

Maternal Riboflavin Deficiency, Resulting in Transient Neonatal-Onset Glutaric Aciduria Type 2, Is Caused by a Microdeletion in the Riboflavin Transporter Gene *GPR172B*



Gladys Ho^{1,3}, Atsushi Yonezawa⁴, Satohiro Masuda⁴, Ken-ichi Inui⁴, Keow G. Sim², Kevin Carpenter^{2,3}, Rikke K.J. Olsen⁵, John J. Mitchell⁶, William J. Rhead⁷, Gregory Peters^{2,3}, and John Christodoulou^{1,2,3,*}

¹ Genetic Metabolic Disorders Research Unit; ² Western Sydney Genetics Program, Children's Hospital at Westmead 2145, Sydney, Australia; ³ Discipline of Paediatrics & Child Health, University of Sydney, Sydney 2006, Australia; ⁴ Dept of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan; ⁵ Research Unit for Molecular Medicine, Aarhus University Hospital and Faculty of Health Sciences, Skejby Sygehus, Aarhus, Denmark; ⁶ Dept of Genetics, Montreal Children's Hospital, Montreal, Canada; ⁷ Medical Genetics Center, Children's Hospital of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA

*Correspondence to Professor John Christodoulou, Western Sydney Genetics Program, Children's Hospital at Westmead, Locked Bag 4001, Westmead, NSW, 2145, Australia. Phone: +61 2 9845 3452, Fax: + 61 2 9845 1864, E-mail: johnc@chw.edu.au

Communicated by Elizabeth Neufeld

ABSTRACT: Riboflavin, or vitamin B2, is a precursor to flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) molecules, required in biological oxidation-reduction reactions. We previously reported a case of a newborn female who had clinical and biochemical features of multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency (MADD), which was corrected by riboflavin supplementation. The mother was then found to be persistently riboflavin deficient, suggesting that a possible genetic defect in riboflavin transport in the mother was the cause of the transient MADD seen in the infant. Two recently-identified riboflavin transporters G protein-coupled receptor 172B (*GPR172B* or *RFT1*) and riboflavin transporter 2 (*C20orf54* or *RFT2*) were screened for mutations. Two missense sequence variations, c.209A>G [p.Q70R] and c.886G>A [p.V296M] were found in *GPR172B*. *In vitro* functional studies of both missense variations showed that riboflavin transport was unaffected by these variations. Quantitative real-time PCR revealed a *de novo* deletion in *GPR172B* spanning exons 2 and 3 in one allele from the mother. We postulate that haploinsufficiency of this riboflavin transporter causes mild riboflavin deficiency, and when coupled with nutritional riboflavin deficiency in pregnancy, resulted in the transient riboflavin-responsive disease seen in her newborn infant. This is the first report of a genetic defect in riboflavin transport in humans. ©2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: RFT1, RFT2, GPR172B, riboflavin transport, MADD

Received 19 August 2010; accepted revised manuscript 19 October 2010.

© 2010 WILEY-LISS, INC.
DOI: 10.1002/humu.21399

INTRODUCTION

Riboflavin or vitamin B2 is a water-soluble vitamin essential for normal cellular functions. It is a precursor in the synthesis of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD), both of which are important molecules in biological reduction-oxidation reactions (Powers, 2003). In particular, FAD is a cofactor for the electron transfer flavoprotein (ETF) and ETF ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO) making up the electron transport pathway for a number of mitochondrial flavoprotein dehydrogenases (most of which are acyl-CoA dehydrogenases) mainly involved in fatty acid and amino acid metabolism. A defect in either ETF or ETF:QO causes multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency (MADD), or glutaric aciduria type 2 (MIM# 231680). This is an autosomal recessive disorder with mutations commonly found in the two genes encoding the two subunits of ETF (*ETFA*; MIM# 608053, and *ETFB*; MIM# 130410), or in *ETFDH* (MIM# 231675) which encodes ETF:QO (Indo et al., 1991; Beard et al., 1993; Colombo et al., 1994; Goodman et al., 2002). The clinical phenotype varies from severe neonatal onset with congenital anomalies and early death to mild and/or later onset forms (Rhead et al., 1987). Some patients respond dramatically to pharmacological doses of riboflavin, in particularly those with mutations in the *ETFDH* gene (Olsen et al., 2007; Law et al., 2009).

We now report on a novel genetic mutation in the mother of a neonatal case of suspected MADD, the latter of whom had no identifiable genetic defects in *ETFA*, *ETFB* or *ETFDH*. A newborn female presented on the first day of life with clinical and biochemical findings consistent with MADD. Riboflavin supplementation corrected the biochemical abnormalities 24 hours after commencing the vitamin. The mother was subsequently shown to be persistently riboflavin-deficient. We postulated that a primary genetic defect in one of the recently identified riboflavin transporter genes in the mother was the cause of the transient MADD in the infant, and that such defect would be absent in the infant.

MATERIALS AND METHODS

The clinical details of this family have been previously reported (Chiong et al., 2007). In brief, a female infant (III:1 – Figure 1), the first child of nonconsanguineous parents of Australian and Maltese background, presented within the first 24 hr of life with clinical features and urinary organic acids highly suggestive of multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD). Urine metabolic screening performed on day 2 showed a typical dicarboxylic aciduria with gross increases in hexandioate, octandioate, decanedioate and decenedioate, moderate increases in ethylmalonate, glutarate, 2-hydroxyglutarate, 5-hydroxyhexandioate and 7-hydroxyoctanedioate. Hexanoylglycine was also markedly increased but no other acylglycines were detected. Blood spot screening from the baby on day 2 by tandem mass spectrometry showed normal acylcarnitines, C4-carnitine, 0.52 and 0.45 $\mu\text{mol/L}$ (cut off 1.3 $\mu\text{mol/L}$), C10-carnitine, 0.76 $\mu\text{mol/L}$ and 0.63 $\mu\text{mol/L}$ (cut off 1 $\mu\text{mol/L}$), C10:1-carnitine, 0.39 $\mu\text{mol/L}$ and 0.21 $\mu\text{mol/L}$ (cut off 1 $\mu\text{mol/L}$), C14-carnitine, 0.73 $\mu\text{mol/L}$ and 0.7 $\mu\text{mol/L}$ (cut off 1 $\mu\text{mol/L}$), C14:1-carnitine, 0.6 and 0.51 (cut off 1), C16-carnitine, 1.91 $\mu\text{mol/L}$ and 1.93 $\mu\text{mol/L}$ (cut off 11 $\mu\text{mol/L}$), C6-carnitine 0.37 $\mu\text{mol/L}$ and 0.27 $\mu\text{mol/L}$ (cut off 1 $\mu\text{mol/L}$) and C5D-carnitine 0.21 $\mu\text{mol/L}$ and 0.22 $\mu\text{mol/L}$ (cut off 0.3 $\mu\text{mol/L}$). C12 – carnitine was not measured in the blood spots. Plasma carnitine and acylcarnitine levels on day 2 were: total – 26 mmol/L (normal range [NR] 8 – 45), free – 11 (NR 4 – 33), glutaryl carnitine – 0.40 (NR 0 – 0.16), hexanoylcarnitine – 0.2 (NR 0 – 0.1), octanoylcarnitine – 0.4 (NR 0 – 0.4), decaonoylcarnitine – 0.9 (NR 0 – 0.4), decenoylcarnitine – 0.2 (0 – 0.2), dodecanoylcarnitine – 1.15 (NR 0 – 0.34), tetradecenoylcarnitine – 1.08 (NR 0 – 0.27), tetradecanoylcarnitine – 0.77 (NR 0 – 0.19), palmitoylcarnitine – 0.91 (NR 0 – 0.74).

Remarkably, within 24 hr of the commencement of resuscitative therapy, including oral riboflavin, her clinical condition improved dramatically and her chemistry returned to normal. Fibroblast ETF and ETF:QO enzymology of cells cultured in riboflavin replete or depleted medium were all normal, making MADD highly unlikely. Riboflavin was ceased at 15 months of age, and now aged 5 yrs she has remained healthy with no further episodes of metabolic decompensation and with normal urinary organic acids and plasma acylcarnitines.

Based on these findings, her mother (II:1 – Figure 1) was suspected of having riboflavin deficiency, and this was confirmed biochemically. Initially, the low riboflavin level was thought to be nutritional in origin, but sustained correction of the plasma acylcarnitines in the mother only when she continued oral riboflavin therapy led to the conclusion that she was likely to have a primary genetic defect of riboflavin transport or metabolism. Her husband (II:2) and parents (I:1 and I:2) had normal riboflavin levels, urinary organic acids and plasma acylcarnitines. A second child (III:2) had normal urine organic acids, plasma acylcarnitines and riboflavin levels at 1 month of age. During the pregnancy with this child the mother (II:1) had been on riboflavin supplementation.

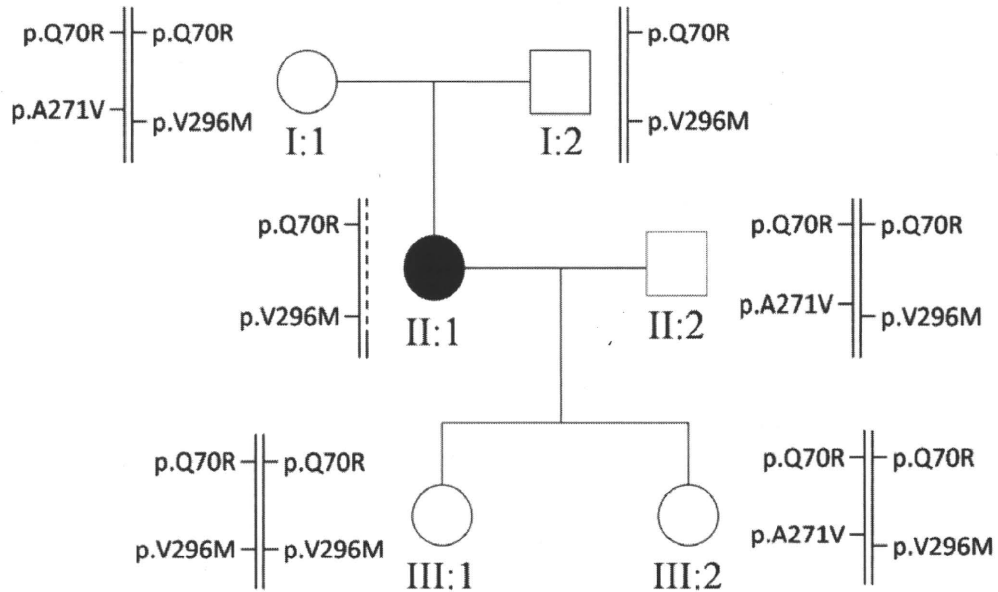


Figure 1. Pedigree and Haplotypes of Family with Riboflavin Deficiency. Pedigree of the family, showing I:1, maternal grandmother, I:2, maternal grandfather, II:1, riboflavin-deficient mother (in black), II:2, father; III:1, infant with transient riboflavin deficiency; III:2, unaffected infant. I:1, I:2, II:2 and III:2 had normal plasma acylcarnitines and riboflavin levels. Schematic diagrams of the *GPR172B* gene show the haplotypes of each family member for the three polymorphisms, p.Q70R, p.A271V and p.V296M. The dashed line represents the position of the region deleted in the pathogenic allele in II:1.

We postulated that a primary genetic defect in riboflavin metabolism or transport in the mother was the cause of the transient MADD in the infant III:1, and that such defect would be absent in the infant. Mutations in *ETFA*, *ETFB* and *ETFDH* have been previously excluded (Chiong et al., 2007). We also excluded mutations of FAD synthesis in the riboflavin kinase (*RFK*) and FAD synthetase (*FLAD1*) genes as the cause of riboflavin deficiency. The newly identified human riboflavin transporters, G protein-coupled receptor 172B (*GPR172B*; MIM# 607883) or riboflavin transporter 1 (*RFT1*) (Yonezawa et al., 2008) and riboflavin transporter 2 (*C20orf54* or *RFT2*; MIM# 613350) (Yamamoto et al., 2009) were screened for mutations that may potentially lead to riboflavin deficiency. *GPR172B*, a 2.8 kb gene located at chr17p13.2, contains 5 exons and has two mRNA transcript variants (GenBank reference numbers NM_001104577.1 and NM_071986.3). The two transcripts differ only in the 5' untranslated region (5' UTR) and encode the same protein of 448 amino acids (NP_001098047.1 and NP_060456.3). Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequences, according to journal guidelines (www.hgvs.org/mutnomen). The initiation codon is codon 1.

These studies were approved by the Ethics Committee of the Children's Hospital at Westmead, and informed consent was obtained from the parents of the proband. Using the genomic DNA of the riboflavin-deficient mother (II:1), the four coding exons (exons 2 - 5) in *GPR172B* were screened using direct sequencing (Macrogen, Seoul, Korea). Primers and PCR conditions are available upon request. Two single nucleotide polymorphisms were identified in exon 3 of *GPR172B*.

In order to exclude pathogenicity of the two mutations, the *in vitro* function of the two mutated *GPR172B* proteins was characterized. Experimental procedures were previously described (Yonezawa et al., 2008). Briefly, human *GPR172B* cDNA was subcloned into pcDNA3.1/Hygro(+) plasmid vector. Site-directed mutations in *GPR172B* gene was introduced with QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and the mutations were confirmed by direct sequencing. HEK 293 cells were seeded onto poly-D-lysine-coated 24-well plates at a density of 7.5×10^4 cells per well. The cells were transfected with 200 ng of plasmid DNA per well using 1 μ l of LipofectAMINE 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA). Forty-eight hours after the transfection, the cells were used for the subsequent experiments. Cells were incubated in the incubation buffer containing 10 nM [³H]riboflavin (0.903 TBq/mmol, Moravex Biochemicals, Inc., Brea, CA) for 1 min, and then washed twice with ice cold incubation buffer. The cells were solubilized in 0.5 N NaOH, and the radioactivity was measured by liquid scintillation counting. The composition of the incubation buffer was as follows: 145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 5 mM D-glucose and 5 mM HEPES (adjusted with NaOH to pH 7.4).

In order to identify any copy number variations in *GPR172B*, primers were designed using Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000) at five different sites along the length of *GPR172B*, with two pairs of primers spanning the locations of the missense mutations in exon 3, and one pair of primers in the remaining coding exons (exons 2, 4 and 5), as well as a pair of primers in a remote genomic region as a reference. Primer sequences are available upon request. Real-time PCR was performed using a RotorGene 6000 (Corbett Life Sciences, now QIAGEN, Doncaster, Vic, Australia). Each reaction of 10 μ l contained 0.5 U Hotmaster Taq polymerase (5 PRIME, Hamburg, Germany), 1x Hotmaster Taq buffer provided with polymerase, 0.2 mM of each dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5 μ M of each primer, 0.5 M betaine (Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia), 5.0% DMSO (Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia), 1x SYBR green dye (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 25 ng genomic DNA. The PCR program conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 40 cycles of 94°C for 20s, 56°C for 20s and 70°C for 30s, with a fluorescence measurement at the end of each 70°C elongation step. Analysis of qPCR was carried out as previously described (Pfaffl, 2001).

RESULTS

Two previously reported single nucleotide polymorphisms (SNP) in exon 3 of *GPR172B* were identified (GenBank reference NC_000017.9), both of which were apparently homozygous in II:2, as shown in Figure 2. The first was a transition from an adenine residue to guanine at cDNA position 209 resulting in a missense mutation at glutamine 70 to arginine (c.209A>G; p.Q70R). The second was a transition from a guanine to adenine at c.886, changing valine 296 to methionine (c.886G>A; p.V296M). Both missense mutations have previously been reported in the dbSNP (reference ID for c.209A>G rs346822, c.886G>A rs2304445).

The uptake of riboflavin of three mutant *GPR172B* proteins was investigated along with the wild-type protein: p.Q70R, p.V296M and a third containing both p.Q70R and p.V296M. Results are shown in Figure 3. There were no significant differences between the rates of uptake of any of the three mutant proteins compared to the wild-type *GPR172B*.

A further possibility is the occurrence of a large deletion that would not be detectable by PCR and direct sequencing. We used a quantitative PCR (qPCR) strategy to search for heterozygous deletions in *GPR172B*, which revealed a partial deletion of the *GPR172B* gene in the riboflavin-deficient mother II:1. Figure 4 shows reduced copy numbers of exon 2 and both regions tested in exon 3, indicating that II:1 carries one intact and one truncated copy of *GPR172B*, whereas the infant III:1 has two intact copies. Array CGH using the Human Genome CGH Microarray 244A (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara CA) array did not detect any deletions in II:1 (data not shown), limiting the size of the deletion to a maximum of 1.9 kb. We were unable to define the exact position of the breakpoints of the deletion.

Additional screening of other family members at these loci revealed that infant III:1 was homozygous for p.Q70R and for p.V296M. Infant III:2 and the father (II:2) of the infants III:1 and III:2 and infant III:2 were homozygous for p.Q70R and heterozygous for p.V296M. The genotype and quantitative PCR results for the infant III:1 is consistent with our hypothesis that she has not inherited the deleterious allele from II:1. The maternal grandfather I:2 was heterozygous for p.Q70R and for p.V296M. The maternal grandmother I:1 was homozygous for p.Q70R and heterozygous for p.V296M. It was not possible to determine from which parental chromosome the partial deletion of *GPR172B* in II:1 has arisen. Screening also revealed a third common SNP at c.812C>T (p.A271V, rs346821), heterozygous in the father, the infant III:2 and the maternal grandmother. Genotype data are

summarized in Figure 1. Biochemical testing for the father, infant III:2 and maternal grandparents revealed normal plasma acylcarnitines and riboflavin levels.

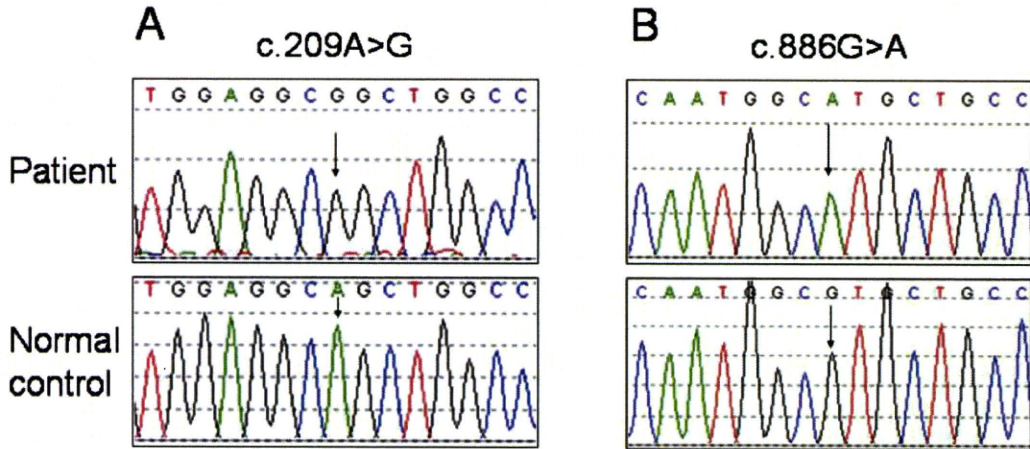


Figure 2. *GPR172B* Missense Mutations c.209A>G (p.Q70R) and c.886G>A (p.V296M). (A) Chromatograms showing the apparently homozygous change in the riboflavin-deficient mother II:1 from the genomic reference sequence (adenine, top panel) to guanine (bottom panel) at cDNA position c.209. (B) Chromatograms showing the apparently homozygous change in the riboflavin-deficient mother II:1 from the genomic reference sequence (guanine, top panel) to adenine (bottom panel) at cDNA position c.886.

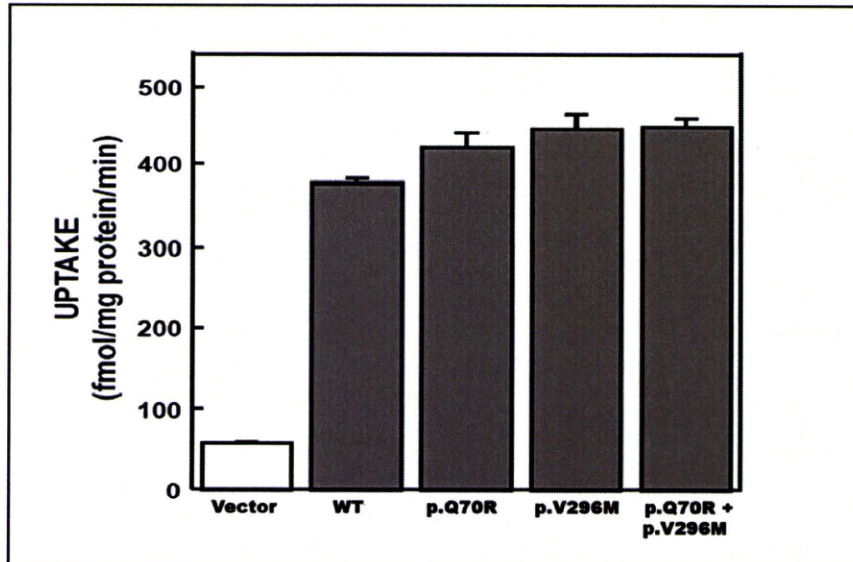


Figure 3. Uptake of Riboflavin by Variant *GPR172B* Proteins. Uptake of [³H]riboflavin (10 nM) in HEK293 cells transfected with pcDNA3.1/Hygro(+) plasmids containing wild-type (WT) or variant (p.Q70R alone, p.V296M alone, or combined p.Q70R and p.V296M) *GPR172B* cDNA. No significant differences were found between the wild-type protein and any of the variant proteins. Data are presented as mean +/- SE (n=3).

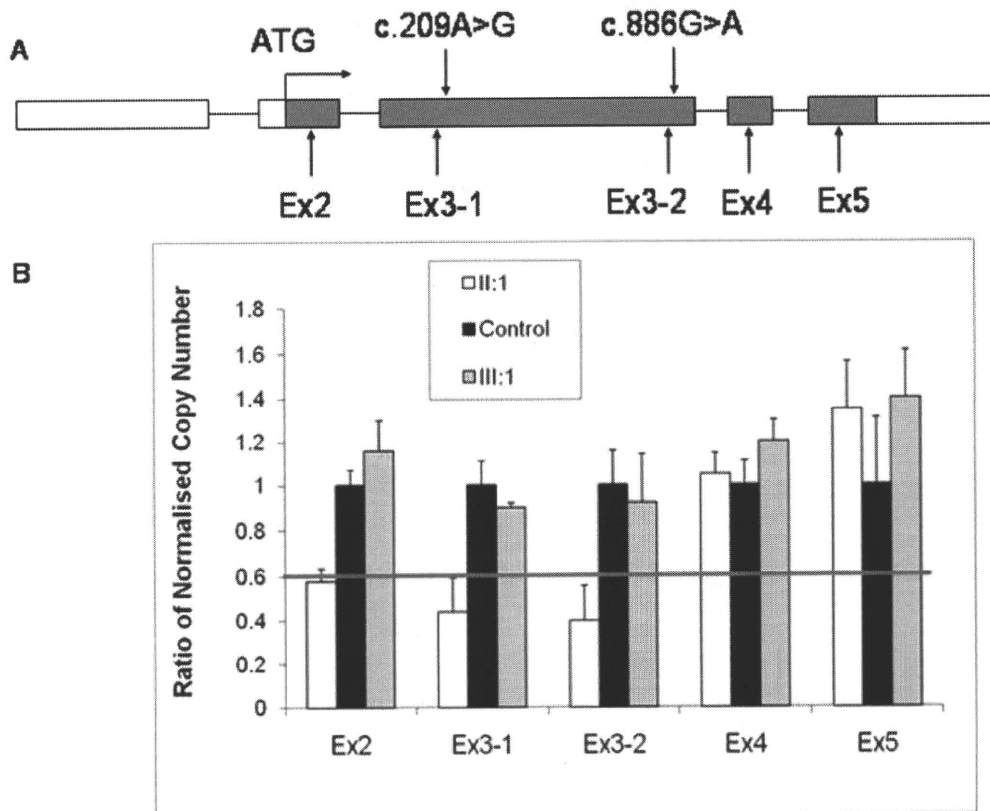


Figure 4. Structure of *GPR172B* and Relative Copy Number in II:1 and III:1. (A) Schematic diagram of the arrangement of exons in *GPR172B* on chromosome 17, showing the five exons (box), with the coding regions highlighted in grey and the untranslated regions in white. Introns are indicated by a line. The initiation ATG codon is marked as shown. The two missense sequence variations detected in the riboflavin-deficient mother (II:1) are indicated by arrows above the gene. The arrows below the gene mark the locations of the primers used for the quantitative PCR studies to identify copy number variations. (B) Normalised copy numbers for five regions of *GPR172B* in riboflavin-deficient mother (white bars) and infant (grey) relative to 3 controls from normal population (black). The threshold for a deletion is 0.6 (solid line). The riboflavin-deficient mother carried a deletion over the regions of Ex2, Ex3-1 and Ex3-2, whilst Ex4 and Ex5 showed normal copy numbers. The infant did not carry any deletions in this locus. Data are presented as means \pm SD ($n = 4$).

DISCUSSION

We hypothesized that a genetic defect in the riboflavin-deficient mother II:1 was responsible for the transient MADD-like phenotype observed in the infant III:1. Screening of the recently discovered riboflavin transporter *GPR172B* revealed a heterozygous deletion of exons 2 and 3. This deletion was identified only in the mother, but not the infant, in accordance with our hypothesis. The deletion is also *de novo*, inferred from the presence of heterozygous SNPs in both parents of II:1 at the same location. The initiation codon of *GPR172B* is located in exon 2, and therefore the deletion of exons 2 and 3 is likely to completely disrupt expression of *GPR172B* from that allele. We surmise that the haploinsufficiency is the cause of the mild riboflavin deficiency observed in II:1.

We also identified two missense mutations which are unlikely to have any pathogenic effects on riboflavin transport. The observed rates of riboflavin uptake of different alleles of *GPR172B*, expressed *in vitro*, suggest that neither the two missense mutations individually, p.Q70R or p.V296M, nor the combination of both p.Q70R and

p.V296M in *cis*, has any effect on the functionality of the GPR172B protein (Figure 3). In addition, *in silico* splicing prediction suggested that neither variation would affect exon splicing.

The frequencies of these alleles in normal populations lend further support to their non-pathogenicity. The genotypic frequency of homozygous p.Q70R is 94.5%, suggesting that the p.R70 is the predominant allele. Alignment of GPR172B to its homologues reveals that p.R70 is the ancestral allele (data not shown). Although the genotypic frequency of homozygous p.V296M is lower (only 1.8%), it is more common than the prevalence of MADD. The screening of the other family members (summarized in Figure 1) and biochemical testing also suggest that the missense mutations p.Q70R and p.V296M are not the genetic causes for riboflavin deficiency.

The second riboflavin transporter gene *C20orf54* (*RFT2*) was also screened, with eleven variations identified (Table 1). We excluded pathogenicity in the only nonsynonymous change identified (data not shown). Large genomic deletions were excluded by the presence of heterozygous variations throughout the length of the gene.

Table 1. Variations in *RFT2* identified in individual II:1

Systematic name ^a	Predicted protein effect ^b	Status ^c	Location	dbSNP entry ^d
c.-14_-6del9	p.M1?	Heterozygous	5' UTR	rs11467076
c.321C>T	p.=	Heterozygous	Exon 2	rs3746808
c.456C>T	p.=	Heterozygous	Exon 2	rs3746807
c.765C>T	p.=	Heterozygous	Exon 3	rs3746805
c.800C>T	p.P267L	Heterozygous	Exon 3	rs3746804
c.1073+21A>T	no change to splicing	Heterozygous	Intron 3	n/a
c.1197+106A>G	no change to splicing	Homozygous	Intron 4	rs6054589
c.1197+108C>T	no change to splicing	Heterozygous	Intron 4	rs3746801
c.1233T>C	p.=	Homozygous	Exon 5	rs910857
c.*16delC		Heterozygous	3' UTR	rs3215628

^a Systematic name designations based on GenBank reference sequence NM_033409.3. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequences, according to journal guidelines (www.hgvs.org/mutnomen).

^b Protein changes based on GenPept reference sequence NP_212134.3, with initiation codon numbered 1; splicing predictions by Berkeley Drosophila Genome Project Splice Site Predictor, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

^c Status in individual II:1

^d dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

In contrast to previous disorders involving riboflavin metabolism, the case we have reported is a dominant disorder with a very mild phenotype. None of the usual symptoms of riboflavin deficiency were observed in the mother II-2, and the deficiency was only detected biochemically. This may be in part due to a compensatory effect of at least one other riboflavin transporter, RFT2 (Yamamoto et al., 2009). *RFT2* is expressed predominantly in the small intestine, and is thought to be the primary transporter involved in riboflavin uptake (Yamamoto et al., 2009). The manifestation of the MADD-like phenotypes in only the infant can be attributed to the greater demand for nutrients in the growing fetus, as well as the high expression level of *GPR172B* in placenta (Yonezawa et al., 2008), suggesting that its main role may be placental transport of riboflavin.

To our knowledge, this is the first description of a genetic defect involving riboflavin uptake in humans. Although there are no similar parallels in human, the mouse ascorbic acid (vitamin C) transporter *Slc23a1* shows a similar gene dosage response, with heterozygote mice having a reduced level of ascorbic acid compared to wild-type, and with homozygous wildtype offspring of heterozygous females showing mild ascorbic acid deficiency (Sotiriou et al., 2002). Interestingly, supplementation of ascorbic acid of heterozygous females during pregnancy normalizes ascorbic acid levels in the newborn pups, except for those homozygous for the mutation (Sotiriou et al., 2002).

It is interesting to note that the second child, III:2, had no postnatal problems and testing confirmed her to be riboflavin replete. Her mother continued riboflavin supplementation throughout the pregnancy. We conclude that the maternal riboflavin supplementation protected the second infant from the consequences of riboflavin deficiency.

In conclusion, a deletion spanning exons 2 and 3 of the riboflavin transporter *GPR172B* was identified in the mother of the infant initially suspected of MADD. The deletion was not present in the infant, indicating that transient clinical and metabolic abnormalities in the infant were a consequence of maternal riboflavin deficiency. Genes involved in cellular riboflavin metabolism/transport have previously been suggested to be associated with riboflavin-responsive forms of MADD (Rhead et al., 1993; Vergani et al., 1999), but identification of mutations have until now been limited to *EFTA*, *EFTB* and *EFTDH*. For patients with MADD and without mutations in these three genes, screening of *GPR172B*, and indeed the second riboflavin transporter *RFT2*, should be considered.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the family described in this report who very kindly allowed us to obtain samples for testing on a number of occasions. This study was supported in part by a grant-in-aid for Scientific Research (KAKENHI) from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan.

WEB RESOURCES

Berkeley Drosophila Genome Project Splice Site Predictor, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
 dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
 GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

REFERENCES

- Beard SE, Spector EB, Seltzer WK, Frerman FE, Goodman SI. 1993. Mutations in electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO) in glutaric acidemia type II (GA2). *Clin Res* 41: 271A.
- Chiong MA, Sim KG, Carpenter K, Rhead WJ, Ho G, Olsen RKJ, Christodoulou J. 2007. Transient multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency in a newborn female cause by maternal riboflavin deficiency. *Mol Genet Metab* 92: 109-114.
- Colombo I, Finocchiaro G, Garavaglia B, Garbuglio N, Yamaguchi S, Frerman FE, Berra B, DiDonato S. 1994. Mutations and polymorphisms of the gene encoding the α -subunit of the electron transfer flavoprotein in three patients with glutaric acidemia type II. *Hum Mol Genet* 3: 429-435.
- Goodman SI, Binard RJ, Woontner MR, Frerman FE. 2002. Glutaric acidemia type II: gene structure and mutations of the electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO) gene. *Mol Genet Metab* 77: 86-90.
- Indo Y, Glassberg R, Yokota I, Tanaka K. 1991. Molecular characterization of variant alpha subunit of electron transfer flavoprotein in three patients with glutaric acidemia type II and identification of glycine substitution for valine-157 in the sequence of the precursor, producing an unstable mature protein in a patient. *Am J Hum Genet* 49: 575-580.
- Law L-K, Tang NLS, Hui J, Fung SLM, Ruiter J, Wanders RJA, Fok T-F, Lam CWK. 2009. Novel mutations in *ETFDH* gene in Chinese patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin Chim Acta* 404: 95-99.
- Olsen RKJ, Olpin SE, Andresen BS, Miedzybrodzka ZH, Pourfarzam M, Merinero B, Frerman FE, Beresford MW, Dean JCS, Cornelius N, Andersen O, Oldfors A, Holme E, Gregersen N, Turnbull DM, Morris AAM. 2007. *ETFDH* mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Brain* 130: 2045-2054.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Powers HJ. 2003. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr* 77: 1352-1360.

E1984 Ho et al.

- Rhead WJ, Roettger V, Marshali T, Amendt B. 1993. Multiple acyl-coenzyme A dehydrogenation disorder responsive to riboflavin: substrate oxidation, flavin metabolism, and flavoenzyme activities in fibroblasts. *Pediatr Res* 33: 129-135.
- Rhead WJ, Wolff JA, Lipson M, Falace P, Desai N, Fritchman K, Moon A, Sweetman L. 1987. Clinical and biochemical variation and family studies in the multiple acyl-CoA dehydrogenation disorders. *Pediatr Res* 21: 371-376.
- Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and biological programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press p 365-386.
- Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang Y, Chen A, Hoogstraten-Miller S, Miller GF, Kwon O, Levine M, Guttentag SH, Nussbaum RL. 2002. Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nature Medicine* 8: 514-517.
- Vergani L, Barile M, Angelini C, Burlina AB, Nijtmans L, Freda MP, Brizio C, Zerbetto E, Dabbeni-Sala F. 1999. Riboflavin therapy: Biochemical heterogeneity in two adult lipid storage myopathies. *Brain* 122: 2401-2411.
- Yamamoto S, Inoue K, Ohta K-y, Fukatsu R, Maeda J-y, Yoshida Y, Yuasa H. 2009. Identification and functional characterization of rat riboflavin transporter 2. *J Biochem* 145: 437-443.
- Yonezawa A, Masuda S, Katsura T, Inui K-i. 2008. Identification and functional characterization of a novel human and rat riboflavin transporter, RFT1. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C632-C641.

特集 | 高齢者の慢性腎臓病(CKD)

各論

8. 高齢者における薬物投与の注意

増田 智先

KEY WORD

- 薬剤性腎障害
- 薬物トランスポータ
- 血中濃度モニタリング
- 経上皮輸送
- 細胞毒性

SUMMARY

■薬物の体内動態は、吸収、分布、代謝、排泄の諸過程の総和として表され、高齢者においては諸過程それぞれについて加齢に伴う機能変化が認められる。腎臓は、肝臓と並んで生体異物の解毒臓器として重要な役割を担っており、高濃度の薬物に曝露される頻度も高い。したがって、腎指向性の薬物による毒性発現が高齢者において、より高リスクであるとも考えられる。本稿では、加齢に伴う薬物動態特性の変化ならびにいくつかの薬物を例に挙げて、実施診療における高齢者における薬物投与の注意点について概説する。

はじめに

高齢者における薬物治療の問題点としては、複数の疾患を抱え、複数の医療機関を受診し、結果的に複数の薬剤を処方されている場合が多いことが挙げられる。これらに伴って、薬理効果の類似した薬剤を複数の医療機関、診療科から処方されている場合や(処方薬の重複)、患者自身による服薬管理の低下(コンプライアンスの低下)、薬物間相互作用や有害事象の多発といった医療事故の危険性が高まる。特に、加齢とともに「腎機能」は低下傾向を示すため、若年齢者と同様の処方では高率に副作用発現につながる。本稿では、高齢者における薬物動態の特徴を述べ、抗MRSA薬と緑内障治療薬を例に投与方法の注意点を述べたい。

加齢による薬物動態の変化

薬物の吸収、分布、代謝、排泄を考える場合、これらの生理機能は加齢とともに低下傾向を示

す^{1,2)}。薬剤性腎障害は、直接的な腎上皮細胞に及ぼす細胞毒性とアレルギー性の間接性腎炎による場合が多い。腎機能の低下を呈する高齢者においては、加齢による薬物動態(吸収、分布、代謝、排泄)の変動の結果、薬物の腎排泄遅延に伴う薬剤性腎障害の発現リスクが高い。

1. 吸収

小腸上皮細胞における薬物の吸収過程では、薬物トランスポータと呼ばれる膜輸送タンパク質を介するイオン性薬物の能動的な取込み過程も存在するが、薬物の脂溶性など物理化学的性質に従った膜透過速度に依存する場合が多いことから、一般的に加齢による変動は小さいと考えられる。むしろ、経口投与された薬物の吸収速度は胃から小腸への移動速度にも依存する(胃内容物排泄速度)ため、高齢者における薬物吸収速度の低下は消化器の蠕動運動の相対的な低下を反映すると考えられる。

■ますだ さとひろ(京都大学医学部附属病院薬剤部)

2. 分布

血清アルブミンは、多くの薬物との可逆的な結合(タンパク結合)を介して薬効を保持する遊離型分率に影響を及ぼす。遊離型薬物は速やかに各組織に分布し、肝臓においては代謝を受けるため、アルブミン値が比較的低い高齢者CKD患者においては、肝代謝型薬物の血中濃度は上がりにくい傾向にある。例えば、経口抗凝固薬のワルファリンは血清中の95~98%がアルブミンと結合しており、ワルファリンの血中濃度はアルブミンの濃度によって大いに影響を受ける。タンパク結合の割合は、アルブミン値にはほとんど左右されないが、アルブミンがワルファリンのプールのような役割を担うために、血清中に存在するトータル濃度が結果的に低下する。したがって、遊離型(アルブミンに結合していない薬物)の薬効を保持したワルファリンの血中濃度を確保するには、用量を増加する必要がある。

3. 代謝

加齢に伴う薬物代謝能の低下も知られている。肝臓は薬物代謝の主要臓器と考えられているが、一部の薬物においては小腸上皮細胞における代謝の寄与を無視できない。すなわち、胃内容物排泄速度の低下は小腸上皮細胞における薬物代謝速度の低下につながる。

4. 排泄

高齢者において散見される頻尿という現象の一部は、機能ネフロン数の低下に伴う残存ネフロンによる代償的な過剰濾過(単一ネフロン当たりのGFR上昇)と尿の濃縮能の低下を反映すると考えられる³⁾。慢性腎臓病の進展によって、腎の予備能の低下が顕著になると、残存腎の代償反応が不足するため総合的な異物の腎排泄能は低下を来す。非ステロイド系消炎鎮痛薬(NS-AID)は、使用頻度の高い解熱鎮痛薬であるがプロスタグランジン合成抑制作用のため、腎血流減少による腎機能低下を生じやすい薬剤であり、その投与には慎重を要する。特に、筋肉量の少ない高齢者においては0.8~0.9 mg/dL程度

の血清クレアチニン値であっても、若年齢における早期腎不全状態と対応させて考えるのが安全である。

抗MRSA薬

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対して用いられる抗生物質であり、国内ではバンコマイシン、テイコプラニン、リネゾリドが使用されている。バンコマイシンとテイコプラニンについては特定薬物治療管理料の対象薬剤であることから、血中濃度モニタリング(TDM)をしながら用量調節することが推奨されている。両薬物の抗菌効果は、いずれも曝露量に依存することが確立されており、一般に次回投与直前の値(トラフ値)を指標にすることが多い⁴⁾。重症感染症の場合、バンコマイシンでは10~15 $\mu\text{g/mL}$ 、テイコプラニンでは15~20 $\mu\text{g/mL}$ を目標として用量が調節される。バンコマイシンの動態特性は、分布容積およびタンパク結合率が小さいことが挙げられる。特に20 $\mu\text{g/mL}$ 以上では、副作用である腎障害が高頻度にみられることから、血中濃度を上げすぎないようにコントロールすることに注意を要する。一方、テイコプラニンの動態特性は、バンコマイシンとは異なり分布容積およびタンパク結合が大きいことから、投与初期に十分な負荷をかけないと血中濃度が上がらない。したがって、薬剤性腎障害の予防を目的としたバンコマイシンのTDMとは対照的に、テイコプラニンのTDMは必要血中濃度上昇の確認という点で特徴的である。いずれの薬物も分子量が大きいため一般的な透析膜では除去されないが、中には20%程度除去される膜も存在する。特にバンコマイシンは組織分布した薬物の血中への戻り現象がみられるため、透析終了直後の血中濃度は不正確とされる。したがって、バンコマイシンの場合は透析終了後2時間程度経過の後に血中濃度を測定する。テイコプラニンは、タンパク結合率や組織移行性が高いため透析終了後の血中濃度変化はバンコマイシンほど大きくない。

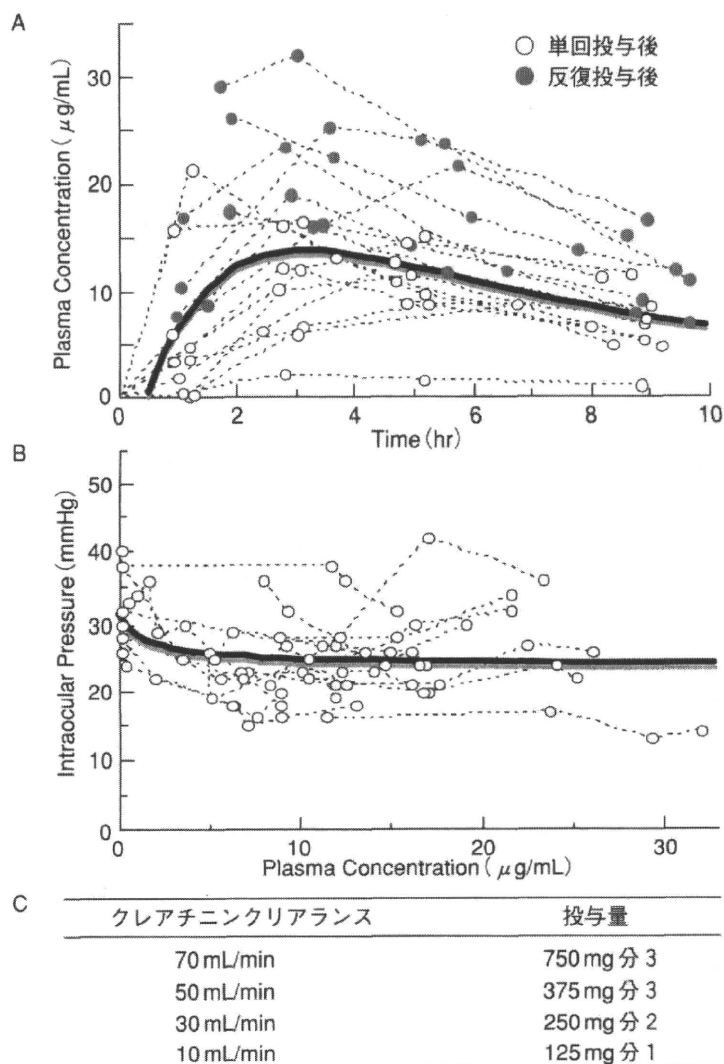


図1 アセタゾラミド投与患者における経口投与後の血漿中濃度時間プロファイル(A)、血漿中濃度と眼圧の関係(B)、クレアチンクリアランスを指標とした投与量ノモグラム(C) (文献5より引用)。

アセタゾラミド

炭酸脱水素酵素阻害薬であるアセタゾラミドは、腎排泄型の薬物であり腎近位尿細管上皮細胞の有機アニオントランスポーターを介して尿細管分泌を受ける。アセタゾラミドは、尿細管分泌を受けた後、近位尿細管における HCO_3^- の再吸収を抑制することから利尿作用を有するが、主として眼圧を下げる目的で緑内障の治療に用いられる。したがって、腎機能の低下した高齢

者においては、必然的にアセタゾラミドの体内貯留が亢進し、副作用発現の頻度が上がる。一般に、しびれ感や胃腸障害が現れる。京都大学では、眼科に入院しアセタゾラミドを投与された患者17名(平均年齢67.4歳)を対象に、薬物動態・薬効解析を進め、アセタゾラミドの血中濃度が $4 \mu\text{g/mL}$ あれば眼圧低下の効果の70%以上が見込めること、すなわちそれ以上の血中濃度上昇は薬効の増強にはほとんどつながらず、副作用発現の危険性のみ高まることを見出した⁵⁾。これらの結果を基に、図1のようなノモ

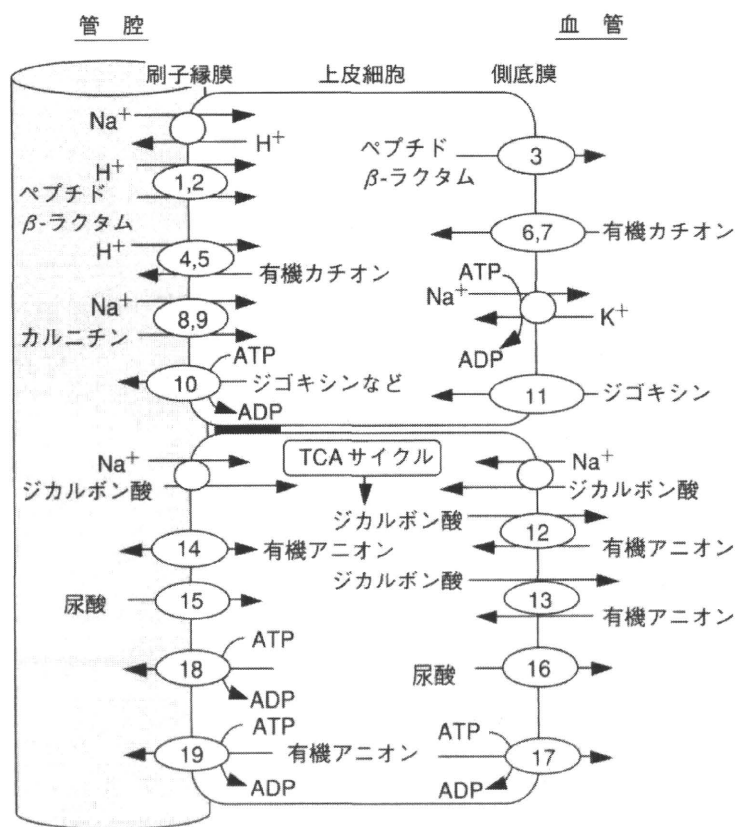


図2 ヒト腎近位尿細管上皮細胞に発現する薬物トランスポータ群
 1: PEPT1, 2: PEPT2, 3: 側底膜型ペプチドトランスポーター, 4: MATE1, 5: MATE2-K, 6: OCT2, 7: OCT3, 8: OCTN1, 9: OCTN2, 10: P-糖タンパク質 (MDR1), 11: OATP4C1, 12: OAT1, 13: OAT3, 14: OAT4, 15: URAT1, 16: URATV1, 17: MRP1, 18: MRP2, 19: MRP4

グラムを作製し、高齢者を含む腎機能低下患者に対するアセタゾラミドの用量調節に応用している。

腎薬物トランスポータ群

腎尿細管における薬物の分泌や再吸収は、尿細管上皮細胞を介して行われている。上皮細胞は、血管側の側底膜と尿細管管腔に面する刷子縁膜からなる極性細胞であり、それぞれの細胞膜には機能特性の異なるトランスポータが豊富に発現している(図2)⁶⁾。一部のアニオン性薬物については、腎組織中の有機アニオントランスポータ OAT3 の発現レベルと良好な相関関係を示し、クレアチニン値に注目した機能評価

では薬物の尿中排泄能を精密に予測できないことが示されている(図3)⁷⁾。このように生体にとって異物である薬物を認識し、積極的に尿中へと排泄するメカニズムは低分子異物に対する解毒機構として位置づけられ、様々な外因的に投与される化合物(異物)が薬物として機能するための必須条件としてとらえることができる。したがって、この解毒機能が低下した高齢者や慢性腎臓病患者においては、薬物に対する曝露量増大による副作用発現につながるため、薬物が毒物となる。すなわち、腎機能が若年齢および正常人とは異なる高齢者や慢性腎臓病患者を対象に薬物治療を実施する場合には、薬物個々の体内動態特性を理解した上で、用量および投与間隔の調節を行わなければならない。血清ク

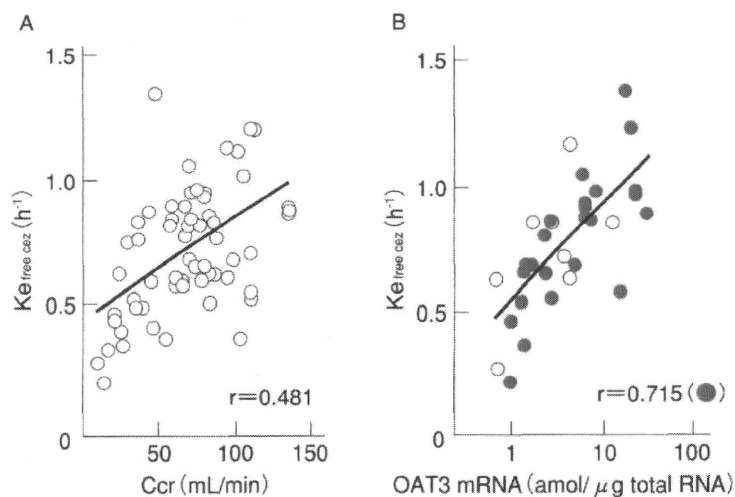


図3 腎生検採取後の抗生物質セファゾリン消失速度定数 (Ke^{free}_{CEZ}) に及ぼすクレアチンクリアランス (Ccr) (A) または腎組織中 OAT3 mRNA 発現レベル (B) の影響
B の○は二次性腎障害患者、●はメサンギウム増殖性糸球体腎炎など一次性腎障害患者を示す(文献7より引用)。

レアチニン値だけでなく複数の指標を用いた患者個々の腎機能を評価し、薬物投与による変化に注意しながら慎重に進めるべきである。

おわりに

加齢と腎による異物解毒能の変化は密接に関連しており、同じ程度の血清クレアチニン値の高齢者に対して、若年齢者と同じ量の薬物を投与しても血中濃度は高くなり、半減期は延長する傾向がある。また、予期せぬ反応も稀に認められる。したがって、症例個々の詳細な病態解析と、使用薬剤の動態特性、副作用ならびに薬剤の多剤併用による相互作用をよく理解して、薬剤の種類と量を決定することが重要である。

文 献

1) Perucca E : Age-related changes in pharmacoki-

netics : predictability and assessment methods. *Int Rev Neurobiol* **81** : 183-199, 2007.

2) 乾 賢一, 土井俊夫(編著) : 改訂3版 腎機能別薬剤使用マニュアル. じほう, 東京, 2010.

3) Brenner BM : Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol* **249** : F324-F337, 1985.

4) Roberts JA and Lipman J : Antibacterial dosing in intensive Care. *Clin Pharmacokinet* **45** : 775-773, 2006.

5) Yano I et al : Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetazolamide in patients with transient intraocular pressure elevation. *Eur J Clin Pharmacol* **54** : 63-68, 1998.

6) 乾 賢一 : 薬物トランスポーター活用ライブラリー—機能・輸送基質から創薬・臨床応用まで. 羊土社, 東京, 2009.

7) Sakurai Y et al : Expression levels of renal organic anion transporters (OATs) and their correlation with anionic drug excretion in patients with renal diseases. *Pharm Res* **21** : 61-67, 2004.

(執筆連絡先) 増田智先 〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学医学部附属病院薬剤部

3. 移植医療

3-1

移植医療における情報提供
——肝臓移植

増田 智先

MASUDA Satohiro

京都大学医学部附属病院薬剤部

はじめに

近年、末期肝不全患者に対する治療の選択肢として「肝移植治療」が取り入れられ、着実に成果をあげ社会的にも評価されている。2010年7月17日に施行された改正臓器移植法は、本人の意思のみではなく家族の同意のみによって脳死者からの臓器提供を可能にし、脳死ドナー由来の肝臓移植症例数の増加につながっている。一方、1989年島根医科大学における生体部分肝移植治療を皮切りに、わが国では末期肝不全患者に対する生体肝移植医療が発展してきた。最近では、年間約550例の生体肝移植術が実施され、5年生存率は小児症例（18歳未満）で83.2%、成人症例（18歳以上）では70.5%と報告されている（日本肝移植研究会2006年度¹⁾）。これらの成績には、外科学における術式の進歩だけでなく、免疫抑制薬を中心とした術後管理、術後感染の予防と治療の進歩もおおいに貢献してきた。

移植肝は、「非自己」であることから、その由来が一卵性双生児でないかぎり、拒絶反応を抑制するための免疫抑制薬を中心とした術後管理は必須である。タクロリムス（FK506）やシクロスポリンなどのカルシニューリン阻害薬は、これまでのアザチオプリンなどを用いて行われてきた術後管理の成績を大幅に改善するとともに、臓器移植治療そのものの社会的認知度の向上に大きく貢献してきた^{2),3)}。しかし、いずれの薬物も微量で強力な薬理効果を発揮する反面、狭い有効治療域を有することから、至適投与量設定を目的とした血中濃度モニタリング（TDM）が必要とされている。一方、頻回のTDMによる血中濃度コントロールが実施されているにもかかわらず、

予後に直接影響する拒絶反応の発現、感染症の合併や重篤な副作用（中枢性、腎毒性、高血糖、高カリウム血症）を回避できない場合がある^{4),5)}。最近、シクロスポリンの投与設計は、従来のトラフ（C₀）モニタリングではなく、服用4時間目までの吸収相を反映するAUC₀₋₄（area under the concentration-time curve）と良好に相関関係を示すことから、C₂（投与後2時間値）モニタリングが有用であるという報告もされてきており、薬物を中心とした免疫抑制療法は移植される臓器ならびに薬剤に応じて細分化されつつある⁶⁾。

肝臓移植など移植医療における薬剤師の役割は、①免疫抑制薬、術後合併症の予防・治療薬の調剤、②免疫抑制薬のTDM、③移植患者および生体ドナーの薬剤管理指導、④医師、看護師などへの情報提供、⑤院内特殊製剤、希少医薬品、未承認薬品などの薬品調達、⑥高カロリー輸液、水分補正用補液の無菌調製、⑦退院後のかかりつけ医師、かかりつけ薬局への情報提供と移植コーディネーターとの連携——など多岐にわたる。本稿では、生体肝移植術後の免疫抑制療法を中心に、術後の容態変化に応じた情報提供の重要性について、われわれの実地診療における取り組みも交え概説したい。

情報提供の対象

1. 患者とその家族

(1) 小児症例

先天性の胆道疾患を原疾患とする肝移植症例では、患児とその両親に対する情報提供が必要である。特に母親がドナーとなる場合には、自身の退院後そのまま患児の

付き添いとなる場合が多く、患児のみならずドナーでもある母親の術後経過にも注意を払う必要がある。実際に、生体ドナーの12.4%が胆汁瘻などの術後合併症を患うことも報じられており、対症療法として用いられるステロイド剤の情報提供は必須と考えられる⁷⁾。

(2) 成人症例

小児症例のドナーはほとんどが両親であるが、成人患者のドナーは配偶者の場合が多い。この場合、血液型不適合症例が増える傾向にあり、血液型一致/適合症例に比して術前からの十分な準備が必要となる。すなわち、血漿交換による抗A抗体、抗B抗体、IgMの物理的な除去に加えて、リツキシマブを用いたB細胞の排除が実施される。したがって、多様な免疫抑制薬それぞれについて、簡単にまとめた情報提供シートをもとに十分に説明することが求められる。場合によっては術中に脾臓を摘出するため、術後の感染対策について十分に情報提供を行うことが求められている。

2. 医師、看護師など医療従事者

肝臓移植患者およびその家族は、移植術後の集中治療室(ICU)管理を経て病棟にて加療、社会復帰を目指すためさまざまな職種が関わることになる。移植病棟担当の薬剤師は、患者およびその家族に対する薬物治療の継続的な説明と理解を促し、医師・看護師への同効薬や薬剤選択に関わる情報提供、血中濃度モニタリングが必要な薬物については採血タイミングのコンサルテーションなどを行うことが求められる。特に、退院後のかかりつけ医や薬局に対する情報提供は、移植コーディネーターを介して行われる場合が多いため、彼らに対する薬物の理解を促すという側面も重要である。同時に、当該施設において実施されてきた過去の症例分析に加えて、論文などで公表されている多施設の情報を考えあわせて、常に最も合理的な薬物治療を選択できる体制を維持することが肝要である。

タクロリムス、シクロスポリンの 血中濃度管理に関わる情報提供

1. カルシニューリン阻害薬の特徴

いずれもT細胞の脱リン酸化酵素であるカルシニュー

リンに対する特異的な阻害薬として、nuclear factor activated T cell (NFATC) の脱リン酸化を抑制し、T細胞の増殖を促すサイトカインであるインターロイキン(IL)-2の産生抑制を薬効としている。シクロスポリンは、細胞内受容体であるシクロフィリンと結合し、カルシニューリン阻害活性を示す。一方、タクロリムスは白血球内のFK506 binding protein 12kd (FKBP1A) と結合し、シクロスポリンと同様にカルシニューリン阻害活性を示す。いずれも化学構造上まったく異なるにもかかわらず、薬理効果の作用機序や薬物動態の制御因子は類似すると考えられてきた。また、いずれの薬物も副作用として腎毒性や中枢毒性を示す。

2. 薬物動態

いずれもバイオアベイラビリティに大きな個人差を示し、タクロリムスのそれは15~80%とされる。タクロリムスの体内動態には大きな個人差があるものの、トラフ(C₀)レベルの血中濃度がAUCと良好な相関関係を示すことから、TDMにおいてトラフモニタリングが推奨されている⁸⁾。一方、マイクロエマルジョン製剤が開発され、シクロスポリンの吸収特性は飛躍的に向上した。Mahalatiらは、従来のトラフモニタリングでは、シクロスポリンのAUCにおける個人差を反映できないことから、吸収相(AUC₀₋₄)を根拠に投与設計をすることが拒絶反応の抑制、副作用の予防に有効であると発表している⁹⁾。実地診療において複数の採血は、患者と医療従事者の双方に大きな負担を強いることから、最小の採血ポイントを見いだす試みが続けられ、AUC₀₋₄と最も相関性の高い服用2時間後の血中濃度値(C₂)のモニタリングが有用であると発表された。われわれは、周術期肝臓移植患者におけるシクロスポリンの1日1回投与法の有用性を発表しているが、そのなかでトラフレベルの継続的な高値は高確率で腎障害を引き起こすことを見いだしている¹⁰⁾。したがって、薬効の指標としてC₂モニタリング、副作用予防の指標としてトラフモニタリングを考慮するのが望ましいと考え、日常診療で活用している。しかしながら、最高血中濃度を示す経口投与後の時間(T_{max})の個人差も見いだされており、すべての患者でC₂値をモニタリングすることの妥当性については、一定

の考慮を要すると考えられる。

タクロリムスやシクロスポリンは、消化管粘膜における初回通過効果を経て、門脈を通じて引き続き肝臓における初回通過効果を受ける。これらの薬物は肝臓において、主として薬物代謝酵素チトクロムP4503A4 (CYP3A4) によって代謝されること、代謝物および未変化体薬物はmultidrug resistance 1 (MDR1) 遺伝子の産物であるP糖蛋白質 (Pgp) を介して胆汁中に排泄されることが知られている。また、CYP3A4やPgpは小腸粘膜にも発現しており、経口投与されたこれら薬物の吸収過程における代謝・排泄を媒介することによって、薬物の吸収障壁として協働的に機能することから、経口投与された免疫抑制薬の血中濃度を支配する重要な生体因子として位置づけられている^{10), 11)}。したがって、小腸のPgpやCYP3A4の同一患者における発現変動や個人差に関する情報は、これら免疫抑制薬の個別投与と設計を行ううえで有用な指標になると考えられる。最近では、CYP3A4の類縁体であるCYP3A5がタクロリムスの代謝に重要な役割を担うことも明らかにされ、これらの代謝酵素や薬物トランスポーターを中心とした薬物相互作用などが注目されている。

3. ファーマコゲノミクス

(1) 薬物動態制御因子の発現レベルと免疫抑制薬の体内動態における個人差の関係

生体肝移植手術では、胆道系の疾患を有する患者において、患者の小腸を一部用いて移植肝から流れ出る胆汁を通すための胆管再建を行う場合がある。われわれは、このときに切除される小腸組織片の一部を用いて、小腸上皮細胞に発現するPgpおよびCYP3A4の発現量を定量し、術後のタクロリムス体内動態との相関解析を行った。その結果、術後早期におけるタクロリムスの血中濃度/投与量 (C/D) 比は、小腸Pgpの発現レベルと良好な逆相関を示した¹¹⁾。一方、CYP3A4発現レベルとの相関関係は認められなかった。さらに、MDR1高発現群における平均C/D比はMDR1低発現群の約50%であり、一定のタクロリムス血中濃度を得るために、MDR1高発現群では、MDR1低発現群と比較して約2倍のタクロリムス投与量を必要とすることが明らかとなった。これらの

結果から、小腸Pgp発現量は、タクロリムス体内動態に大きく影響することが判明した。生体肝移植治療に用いられる移植肝は部分肝であり、そのサイズは移植後経日的に回復する。タクロリムスの体内動態についても経日的な全身クリアランスの増大を認めるが¹²⁾、術後初期における有用な投与量設定のための指標が不明であった。これらの結果から、術後初期においては移植された肝組織の機能レベルが低値であり、小腸Pgpの発現量が、特に術後初期段階における投与量設定マーカー、すなわちタクロリムス治療の際の個人間変動要因となると考えられる。

現在われわれは、小腸を用いた胆管再建の対象となる患者に対し、術時小腸組織を用いたMDR1 mRNA定量数値化とそれに基づくタクロリムスの初期投与量設定を継続しており、一定の成果を上げつつある。一方、良好な小腸Pgp発現量とタクロリムスのC/D比の逆相関関係は、術後10日以降乖離しはじめる。このことは、術後の経時的な肝機能の回復とそれに伴う肝クリアランスの増大に起因すると考えられ¹³⁾、術後2週間以降はPPKパラメータとベイジアン解析を中心に¹²⁾、タクロリムスの個別投与設計を行うことで補えるであろう。

小腸Pgp発現レベルは、生体肝移植直後におけるタクロリムス吸収特性の個人差を予測するうえで有用であるが、個体内における変動については不明であった。われわれは、原発性硬化性胆管炎により生体肝移植治療を受けた後、慢性拒絶反応による再移植を受けた患者において小腸Pgp発現量が初回移植術時に比して3.5倍上昇していることを見いだした。さらに、それによると考えられるシクロスポリンの著しい吸収不良と考えられる事象について報告した¹⁴⁾。本症例では、慢性拒絶反応に加え慢性的な胆管炎も合併しており、さまざまな臨床症状が小腸のPgp発現量を変化させること、肝機能が低下している場合には小腸Pgpを介した免疫抑制薬の小腸管腔中への排出活性の影響が、薬物の肝代謝よりも大きくなることが示唆された。

(2) MDR1遺伝子多型の影響

これまで述べてきたように、肝臓移植患者に対する小腸Pgp発現レベルは、術後のタクロリムスまたはシクロスポリンを中心とした免疫抑制療法を円滑に行ううえで

有用であると考えられた。近年、ジゴキシンなどPgpの基質について、その薬物動態がMDR1遺伝子多型によって影響を受けることが報告されている¹⁵⁾。すでに述べたように、生体肝移植患者における術後初期のタクロリムス体内動態の個人差は、小腸Pgpの発現レベルと良好な負の相関を示した。したがって、小腸Pgpの発現量に影響を与える遺伝子多型を見いだすことができれば、患者一人ひとりの小腸組織を採取・解析するまでもなく、初期投与量を設定することが可能になると考えられる。そこで、MDR1遺伝子多型のなかから主な10カ所について遺伝子多型解析を行った。そのなかで、小腸Pgpの発現量や機能に関係があると考えられているMDR1 mRNAの3435番目のCからTに変異する多型について解析を進めた。その結果、小腸Pgpの発現量や術後初期のタクロリムスのC/D比に対してC3435T多型は、有意な影響を示さなかった¹⁶⁾。生体肝移植患者においてMDR1遺伝子のC3435T多型が、小腸CYP3A4発現量や薬物体内動態とどのような関係にあるかについては、今後さらに詳細な解析を実施する必要があると考える。

(3) CYP3A5遺伝子多型の影響

CYP3A4のアイソフォームであるCYP3A5の多型性について、その発現はCYP3A5ゲノム上のイントロン3における一塩基多型 (SNP) が引き起こすCYP3A5 mRNAのスプライシング異常とそれに引き続く機能蛋白質の欠失に左右される。この遺伝子変異は欧米系コーカサス人種においては高い頻度で認められ、その結果、60~90%のコーカサス人種はCYP3A5機能を欠失する。一方、少なくとも50%以上のアフリカ系人種は野生型であるCYP3A5*1遺伝子多型を有し、機能蛋白質を発現するとされている。そして日本人を含むアジア系人種では、CYP3A5*1遺伝子多型の頻度は27.6%であり、コーカサス人種とアフリカ系人種の中間と理解できる^{17), 18)}。生体肝移植術を受けた患者については、小腸は患者自身の遺伝子型を反映するものの肝臓はドナー由来であり、両者の遺伝子型が異なることが想定される。したがって、肝臓移植患者においてはCYP3A5活性が肝臓のみ、あるいは小腸のみに認められる症例が存在する。そこで、移植術後の経過日数に伴うタクロリムス体内動態の個体内変動とCYP3A5遺伝子多型との関係について調べ

た結果、術直後では小腸における多型が、術後2週以降では移植肝の多型が強く影響を及ぼすことが明らかになっている。これらの検討により、移植肝/患者体重比(%), 術時の小腸MDR1 mRNA発現量, 患者小腸および移植肝CYP3A5遺伝子多型情報をタクロリムス動態影響因子として日常診療への応用を進めている¹⁹⁾。



薬物相互作用に関わる情報

タクロリムスやシクロスポリンは、PgpやCYP3A4/5の基質であるためさまざまな併用薬による薬物動態学上の影響を受ける。個々の事例については膨大な蓄積があると考えられるが、ここでは筆者らの経験を交えて若干紹介するととどめる。

(1) グレープフルーツジュース

果皮、果肉に含まれるフラノクマリン誘導体などが相互作用の原因物質とされており、経口投与された薬物の小腸粘膜における薬物代謝能を攪乱することによってシクロスポリンの血中濃度上昇を引き起こすことが知られている。われわれは、タクロリムスの血中濃度コントロールに難渋していた生体肝移植後の症例に対して、グレープフルーツジュースを適用した。患者自身の訴えによりグレープフルーツジュースの飲用を中止したが、遅れてタクロリムスの血中濃度上昇が観察され、飲用中止後も注意が必要であると考えられた²⁰⁾。一方、グレープフルーツジュースの飲用は免疫抑制薬の服用量の削減に加えて、血中濃度コントロールに難渋する際の一手法として考慮している。

(2) プロトンポンプ阻害薬

高度な侵襲を伴う肝移植術を受けた患者の多くは、ストレス性の潰瘍性消化管出血の予防を目的に、術直後からプロトンポンプ阻害薬が投与される。プロトンポンプ阻害薬として用いられるオメプラゾールの解毒機構は、80%をCYP2C19、20%をCYP3A4が担うとされる。一方、ランソプラゾールのそれはCYP2C19とCYP3A4がほぼ同程度の寄与を示すことが知られている²¹⁾。欧米系コーカサス人種に比して日本人を含むアジア系人種では、CYP2C19の機能欠損型を示す割合が約20%と高いこと、肝臓移植患者においては小腸と肝臓の遺伝子型が異なる

症例がしばしば存在することから、タクロリムスとの相互作用には遺伝子型が影響を及ぼすことが想定される。われわれは、タクロリムスとプロトンポンプ阻害薬の相互作用に、肝移植患者小腸およびドナー肝のCYP2C19とCYP3A5遺伝子多型の組み合わせが影響を及ぼすと想定し、89症例を対象に検討を行った。その結果、CYP2C19およびCYP3A5遺伝子多型が患者小腸およびドナー肝において同時に機能欠損型である症例において、オメプラゾール併用によってタクロリムスのC/D比が約3倍上昇することが判明した。一方、ランソプラゾールを併用した患者ではCYP2C19遺伝子多型の影響はほとんどみられず、むしろCYP3A5遺伝子多型の影響を強く受けることが示された。生体における消失経路のほとんどが代謝酵素非依存性であるラベプラゾールについては、遺伝子型によらずタクロリムスのC/D比は変動しないことも見いだされた²¹⁾。

(3) アゾール系抗真菌薬

アスペルギルス感染症の予防を目的として、 β -Dグルカン値の上昇ならびにアスペルギルス抗原陽性を呈した患者に対して、イトラコナゾールまたはボリコナゾールが用いられる。イトラコナゾールは強力なCYP3A4阻害作用を有しており、併用開始とともに必然的にタクロリムスやシクロスポリンの血中濃度上昇を引き起こす²²⁾。また、ボリコナゾールはその主要代謝酵素がCYP2C19とCYP3A4とされる²³⁾。すなわち、オメプラゾールの場合と同様に、ボリコナゾール併用によるタクロリムスやシクロスポリンの血中濃度上昇には、一部薬物代謝酵素の多型性も関わる可能性が考えられる。またボリコナゾールは、イトラコナゾールと同様に強くCYP3A4阻害作用を示すことから、薬物相互作用において広く注意を払う必要がある。

退院時および外来通院時における注意点

生体肝移植治療を受けた患者の多くは、退院後にかかりつけ医やかかりつけ薬局にフォローを受ける場合が多い。したがって、入院中に見いだされたさまざまなイベントを適切にまとめ、情報交換を通じて円滑な術後管理の継続を進める必要がある。特に、免疫抑制薬の血中濃

度管理については、どのタイミングで測定したのか、測定方法はどの方法なのかについても確認する必要がある。シクロスポリンおよびタクロリムスの血中濃度測定については、CLIA法 (chemiluminescence enzyme immunoassay) であるアボット社のARCHITECTシステム、ACMIA法 (affinity column-mediated immunoassay) であるシーメンス社のディメンションシステムで、用いる抗薬物抗体の特性の差異から、同一検体においても異なるデータが得られる場合が報じられている^{24), 25)}。免疫抑制薬の測定法など施設間における差異を明確にしたうえで、かかりつけ医との意思疎通を円滑にすることが望ましい。

おわりに

生体肝移植術後の免疫抑制療法は、過去15年以上にわたる経験を積み重ね、免疫抑制薬の体内動態制御機構の解明や薬物相互作用の分子メカニズム解明などを経て、ようやく落ち着きを見せてきたと考えられる。生体ドナーによる移植医療は、術前の詳細な検査などを通じて十分な準備のもと実施される。一方、最近の脳死ドナー由来の肝臓移植件数の増加は、臨機応変な対応が薬剤師にも求められる。すなわち、当該移植患者の情報を移植コーディネーターからいち早く入手し、術後の薬物治療全般にわたる計画について医師・看護師に適切にコンサルトを実施することが求められる。これまで生体肝移植症例の積み重ねによって蓄えられてきた経験が、今後増加することが想定される脳死肝移植治療にも活かされることを期待する。

■ 参考文献

- 1) 日本肝移植研究会: 肝移植症例登録報告 (第二報). 移植, 43: 45-55, 2008
- 2) Iwatsuki S, et al: Experience in 1,000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy; a survival report. Transplant Proc. 20: 498-504, 1988
- 3) Kelly D, et al: Tacrolimus and steroids versus ciclosporin microemulsion, steroids, and azathioprine in children undergoing liver transplantation; randomised European multicentre trial. Lancet, 364: 1054-1061, 2004

- 4) Pirsch JD, et al : A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation*, 63 : 977-983, 1997
- 5) Venkataramanan R, et al : Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*, 29 : 404-430, 1995
- 6) Levy GA : C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the Neoral formulation. *BioDrugs*, 15 : 279-290, 2001
- 7) Umeshita K, et al : Operative morbidity of living liver donors in Japan. *Lancet*, 362 : 687-690, 2003
- 8) Yasuhara M, et al : Pharmacokinetics and pharmacodynamics of FK 506 in pediatric patients receiving living-related donor liver transplantations. *Transplant Proc*, 27 : 1108-1110, 1995
- 9) Mahalati K, et al : Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve ; its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation*, 68 : 55-62, 1999
- 10) Fukudo M, et al : Cyclosporine exposure and calcineurin phosphatase activity in living-donor liver transplant patients : twice daily vs. once daily dosing. *Liver Transpl*, 12 : 292-300, 2006
- 11) Hashida T, et al : Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal MDR1 expression in recipients of living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther*. 69 : 308-316, 2001
- 12) Fukatsu S, et al : Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult recipients receiving living-donor liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol*, 57 : 479-484, 2001
- 13) Fukudo M, et al : Forecasting of blood tacrolimus concentrations based on the Bayesian method in adult patients receiving living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacokinet*, 42 : 1161-1178, 2003
- 14) Masuda S, et al : Enhanced expression of enterocyte P-glycoprotein depresses cyclosporine bioavailability in a recipient of living donor liver transplantation. *Liver Transpl*, 9 : 1108-1113, 2003
- 15) Cascorbi I, et al : Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 69 : 169-174, 2001
- 16) Goto M, et al : C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics*, 12 : 451-457, 2002
- 17) Hustert E, et al : The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*, 11 : 773-779, 2001
- 18) Kuehl P, et al : Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 27 : 383-391, 2001
- 19) Uesugi M, et al : Effect of intestinal CYP3A5 on post-operative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*, 16 : 119-127, 2006
- 20) Fukatsu S, et al : Delayed effect of grapefruit juice on pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in a living-donor liver transplant recipient. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21 : 122-125, 2006
- 21) Hosohata K, et al : Impact of intestinal CYP2C19 genotypes on the interaction between tacrolimus and omeprazole, but not lansoprazole, in adult living-donor liver transplant patients. *Drug Metab Dispos*, 37 : 821-826, 2009
- 22) Billaud EM, et al : Evidence for a pharmacokinetic interaction between itraconazole and tacrolimus in organ transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*, 46 : 271-272, 1998
- 23) Theuretzbacher U, et al : Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet*, 45 : 649-663, 2006
- 24) Wallemacq P, et al : Multi-site analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT tacrolimus assay. *Ther Drug Monit*, 31 : 198-204, 2009
- 25) Wallemacq P, et al : Multisite analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT cyclosporine assay. *Ther Drug Monit*, 32 : 145-151, 2010