬 SSRI (serotonin selective reuptake inhibitor) を服用し、嘔気の副作用が発生したうつ病患者(ケース群)と発生しなかった患者(コントロール群)について、ケース・コントロール研究による網羅的 SNP 関連解析(全ゲノム関連解析)を行った。6) 抗うつ薬の有効性・安全性に影響を及ぼすと考えられる候補遺伝子多型の解析を行った。

### B. 研究方法

#### ①遺伝子多型のインビトロ機能解析

##### 1) CYP3A4 及び CYP2C9 多型の機能解析

組換えバキュロウイルスは、ヒト野生型 *CYP3A4*、*CYP3A4\*11* (Thr363Met)、\*16 (Thr185Ser)、\*18 (Leu293Pro) または野生型 *CYP2C9*、*CYP2C9\*26* (Thr130Arg)、\*28 (Gln214Leu) cDNA を polyhedrin プ

ロモーター下に、ヒト NADPH-P450 還元酵素 (OR) cDNA を p10 プロモーター下に連結した Bacmid DNA を有し、 $2.5 \times 10^7$  pfu/ml 以上のウイルス価を示した。OR のみを発現する組換えバキュロウイルスも同様に調製した。宿主細胞種である Sf21 細胞にウイルスストックを感染させ、24 時間後にクエン酸鉄と  $\delta$ -アミノレブリン酸を加え、さらに 48 時間培養し、細胞を回収後、ミクロソーム画分の調製を行った。

還元型 CO 差スペクトルの測定は定法に従い、CYP 含量を算出した。OR の活性としては、シトクロム C の還元活性を測定した。CYP3A4 または CYP2C9 アポ蛋白及び OR 蛋白の発現は、イムノブロット法により確認した。酵素活性は、P450-Glo™ CYP450 Assay System (Promega 社) を用いて添付のマニュアルに従い定量した。

また来年度の本格的な解析のため、CYP3A4 の基質であるパクリタキセル (PTX) 及びアトルバスタチン (AST) 測定の条件検討及び予備的解析を行った。調製したヒト CYP3A4 野生型 (CYP3A4wt) および OR をバキュロウイルスに導入し昆虫細胞

(Sf21) で発現・調製したミクロソーム、CYP3A4\*16 および OR を同様に発現・調製したミクロソーム、バキュロウイルスを感染していない Sf21 細胞より調製したミクロソームを用いた。PTX の濃度は 1-20  $\mu$ M、AST の濃度は 5-120  $\mu$ M、P450 濃度は 10 pmol/mL (0.09-0.10 mg protein/mL) とし、CYP3A4wt および CYP3A4\*16 にはチトクローム b5 精製蛋白を 80 pmol/mL 添加した。37°C で 5 分間プレインキュベートした後、NADPH 産生系を添加して反応を開始した。37°C で 10 分間 (PTX) または 5 分間 (AST) 反応後、反応液中の代謝物を LC/MS/MS にて定量した。

## 2) 第一相及び第二相酵素の共発現系構築と機能解析

### a) CYP2D6 及び UGT1A9 発現プラスミドの作製

すでに 5' 及び 3' 末端に HindIII 認識配列並びに開始コドンの上流に酵母コンセンサス配列が挿入されている pBluescript-SK(±)/CYP2D6 プラスミドより、インサート DNA を調製した。次に、CYP2D6 cDNA を pYES2/CT ベクターの HindIII 切断部位にライゲーションし、*E. coli* DH5 $\alpha$  を形質転換した (pYES2/CYP2D6)。

ヒト UGT1A9 cDNA のクローニングはヒト肝全 RNA からの RT-PCR 法により行った。なお、センス及びアンチセンスプライマーの 5' 末端には HindIII 認識配列を付加した。また、センスプライマーには酵母コンセンサス配列を付加した。PCR 産物を精製後、pGEM-T vector へサブクローニングした。プラ

スミド中の UGT1A9 cDNA 配列を確認し、HindIII で完全消化し、UGT1A9cDNA 断片を pYES3/CT にライゲーションし、大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した (pYES3/UGT1A9)。

### b) CYP2D6-UGT1A9 酵素の共発現

pYES2/CYP2D6 プラスミドを酵母細胞 *S. cerevisiae* INVSc1 にトランスフェクションし、CYP2D6 導入酵母の安定株 (INVSc1/CYP2D6) を作製した。次に、この安定株を用いて pYES3/UGT1A9 をトランスフェクションした。順次、培養容量を上げて、選択培地 2000 mL より酵母細胞のミクロソーム画分を調製した。ネガティブコントロールとして pYES2/CT vector のみで INVSc1 を形質転換したものを同様に作製した (mock)。

### c) 共発現酵素の分析

CYP2D6 及び UGT1A9 蛋白の発現は、イムノブロット法により確認した。NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (OR) 活性は、シトクロム C を基質にして、その還元活性を算出した。ブフラロールに対する 1-水酸化活性は、Hanioka らの方法 (Hanioka et al., *Drug Metab. Dispos.*, 30: 391-396 (2002)) に準じて測定した。4-トリフルオロメチル-7-ヒドロキシマリリンに対するグルクロン酸抱合活性は、Jinno らの方法 (Jinno et al., *Drug Metab. Dispos.*, 31: 528-532 (2003)) に準じて測定した。

## ②有用遺伝子多型のタイピング系開発

薬物トランスポーターの多剤耐性関連タンパク質 2(MRP2)をコードする *ABCC2* 遺伝子に関して、日本人のハプロタイプ構造につき、さらにグループ分けを行い、頻度約 0.01 以上のグループハプロタイプのタグ多型 7 種を選定した。今回のタイピング系開発では、これら-1774delG, -24C>T, 1249G>A (Val417Ile), 1457C>T (Thr486Ile), 2366C>T (Ser789Phe), 2934G>A (Ser978Ser)及び 3972C>T (Ile1324Ile)を対象にしたが、-24C>T 多型を解析する際に、隣接する-23G>A 多型も同時に検出されるため、本多型も解析した。

また肝臓に発現し抗がん剤イリノテカンの活性代謝物 SN-38 や高脂血症治療薬プラバスタチン等の肝取り込みに関与することが報告されている薬物トランスポーター-OATP1B1 をコードする *SLCO1B1* 遺伝子に関して、日本人で機能低下を示す\*15 及び\*17 ハプロタイプのタグとなる多型、-11187G>A, 388A>G, 521T>C の 3 多型及び活性変化が推定される 1738C>T を対象とした。

まず各多型部位を含む断片をゲノム DNA (25ng、日本人樹立細胞株由来) より特異的に PCR 増幅した。この際、それぞれのプライマーのいずれか一方は、ビオチンラベルしたものをを用いた。PCR 産物をスト

レプトアビジンのビーズと結合させ、スクリーンプレート上に移した。アルカリ処理することにより1本鎖化し、さらに洗浄後、シーケンシングプライマーを10 pmol 分加え、95°Cで2 分間処理した後、室温まで冷却し、シーケンシングプライマーとPCR産物をハイブリダイズさせた。これをPSQ™96MA (Biotage AB)及びPSQ 96 SNP reagent kit (Biotage AB)を用いてミニシーケンシング反応を行い、塩基配列を解読することにより多型を解析した。

### ③有用遺伝子多型の一覧作成 (薬物代謝酵素)

国立医薬品食品衛生研究所で解析し公表した結果に加えて、文献検索を行い、日本人を含む東アジア人で比較的頻度が高く、インビトロ・インビボの解析結果につき2 報以上論文が出ているなど、活性影響に対する評価が定まっていると判断された多型を中心にまとめた。

### ④抗うつ薬の有効性・安全性に影響を及ぼすと考えられる候補遺伝子多型の解析

候補遺伝子としてドパミン D2 受容体(DRD2)遺伝子、p-糖蛋白をコードしているMDR1 遺伝子を対象とした。DRD2 遺伝子多型として、Taq1A (intronX) 及び-141C Ins/Del を解析対象とした。投与薬剤別 [paroxetine (PAR)または fluvoxamine (FLV)] に、遺伝子多型と抗うつ効果との関連を検討した。

### ⑤副作用 (嘔気) の有無を指標とした SSRI 服用患者の網羅的遺伝子多型関連解析

#### 1) 網羅的遺伝子多型 (SNP) 解析の為の試料

本研究開始前に、分担研究者 (大阪大学 東 純一、関西医科大学 奥川学) らによって集積されたSSRI (フルボキサミンあるいはパロキセチン) 服用患者の既存 DNA 試料 100 検体の提供を大阪大学より受け、本年度はこのうちの48 検体を解析に用いた。なお、これら検体の集積は、大阪大学及び関西医科大学の倫理委員会の承認を得て実施されたものであり、大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学分野において保管・管理されていた検体である。

#### 2) ゲノム網羅的 SNP ジェノタイプピング

Affymetrix 社の GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array を用いて、26 万 SNPs の genotyping を Affymetrix 社が作成したプロトコールに従って行った。使用した機器は、GeneChip® Fluidics Station 450、GeneChip® Hybridization Oven 640、GeneChip® Scanner 3000 7G で、機器の制御には GeneChip® Operating Software (GCOS) 1.4 client を、遺伝子型の決定には GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE) 4.1 を用いた。ジェノタイプコーリングア

ルゴリズムとして BRLMM を採用した。

### 3) 全ゲノム関連解析

GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array から得られた遺伝子多型に関するデータは、統計計算ソフトウェア R および関連解析ソフトウェア GQuest (株) スタージェン) および遺伝統計研究デザインソフトウェア GDesignPlus (株) スタージェン) を用いて解析を行った。

### ⑥PGx 臨床試験のための支援・評価システムの構築

大阪圏の医療機関(精神神経科等)に協力を求め、SSRI や SNRI の服薬で副作用が発症したうつ病患者の血液試料を収集し、副作用を発症しなかったうつ病患者の血液試料と比較し、網羅的に遺伝子多型を解析するため、副作用を発症した患者の血液試料を医療機関から多数収集するシステムを外部の医療機関支援機関 SMO の協力を得て構築する。さらに、得られた患者の診療情報・遺伝子多型の統合データベースを作成し、これを用いて薬物応答性との関連解析を実施する。

### ⑦倫理面への配慮

「①遺伝子多型のインビトロ機能解析」研究は、既知の遺伝子多型に関するインビトロ機能解析のため、倫理面での問題は生じないと考えられる。

「②遺伝子多型のタイピング系開発」は、公的バンクより購入した日本人由来樹立細胞株のゲノム DNA を用いた研究である。従って、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象とはならないと考えられる。

「③有用多型の一覧作成」は、既発表資料を対象とする文献調査であるため、倫理面での問題は生じないと考えられる。

「④抗うつ薬の有効性・安全性に影響を及ぼすと考えられる候補遺伝子多型の解析」および「⑤副作用 (嘔気) の有無を指標とした SSRI 服用患者の網羅的遺伝子多型関連解析」については、研究全般を通じて「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、また、各研究実施機関毎に研究目的、研究内容等の倫理的、科学的妥当性について研究倫理審査委員会より適正な審査を受け、実施の承認を得た上で行った。その際は試料提供者に一切の不利益、危険性を伴わないよう配慮し、また、人権に十分考慮し、この点を含めたインフォームドコンセントを得た上で試料を採取すると共に、患者の個人情報が発漏することのないように、適切な匿名化を行った。

「⑥PGx 臨床試験のための支援・評価システムの構築」に関しては、現在、倫理承認申請準備中であ

る。

## C. 研究結果

### ①遺伝子多型のインビトロ機能解析

#### 1) CYP3A4 及び CYP2C9 多型の機能解析

##### a) CYP3A4

野生型、\*11 型、\*16 型または\*18 型の CYP3A4 と OR の cDNA を含む共発現用組換えバキュロウィルスを 72 時間感染させ、昆虫細胞よりマイクロソーム画分を調製した。P450 発現量は野生型、\*11 型及び\*18 型が 100 pmol P450/mg protein 程度であり、\*16 型が 140 pmol P450/mg protein 程度であった。OR 活性は野生型、変異型及び OR 単独発現系ともに、約 500 nmol/min/mg protein であった。さらに Glo assay により発現した酵素蛋白質が活性を有するか否かを解析したところ、野生型及び 3 種の変異型酵素全てで活性が認められたため、目的とする CYP3A4 分子が発現され、酵素活性を有することが明らかとなった。

PTX は CYP3A4 により 3'-p ヒドロキシパクリタキセル (3'-p-OH PTX) に代謝される。CYP3A4wt および CYP3A4\*16 の代謝反応の結果、3' -p-OH PTX の生成を認めた。1 ロットのみの予備的な結果であるが、CYP3A4\*16 において、 $K_m$  値の増加、 $V_{max}$  値および  $V_{max}/K_m$  値の減少を認めた。

AST は CYP3A4 により 2-ヒドロキシアトルバスタチン (2-OH AST) および 4-ヒドロキシアトルバスタチン (4-OH AST) に代謝される。CYP3A4wt および CYP3A4\*16 を用いた代謝反応の結果、2-OH AST および 4-OH AST の生成を認めた。1 ロットのみの結果であるが、CYP3A4\*16 において 2 位水酸化では  $K_m$  値の増加および  $V_{max}/K_m$  値の減少、4 位水酸化では  $K_m$  値の増加、 $V_{max}$  値および  $V_{max}/K_m$  値の減少を認めた。

##### b) CYP2C9

まず組換え蛋白質発現時の Sf21 細胞の培養条件 (振とう培養法及び接着培養法) を検討したところ、野生型 CYP2C9 と OR を共発現しているマイクロソーム画分の P450 量は、接着培養法を用いた方が、mg 蛋白あたりの P450 発現量が高かった。さらに、OR 活性についても、接着培養法を用いた場合の方が、振とう培養法を用いた場合より 4 倍以上の高い活性を有しており、またイムノブロット法による解析の結果、OR アポ蛋白の発現レベルは、振とう培養下で非常に低く、組換え蛋白が分解していると考えられた。これらのことから、バキュロウィルス感染時の Sf21 細胞の培養条件としては、接着培養法を選択した。

CYP2C9 野生型または変異型蛋白質を OR と共発現した昆虫細胞マイクロソーム画分を 3 ロット調製し、活性測定用とした。平均の P450 発現量は野生型が 189 pmol P450/mg protein、\*26 型が 167 pmol P450/mg protein、\*28 型が 178 pmol P450/mg protein であった。OR 活性は野生型、\*26、\*28 及び OR 単独発現系ともに、552-738 nmol/min/mg protein の範囲にあった。また、イムノブロット法による解析で、野生型と両変異型は、CYP2C9 アポ蛋白及び OR 蛋白を同程度発現していた。野生型及び変異型の CYP2C9 酵素活性を Glo assay により測定し、野生型及び両変異型は酵素活性を有していることを確認した。 $K_m$  値付近の基質濃度において\*26 型及び\*28 型の酵素活性は、野生型の 10%以下であった (図 1)。

#### 2) 第一相及び第二相酵素の共発現系構築と機能解析

CYP2D6 と UGT1A9 の酵素タンパク質が酵母細胞で共発現されているかを確認するために陰性対照 (mock) 及び CYP2D6-UGT1A9 酵母細胞発現マイクロソームのイムノブロット分析を行った。陰性対照とは異なり、CYP2D6-UGT1A9 酵母細胞発現マイクロソームでは CYP2D6 及び UGT1A9 のタンパク質バンドがそれぞれ検出された。

酵母細胞で発現した CYP2D6-UGT1A9 酵素の機能を解析するためにマイクロソーム画分のブフラロールに対する 1'-水酸化活性 (CYP2D6 活性) 及び 4-トリフルオロメチル-7-ヒドロキシクマリンに対するグルクロン酸抱合活性 (UGT1A9 活性) を測定した。また、酵母細胞の常在性電子伝達系が機能しているかを確認するために OR 活性も測定した。酵母細胞マイクロソームの OR 活性は陰性対照及び CYP2D6-UGT1A9 酵素のいずれにおいても認められ、その活性値はほぼ同程度であった (陰性対照, 0.16 nmol/min/mg protein ; CYP2D6-UGT1A9 酵素, 0.13 nmol/min/mg protein)。ブフラロールに対する 1'-水酸化活性は CYP2D6-UGT1A9 酵素でのみ認められた (1.06 nmol/min/mg protein)。一方、CYP2D6-UGT1A9 酵素の 4-トリフルオロメチル-7-ヒドロキシクマリンに対するグルクロン酸抱合活性は極めて低かった。

#### ②遺伝子多型のタイピング系開発

日本人由来ヒト培養細胞 12 株のゲノム DNA を用いて、開発したパイロシーケンシング法による 11 遺伝子多型のタイピングを試みたところ、*ABCC2* 及び *SLCO1B1* 遺伝子共に、全ての多型・細胞株につき明瞭なタイピング結果が得られた。単一タイピングの例である *ABCC2*-1774delG 及び *ABCC2*

2366C>T (Ser789Phe)の結果を図2に、同時タイピングの例である *ABCC2*-24C>T 及び *ABCC2*-23G>A の結果を図3に示した。なお-24C>T 及び-23G>A で、理論的には9種類の組み合わせが考えられるが、-23G>A の頻度が低いため、図2に示した5種類以外の組み合わせは検出されなかった。

これらパイロシーケンシング法による解析結果は直接シーケンス法による結果と完全に一致したことから、結果は正確であり、今回確立したパイロシーケンシング法によるタイピング系は有用であることが示された。

### ③有用多型の一覧作成 (薬物代謝酵素)

日本人でのみ詳しいゲノム構造の解析がなされている *CYP2D6*、及び中国人でアリル頻度 0.005 と日本人とは頻度が大きく異なる *CDA\*3* の結果は日本人のみの結果を示したが、それ以外の多くの酵素については、中国人及び韓国人のアリル頻度が報告されている場合が多いため、東アジア人としてまとめて掲載した。

### ④抗うつ薬の有効性・安全性に影響を及ぼすと考えられる候補遺伝子多型の解析

パロキセチンが基質となる薬物トランスポーター *MDR1* 遺伝子の *C3435T* 遺伝子多型はパロキセチンの抗うつ効果と関連していることが明らかとなった。またドパミン *D2* 受容体である *DRD2* 遺伝子の *Taq1A* 多型では、*FLV* 服用群において *A1/A1* 群が他の遺伝子型 (*A1/A2*、*A2/A2*) に比べて十分なうつ症状の改善が得られなかった ( $p=0.03$ )。 *PAR* 服用群では、遺伝子型間の奏功率に有意な差は見られなかった。*-141C Ins/Del* 多型では *FLV*、*PAR* 服用群とも臨床効果発現と遺伝子型との間に有意な関連は観察されなかった。

### ⑤副作用 (嘔気) の有無を指標とした SSRI 服用患者の網羅的遺伝子多型関連解析

#### 1) 網羅的 SNP データの品質評価と解析対象とす SNP の選択

SSRI 服用患者のゲノム DNA 48 検体に対して、ゲノム網羅的遺伝子多型解析を行った。測定したデータには、各検体について約 26 万個の SNP データが含まれるが、得られたデータが関連解析を行うに十分な品質を保持しているか、あらかじめ検討する必要がある。そこで、遺伝子多型解析を行った 48 検体のデータについて、測定の質 (精度) および遺伝継承法則への適合性の点からデータ品質を評価した。

#### 1-1) 検体毎の品質評価

検体毎の Call Rate および男性 X 染色体のヘテロ接合度について検討した結果、48 検体全てを関連解析の

対象とすることに問題がないことが判明した。

#### 1-2) 集団における品質評価

##### 1-2-1) マイナーアレル頻度 (MAF)

本研究では、現段階のサンプル数が少ないこともあり、MAF の低いものも含めて検出できるように、事前に MAF の閾値を決めることはせず、全ての検体でホモ接合である SNP (関連解析の対象として不適当な SNP) についてのみ、解析対象から除外することとした。解析の結果、52,293 個の SNPs がホモ接合である事が分かった。

##### 1-2-2) 各 SNP における Call Rate

ある一つの SNP 座位に関して、何らかの遺伝子型の決定がなされた個体の割合を 90%以上と設定した。即ち、 $48 \times 0.9 = 43.2$  なので、少なくとも 44 検体において遺伝子型が決定された SNP のみを解析対象とした。この基準により SNP の数は 13,405 であった。用いた GeneChip は 262,264 個の SNPs を検出対象としているので、約 5%が除外されたことになる。

##### 1-2-3) ハーディー・ワインベルク平衡 (HWE) への適合度の検定

ハーディー・ワインベルク平衡 (HWE) からずれが生じた場合、その原因はデータの誤りである (場合がほとんどである)。そこで、コントロール群 34 検体を用いて各 SNP につきハーディー・ワインベルク平衡 (HWE) を満たしているか否かの検定をフィッシャーの正確確率法を用いて評価し、検定の有意水準をボンフェローニの補正により設定し、満たしていない SNP ( $p$  値が 0.05 以下) を解析対象から除外した。その数は 205 個であり、GeneChip に載っている SNP 総数 262,264 個の 0.078%であった。

##### 1-2-4) 解析対象とした SNP

解析対象とする SNP を選定するための条件 (上記 1-2-1 から 1-2-3 まで) をすべて満たした SNP 座位は最終的に 196,706 となり、これら SNP 多型データを用いて関連解析を行った。

#### 2) 嘔気発生と関連のある SNP の探索

全ゲノム関連解析を行うに当たり、嘔気を発生しなかった 34 検体をコントロール群とした。ケース群はフルボキサミン或いはパロキセチンを服用し、嘔気が発生した全ての患者 (14 例) とした。嘔気発生と SNPs の関連は、優性遺伝モード、劣性遺伝モード、遺伝子型モード、アレル頻度モードのそれぞれのモデルを用いた分割表を作成し、カイ 2 乗検定法およびフィッシャーの正確検定法で解析した。また、遺伝子型の量的違いが表現型に及ぼす影響の傾向性の違いを検討するためのコ克蘭・アーミテージ検定法を用いた検討も行った。各検定法でのタイプ I の誤りの多重性については、検体数が少ないことからボンフェローニの不等式による有意水準の補正や

FDR のコントロールによる有意水準の設定を今回の検定では採用せず、確率点・確率点プロット (log QQ p-value plot) から設定し、関連性の判断を行った。その結果、Allele frequency mode を仮定したフィッシャーの正確検定による P 値の log QQ p-value plot のみ、有意である可能性があるとして判断された SNP が (3 個) 見いだされた (図 4)。SNP A, B, C のオッズ比はそれぞれ、0.0861 (逆数: 11.61), 26.52, 24.00 であった。表 1 に有意であると判定された SNP A, B, C のアレル頻度、オッズ比、染色体番号などをまとめた。

⑥PGx 臨床試験のための支援・評価システムの構築  
SSRI と SNRI 服薬患者で副作用を発症した患者血液試料を収集し、網羅的に遺伝子多型を解析し、副作用予測のための遺伝子マーカーを同定する研究等実施計画書「抗鬱薬の薬物応答性に関する遺伝子マーカーの探索と応用に関する研究」を作成した。また、患者の同意説明文書と同意文書(3 枚綴り)を作成した。本臨床試験を実施する上で、個人情報保護への対応は特に重要である。大阪大学大学院臨床薬効解析学分野に個人情報管理者を置き、患者 ID を設定し、各医療機関でこの ID を用いることにより、連結可能匿名化した血液試料を大阪大学に搬送、遺伝子解析を実施し、さらに、大阪大学から国立衛生研究所に搬送し、網羅的遺伝子解析を実施することとした。SSRI と SNRI の服薬で発生する副作用症例のなかから、本研究において収集する副作用症例を決定し、これに基づいて「診療情報」を作成した。副作用発症患者の血液試料収集方策を検討し、「医師への協力依頼」、「医療機関の先生へ」、「患者様への医療機関説明資料」と「採血手順」を作成した。これを用い、外部の医療機関支援機関 SMO の協力下を実施する体制を構築し、運用を開始し、参加医療機関リストを作成中である。副作用症例患者の診療情報と遺伝子解析データを一元管理することは、関連解析を実施するために必須である。外部に依頼しカスタマイズした症例報告書ソフトを用いて過去の血液試料データの入力を開始した。

## D. 考察

### ①遺伝子多型のインビトロ機能解析

#### 1) CYP3A4 及び CYP2C9 多型の機能解析

インビトロ機能解析系に用いる組換え CYP 酵素の調製には、酵母細胞系、昆虫細胞-バキュロウイルス系、哺乳動物細胞系、大腸菌を用いる系等が広く用いられている。本研究では、肝ミクロソームと等価の P450 活性を示すとされる昆虫細胞-バキュロウイ

ルス系を用いて組換え酵素の発現を行った。宿主細胞の選択、MOI、感染時間の最適化により、CYP3A4 及び CYP2C9 の発現が高レベルで得られた。

CYP3A4 は現在市販されている医薬品の約半数の体内代謝に関わる重要な酵素である。日本人で認められる多型のうち、CYP3A4\*16 は比較的高いアレル頻度 (0.014) で見いだされ、テストステロン水酸化活性につき約 50% の低下を引き起こすことが報告されている。また、\*11 は頻度 0.002 と低いものの、\*16 型酵素以上の活性低下が報告されている。\*18 (頻度 0.028) も一部の基質で活性変化が報告されているため、解析対象とした。本年度調製した野生型及び変異型 CYP3A4 を用いて、これまでに解析したミダゾラム及びカルバマゼピン以外の基質につきインビトロ機能解析を行い、変異型 CYP3A4 における機能変化を詳細に明らかにする予定である。この来年度の解析のため、PTX 及び AST 定量のための条件検討、及び 1 ロットの昆虫細胞発現ミクロソームを用いた予備的検討を行った。野生型酵素と比較して \*16 型酵素の PTX および AST 水酸化活性に対する  $K_m$  値は増加、 $V_{max}$  値あるいは  $V_{max}/K_m$  値は減少した。

CYP2C9 は、抗凝固薬ワーファリンや抗てんかん薬フェニトイン、経口糖尿病薬グリメピリド等の治療域の狭い薬物の代謝に関与する。日本人に認められる多型のうち、CYP2C9\*26 及び CYP2C9\*28 は、ジクロフェナック水酸化活性を野生型の約 20% に低下させることが哺乳動物細胞系で報告されている。昆虫細胞-バキュロウイルス系で発現させた両変異体は、野生型と同等の発現レベルを有することが、CO 差スペクトルによる P450 量及びイムノプロット法により確認されたが、Glo assay において、Luciferin H の代謝活性は、野生型の 10% 以下に低下した。\*26 のアミノ酸置換部位は、OR と P450 の相互作用部位とされる。一方、\*28 のアミノ酸置換部位は、第二基質認識部位の直後 5 アミノ酸目に位置する。従って、数種の基質を用いて、これらの多型の活性影響を検討する予定である。

来年度は複数の基質を用いて機能影響を詳細に解析する予定である。本成果は、薬物の有効性の確保および副作用発現の回避に役立つとともに、多型影響の構造活性相関に関する有用な知見が得られる。これは遺伝子多型に基づく体内代謝の低下による副作用発現を回避するため、医薬品開発時に化合物選択法として利用しうる可能性がある。

#### 2) 第一相及び第二相酵素の共発現系構築と機能解析

医薬品に対する代謝能及び多型影響をインビトロ系で包括的に評価する系を開発することを目的として、CYP2D6 及び UGT1A9 に着目し、これら両酵



素の酵母細胞における共発現系構築を試みた。例えば非選択的交換神経β受容体遮断薬であるプロプラノロールはCYP2D6による酸化反応とUGT1A9によるグルクロン酸抱合反応により段階的に代謝される経路が報告されている。CYP2D6及びUGT1A9を発現した酵母細胞マイクロソームでは、抗ヒトCYP2D6及び抗ヒトUGT1As抗体と免疫交差するバンドが認められ、酵母細胞で共発現していることが確認された。

発現したCYP2D6-UGT1A9の酵素機能を評価するため、それぞれの酵素活性を測定した。CYP2D6活性は以前確立されたpGYR1ベクターを用いた酵母細胞に発現させた時の活性値に近似していた。このことは、本研究で用いたpYES2/CTベクターでもCYP2D6は酵母細胞で発現し、十分な機能を持つことを示唆するものである。一方、CYP2D6-UGT1A9酵素のUGT1A9活性も認められたが、その活性は昆虫細胞系で発現されたUGT1A9酵素の1%以下であった。同様に本発現系を用いて種々のステロイド代謝に関与するUGT2B7及びUGT2B15酵素を発現することを試みたが、酵素活性は全く検出されなかった。一方、UGT1A6酵素では、活性が認められた。これらの原因は不明であるが、UGT酵素は酵母細胞ではタンパク質として発現するが、酵素機能を維持できない分子種もあることが推測された。今後は、この問題点を解決するため、哺乳動物細胞系や昆虫細胞系におけるCYPとUGT酵素の共発現系構築についてさらに検討する必要がある。

## ②有用遺伝子多型のタイピング系開発

ABCC2遺伝子がコードする薬物トランスポーターMRP2は、グルクロン酸等の抱合化合物及び有機アニオンを輸送し、イリノテカン、シスプラチン等の抗がん剤へ耐性を与える。日本人で比較的高頻度のグループハプロタイプを同定するためのタグ多型7種を選定し、これらにつきパイロシーケンシング法によるタイピング系を確立した。使用ゲノム量も比較的少なく、また-24C>Tと-23G>Aのように、近接した複数の多型も同時に解析可能である。対象とした多型の中、-1774delGと-24C>Tでは転写活性の低下が、2366C>T(Ser789Phe)では蛋白質発現レベルの低下及び細胞内局在の変化が報告されている。今回開発したタイピング系は、MRP2が体内動態に関与する薬物のファーマコゲノミクス解析に有用である。

SLCO1B1遺伝子では約20種のハプロタイプが報告されており、このうち、日本人で頻度の高いものは、\*1b(388A>G)、\*15(388A>G,521T>C)、及び\*17(-11187G>A,388A>G,521T>C)の3種であり、特に\*15及び\*17に関しては、機能低下に関する報告が多くなされている。また、最近、塩基置換により終

止コドンとなるため翻訳が途中で終止する多型

(1738C>T(Arg580Stop))が日本人で報告されたため、本多型も対象とした。今回作成したタイピング系は、SLCO1B1遺伝子によりコードされるOATP1B1が輸送に関与するイリノテカン(活性代謝物SN-38)、プラバスタチン、シンバスタチン、ナテグリニド等のファーマコゲノミクス解析に有用と思われる。

## ③有用多型の一覧作成(薬物代謝酵素)

日本人を対象とした我々の解析結果(既発表)を中心に、東アジア人における解析の文献情報を加えて、有用多型の一覧を作成した。今年度対象とした薬物代謝酵素には、多くの医薬品の体内代謝に関与するCYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、UGT1A1等が含まれており、本成果は遺伝子多型情報の医薬品開発への応用及び臨床現場における有効性・安全性確保に有用と思われる。来年度は薬物トランスポーターの有用多型について一覧作成を行う予定である。

## ④抗うつ薬の有効性・安全性に影響を及ぼすと考えられる候補遺伝子多型の解析

DRD2 Taq1A多型のA1アレル保有群ではDRD2の密度が低下すると報告されており、DA神経の反応性の低下をきたす。このため、A1/A1群で十分な抗うつ効果が得られなかったと考えられる。

## ⑤副作用(嘔気)の有無を指標としたSSRI服用患者の網羅的遺伝子多型関連解析

### 1) 網羅的SNPsデータの品質評価

マイナーアレル頻度については、全ての検体でホモ接合となるSNPは今回のデータでは約5.2万個あった。GeneChip® Human Mapping Arrayに用いられている約26万個のSNPsのうち、日本人の場合は約2割がmonomorphicなマーカーである(即ち全ての日本人がホモ接合となる遺伝子多型は26万×0.2=5.2万である)とされている。従って、今回ホモとして選出された数は日本人検体の特性を反映する妥当な結果であると考えられ、測定方法に不具合があるからではないと考えられた。また、48検体を通して1SNP当たりのCall Rateが90%以下のSNPは5%以下であり、HWEに適合しないSNPは0.078%以下であった。これらの結果から、SNPsデータの品質に関しては、関連解析を行うに十分な品質を保持していると考えられる。

### 2) 関連解析

今回の測定で得られた比較的少ない数のデータセット(48検体分:ケース14,コントロール34)を用いて、嘔気の発生と関連するSNPの探索を試験的

に行ったところ、Allele frequency mode を仮定したフィッシャーの正確検定による P 値の log QQ p-value plot (図 4) により、有意である可能性があるとして判断された 3 個の SNP A, B, C が見いだされた。それら A, B, C のオッズ比はそれぞれ、0.0861 (逆数: 11.61), 26.52, 24.00 といずれも 1 から大きな隔たりを示した。しかしながら、現段階の検体数ではオッズ比の信頼区間が非常に大きい (表 1)。従って、今後、検体数を増やし、解析する必要があると考えられる。また、これら 3 つの SNP が真の関連 SNP であると仮定した場合の、コントロール群のサンプルサイズの増加と検出力の関係を解析した結果、現状では SNP A, B, C の検出力はそれぞれ 0.701, 0.4464, 0.3476 であり、十分な検出力を得るためには、やはり、解析する検体数を増やす必要があると考えられる。

#### ⑥PGx 臨床試験のための支援・評価システムの構築

信頼性の高いデータを得るためには多くの副作用発現患者の血液試料を収集しなければならない。これを実現するため、まずは、大阪圏の医療機関(精神神経科等)の協力を求める。医療機関を訪問、あるいは医療機関に資料を郵送することにより、本プロジェクトへの参加協力を得ることとした。医療機関の倫理審査委員会の承認が必要な場合はその対応、医療機関における診療情報の作成、出向いて同意文書の取得、さらには、血液試料を大阪大学に搬送する等に関しては、全面的な支援を行うこととした。今後、これを発展させ、全国的に副作用発症患者の血液試料を収集する体制を構築する必要があると考えている。今後、副作用発現患者の血液試料収集体制の維持、拡大を図ると共に、研究過程で見出される有効性、副作用に関連する薬物応答性遺伝子マーカーを用いた SSRI と SNRI 専用 DNA チップを外部の医療機器企業の協力で作製し、Prospective な臨床試験実施を実施し得る体制 (IP-VPN、生体認証付与) の構築を進める。

#### E. 結論

CYP3A4 及び CYP2C9 多型の機能解析に供するため、昆虫細胞で CYP3A4 (野生型、\*11 型、\*16 型、及び\*18 型) または CYP2C9 (野生型、\*26 型、\*28 型) 酵素を発現した。また CYP3A4 での機能解析のため、PTX 及び AST の定量系を作成し、予備的検討を行った。さらに、医薬品に対する代謝能及び多型影響を包括的に評価する系を開発するため、CYP2D6 及び UGT1A9 に着目し、これら両酵素の酵母細胞における共発現系構築を試みた。薬物トランスポーター ABCC2 及び SLCO1B1 のハプロタイプタグ多型、計 11 種につき、パイロシーケンシング法に

よりタイピング系を開発した。シトクロム P450 及び UDP-グルクロン酸転移酵素等の薬物代謝酵素に関して、機能変化を有する有用多型の一覧を作成した。候補遺伝子多型解析により、DRD2 遺伝子多型が SSRI の薬剤反応性に影響を及ぼすことが示唆された。このことは、DA 神経系の活性調節がうつ病治療に重要な役割を果たす可能性を示唆するものと考えられる。また、MDR1 遺伝子多型についてもパロキセチンの抗うつ効果と関連していることが明らかとなった。副作用の有無を指標とした SSRI 服用患者の網羅的遺伝子多型関連解析のデータ品質については関連解析を行うに十分な品質を保持していることが分かり、測定系については問題がないと考えられた。嘔気の発生と関連する SNP の探索に関しては、Allele frequency mode により候補が 3 個見いだされたが、得られたオッズ比の信頼区間ならびに検出力の値を考えると、今回の検体数では充分と言えないことが分かった。従って、今後、さらに解析検体数を増やす必要があると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hanioka, N., Yamamoto, M., Iwabu, H., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Naito, S., Shimizu, T., Masuda, K., Katsu, T., and Narimatsu, S.: Functional characterization of human and cynomolgus monkey cytochrome P450 2E1 enzymes. *Life Sci.*, 81: 1436-1445 (2007).
- 2) Koue T, Kubo M, Funaki T, Fukuda T, Azuma J, Takaai M, Kayano Y, Hashimoto Y. Nonlinear mixed effects model analysis of the pharmacokinetics of aripiprazole in healthy Japanese males. *Biol Pharm Bull.*, 30: 2154-2158 (2007).
- 3) Kubo M, Koue T, Maune H, Fukuda T, Azuma J. Pharmacokinetics of Aripiprazole, a New Antipsychotic, following Oral Dosing in Healthy Adult Japanese Volunteers: Influence of CYP2D6 Polymorphism. *Drug Metab Pharmacokinet.*, 22: 358-366 (2007).
- 4) Wakeno M, Okugawa G, Takekita Y, Kato M, Fukuda T, Yamashita M, Hosoi Y, Azuma J, Kinoshita T. Delirium associated with paroxetine in an elderly depressive patient: a case report. *Pharmacopsychiatry.* 40: 199-200 (2007).
- 5) Kato M, Fukuda T, Serretti A, Wakeno M, Okugawa G, Ikenaga Y, Hosoi Y, Takekita Y, Mandelli L, Azuma J, Kinoshita T. ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with

major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 32: 398-404 (2008).

- 6) Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Kaniwa N, Kamatani N, Shirao K, Yamamoto N, Hamaguchi T, Kunitoh H, Ohe Y, Tamura T, Yamada Y, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Sawada J: Impact of CYP3A4 haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* in press.
- 7) Sai K, Saito Y, Itoda M, Fukushima-Uesaka H, Nishimaki-Mogami T, Ozawa S, Maekawa K, Kurose K, Kaniwa N, Kawamoto M, Kamatani N, Shirao K, Hamaguchi T, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Yamada Y, Tamura T, Yoshida T, Minami H, Matsumura Y, Ohtsu A, Saijo N, Sawada J: Genetic variations and haplotypes of *ABCC2* encoding MRP2 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Yuka Hosoi, Tsuyoshi Fukuda, Masaki Kato, Masataka Wakeno, Megumi Yamashita, Yoshiteru Takekita, Gaku Okugawa, Toshihiko Kinoshita, Junichi Azuma: Dopamine receptor D2 (DRD2) polymorphism could modulate the clinical response to antidepressant drug SSRI. The 3rd China-Japan Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology, August 23-24, 2007 (Dalian, China)
- 2) 奥川 学：ペロスピロンー統合失調症に対するペロスピロンとリスペリドンの他施設共同無作為割付試験。第17回日本臨床精神神経薬理学会、2007年10月3～5日（大阪）シンポジウム
- 3) Hanioka, N., Takeda, Y., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Naito, S., Shimizu, T., and Narimatsu, S.: Characterization of cynomolgus monkey UGT1A6: comparison with human UGT1A6. 8th International ISSX Meeting, October 9-12, 2007 (Sendai, Japan)
- 4) M. Saeki, K. Kurose, M. Tohkin and R. Hasegawa, Identification of vitamin D receptor response elements in the human MDR1 gene. The 8th International ISSX Meeting, October 9-12, 2007 (Sendai, Japan)
- 5) 長岡憲次郎, 風盛大地, 埴岡伸光, 清水剛文, 内藤真策, 成松鎮雄: カニクイザル UGT2B20 の酵素機能解析。第46回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2007年11月10～11日（高知）
- 6) 細井夕香, 福田剛史, 分野正貴, 奥川学, 加藤正樹, 南畝晋平, 嶽北佳輝, 山下恵実, 鉄尾真司, 木下利彦, 東純一: 抗うつ薬の臨床効果に及ぼす

ADRA2A 及び NET 遺伝子多型の影響。第28回日本臨床薬理学会年会、2007年11月28日～12月1日（宇都宮）

- 7) 前川京子, Tong Yin, 神出計, 斎藤嘉朗, 他: 日本人における薬物代謝酵素 CYP2C9 の新規遺伝子多型の機能解析及びロサルタンの血圧降下作用に対する影響。日本薬学会第128年会、2008年3月27日（横浜）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

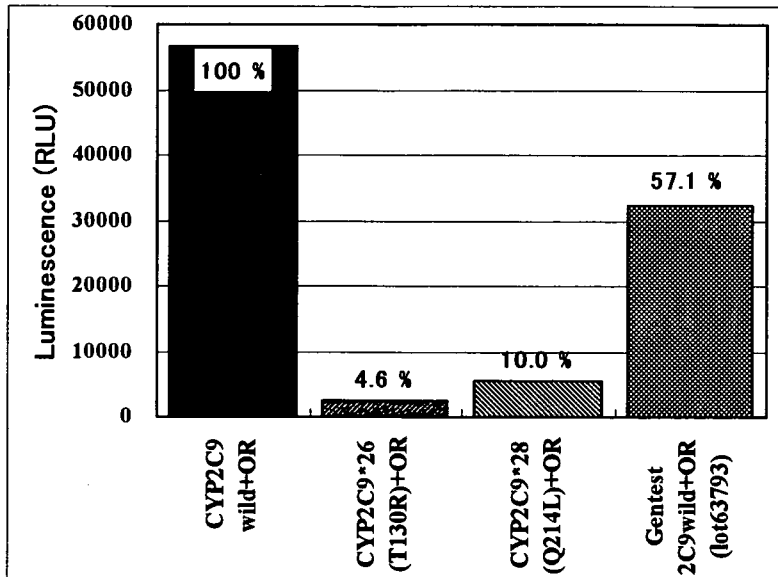


図1 野生型、\*26型及び\*28型 CYP2C9 酵素の Luciferin H に対する代謝活性

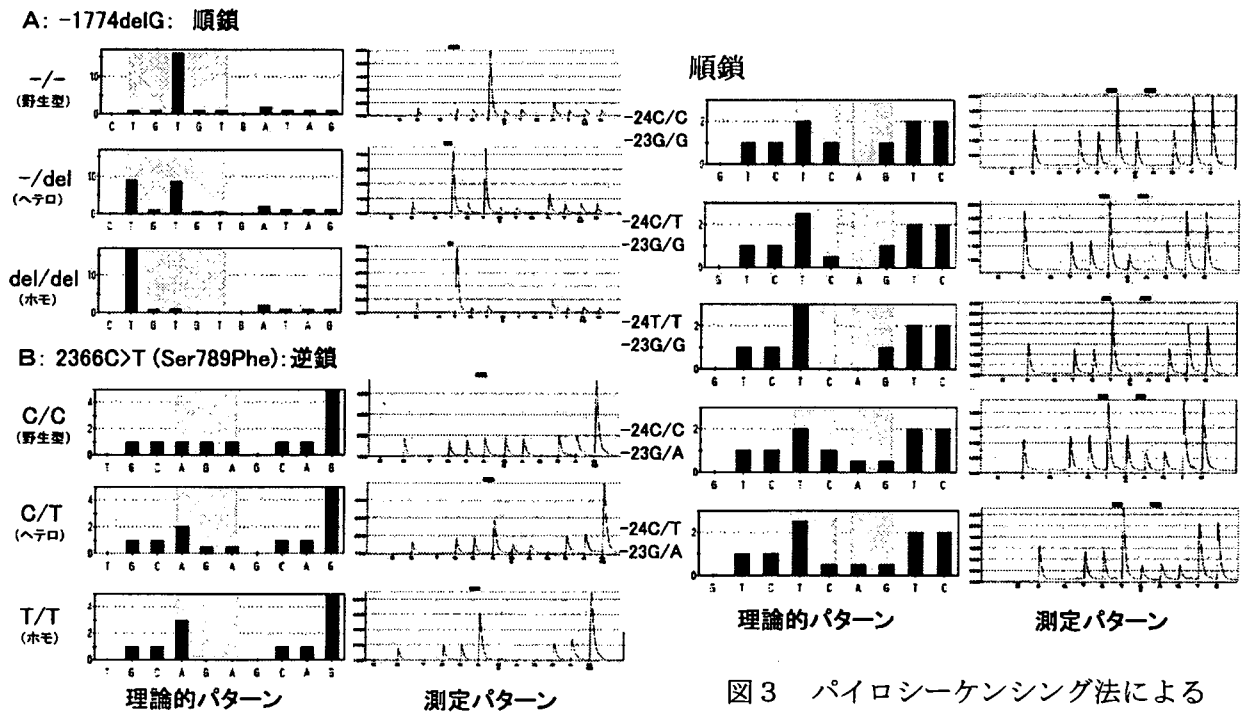


図2 パイロシーケンシング法による ABCC2 遺伝子多型のタイピング (A: -1774delG, B: 2366C>T)

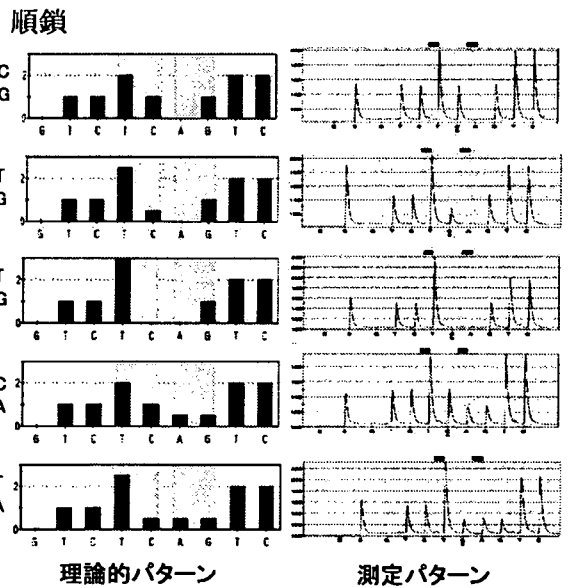


図3 パイロシーケンシング法による ABCC2 遺伝子-24C>T, -23G>A 多型のタイピング

表 1 副作用（嘔気）の有無を指標とした SSRI 服用患者の網羅的 SNP 関連解析（有意差 有りと考えられる 3 SNPs について）

(Case 28 alleles (14 samples) vs Control 68 alleles (34 samples))

SNP ID	Sample size			P values (allele frequency mode)	Odds ratio (95% Confidence Interval)
	Case (major allele/ minor allele)	Control (major allele/ minor allele)	Total (Case/Control)		
A	12/16	61/7	28/68	3.73E-06	0.0861 (0.0250-0.2856)
B	25/1	33/35	26/68	8.95E-06	26.51 (3.790-1113)
C	27/1	36/32	28/68	1.46E-05	24.00 (3.454-1008)

SNP ID	Chr	Call rate for SNP	Minor Allele Frequency (MAF)			P-value of HWE test (Exact test) for control sample
			Total	Case	Control	
A	X	1	0.228	0.571	0.103	0.290
B	4	0.979	0.383	0.038	0.515	0.504
C	4	1	0.344	0.036	0.471	0.317

ここでの Minor allele の定義は、全サンプルにおいて頻度の少ないアレルを示す。

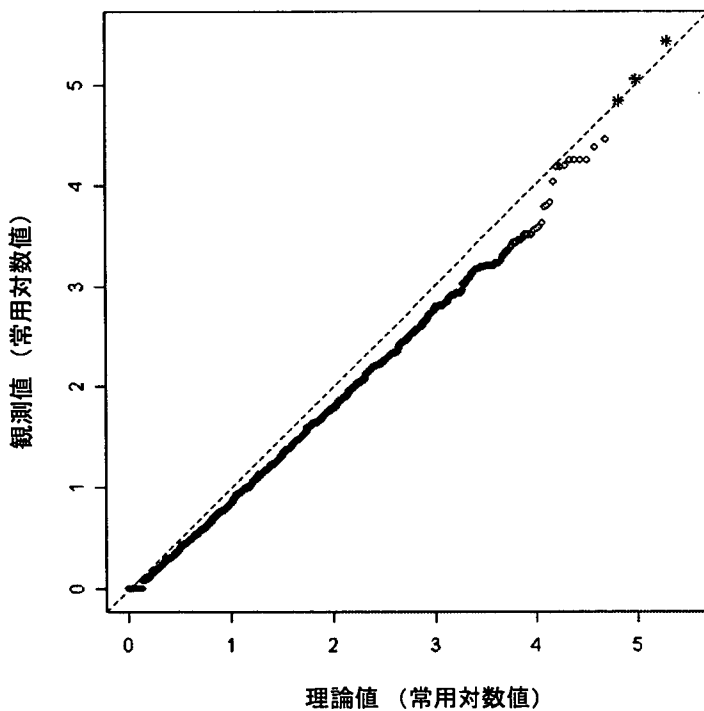


図 4 Allele frequency mode を仮定したフィッシャーの正確検定による P 値の log QQ p-value plot.

横軸に帰無仮説の下での P 値の経験分布（一様分布）、縦軸に観測から得られた P 値をとった。  
点線は傾き 45 度の直線。3 つの SNP (\*でポイントされている) が有意である可能性があると判断した。

## 医薬品の安全性監視と安全性監視計画立案のための医薬品安全性情報の解析、評価に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部  
研究者 森川 馨

研究要旨 FDA 大規模副作用症例データ (AERS) のデータベースを構築し、抗精神病薬、造血因子、内分泌、リウマチ薬等の安全性情報の解析を行った。また、海外規制機関の安全性情報の蓄積、評価を行うと共に、安全性監視計画の検討として米国と欧州における動向について調査を行った。

### 分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部  
森川 馨
- (2) 京都大学大学院・医学研究科社会健康医学系  
専攻、健康情報学  
中山健夫
- (3) あすか製薬(株)薬剤部  
松倉竹雄
- (4) エーザイ(株)信頼性保証本部・安全管理部  
大家正芳
- (5) 参天製薬(株)研究開発本部  
西畑利明
- (6) 塩野義製薬(株)医薬開発本部・解析センター  
田崎武信
- (7) キリンファーマ(株)信頼性保証本部 関 利之
- (8) アステラス製薬(株)信頼性保証本部・ファーマ  
コヴィジランス部  
中村信弘
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部  
竹村玲子
- (10) 国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部  
芦澤一英

### A. 研究目的

医薬品の価値はベネフィット(有効性)とリスク(安全性)のバランスで決まる。リスクを軽減できれば相対的にベネフィットが増すことになる。医薬品の安全性は、特に有効性と異なり、市販後の医療現場での使用によりその特性が明確にされていく。安全性は個々の患者背景、使用法、期間等で異なり、歴大な安全性データがあつて初めて科学的な検討が可能になる。今日、世界各国の規制機関は、市販後の安全性データを収集し、公開するようになってきている。そして、焦点はそのデータのいかに科学的に評価し活用するかに移ってきている。米国 FDA は、Adverse Event Reporting System (AERS) として世界規模で副作用データを集め、データベース(年約 30 万件)として公開している。一方、医薬品は承認にあたり、

承認条件として使用成績調査あるいは製造販売後臨床試験など実地医療に近い形での追加試験が課せられている場合が多いが、これらの試験では症例数が明確であることから頻度、発現率などの解析を可能とするメリットはあるものの、通常 3000 例程度の規模であるため安全性監視には不十分である。他方、上記データベースは自発報告ではあるが、症例数が年 30 万件と歴大なデータが含まれるため、医薬品の安全性を考えるに当たっては非常に価値の高いデータである。

一方、ICH から開発から市販後まで一貫した安全性情報のライフサイクルマネジメントとして安全性監視に関するガイドライン E2E が提案され、厚生労働省から医薬品安全性監視計画実施が通知されている(平成 17 年 3 月 28 日)。E2E では、すべての新医薬品について開発段階で特定されたリスクのほか、潜在的リスク、および検討不十分なリスクについて、開発段階から安全性監視計画を事前に策定することが要求されており、医薬品の安全性監視は今後製薬企業にとって重要な日常的活動になっていくと考えられる。しかしながらリスク検出のための手法はまだ確立されておらず、行政、各製薬企業にとっての大きな課題である。

本研究では、これらの大規模副作用症例データベースの解析法の検討を通じ、副作用を早期に見出し、未然に防止するための監視方法、および安全性監視システムについて検討した。

本年度の主な研究内容を以下に挙げた。

- 1) FDA 大規模副作用症例データベース(AERS)のリレーショナルデータベースの構築
- 2) リレーショナルデータベース使用に当たつての MedDRA バージョン間での医学用語の整合性の確保と日本語表示、
- 3) シグナル検出手法の統計的検討と解析プログラムを開発、
- 4) AERS データベースを用い

た副作用情報の解析①抗精神病薬の有害事象の解析、②Gd 造影剤と腎性全身性線維症、③血液及び腎領域における副作用情報の解析、④内分泌領域、⑤リウマチ領域、⑥泌尿器科領域における副作用情報の評価と活用、⑦抗菌薬の安全性モニタリング、5) 海外規制機関安全情報データベースの構築と海外規制機関情報における市販後医薬品安全性情報の評価・活用、6) 米国と欧州における医薬品の安全性監視計画の検討として、米国「連邦食品医薬品化粧品法」と EU Pharmacovigilance Guideline Vol. 9A、欧米における医薬品副作用リスク対応の動向、及び日本の医療現場での医薬品安全性の確保に関して、医薬品安全性情報の診療ガイドラインへの適用等について検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1 FDA 大規模副作用症例データベース (AERS) を用いた医薬品安全性情報の解析

FDA 大規模副作用症例データベース (AERS) のリレーショナルデータベースの作成を検討した。

AERS データは現在 2004 年 Q1 から 2007 年 Q3 まで FDA の HP (<http://www.fda.gov/cder/aers/default.htm>) で公開されている。それ以前の 1997 年 Q4 から 2003 年 Q4 までの約 6 年のデータは CD-R 化されており、National Technical Information Service (NTIS) から入手した。データ統合及び解析にはマイクロソフト MS Access 2003 を使用し、それら AERS 11 年分のデータインポート時に生じたエラーや重複データを調査、その対応方法の検討を行い、その上で最新情報のみを抽出したリレーショナルデータベース (以下、最新データ) を作成する方法を検討した。

解析対象の薬剤名は Martindale (<http://www.thomsonhc.com/home/dispatch>) 及び、日本の販売名が Martindale に登録されていない場合は、医療用医薬品添付文書情報 ([http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu\\_tenpu\\_base.html](http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html)) を使用し、一般名から世界各国の販売名を調査した。

検討医薬品の副作用情報のシグナル検出基準として、MHRA の方法 (Proportional Reporting Ratio (PRR)  $\geq 2$ ,  $\chi^2 \geq 4$ ,  $n_{11} \geq 3$ ) を採用し副作用の解析を行った。

### B-2 シグナル検出の統計的考察と実装

大規模自発報告データベース AERS を対象に Proportional Reporting Ratio (PRR) や Reporting Odds Ratio (ROR) を用いてシグナル検出をする際の問題点、特に層または多重性の影響について検討した。またこの検討結果を反映させた集計解析システムを作成した。

### B-3 Gd 造影剤と腎性全身性線維症に関する検討

Gd 造影剤の NSF に関する安全性シグナルの発生状況について、1997 年から 2006 年までの AERS データを用いて確認することを目的とした。

安全性シグナルの検出は、Proportional Reporting Ratio (PRR) を用い、 $PRR > 2$ ,  $\chi^2 > 4$ , 報告数  $> 2$  を安全性シグナルと定義し各年度毎に算出した。なお、PRR は、(当該医薬品での当該事象の報告数)/(当該医薬品での全報告数)を(全医薬品での当該事象の報告数)/(全医薬品での全報告数)で除したものとした。

### B-4 血液及び腎領域における副作用情報の解析

赤血球造血刺激因子 (Erythroiesis stimulating agent, ESA) について、米国 FDA のウェブサイト上に公開されている AERS データベース 2004 年から 2006 年までの 4 年分のデータを基本的な解析対象とした。解析対象薬剤は、個別 ESA の一般名あるいは商品名のいずれかと一致する薬剤全体とした。また PRR の算出は有害事象について MedDRA の PT (Ver. 10.1) に準拠した AERS の有害事象名を単位として、Evans らの方法に従い報告事象数を用いて算出した。また、基礎疾患による交絡の検討は全症例を解析対象とした際の PRR と、適応に「腎不全」あるいは「透析」に対応する語を含む薬剤を投与している症例のみを解析対象とする部分集団解析での PRR との比較することにより行なった。

### B-5 内分泌領域における副作用情報の評価と活用

FDA の AERS データからの内分泌領域における副作用情報の評価と活用を目的に、疾患 X を取り上げ、投与されている医薬品を作用機序別及び世代別の群に分け、AERS データからの副作用のシグナル検出を検討した。AERS は、2004 年 Q1 から 2007 年 Q1 までのデータをダウンロードした後、重複データの処理を行ってシグナル検出に用いた。MedDRA のバージョンは V10.1 で、アプリケーションとして Microsoft Access 2003 を用いた。シグナルの検出は主として、PRR 法を用いて行い、BCPNN 法を参考として用いた。疾患 X は男性のみを対象とする疾患なので、DEMO の「GNDR\_COD」は“M”を選択し、DRUG の「ROLE\_COD」では“PS” Or “SS”のみを対象とした。PRR の上位 20 位までをピックアップして検討を行った。

### B-6 リウマチ領域における副作用情報の評価と活用

リウマチ領域における副作用情報の評価と活用として、米国 FDA の AERS データベースを用いてメトトレキサート製剤の安全性情報と日本国内で実施した使用成績調査の結果を比較検討した。なお、シグナル検出には Proportional Reporting Ratio (PRR)法を用いた。

#### B-7 泌尿器科領域における副作用情報の評価と活用

泌尿器科領域における副作用情報の評価と活用として、米国 FDA の AERS を用い、有害事象 (AE) のシグナル検出を行った。2008 年 1 月 1 日現在、FDA が公開している 2004 年第 1 四半期から 2007 年第 2 四半期のうち薬剤 A が米国で上市された 2005 年第 1 四半期から 2007 年第 2 四半期に FDA に報告された AE を対象に解析した。

AERS より、薬剤および注目する AE から 2×2 の分割表を算出した。AE は AERS に入力されている有害事象情報 (データセット REAC にある変数 PT) と MedDRA version 10.1 の LLT をマッチングさせ、REAC の PT を MedDRA version 10.1 で再コーディングしたものを解析に用いた。医薬品情報については、データセット DRUG にある変数 DRUGNAME より薬剤 A の一般名および製品名をもとに、目視により薬剤 A を選択し解析に用いた。

シグナル検出のアルゴリズムは Proportional Reporting Ratio (PRR)法を用い、PRR が 2 以上、注目する薬剤の AE 報告件数 ( $n_{11}$ ) が 3 以上かつ  $\chi^2$  値が 4 以上の AE をシグナルとした。

#### B-8 抗菌薬の安全性モニタリングの検討

抗菌薬の安全性モニタリングの検討として、AERS データを用いて、類薬の副作用に関する情報を自社薬の副作用発現予測に役立てる方法について検討した。2004 年の第 2 四半期 (04Q2) から 8 四半期分 (2 年間) の AERS データを解析対象とし、四半期毎にシグナル検出 (MHRA で用いられている基準  $PRR \geq 2$ ,  $\chi^2 \geq 4$ , 注目薬剤の特定副作用群の報告件数  $\geq 3$ ) を用いた。シグナル指標としては PRR を用い、AERS データで利用可能な背景因子 (性、年齢、体重) 別に四半期毎に PRR を算出し、背景因子の影響の有無を調べた。

#### B-9 海外規制機関の医薬品安全性情報データベースの構築と 2007 年の海外規制機関の安全性情報

WHO、米国 FDA、EU EMEA (European Medicines Agency)、英国 MHRA (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency)、カナダ Health Canada、豪州 TGA (Therapeutic Goods Administra-

tion)、ニュージーランド Medsafe (Medicines and Medical Devices Safety Authority) 等の安全性情報、及び安全性に関する定期刊行物 (米国 FDA の Drug Safety Newsletter、英国 MHRA の Drug Safety Update、カナダ Health Canada の Canadian Adverse Reaction Newsletter、豪州 TGA の Australian Adverse Drug Reactions Bulletin、ニュージーランド Medsafe の Prescriber Update Articles、WHO Pharmaceuticals Newsletter) を対象として海外規制機関の医薬品安全情報データベースを構築した。

2007 年 1~12 月に「海外規制機関情報データベース」に登録された情報を検索して、キーワードを含むレコード数をもとに検討した。

#### B-10 海外規制機関情報における市販後医薬品安全性情報の評価・活用

WHO、米国 FDA、EU EMEA、英国 MHRA、カナダ Health Canada、豪州 TGA、ニュージーランド Medsafe 等の安全性情報、及び安全性に関する定期刊行物を検討対象とすると共に主要海外臨床雑誌等の文献によるエビデンスの確認と評価、検討を行った。

#### B-11 米国「連邦食品医薬品化粧品法」と EU Pharmacovigilance Guideline Vol. 9A における医薬品安全管理

米国の連邦食品医薬品法 (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act、以下 FDCA) の改訂点のうち、医薬品安全管理に関する条項、及び欧州ファーマコヴィジランスガイドライン Vol. 9A に述べられたリスクマネジメントプラン (EU-Risk Management Plan、以下 EU-RMP) について調査した。

#### B-12 欧米における医薬品副作用リスク対応の動向

欧米諸国では、規制当局、研究機関を中心に医薬品の安全対策に関し従来の考え方やプロセスを見直し、抜本的な検討が続けられてきた。その結果、2007 年米国では Food Drug Administration Amendment Act が立法化され、欧州共同体でも Pharmacovigilance Guideline Vol. 9A に European Risk Management Plan (EU-RMP) が出されている。このような状況下で欧米では副作用リスク低減を目指し、科学的な安全性監視およびリスクマネジメントを目的とした議論が展開されている。本研究では、欧米における医薬品副作用リスク対応の動向について調査した。

#### B-13 医薬品安全性情報の診療ガイドラインへの適用と薬物療法に対する外来患者の姿勢



診療ガイドラインは、適切な医療を行う上で重要な役割を担う。診療ガイドラインにおける安全性情報の扱いについて、喘息診療ガイドラインを例として、フルチカゾン(吸入ステロイド薬)、サルメテロール(ベータ2刺激薬)、テオフィリン(キサンチン誘導体)、ザフィルルカスト(抗アレルギー薬)について、国内外の機関からの安全性情報を調査し、比較検討を行った。また、薬物療法に対する外来患者の薬に関する事故回避につながる患者行動の意識を明らかにするため、薬物療法に対する姿勢(4 下位領域、19 項目)、事故回避行動(9 項目)に関する無記名の自記式質問紙暫定版を作成し、大阪府高槻市内の薬局 5 施設において調剤を受けに来る成人患者を対象に横断的調査を実施した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は公開されている米国 FDA の AERS データベースを用いた AERS の最新データ抽出方法、及びそれを用いた医薬品での副作用の解析方法についての研究であり倫理的配慮は必要としない。

### C. 研究結果と考察

#### C-1 FDA 大規模副作用症例データベース(AERS)を用いた医薬品安全性情報の解析

米国 FDA の Adverse Event reporting System (AERS) は自発報告に基づく世界規模の副作用症例データベースであり報告数は年 34 万件、11 年で計 230 万件と膨大で、医薬品の安全性を考えるにおいて価値の高いデータである。そのデータベースを使用し、簡便で迅速な解析が可能となれば医薬品の安全性確保に大いに役立てることができる。現在の課題はこれら大規模な安全性データをいかに解析し、活用するかが課題となっている。本研究では、この公開されている 11 年分の AERS データベースを使用し、医薬品の副作用症例の抽出及び検討が容易にできるように、AERS のデータ内容を調査し有用なリレーショナルデータベースを作成し、医薬品での副作用の解析を行うためのデータ抽出方法、及び副作用の解析を行い、シグナルを検出するための方法を検討した。

##### 1) AERS リレーショナルデータベースの作成

AERS11 年のデータを統合する際、ASCII ファイルのデータインポート時のエラー、期を跨ったデータでの ISR の重複(3,309 件)、CASE 番号の欠落(14 件)、情報追加処理後の CASE 番号の変更による問題、8 桁以上の桁数データの混在という様々な問題点がみつかった。これらそれぞれに対応して得られた最新データは 1,838,531 症例であった。次に、最新データから特定薬剤のデータを検索す

る際にも、DRUG テーブルの DRUGNAME の薬剤の名称の入力規定がされていない問題、REAC テーブルの PT 及び INDI テーブルの INDI\_PT の MedDRA PT Term が報告時に Version が異なっているという問題がみつかった。それに対し、薬剤名検索後にその抽出データ内容を調査した DRUGNAME のマスターテーブルの作成や、どの Version の PT のデータでも最新 Version で再コードできる AERS 専用の MedDRA 辞書の作成を行うという効率的な対応方法を考案した。それを基に、MS Access で特定薬剤の副作用ごとの集計を求めるクエリーと、全体の副作用の集計テーブルを組み合わせることで、特定薬剤のシグナル検出を容易に求めることができた。

##### 2) AERS データベース用いた抗精神病薬の医薬品安全性情報の解析

構築した AERS データベースを用いて、海外規制機関からの安全性情報で副作用の発現リスクの増加が報告された抗精神病薬 7 剤の解析を行った。従来型抗精神病薬の Clorpromazine(3,247 症例)で高い PRR を示したものは、悪性症候群(31.9)、錐体外路障害(10.6)、母体を介した新生児時に対する有害事象であり、Haloperidol(9,352 症例)では、悪性症候群(44.1)、錐体外路障害(21.9)、心臓に対する有害事象であった。

一方、非定型型抗精神病薬の Risperidone(19,875 症例)では、高プロラクチン血症(139.0)、悪性症候群(20.0)、錐体外路障害(16.9)、Olanzapine(24,704 症例)では、糖尿病性昏睡(45.5)など糖尿病、悪性症候群(20.8)、錐体外路障害(8.3)、Quetiapine(19,849 症例)では、糖尿病性昏睡(69.3)、遅発性ジスキネジー(37.7)、悪性症候群(15.6)、Clozapine(16,701 症例)では、顆粒球減少症(141.6)など造血機能障害、心筋炎(26.0)など心臓への有害事象であった。Aripiprazole(7,862 症例)では、糖尿病は少ないが遅発性ジスキネジー(40.8)など錐体外路障害、悪性症候群(16.0)であった。ここで示した値は、併用薬を含むため抗精神病薬の直接の副作用を示すものではないが、各薬剤での副作用の特徴を示していると考えられた。

AERS は、世界からの副作用報告を集めた貴重な副作用データベースであり、その解析は安全性検討において極めて重要であると考えられる。またこれら大規模副作用症例データベースの解析は、市販後医薬品の安全性確保のための重要な検出ツールであるとともに、医療現場で安全性の実態、及び医薬品特性把握、類薬との比較など医薬品の安全性のより深い理解を可能とすると考えられる。

## C-2 シグナル検出の統計的考察と実装

医薬品の自発報告データからの安全性監視において、シグナル検出は欠かせない。本研究では、大規模自発報告データベース AERS を対象に Proportional Reporting Ratio (PRR) や Reporting Odds Ratio (ROR) を用いてシグナル検出を行うときの問題点、特に層または多重性の影響について考察すると共に、この検討結果を反映させた集計解析システムの作成を検討した。

### 1) シグナル検出の統計的考察

自発報告データでは薬剤と有害事象の関係に報告年、性別、年齢などが交絡しうる。このとき、データを層別せず、全体を1つのデータとして解析を行うと、その結果が層ごとに得られる結果と矛盾するというシン普森のパラドックスが生じうる。この問題を回避するため、層ごとに得られる結果を併合し評価する指標として、併合した PRR と ROR を示し、これらの 95%信頼区間を用いたシグナル検出、及び層の併合を視覚的に示すものとして Forest Plot の利用を検討した。最近、新しいシグナル検出アプローチとして Pharmacovigilance Map が提案されている。これは、Reporting Ratio (RR) と Statistical Unexpectedness という指標を計算し、これらを 2次元にプロットするものである。報告された有害事象の種類だけ有意性判定を繰り返すことで生じる多重性を調整した基準線を描く点も、この方法の大きな特徴である。しかし、比例性からの乖離を直接計測する PRR の魅力は捨てがたいと考えられる。そこで、Pharmacovigilance Map の PRR 版として、RR を PRR へ、Statistical Unexpectedness を  $\chi^2$  統計量へ置き換えてプロットする変形 Pharmacovigilance Map を考案した。これら 2つの Map を AERS データへ適用し、2007 年第 1 四半期におけるある薬剤のシグナル検出を試みた。この結果、Pharmacovigilance Map で検出された有害事象は全て Pharmacovigilance Map の PRR 版においても検出された。

### 2) 集計解析システムの作成

AERS は安全性監視のみならず医薬品に関わる種々の業務で有用であり、AERS をそれらの業務へ結びつけるためには、システム環境を整備する必要があると考えられた。そこで、誰もが容易に AERS データへアクセスでき、かつ、検討した統計的理論に基づいた結果を出力できるシステムの構築を検討した。Oracle がインストールされたサーバに AERS データを格納した。ユーザーが操作するインターフェイスとしては MS/Access で開発した。実装した機能の一つでは、特定薬剤における特定有害事象の報告数を計算し、シグナル検出

の結果を出力する。具体的には、報告年毎に PRR、ROR などの統計量を計算し、その上で結果を統計的に併合した値として、上記の併合した PRR と ROR、これらの 95%信頼区間を算出する。そして、この算出された値を Forest Plot とともに表示し、もう一つの機能としては、特定薬剤について報告された全ての有害事象毎に報告数を算出し、各シグナルの検出結果を出力するものである。この機能では、報告された有害事象について、横軸を PRR もしくは ROR、縦軸を  $\chi^2$  統計量とした散布図を描くことが可能とした。なお、どちらの機能においても、シグナル「有」の判定基準は、PRR については MHRA 基準 (PRR が 2 以上、 $\chi^2$  統計量が 4 以上、注目している報告が 3 件以上)、ROR については 95%信頼区間の下限が 1 を超えることとした。

以上、解釈の容易な PRR を用いて層または多重性の影響を調整し、シグナル検出を行う方法を検討し、これらの方法を広く業務に活かすためのシステムを試作した。

## C-3 Gd 造影剤と腎性全身性線維症に関する検討

米国の副作用報告データベースである Adverse Event Reporting System (AERS) 1997 年から 2006 年までのデータを用いて、Gd 造影剤の NSF に関する安全性シグナルの発生状況を検討した。

NSF および NSF 関連事象は、それぞれ「Nephrogenic systemic fibrosis」、「そう痒症、黄斑症、黄斑変性、関節硬直、関節痛、筋固縮、筋硬化症、筋骨格硬直、筋骨格痛、筋痛、筋膜疼痛症候群、筋力低下、頸部痛、紅斑、骨痛、四肢痛、湿疹、全身性硬化症、側腹部痛、多形紅斑、背部痛、斑状皮疹、皮膚のつっぱり感、皮膚硬化症、皮膚灼熱感、皮膚腫脹、皮膚熱感、皮膚剥脱、網状皮斑、肋間筋痛、皮膚線維症」と定義した。Gd 造影剤は、Gadobenic acid、Gadobutrol、Gadodiamide、Gadopentetic acid、Gadoteric acid、Gadoteridol、Gadoversetamide、Gadovetic acid の各製品名及び一般名の一部を用い検索した後目視により各造影剤を特定した。

NSF 報告は 2005 年に 1 件、2006 年に 139 件認められ、Gd 造影剤での報告はそれぞれ、0 件、135 件であった。Gd 造影剤での NSF 報告の PRR 値は、2006 年度に 374.1 と安全性シグナルとして認識されたものの 2006 年までにそのシグナルを確認することは出来なかった。一方、NSF 関連事象については、1998 年にそう痒症、紅斑についてシグナル発生を確認できたものの、製品情報から予測できない事象としては、2001 年の筋固縮についてのシグナル発生まで認識できなかった。

腎性全身性線維症 (NSF; Nephrogenic systemic

fibrosis)は1997年にカリフォルニアで始めて同定された疾患で、皮膚が線維化する異常が腎不全患者のみに発症したことから以前は腎性線維化性皮膚症(NFD; Nephrogenic fibrosing dermopathy)とも呼ばれていた。近年、核磁気共鳴画像(MRI)検査時に用いられるGd造影剤がNSFの原因あるいは発症のきっかけになっているとの報告がなされ、各国の規制当局や学会からガイドラインが出されている。今回の検討から、NSF自体の安全性シグナルは2006年まで確認できず、またNSF関連事象については1998年から確認できたものの、新たなシグナルとしての認識は2001年まで困難と考えられた。既に製品情報に記載されている事象、その関連事象、治療対象となる疾患や関連事象も安全性シグナルとして認識されるため、これらの想定シグナルを除去し、残った事象群について、必要な安全対策を適宜行っていくことにより、安全性上のリスク軽減が図れるものと考えられた。

#### C-4 血液及び腎領域における副作用情報の解析

赤血球造血刺激因子(Erythroiesis stimulating agent, ESA)については稀ではあるが重篤な有害事象の検討が必要であり、米国自発報告有害事象データベース(AERS)を用いた解析は重要な情報源となる。しかしながら、AERSを用いた解析ではバイアス要因の混入は避けられず、またESAには日本と外国では承認されている適応に違いがあるため、通常の結果のみでは十分な考察が困難である。本研究ではESAの解析について、日本での主な適応「透析施行中における腎性貧血」の基礎疾患である「透析」及び「慢性腎不全」の影響を、データベースに含まれている併用薬剤の適応に関する情報を用いた部分集団解析により排除する可能性を検討した。

全解析対象症例数は68,405例、有害事象数は2,586,977件であり、ESA投与症例で発現していた有害事象は2,259項目であった。このうち424項目がシグナル陽性であったが、薬剤との因果関係が強く示唆される有害事象が上位を占めており、その他、一方で基礎疾患である腎不全あるいは透析施行に関連すると考えられる有害事象、及び適応症自体と関連する有害事象も含まれていた。

ESA投与有無別に見ると、投与症例においては「腎不全/透析」を適応とする薬剤を投与された患者の割合が高い(18.0%)のに対して、非投与症例においてはその割合が極めて低く(0.2%)、事象数でもそれぞれ12.3%及び0.2%と類似した値であった。

「腎不全/透析」を適応とする薬剤投与患者のみを対象とした部分集団(事象数6,976件)での解析においては、27項目の有害事象がシグナル陽性であり、うち8項目についてはESA非投与症例における報告件数が0であったため、PRRが無限大と計算されたものであった。これらを除くと、薬剤との因果関係が強く示唆される事象は全症例の場合と同様シグナル陽性となり上位を占めたが、腎不全あるいは透析施行に関連すると考えられる有害事象はいずれもシグナルが陽性とはならなかった。なお、適応症自体と関連すると考えられる有害事象は順位変動があるものの陽性となる項目が残った。

以上、「腎不全/透析」を適応とする薬剤投与患者のみを対象とした部分集団解析結果は、解析対象数の減少のため安定性には問題があるものの、薬剤との因果関係が強く示唆される有害事象については全症例での解析結果の再現性が高い一方、基礎疾患に関連すると考えられる有害事象についてはシグナルが陽性とならず、適応症の原因となっている基礎疾患による交絡の影響を排除するために有効であることが示唆された。これは、AERSデータの解析において付加的な情報を有効に用いることにより、通常の結果では除去が困難なバイアスを排除することが可能であることを示しており、全症例を対象とした解析と併せて考察することにより、検出された有害事象の評価をより適切に行うための有用な情報を与えるものと考えられた。

#### C-5 内分泌領域における副作用情報の評価と活用

FDAのAERSの重要性に注目し、内分泌領域における副作用情報の評価と活用として、疾患Xを取り上げ、投与されている医薬品を作用機序別、及び世代別の群に分けて、副作用のシグナル検出を検討した。

##### 1) 疾患Xに投与された医薬品による副作用のシグナル検出

全ての疾患に投与された医薬品を対象として、INDIの「PT」が疾患Xと記載された全ての医薬品による副作用のシグナル検出結果の上位20位までの副作用は全て高いPRR及び $\chi^2$ の値を示して、PRR及びBCPNNいずれもシグナルありと判定された。副作用の具体的内容としては、虹彩に関する副作用と乳房に関する副作用が大部分を占めていた。

##### 2) 疾患Xに投与された医薬品の作用機序別分類による副作用のシグナル検出

疾患Xに投与された医薬品による副作用を対象

として、それらの医薬品のうち作用機序 A(非ホルモン作用)及び作用機序 B(ホルモン作用)の医薬品群について検討した。

作用機序 A の医薬品群では、上位 19 位までの副作用が PRR でシグナルありと判定され、BCPNN ではそのうち 4 つの副作用でシグナルありと判定された。副作用の具体的内容としては、虹彩に関する副作用が多くみられ、乳房に関する副作用はみられなかった。

作用機序 B の医薬品群では、上位 20 位までの全ての副作用が PRR でシグナルありと判定され、そのうち 6 つの副作用が BCPNN でシグナルありと判定された。副作用の具体的内容としては、乳房及び性機能に関する副作用が多くを占めており、虹彩及び血圧低下に関する副作用はみられなかった。

3) 疾患 X に投与された作用機序別医薬品の世代別分類による副作用のシグナル検出

疾患 X に投与された全ての作用機序 A の医薬品を、①血圧低下関連の副作用が多くみられている第 1 世代群、②血圧低下の少ない医薬品として開発された第 2 世代群に分けてシグナルを検出した。第 1 世代の医薬品群においては、やはり血圧低下関連の副作用が比較的多くシグナル検出されたのに対して、第 2 世代の医薬品群においては、当初の開発の目標どおり、第 1 世代で検出された血圧低下関連の副作用は検出されなかったが、逆に虹彩関連の副作用が検出された。

疾患 X に投与された全ての作用機序 B の医薬品を、①乳房や性機能に対する影響がみられている第 1 世代群、②乳房や性機能に対する影響が少ない医薬品として開発された第 2 世代群に分けてシグナルを検出した。第 1 世代の医薬品群においては、副作用件数が少ないためか、特徴的な副作用は認められなかったが、第 2 世代の医薬品群においては、乳房関連の副作用がシグナル検出されており、当初の開発の目標には到達していなかった。

以上、AERS のデータベースを用いてシグナル検出を行うことにより、特定の疾患に用いられている医薬品の安全性の面での特徴を確認することができた。また、作用機序別に更に世代別にシグナル検出を行うことにより、それぞれの医薬品群間における安全性の面での相違を明らかにすることができた。現在、逐次報告される副作用から、今後シグナル検出を用いて早期に医療関係者に副作用を警告できると考えられた。

C-6 リウマチ領域における副作用情報の評価と活用

リウマチ領域における副作用情報の評価と活

用として、米国 FDA の大規模副作用症例データベース AERS を用いて検討したメトトレキサート製剤の安全性情報と日本国内で実施した使用成績調査の結果を比較検討し、AERS データの解析結果の製造販売後調査計画作成への有用性について検討した。

解析した結果、メトトレキサート製剤で高い PRR を示した副作用(基本語:PT)は、脛骨内側過労性症候群(182.6)、リンパ形質細胞様リンパ腫・免疫細胞腫(69.6)、感染性滑液包炎(60.9)、濾胞中心リンパ腫(60.9)、硬膜炎(60.9)の順であった。また、発現器官の検討として行ったシグナルとして検出できた PT の PRR 値の和として SOC 別に集計した結果、感染症および寄生虫症(726.9)、筋骨格系および結合組織障害(373.5)、良性、悪性および詳細不明の新生物(220.3)、全身障害および投与局所様態(188.7)、呼吸器、胸郭および縦隔障害(142.8)の順であった。一方、自社で実施した使用成績調査による副作用(PT)発現率は、肝機能障害 7 件(2.3%)、ALT 増加 4 件(1.3%)、鼻咽頭炎 4 件(1.3%)、AST 増加 3 件(1.0%)、悪心 3 件(1.0%)、口内炎 3 件(1.0%)の順で高かった。また、SOC 別の発現状況は、肝障害 17 件(5.5%)、感染症 8 件(2.6%)、胃腸障害 8 件(2.6%)、呼吸器障害 7 件(2.3%)、血液障害 3 件(1.0%)、皮膚障害 3 件(1.0%)、腎障害 2 件(0.6%)という順であった。

AERS と使用成績調査の解析結果を PT で比較したところ、上位 5 位の中に共通する副作用名(PT)はみられなかった。次に、SOC 分類で比較した結果、「筋骨格系および結合組織障害」、「良性・悪性および詳細不明の新生物」、「全身障害および投与局所様態」は AERS データの解析では、注目すべき副作用として検出されたが、使用成績調査では全く報告されていなかった。また、使用成績調査では、「胃腸障害」や「肝胆道系障害」が高頻度で認められたが、AERS データにおける SOC 別の PRR 値の和は低値を示していた。しかし、「感染症」および「呼吸器障害」に関しては、AERS、使用成績調査のいずれの解析結果においても、上位に位置づけられていた。

これらの結果は、今回使用した使用成績調査や AERS データの特殊性が影響しているためと考えられた。例えば、使用成績調査中の当局報告対象症例(重篤症例)は呼吸器障害 3 例、感染症 2 例であり、これらの器管別大分類は、AERS データからも注目すべき器官として予測できていたことから、AERS データは「重篤」症例のみのデータとなっているが、使用成績調査では非重篤な副作用も含まれていることが推察された。また、使用成績調査で収集された症例数が 308 例とかなり小規模