

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6581117号

(P6581117)

(45) 発行日 令和1年9月25日 (2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日 (2019.9.6)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)** C 1 2 Q 1/6827 Z  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/09 Z

請求項の数 16 (全 80 頁)

(21) 出願番号	特願2016-570925 (P2016-570925)	(73) 特許権者	505006747
(86) (22) 出願日	平成27年2月23日 (2015.2.23)		チルドレンズ ホスピタル メディカル センター
(65) 公表番号	特表2017-512069 (P2017-512069A)		アメリカ合衆国 オハイオ 45229- 3039, シンシナティ, バーネット アベニュー 3333, インテレク チュアル プロパティ アンド ベンチャー デベロップメント
(43) 公表日	平成29年5月18日 (2017.5.18)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/017134	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開番号	W02015/127379		弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開日	平成27年8月27日 (2015.8.27)	(74) 代理人	100075270
審査請求日	平成30年2月23日 (2018.2.23)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	61/943, 944	(74) 代理人	100101373
(32) 優先日	平成26年2月24日 (2014.2.24)		弁理士 竹内 茂雄
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 個別化疼痛管理のための方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鎮痛に必要な患者のために鎮痛薬を選択するための方法であって、

少なくとも1つの遺伝的変異 ABCC3 rs4148412 について該患者の遺伝子型を決定又は受容し、

少なくとも1つの遺伝的変異についての患者の遺伝子型に基づいて、重篤なオピオイド誘発性有害事象の低リスク及び高リスクとして定義される2つのリスク群の1つに該患者を割り当て、そして

該患者の割り当てられたリスク群に基づいて該患者のために医薬品を選択する、ことを含んでなり、ここで、

該医薬品は、患者が高リスク群に割り当てられる場合は、非モルヒネオピオイド又は非オピオイド鎮痛薬より選択され、患者が低リスク群に割り当てられる場合は、モルヒネ又は別のオピオイド鎮痛薬より選択され、そして

変異は以下のようなリスク群に割り当てられ、重篤なオピオイド誘発性有害事象は、呼吸抑制 (RD) による回復期の滞在の延長 [prolong RD] である、前記方法：  
ABCC3 rs4148412 AA：高い、AG：高い、GG：低い [prolong RD]。

【請求項 2】

重篤なオピオイド誘発性有害事象のリスク状態にある患者を同定する方法であって、

少なくとも1つの遺伝的変異 ABCC3 rs4148412 について該患者の遺伝子

型を決定又は受容し、そして

遺伝的変異のパネルの少なくとも1つについての患者の遺伝子型に基づいて、重篤なオピオイド誘発性有害事象の低リスク及び高リスクとして定義される2つのリスク群の1つに該患者を割り当てる、

ことを含んでなり、ここで、

高リスク群に割り当てられる患者は、重篤なオピオイド誘発性有害事象のリスク状態にある患者として同定され、そして

変異は以下のようなリスク群に割り当てられ、重篤なオピオイド誘発性有害事象は、RDによる回復期の滞在の延長[prolong RD]である、前記方法：

ABCC3 rs4148412 AA：高い、AG：高い、GG：低い[prolong RD]。 10

【請求項3】

少なくとも1つの遺伝的変異が、OPRM1 rs1799971、ABCC3 rs739923、FAAH rs324420、及びABCB1 rs1045642から成る群より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む、請求項1又は2の方法。

【請求項4】

変異が以下のような2つのリスク群の1つに割り当てられ、重篤なオピオイド誘発性有害事象は、呼吸抑制[RD]、RDによる回復期の滞在の延長[prolong RD]、並びに術後の悪心及び嘔吐[PONV]より選択される、請求項3の方法：

OPRM1 rs1799971 GG：高い、AG：高い、AA：低い[RD]； 20

ABCC3 rs739923 GG：無い、AG：低い、AA：低い[prolong RD]；

FAAH rs324420 AA：高い、AC：高い、CC：低い[PONV]；及び  
ABCB1 rs1045642 TT：高い、TC：高い、CC：低い[RD]。

【請求項5】

PONVが難治性である、請求項4の方法。

【請求項6】

割り当てが、コンピュータに実装された方法によって実施され、場合により、コンピュータに実装された方法は：

a) 決定則、さらに場合により、それぞれのSNPが2つの共役二値変数を生じるように遺伝子型をエンコードすること；又は 30

b) それぞれのSNPが2つの共役二値変数を生じるように遺伝子型をエンコードすること、

を含む、請求項1～5のいずれかの方法。

【請求項7】

割り当てが、決定則を含んでなるコンピュータに実装された方法によって実施され、決定則は：

IF [(rs4148412=GG)] THEN RISK=NO (low)

ELSE RISK=YES (high)

([(rs4148412=GG)]であれば、リスク=無し(低い) 40

さもなければ、リスク=有り(高い))

を含む、請求項1又は2の方法。

【請求項8】

少なくとも1つの追加の非遺伝的要因を利用して、2つのリスク群の1つへの患者の割り当てを精緻化するか又は医薬品の用量を選択する、請求項1～7のいずれかの方法。

【請求項9】

少なくとも1つの追加の非遺伝的要因が、ジェンダー、人種、年齢、及び診断より選択される、請求項8の方法。

【請求項10】

患者が小児患者である、請求項1～9のいずれかの方法。

## 【請求項 11】

患者が白人家系である、請求項 1 ~ 10 のいずれかの方法。

## 【請求項 12】

患者が、低リスク群に割り当てられる白人家系の女兒患者であって、オピオイド医薬品が、総用量が  $0.15 \text{ mg/kg}$ 、 $0.2 \text{ mg/kg}$ 、又は  $0.275 \text{ mg/kg}$  を超えないように投与される、請求項 9 の方法。

## 【請求項 13】

患者の遺伝子型が、患者の遺伝子型を決定するのに使用される機器より直接受容される、請求項 1 ~ 12 のいずれかの方法。

## 【請求項 14】

患者の遺伝子型が、患者から生体試料を入手又は受容し、該試料から DNA を抽出し、そして該 DNA を分析してパネル中のそれぞれの遺伝的変異において患者の遺伝子型を決定する、ことを含んでなる方法によって決定され、

場合により、DNA は、ポリメラーゼ連鎖反応ベースの遺伝子型決定プラットフォームを使用して分析され、

さらに場合により、遺伝子型決定プラットフォームは、特定の遺伝的変異を増幅及び検出するための 5'ヌクレアーゼアッセイを利用し、

さらに場合により、生体試料は、血液試料及び口腔スワブより選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれかの方法。

## 【請求項 15】

鎮痛の必要な患者のために鎮痛薬を選択するための、コンピュータに実装された方法であって、

少なくとも 1 つの遺伝的変異について該患者の遺伝子型を決定又は受容し、

少なくとも 1 つのデータプロセッサによって、少なくとも 1 つの遺伝的変異についての患者の遺伝子型に基づいて、重篤なオピオイド誘発性有害事象の低リスク及び高リスクとして定義される 2 つのリスク群の 1 つに該患者を割り当て、そして

少なくとも 1 つのデータプロセッサによって、該患者の割り当てられたリスク群に基づいて該患者のために医薬品を選択する、

ことを含んでなり、ここで、

該医薬品は、患者が高リスク群に割り当てられる場合は、非モルヒネオピオイド又は他の鎮痛薬より選択され、患者が低リスク群に割り当てられる場合は、モルヒネ又はモルヒネ系オピオイドより選択され、

少なくとも 1 つの遺伝的変異は、ABCC3 rs4148412 を含み、そして

変異は以下のような 2 つのリスク群の 1 つに割り当てられ、重篤なオピオイド誘発性有害事象は、RD による回復期の滞在の延長 [prolong RD] である：

ABCC3 rs4148412 AA：高い、AG：高い、GG：低い [prolong RD]、

前記方法。

## 【請求項 16】

重篤なオピオイド誘発性有害事象のリスク状態にある患者を同定する、コンピュータに実装された方法であって：

少なくとも 1 つのデータプロセッサによって、少なくとも 1 つの遺伝的変異について該患者の遺伝子型を決定又は受容し；そして

少なくとも 1 つのデータプロセッサによって、遺伝的変異のパネルの少なくとも 1 つについての患者の遺伝子型に基づいて、重篤なオピオイド誘発性有害事象の低リスク及び高リスクとして定義される 2 つのリスク群の 1 つに該患者を割り当てる、

ことを含んでなり、ここで、

高リスク群に割り当てられる患者は、重篤なオピオイド誘発性有害事象のリスク状態にある患者として同定され、

少なくとも 1 つの遺伝的変異は、ABCC3 rs4148412 を含み、そして

10

20

30

40

50

変異は以下のような2つのリスク群の1つに割り当てられ、重篤なオピオイド誘発性有害事象は、RDによる回復期の滞在の延長[prolong RD]である：

ABCC3 rs4148412 AA：高い、AG：高い、GG：低い[prolong RD]、

前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

[1] 本出願は、その内容がその全体で参照により本明細書に組み込まれる、米国仮特許出願第61/943,944号(2014年2月24日出願)の利益を請求する。

【0002】

連邦政府支援研究に関する陳述

[2] 本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって授与されたRR026314及びHG006828の下での政府支援でなされた。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

[3] 本明細書に開示する本発明は、疼痛管理のための方法及び組成物に概して関する。

【背景技術】

【0004】

[4] 安全で有効な鎮痛は、重要な未充足の医療ニーズである。例えば、Sadhasivam and Chidambaram, Pharmacogenomics (2012) 13(15):1719-1740; Caldas, J. et al., Paediatr. Anaesth., 14:910-5 (2004); Duedahl, T. and Hansen, E., Paediatr. Anaesth., 17:756-74 (2007) を参照のこと。オピオイドは、術後疼痛を管理するのに通常使用される鎮痛薬である。有意な鎮痛力を有するものの、オピオイドはまた、治療指数が狭くて、例えば、呼吸抑制、縮腫、眠気、悪心、嘔吐、及び便秘が含まれる、いくつかの関連した有害作用を有する。モルヒネは、周術期の間に最もよく使用されるオピオイドである。オピオイド応答における患者間変動が予測不能で、モルヒネの治療指数が狭いために、モルヒネ誘発性呼吸抑制の発症率が高い。オピオイド誘発性呼吸抑制は、最も重篤なオピオイドの有害作用であって、50%近くの術後呼吸不全事象の原因である(Fecho K. et al., Therapeut. and Clin. Risk Mgmt. 5:961-8 (2009))。双子の研究により、オピオイド由来の呼吸抑制について有意な遺伝可能性(30%)が明らかにされた(Angst M. et al., Anesthesiology 117:22-37 (2012))。モルヒネに対する臨床応答における個体間変動性のほぼ50%が、疼痛機序とオピオイドの代謝、輸送、及び受容体シグナル伝達に關与する遺伝子中のSNPによって説明され得る。また、女性、人種、併存疾患のような非遺伝リスク因子と、CYP2D6変異のような他の遺伝リスク因子が寄与することについても、記載されてきた(Ramachandran S. et al., J. Clin. Anesth. 23:207-13 (2011); Niesters M. et al., British Journal of Anaesthesia 110:175-82 (2013))。オピオイドへの患者応答を予測するための努力は、その有害作用を最小にしながら疼痛緩和を最大にするように鎮痛を個別化することを臨床医に可能にするのに、多大な影響を及ぼすことができる。

【0005】

[5] 扁桃摘出術は、小児が体験するごく一般的で有意に有痛性の外科手技の1つである。毎年、米国だけで約530,000例の扁桃摘出術が実施されている(Erickson B. et al., Otolaryngol. Head Neck Surg., 140:894-901 (2009))。アメリカの小児のほぼ8人に1人に扁桃摘出術が施行される(Marcus, C. et al., The New England Journal of Medicine, 368:2366-76 (2013); Brouillette, R. The New England Journal of Medicine, 368:2428-9 (2013))。モルヒネは、入院状況にある小児に対して投与される上位1

10

20

30

40

50

0種の医薬品の1つであり(Lasky, T. et al., Clin. Ther., 34:720-727 (2012))、それは、小児における扁桃摘出術の間又は後での疼痛を管理するのに頻繁に使用されている。扁桃摘出術の適応症である閉塞性睡眠時無呼吸のために、小児は、呼吸抑制が含まれるオピオイドの中樞抑制作用に対して特に敏感になる(Brown, K. et al., Anesthesiology, 105:665-669 (2006))。扁桃摘出術後の死亡率についての最大規模の原報に関する最新の研究により、オピオイド疼痛医薬品の使用が多数の死亡と無酸素性脳障害の原因となることが実証された(Goldman, J. et al., The Laryngoscope 123:2544-53 (2013))。2013年2月、アメリカ食品医薬品局は、FDA Drug Safety Communication 2013において、死亡と重篤な有害作用に関する多数の報告に基づいて、CYP2D6遺伝子型と代謝状態に拘らず、扁桃摘出術を施行中の小児におけるコデイン(モルヒネのプロドラッグ)の使用を禁ずる警告を出した(アメリカ食品医薬品局、「小児におけるコデイン使用の安全性レビュー(最新版)；扁桃摘出術及び/又はアデノイド切除術後の使用に関する新たな枠組み警告と禁忌」)。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

[6] 本発明は、鎮痛の必要な患者のために鎮痛薬を選択するための方法と、重篤なオピオイド誘発性有害事象のリスク状態にある患者を同定するための方法を提供し、該方法は、少なくとも1つの遺伝的変異について該患者の遺伝子型を決定又は受容し、少なくとも1つの遺伝的変異についての患者の遺伝子型に少なくとも一部基づいて、重篤なオピオイド誘発性有害事象の2つのリスク群(即ち、低リスク群と高リスク群)の1つへ該患者を割り当てることを含んでなる。1つの態様において、該医薬品は、患者が高リスク群に割り当てられる場合は、非モルヒネオピオイド鎮痛薬又は非オピオイド鎮痛薬より選択されて、患者が低リスク群に割り当てられる場合は、モルヒネ又は別のオピオイド鎮痛薬より選択される。1つの態様において、非オピオイド鎮痛薬は、パラセタモール(アセトアミノフェンとも呼ばれる)と非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)から成る群より選択される。1つの態様において、モルヒネ以外のオピオイド鎮痛薬は、フェンタニル、ヒドロモルホン、コデイン、オキシコドン、ヒドロコドン、トラマドール、オンダンセトロン、デキサメタゾン、メタドン、アルフェンタニル、及びレミフェンタニルから成る群より選択される。1つの態様において、高リスク群へ割り当てられる患者は、重篤なオピオイド誘発性有害事象のリスク状態にある患者として同定される。

#### 【0007】

[7] 1つの態様において、少なくとも1つの遺伝的変異は、ABCB1 rs9282564、ABCC3 rs4148412、及びABCC3 kgp8560677から成る群より選択される少なくとも1つの変異を含む。1つの態様において、変異は、以下のような2つのリスク群の1つへ割り当てられて、重篤なオピオイド誘発性有害事象は、呼吸抑制[RD]、RDによる回復期の滞在の延長[prolong RD]、及び難治性PONVでもあり得る、術後の悪心及び嘔吐[PONV]より選択される：

[8] ABCB1 rs9282564 GG：高い、AG：高い、AA：低い[RD]；

[9] ABCC3 rs4148412 AA：高い、AG：高い、GG：低い[prolong RD]；及び

[10] ABCC3 kgp8560677 AA：高い、AG：高い、GG：低い[PONV]。

#### 【0008】

[11] 1つの態様において、少なくとも1つの遺伝的変異は、OPRM1 rs1799971、ABCC3 rs739923、FAAH rs324420、及びABCB1 rs1045642から成る群より選択される少なくとも1つの変異を含むか又はさらに含む。1つの態様において、その変異は、以下のような2つのリスク群の1つへ割り当てられて、重篤なオピオイド誘発性有害事象は、呼吸抑制[RD]、RDによる回復期の滞在の延長[prolong RD]、及び難治性PONVでもあり得る、術後の悪心及

10

20

30

40

50

び嘔吐 [ P O N V ] より選択される :

[12] O P R M 1 r s 1 7 9 9 9 7 1 G G : 高い、A G : 高い、A A : 低い [ R D ] ;

[13] A B C C 3 r s 7 3 9 9 2 3 G G : 無い、A G : 低い、A A : 低い [ p r o l o n g R D ] ;

[14] F A A H r s 3 2 4 4 2 0 A A : 高い、A C : 高い、C C : 低い [ P O N V ] ; 及び

[15] A B C B 1 r s 1 0 4 5 6 4 2 T T : 高い、T C : 高い、C C : 低い [ R D ] 。

【 0 0 0 9 】

[16] 1つの態様において、少なくとも1つの遺伝的変異は、F A A H r s 2 2 9 5 6 3 2、A B C B 1 r s 1 0 4 5 6 4 2、及びA D R B 2 r s 1 0 4 2 7 1 3から成る少なくとも3つの変異を含む。1つの態様において、変異は、以下のような2つのリスク群の1つへ割り当てられて、重篤なオピオイド誘発性有害事象は、呼吸抑制 [ R D ] である :

[17] F A A H r s 2 2 9 5 6 3 2 A A : 高い、C A 高い、C C : 低い ;

[18] A B C B 1 r s 1 0 4 5 6 4 2 T T : 高い、T C : 高い、C C : 低い ; 及び

[19] A D R B 2 r s 1 0 4 2 7 1 3 G G : 高い、G A 高い、A A : 低い。

【 0 0 1 0 】

[20] 上記に記載した方法のいずれにも従えば、割り当ては、コンピュータに実装された方法によって実施し得て、好ましくは実施される。1つの態様において、コンピュータに実装された方法は、決定則を含む。1つの態様において、コンピュータに実装された方法は、それぞれのS N Pが2つの共役 (coupled) 二値変数を生じるように遺伝子型をエンコードすることを含む。1つの態様において、割り当ては、決定則を含んでなるコンピュータに実装された方法によって実施されて、決定則は、

[21] IF [(rs9282564=AA) OR (rs4148412=GG) OR (kgp8560677=GG)] THEN RISK=NO (low)

( [ ( r s 9 2 8 2 5 6 4 = A A ) 又は ( r s 4 1 4 8 4 1 2 = G G ) 又は ( k g p 8 5 6 0 6 7 7 = G G ) ] であれば、リスク = 無し ( 低い ) )

[22] ELSE RISK=YES (high)

( さもなければ、リスク = 有り ( 高い ) ) を含む。

【 0 0 1 1 】

[23] 別の態様において、割り当ては、決定則を含んでなるコンピュータに実装された方法によって実施されて、決定則は、

[24] IF [(rs2295632=CC) OR (rs1045642=CC) OR (rs1042713=AA)] THEN RISK=NO (low)

( [ ( r s 2 2 9 5 6 3 2 = C C ) 又は ( r s 1 0 4 5 6 4 2 = C C ) 又は ( r s 1 0 4 2 7 1 3 = A A ) ] であれば、リスク = 無し ( 低い ) )

[25] ELSE RISK=YES (high)

( さもなければ、リスク = 有り ( 高い ) ) を含む。

【 0 0 1 2 】

[26] 上記に記載した方法の1つの態様では、少なくとも1つの追加の非遺伝的要因を利用して、2つのリスク群の1つへの患者の割り当てを精緻化する、及び/又は該患者と同じ年齢、体重、ジェンダー、及び民族性の被験者の標準用量とは異なる、医薬品の用量を選択する。1つの態様において、少なくとも1つの追加の非遺伝的要因は、ジェンダー、人種、年齢、及び診断より選択される。

【 0 0 1 3 】

[27] 上記に記載した方法のいずれにも従えば、1つの態様において、患者は、小児患者である。1つの態様において、患者は、白人家系である。

[28] 特別な態様において、患者は、低リスク群へ割り当てられる白人家系の女児患者

10

20

30

40

50

であって、オピオイド医薬品は、総用量が  $0.15 \text{ mg/kg}$ 、 $0.2 \text{ mg/kg}$ 、又は  $0.275 \text{ mg/kg}$  を超えないように投与される。

【0014】

[29] 1つの態様において、鎮痛薬を選択する方法は、低リスク群へ割り当てられる患者へのオピエート鎮痛薬の用量を調整することを含み、該方法は、オピオイド感受性に関連した少なくとも1つの追加の遺伝的変異についての患者の遺伝子型を決定又は受容することを含んでなる。1つの態様において、オピオイド感受性に関連した少なくとも1つの追加の遺伝的変異は、 $ABCB1 \text{ rs} 2229109$ である。この態様に従えば、オピエート鎮痛薬の用量は、 $ABCB1 \text{ rs} 2229109 \text{ CC}$  遺伝子型を有する患者では、標準用量より上方に調整されて、 $ABCB1 \text{ rs} 2229109 \text{ AA}$  遺伝子型を有する患者では、その用量は、下方へ調整される。1つの態様において、用量は、 $0.04 \text{ mg/kg}$  ずつ調整される。本発明で使用される標準用量は、患者の年齢、体重、ジェンダー、民族性、及び/又は診断の項目についての、FDA承認された製品ラベル上に示される用量を意味する。

【0015】

[30] 上記に記載した方法のいずれにも従えば、1つの態様において、患者の遺伝子型は、患者の遺伝子型を決定するのに使用される機器より直接受容される。1つの態様において、患者の遺伝子型は、患者より生体試料を入手又は受容し、該試料よりDNAを抽出し、そして該DNAを分析してパネル中のそれぞれの遺伝的変異で患者の遺伝子型を決定することを含んでなる方法によって決定される。1つの態様において、DNAは、ポリメラーゼ連鎖反応ベースの遺伝子型決定プラットフォームを使用して分析される。1つの態様において、遺伝子型決定プラットフォームは、特異的な遺伝的変異を増幅して検出するために5'ヌクレアーゼアッセイを利用する。1つの態様において、生体試料は、血液試料と口腔スワブより選択される。

【0016】

[31] 本発明はまた、診断キット又は「バイオアッセイキット」を提供する。1つの態様において、バイオアッセイキットは、以下の成分：(i)以下のSNP： $OPRM1 \text{ rs} 1799971$ 、 $ABCB1 \text{ rs} 9282564$ 、 $ABCB1 \text{ rs} 1045642$ 、及び $ADRB2 \text{ rs} 1042713$ のそれぞれを増幅するのに有効な配列特異的フォワードプライマーとリバースプライマーのセット；(ii)該SNPの異なるアレルへハイブリダイズするのにそれぞれ有効な2つの標識DNAプローブ；及び(iii)5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含む。1つの態様において、バイオアッセイキットは、以下の成分：(i) $ABCB1 \text{ rs} 9282564$ 、 $ABCC3 \text{ rs} 4148412$ 、及び $ABCC3 \text{ kpg} 8560677$ より選択される1以上の遺伝的変異を増幅するのに有効な配列特異的フォワードプライマーとリバースプライマーのセット；(ii)該SNPの異なるアレルへハイブリダイズするのにそれぞれ有効な2つの標識DNAプローブ；及び(iii)5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含む。1つの態様において、本発明のバイオアッセイキットは、 $OPRM1 \text{ rs} 1799971$ 、 $ABCC3 \text{ rs} 739923$ 、 $FAAH \text{ rs} 324420$ 、及び $ABCB1 \text{ rs} 1045642$ より選択される1以上の追加の遺伝的変異を増幅するのに有効な配列特異的フォワードプライマーとリバースプライマーのセットをさらに含む。1つの態様において、バイオアッセイキットは、以下の成分：(i) $FAAH \text{ rs} 2295632$ 、 $ABCB1 \text{ rs} 1045642$ 、及び $ADRB2 \text{ rs} 1042713$ から成る少なくとも3つの変異を増幅するのに有効な配列特異的フォワードプライマーとリバースプライマーのセット；(ii)該SNPの異なるアレルへハイブリダイズするのにそれぞれ有効な2つの標識DNAプローブ；及び(iii)5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含む。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】[32] 有意に関連する領域が同定された、 $FAAH$ の46.86 Mb ~ 46.8

10

20

30

40

50

9 Mbの拡大領域。11種のSNPについて試験した。PONV（上パネル）、呼吸抑制（中央パネル）、及び総モルヒネ量（mg/kg）（下パネル）と単一SNPの関連性についての $-\log 10$ （p値）を示す。

【図2】[33] アデノイド口蓋扁桃摘出術群の研究において観測されたOCT1、ABCC3、及びABCB1遺伝子型でのモルヒネクリアランスとM3G/M-6G生成クリアランスの変動。

【図3A】[34] 我々の研究において観測されたABCC3 rs4793665遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物（M3G/M6G）生成クリアランス（FCLM3G及びFCLM6G）における個体間変動。下パネルが脊椎手術からの結果を要約するのに対し、上パネルは、アデノイド口蓋扁桃摘出術施行の研究からの結果を要約した。ABCC3 rs4793665遺伝子型がx軸で変動している。Nonmem解析からの個々のモルヒネCL（Mor, CL）、M3G生成CL（M3G, FCL）、及びM6G生成CL（M6G, FCL）の経験的ベイズ推定値を左パネル、中央パネル、及び右パネルのy軸にそれぞれプロットする。

10

【図3B】[35] 我々の研究において観測されたABCC3 rs4148412遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物（M3G/M6G）生成クリアランス（FCLM3G及びFCLM6G）における個体間変動。下パネルが脊椎手術からの結果を要約するのに対し、上パネルは、アデノイド口蓋扁桃摘出術施行の研究からの結果を要約した。ABCC3 rs4148412遺伝子型がx軸で変動している。Nonmem解析からの個々のモルヒネCL（Mor, CL）、M3G生成CL（M3G, FCL）、及びM6G生成CL（M6G, FCL）の経験的ベイズ推定値を左パネル、中央パネル、及び右パネルのy軸にそれぞれプロットする。

20

【図4A】[36] 我々の研究において観測されたABCC3 rs739923遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物（M3G/M6G）生成クリアランス（FCLM3G及びFCLM6G）における個体間変動。下パネルが脊椎手術からの結果を要約するのに対し、上パネルは、アデノイド口蓋扁桃摘出術施行の研究からの結果を要約した。ABCC3 rs739923遺伝子型は、x軸で変動している。Nonmem解析からの個々のモルヒネCL（Mor, CL）、M3G生成CL（M3G, FCL）、及びM6G生成CL（M6G, FCL）の経験的ベイズ推定値を左パネル、中央パネル、及び右パネルのy軸にそれぞれプロットする。

30

【図4B】[37] 我々の研究において観測されたABCC3 kgp8560677遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物（M3G/M6G）生成クリアランス（FCLM3G及びFCLM6G）における個体間変動。下パネルが脊椎手術からの結果を要約するのに対し、上パネルは、アデノイド口蓋扁桃摘出術施行の研究からの結果を要約した。ABCC3 kgp8560677遺伝子型がx軸で変動している。Nonmem解析からの個々のモルヒネCL（Mor, CL）、M3G生成CL（M3G, FCL）、及びM6G生成CL（M6G, FCL）の経験的ベイズ推定値を左パネル、中央パネル、及び右パネルのy軸にそれぞれプロットする。

【図5】[38] 我々の研究において観測されたABCC3 rs4148412遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物（M3G/M6G）生成クリアランス（FCLM3G及びFCLM6G）における個体間変動。下パネルが脊椎手術からの結果を要約するのに対し、上パネルは、アデノイド口蓋扁桃摘出術施行の研究からの結果を要約した。ABCC3 rs4148412遺伝子型がx軸で変動している。Nonmem解析からの個々のモルヒネCL（Mor, CL）、M3G生成CL（M3G, FCL）、及びM6G生成CL（M6G, FCL）の経験的ベイズ推定値を左パネル、中央パネル、及び右パネルのy軸にそれぞれプロットする。

40

【図6】[39] 脊椎後方固定術を施行中の若年者におけるABCC3 rs733392と呼吸抑制の間の関連性の検証。ABCC3 SNP rs733392は、脊椎手術集団における呼吸抑制に関連して、扁桃摘出術集団で見出された関連性に一致した。ABCC3 rs733392とrs733923は、連鎖不平衡状態にある。つまり、いずれ

50



も扁桃摘出術集団における呼吸抑制に関連した。

【図 7】[40] これらのグラフは、術後 1 日目と 2 日目のモルヒネ誘発性呼吸抑制 (MIR D) と疼痛転帰に対する OPRM1 rs1799971 変異の影響を図解する。異なる遺伝子型での MIR D の発生率 (A) ; 異なる遺伝子型で MIR D のリスク (B) ; 異なる遺伝子型についての疼痛スコアと累積モルヒネ投与量 (C)。

【図 8】[41] 術後介入を必要とする患者の間で「高リスク」対「低リスク」サブタイプを同定するための SNP シグネチャーの使用。3 つの SNP を用いれば、このシグナルのほとんどを捉えることが可能である。各クラスターにおける RD 症例のパーセント (A) ; 患者を「低リスク層」対「高リスク層」へ分類するデシジョンツリー (決定木)。ここで「rs2295632\_\_A = No」は、A アレルの欠失、即ち CC を示して、「rs2295632 = Yes」は、CA 遺伝子型と AA 遺伝子型に対応する (B)。

10

【図 9】[42] 術後呼吸抑制と Human Illumina Omni5 GWAS チップからの ABC C 3 SNP の間の関連性。

【図 10】[43] 人種、性別、OSA (非 OSA : 左のボックスプロット ; OSA : 右のボックスプロット)、RD (非 RD : 左のボックスプロット ; RD : 右のボックスプロット) とモルヒネ用量の相関性。OSA 患者は、より低い全投与量を有して、モルヒネの用量増加につれて RD リスクが増加した。これらの結果には、274 名の患者のセットが含まれる。

【図 11】[44] このコソートダイアグラムは、試験参加者の本臨床試験での流れを図解する。有資格参加者、除外理由、及び登録患者について報告する。IRB = 施設内審査委員会。

20

【図 12 A】[45] 麻酔後回復室 (PACU) でのモルヒネ関連性の術後悪心及び嘔吐 (PONV) における性特異的な差異。PACU でのモルヒネ関連性 PONV における性特異的な差異。男児と女児に関して、X 軸に総モルヒネ用量をプロットして、Y 軸にモルヒネ関連性 PONV の確率をプロットする。PACU でのオピオイド関連性 PONV の全体発生率は、総モルヒネ用量が増加するにつれて、男児と比べて女児で相対的に高かった。

【図 12 B】麻酔後回復室 (PACU) でのモルヒネ関連性の術後悪心及び嘔吐 (PONV) における性特異的な差異。PACU での滞在延長をもたらすモルヒネ関連性 PONV における性特異的な差異。男児と女児に関して、X 軸に総モルヒネ用量をプロットして、Y 軸に PONV による PACU 滞在延長の確率をプロットする。PACU 滞在延長をもたらす PONV の確率は、総モルヒネ用量が増加するにつれて、男児と比べて女児で相対的に高かった。

30

【図 13 A】[46] PACU でのモルヒネ関連性の呼吸抑制 (RD) における性特異的な差異。PACU でのモルヒネ関連性 RD における性特異的な差異。男児と女児に関して、X 軸に総モルヒネ用量をプロットして、Y 軸にモルヒネ関連性 RD の確率をプロットする。PACU でのオピオイド関連性呼吸抑制の全体発生率は、総モルヒネ用量が増加するにつれて、男児と比べて女児で相対的に高かった。

【図 13 B】PACU でのモルヒネ関連性の呼吸抑制 (RD) における性特異的な差異。PACU での滞在延長をもたらすモルヒネ関連性 RD における性特異的な差異。男児と女児に関して、X 軸に総モルヒネ用量をプロットして、Y 軸に RD による PACU 滞在延長の確率をプロットする。PACU 滞在延長をもたらす RD の確率は、総モルヒネ用量が増加するにつれて、男児と比べて女児で相対的に高かった。

40

【図 14】[47] 低い総モルヒネ用量 ( $< 0.3 \text{ mg} / \text{kg}$ ) と高い総モルヒネ用量 ( $0.3 \text{ mg} / \text{kg}$ ) の間での、PACU の滞在期間における性特異的な差異。 $0.3 \text{ mg} / \text{kg}$  以上の総モルヒネを受容した白人女児は、 $< 0.3 \text{ mg} / \text{kg}$  未満の総モルヒネを受容した女児 ( $82.2 \pm 3.3$  分) より長く PACU に滞在した ( $111.1 \pm 6.6$  分)。 $0.3 \text{ mg} / \text{kg}$  未満のモルヒネを受容した男児が PACU に  $88.3 \pm 3.6$  分間滞在したのに対し、 $0.3 \text{ mg} / \text{kg}$  以上の総モルヒネを受容した男児は、PACU に  $99.7 \pm 6.4$  分間滞在した。白人女児では、低い総モルヒネ用量と高い総モルヒネ用量の間で約 30 分のより長い滞在があったので、PACU 滞在期間における差異は、臨床

50

的に有意であるが、年齢、体重、OSAの既往歴について補正した後では、統計学的有意差に達しなかった ( $p = 0.09$ )。高用量の女児におけるPACU滞在の延長が、男児におけるそれと統計学的有意差をもって異ならない ( $p = 0.09$ ) としても、性によって層別した解析では、高用量の女児が低用量の女児より長いPACU滞在を有した ( $p = 0.0002$ )。しかし男児では、この差異は、統計学的に有意でない ( $p = 0.11$ )。

【図15】[48] このコソートダイアグラムは、試験参加者の本臨床試験での流れを図解する。有資格参加者、除外理由、登録されて分析された患者について報告する。IRB = 施設内審査委員会。

【図16】[49] 5種のABCB1 SNPと臨床転帰の遺伝的関連性。加法モデルにおいて検定した単一SNP関連性の $-\log_{10}(p\text{値})$ をプロットした。基準線は、 $-\log_{10}(0.05\text{の}p\text{値})$ レベルを示す。この検定は、白人(A)、黒人(B)において、そして人種混合(C)で実施した。いずれの人種においても、ABCB1 SNPの $rs9282564$ は、常に、呼吸抑制によるPACU滞在延長と有意な関連性を有し；そしてABCB1 SNPの $rs2229109$ は、術後モルヒネ要求性に関連した。RD = 呼吸抑制；PACU = 麻酔後回復室；FLACC = 顔・脚・活動性・泣き声・機嫌の疼痛尺度。

【図17】[50] ABCB1遺伝子型と呼吸抑制のリスク。 $rs9282564$ がGG遺伝子型の小児は、GA遺伝子型の小児と比較して、PACUにおける滞在延長をもたらす呼吸抑制の確率が4.7倍高かった ( $95\%CI: 2.1 \sim 10.8, p = 0.0002$ )。 $rs9282564$ がAA遺伝子型の小児は、GA遺伝子型の小児と比較して、PACUにおける滞在延長をもたらす呼吸抑制の確率がより低かった [ $0.2 (0.1 \sim 0.5)$ ]。PACU = 麻酔後回復室。

【図18】[51] ABCB1輸送体の構造と非同義多型のマッピング。配列アライメント、二次構造、及びTMヘリックス予測 (<http://colonslashslash.sable.cchmc.org>) とマウス相同体の決定構造を使用して、3つの非同義SNPを21位 (未決定N末端断片内部の赤色部位)、400位 (第一のATP結合部位の近傍に示した青色の側鎖モデル)、及び893位 (TM10の細胞質延長部分内にあるマゼンタ色の部位) へマッピングする。この構造の残りでは、黄色を使用して疎水性残基を示し、赤色、橙色、及び褐色を使用して、荷電性残基と親水性残基をそれぞれ示す。膜は、青色の矩形として象徴的に示す。Polyview-3D (<http://colonslashslash.polyview.cchmc.org>) を使用して、この図を作成した。ABCB1 SNPの効果についての構造ベースの分析：分析したABCB1 SNPの中で、 $rs9282564$ 、 $rs2229109$ 、及び $rs2032582$ は非同義であって、それぞれ21位 (N対D)、400位 (S対N)、及び893位 (S対A対T) でアミノ酸配列の変化を生じる。赤色、マゼンタ色、及び青色の部位によって示されるように、影響を受ける3つの残基は、いずれも輸送体の細胞質「アーム」の1つの内部に位置している。上記部位の第一部位 (残基21) は、可撓性のN末端細胞質セグメントの内部に位置して、膜貫通ヘリックスのTM1がすぐに続く。このN末端ドメインは、きわめて可変性であって、多数の陽電荷残基を含有する。それは、輸送体の細胞質部分の残りとは、又はABCB1補因子と相互作用し得るが、この部位の機能上の役割への洞察を深めるには、さらなる配列決定とともに、そのような相互作用に関する構造データが必要であろう。一方、第二の変異 (青色の部位) の構造コンテキストに関する詳細な分析からは、それがABCB1機能の調節において直接的な役割を潜在的に担う可能性があること示唆されている。400位は、それ自体は進化的に保存されていないが、強固に保存された2つの芳香族残基が隣接して、FSYモチーフを形成する。これら2つの残基は、残基442 ~ 445 (RL YD) を含む、別の保存部位と接触する。これら2つの溶媒曝露ループは、一緒になって、残基427 ~ 434 (緑色で示される) が含まれるATP結合部位 (と直に接触してはいないが) の直ぐ近傍を構成する。これらのループは、ATP加水分解時にコンホメーション変化を受けると予測されるので、Asn400アレルは、これらの変化が構造全体に伝播する仕組みに影響を及ぼして、この輸送体の開閉に寄与

10

20

30

40

50

する可能性がある。残る2つのSNP（即ち、rs1128503とrs1045642）は、同義である。興味深いことに、これら2つのSNPは、互いだけでなく、非同義のrs2032582とも比較的強い連鎖状態にある（但し、他の2つの非同義SNP、rs9282564とrs2229109とは連鎖しない）。1000 Genomes CEU コホートでは、rs2032582と上記2つの非同義SNPの間に0.87と0.51の $r^2$ が観測される。これらSNPのいずれも、連鎖不平衡状態にある別の遺伝子多型の有効なマーカーになり得る（例えば、ABC B1タンパク質の発現に影響を及ぼす）。真の機能マーカーを確定するには、さらなる配列決定、構造研究、及び生化学研究が必要とされよう。

【図19】[52] 主成分1及び2の散布図。Golden Helix Software を使用して、218の家系情報マーカー（AIM）で主成分分析を実施した。研究コホートの自己申告性の人種（白人種を赤丸として示し、黒人種を青丸として示す）をHapMap プロジェクト由来の準拠集団（白三角印）とともにプロットした。準拠集団を以下の略語と異なる色の開き三角印によって以下のように示した：CEU = 北欧・西欧家系のユタ州住民；ASW = 米国南西部のアフリカ系；LWK = ウェブエ（ケニア）のルイヤ族；MKK = キニャワ（ケニア）のマサイ族；YRI = イバダン（ナイジェリア）のヨルバ族；CHD = コロラド州デンバー市の中国人；CHB = 北京（中国）の漢民族；JPT = 東京（日本）の日本人；及びGIH = テキサス州ヒューストンのグジャラティーインド人。

【図20】[53] 本明細書に記載するシステムの概略図。

【発明を実施するための形態】

【0018】

[54] 本発明は、鎮痛の必要な患者のために鎮痛薬を選択するための方法と、重篤なオピオイド誘発性有害事象のリスク状態にある患者を同定するための方法を提供し、該方法は、少なくとも1つの遺伝的変異について該患者の遺伝子型を決定又は受容し、少なくとも1つの遺伝的変異についての該患者の遺伝子型に少なくとも一部基づいて、重篤なオピオイド誘発性有害事象の2つのリスク群（即ち、低リスク群と高リスク群）の1つへ該患者を割り当てることを含んでなる。本発明はまた、鎮痛薬の必要な患者のためにその投与量を調整するための方法を提供し、該方法は、少なくとも1つの遺伝的変異について該患者の遺伝子型を決定又は受容し、本明細書に記載のように従って、医薬品の投与量を調整することを含んでなる。1つの態様において、鎮痛薬は、オピオイド鎮痛薬である。1つの態様において、オピオイド鎮痛薬は、モルヒネである。1つの側面において、本発明は、単独で、又は他の遺伝的変異又は非遺伝的要因との組合せにおいて、特別な遺伝子型を有する患者にとっての1以上のオピオイド関連の有害事象、又は不十分な疼痛制御、又はその両方のより高いリスクを示す遺伝的変異を提供する。1つの態様において、遺伝的変異は、一塩基多型（single nucleotide polymorphism）、又はSNPである。

【0019】

[55] 本発明はまた、有害事象のリスクを抑えるとともに鎮痛作用を高めるための個別化介入を提供するのに有用な臨床転帰の予測モデルを作成するために、本明細書に記載の遺伝的関連性を取り込んだデシジョンツリー及びアルゴリズムを提供する。これらのデシジョンツリー及びアルゴリズムはまた、オピオイド及び/又は鎮痛薬を投与することの効能と安全性について評価するために使用することができる。本明細書に記載のデシジョンツリー及びアルゴリズムの使用は、有害作用がほとんど無いより良好な鎮痛を提供することによって周術期臨床転帰を改善し得るだけでなく、PACU滞在延長、不十分な疼痛制御のための緊急室往診、オピオイド誘発性嘔吐に続く脱水症状、及び酸素と集中的な呼吸支援手段が求められる呼吸抑制を減らすことによって、経済的成果を高めることもできる。これらの臨床決定アルゴリズムは、個別対応のオピオイド選択及び投薬を可能にして、重篤な有害事象のリスクを最小にする一方で疼痛緩和を最大にすることができる。上記の知見は、オピオイドが求められる外科的又は非外科的疼痛のある成人及び小児へ外挿することができる。他に述べなければ、種々の用語は、関連技術分野の当業者による慣用の使用法に従って理解されたい。

## 【 0 0 2 0 】

[56] 「一塩基多型」又は「SNP」は、ゲノム中の特定位置にある単一ヌクレオチドが種の成員間で、又は個体中の対合染色体間で異なる場合に生じるDNA配列変異である。ほとんどのSNP多型は、2つのアレルを有する。各個体は、この場合、多型の1つのアレルについて同型接合である（即ち、個体の両方の染色体コピーは、そのSNP位置で同じヌクレオチドを有する）か又はその個体は、異型接合である（即ち、個体の2つの姉妹染色体は、異なるヌクレオチドを含有する）。本明細書において報告されるSNPの命名法は、それぞれ独自のSNPに対して国立生命工学情報センター（NCBI）によって割り当てられるような公式のレファレンスSNP（rs）ID識別タグを参照とするか、又は同定された遺伝子多型に関連する残基変化を明確にする。

10

## 【 0 0 2 1 】

[57] 本明細書に使用するように、「参照表（look-up table）」という用語は、あるデータ形式を別の形式へ関連付ける、又は1以上のデータ形式をそのデータが関連する、表現型又は形質のような予測結果へ関連付ける表である。例えば、参照表は、本明細書に記載のような遺伝的変異と、その変異を保有する個体が示す可能性があるか又はその変異を保有しない個体より示す可能性が高い特別な形質又は表現型（例、薬物に関連した有害事象のリスク、又は標準用量での不十分な薬物活性）との相関性を含み得る。参照表は、多次元的であり得る、即ち、それらは、多数の遺伝的変異（例、アレル、SNP、遺伝子欠失又は挿入）に関する情報を含有し得るか又はそれらは、多数の変異に関する情報を含有し得る；それらはまた、診断、ジェンダー、民族性、併存疾患、等のような患者特有の臨床データが含まれる他の非遺伝的要因、並びに、例えば、治療法と医薬品が含まれる治療オプションに関する情報を含有し得る。

20

## 【 0 0 2 2 】

[58] 本明細書に使用するように、「デシジョンツリー」という用語は、多変量データ解析及び分類化のための標準的な機械学習技術に関連する（Hastie, T., et al. 「The Elements of Statistical Learning（統計学習の要素）」第2版、スプリンガー（2009）；Witten, I. and Frank, E. 「Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques（データマイニング：実践的な機械学習ツール及び技術）」第2版、モーガン・カウフマン、サンフランシスコ（2005）；Hothorn, T. Journal of Computational and Graphical Statistics, 15:651-74（2010））。デシジョンツリーを使用して、決定支援システム用の容易に解釈可能で直観的な規則を導くことができる。

30

## 【 0 0 2 3 】

[59] 本発明の態様には、それぞれの遺伝的変異の診断又は予後マーカーとしての別々の使用、又は1つのパネルに組み合わせた2以上の変異の使用が含まれ、ここでそのパネルは、表現型（例、薬物誘発性又は薬物関連性の有害事象、又は薬物の標準用量での無効性）のより良好な予測因子である。

## 【 0 0 2 4 】

遺伝的変異と非遺伝的要因

[60] 本発明は、臨床決定支援のための方法、例えば、鎮痛薬の必要な患者に適したそれを選択するための方法、並びに重篤な薬物誘発性（又は薬物関連性）の有害事象のリスク状態にある患者を同定するための方法を提供する。該方法は、特別な遺伝的変異での患者の遺伝子型に関する情報を単独で、又は他の遺伝的要因又は（年齢、ジェンダー、民族性、併存疾患、診断、等のような）非遺伝的要因との組合せにおいて利用して、該患者に適した医薬品の選択を知らせて、重篤な薬物誘発性（又は薬物関連性）の有害事象のリスク状態にある患者、特に高リスク状態にある患者を同定する。

40

## 【 0 0 2 5 】

ATP結合カセットB1（ABC B1）（MCR1としても知られる）

[61] モルヒネの脳中濃度は、血液脳関門にあるP-糖タンパク質輸送体、ABC B1によって影響されける。ABC B1の遺伝子多型、3435 C>Tは、成人におけるモルヒネの血液脳関門輸送活性に関連付けられていて、同型接合のTT遺伝子型は、他の遺伝

50

子型より高いモルヒネの最大C S F濃度に関連していた (Meineke, I. et al., British Journal of Clinical Pharmacology, 54:592-603 (2002))。以前から、同じA B C B 1 遺伝子多型の3 4 3 5 C > Tは、別のオピオイド、フェンタニルを受容している韓国の成人での呼吸抑制増加と関連付けられてきた (Park, H. et al., Clin. Pharmacol. Ther., 81:539-546 (2007)) が、小児におけるモルヒネ誘発性呼吸抑制にA B C B 1 変異が関連しているかどうかは、実施例7において詳述される研究までは知られていなかった。その実施例において記載されるように、A B C B 1 r s 9 2 8 2 5 6 4 は、白人種とアフリカ系アメリカ人の小児の両方で、呼吸抑制によるP A C U 滞在の延長と強く関連していた (人種特異的な影響は検出されなかった)。このように、A B C B 1 r s 9 2 8 2 5 6 4 のG G 同型接合体は、病院滞在の延長をもたらす呼吸抑制のリスクを増加させた。本研究において観測された別の臨床的に重要な関連性は、A B C B 1 r s 2 2 2 9 1 0 9 と、P A C U でモルヒネの救助的投与を必要とした小児における術後モルヒネ用量との間にあった。A B C B 1 r s 2 2 2 9 1 0 9 のマイナーアレル (A) のそれぞれの追加コピーは、術後モルヒネ用量を0.04 mg / kg だけ減少させた (95% C I : 0.01 ~ 0.07)。従って、A B C B 1 r s 2 2 2 9 1 0 9 のC C 同型接合体では、術後の鎮痛介入が必要とされるときにより多くのモルヒネが要求され、一方A A 遺伝子型の小児は、モルヒネに対してより感受性が高く、モルヒネをさほど必要としない。

#### 【0026】

##### A B C C 3

[62] 胆管側多選択性有機アニオン輸送体2は、肝細胞の側基底面において主に発現されるA B C C 3 遺伝子によってエンコードされて (Scheffer, G., et al., Lab Invest., 82:193-201 (2002))、モルヒネの活性代謝産物、M 3 G 及びM 6 G が含まれるグルクロニドへの高親和性を有すると報告されたことがある (Zelcer, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102:7274-9 (2005))。- 2 1 1 C > T T T 遺伝子型の被験者では、C C 遺伝子型よりも、おそらくは該遺伝子のプロモーター領域への核内タンパク質の結合の低下により、肝臓組織におけるm R N A 発現が減少していると報告された (Lang, T. et al., Pharmacogenetics, 14:155-64 (2004); Gradhand, U. et al., Life Sci., 80:1490-4 (2007))。実施例2において詳しく記述されるように、A B C C 3 r s 4 7 9 3 6 6 5 でC / C 遺伝子型の小児は、モルヒネの2つの活性代謝産物の41 ~ 46% 高い生成を有し、この遺伝子型がモルヒネの薬物動態に対して有意な影響があることを示唆して、この遺伝子型が白人種においてより頻出するので、アフリカ系アメリカ人に比較して、白人種においてモルヒネクリアランスがより低くてモルヒネの有害作用の発生率がより高いことへの有り得る説明を提供する。実施例3において考察するように、A B C C 3 r s 4 7 9 3 6 6 5 の薬物動態効果を確認して、有意な薬物動態効果を有する別のA B C C 3 変異を同定した。このA B C C 3 r s 4 1 4 8 4 1 2 A A 遺伝子型も、他の遺伝子型と比べて、モルヒネの活性代謝産物のより高い生成に関連していることが見出された。加えて、有害事象 (例、術後の悪心及び嘔吐と、呼吸抑制による回復期の滞在の延長) が含まれる臨床転帰と総モルヒネ要求量に有意に関連しているものとして、いくつかのA B C C 3 変異が同定された。これらには、例えば、A B C C 3 r s 4 1 4 8 4 1 2、r s 7 3 9 9 2 3、及びk g p 8 5 6 0 6 7 7 が含まれる。他の変異についても実施例3に記載する。

#### 【0027】

##### 脂肪酸アミドヒドロラーゼ (F A A H)

[63] 脂肪酸アミドヒドロラーゼ (F A A H) は、アナンダミド異化の原因となる、内在性カンナビノイド系の一部である。アナンダミドは、嘔吐の神経修飾物質である。F A A H は、C B 1 受容体への内因性アゴニストとして、アナンダミドを分解する。カンナビノイド (canniboid) アゴニストは、C B 1 受容体を介して、オピオイドに抗する有効な鎮吐薬となる。実施例1において詳述されるように、白人種患者では、P O N V と3種のS N P (r s 3 2 4 4 2 0、r s 2 2 9 5 6 3 2、及びk g p 1 2 5 1 7 3 6 9) の間に、そして総モルヒネ用量とr s 6 4 7 3 2 5 の間に有意な関連が検出された。しかしながら

、アフリカ系アメリカ人の患者では、その転帰のいずれについても、名義的な関連しか検出されなかった。白人種では、F A A H r s 4 1 4 1 9 6 4、F A A H r s 3 7 6 6 2 4 6、F A A H r s 3 2 4 4 2 0、F A A H r s 2 2 9 5 6 3 2、及びF A A H k g p 1 2 5 1 7 3 6 9のマイナーアレルの1コピーが加わると、P O N Vの確率がそれぞれ2.42、2.42、2.73、2.61、及び2.61倍増加した（ $P < 0.0018$ ）。F A A H r s 3 2 4 4 2 0は、P O N Vと有意に関連して（ $P = 0.0053$ ）、マイナーアレル（A）の1コピーが加わると、オッズ比が2.0倍高まって；それは、P A C U滞在延長をもたらすP O N Vとも関連して（ $P = 0.0209$ ）、マイナーアレル（A）の1コピーが加わると、そのオッズ比が2.2倍高まった。実施例3において考察するように、F A A H r s 3 2 4 4 2 0のP O N Vとの強い関連性は、より大きな標本でさらに立証された。

10

#### 【0028】

##### オピオイド受容体 $\mu 1$ (OPRM1)

[64] その受容体をコードするオピオイド受容体  $\mu 1$  (OPRM1) 遺伝子は、疼痛知覚とオピオイドへの反応における変異の候補遺伝子であり得る (Mogil, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96:7744-51 (1999))。OPRM1 r s 1 7 9 9 9 7 1 (A 1 1 8 G) は、脳中での  $\mu$  受容体結合能の減少をもたらす (Ray, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108:9268-73 (2011))。G G 同型接合遺伝子型の成人保有者は、A A 変異体より2 ~ 4 倍まで高いモルヒネ用量を要求することができる。実施例4は、OPRM1 A A 遺伝子型の保有者では、A G / G G 遺伝子型の保有者に比較して、モルヒネ要求量がより少ないにもかかわらず、呼吸抑制のリスクがより高いこと、そしてさらに、G アレルの存在が保護効果を有することを示す、最初の前向き臨床試験について記載する。この関連性は、呼吸抑制のより高いリスク状態にある小児を同定することと、重篤な有害事象の見込みを最小にする一方で疼痛緩和を最大にするように小児におけるモルヒネの使用を個別化することにおいて有用である。

20

#### 【0029】

##### O C T 1

[65] モルヒネがO C T 1の基質であることについては十分に明らかにされているが、実施例2に記載されるその活性代謝産物の取込みにおけるO C T 1の役割は、これまで知られていなかった。実施例2に提示する結果は、モルヒネクリアランスに対するO C T 1の影響が現在推定されている16%よりずっと高い可能性があることを示し、同型接合の被験者は、モルヒネ投薬に反応して、より良好な鎮痛であるがより不良な有害反応を経験することを意味する。

30

#### 【0030】

##### 閉塞性睡眠時無呼吸 (OSA)

[66] 閉塞性睡眠時無呼吸 (OSA) は、アフリカ系アメリカ人の患者の間で大きな比率を占めていて、彼らは、不十分な疼痛緩和のより高いリスク状態にある可能性がより高い。故に、OSAと人種は、重要な共変数を代表するが、それがさらに注目されるのは、A D R B 2とF A A Hの遺伝子多型を使用して、比較的正確に人種を予測することができる（約80%の予測精度）という知見による。OSAそれ自体も、ほとんど理解されていないものの、比較的強い遺伝要素を有するようである (Larkin, E. et al. Resp. Crit. Care Med. 182:947-53 (2010))。OSAは、扁桃摘出術の適応症でもある。

40

#### 【0031】

##### ジェンダー

[67] いくつかの前臨床試験と実験研究によって、齧歯動物の雄と雌の間での疼痛調節における差異と、そして成人においても、女性での疼痛とオピオイド感受性の増加に関連した差異が示されているが、術後疼痛と性差について検討した臨床試験結果は、一致していない。さらに、成人試験に由来する、オピオイド鎮痛薬に関連した性差のデータは、小児の臨床診療を確実に導くのに十分ではない (Hurley R. and Adams M. Anesth. Analg., 107:309-17 (2008))。実施例6において詳しく考察するように、術後の悪心及び嘔吐 (

50

PONV,  $p = 0.001$ )とPONVによるPACU滞在の延長( $p = 0.010$ )では、有意な性特異的な影響が検出された。女兒では、総モルヒネ用量の増加に伴ってこれらの有害作用を有する確率が高かったのである。

#### 【0032】

##### マーカーとハプロタイプの評価

[68] 特異的な多型マーカー及び/又はハプロタイプを検出することは、当該技術分野で知られている、多型部位で配列を検出するための方法によって達成することができる。例えば、PCR、LCR、ネステッド(nested)PCR、及び核酸増幅用の他の技術を利用して、蛍光ベースの技術のような、SNP及び/又はマイクロサテライトマーカーの存在について遺伝子型決定するための標準技術を使用することができる(例えば、Chen, X. et al., Genome Res. 9(5): 492-98 (1999); Kutyavin et al., Nucleic Acid Res. 34:e128 (2006))。SNP遺伝子型決定のために利用可能な特定の市販の手法には、限定されないが、TaqMan 遺伝子型決定アッセイとSNPlex プラットフォーム(アプライド・バイオシステムズ)、ゲル電気泳動法(アプライド・バイオシステムズ)、質量分析法(例、Sequenom 製の MassARRAY システム)、ミニ配列決定法、リアルタイムPCR、Bio-Plex システム(BioRad)、CEQ 及び SNPstream システム(ベックマン)、アレイハイブリダイゼーション技術(例、Affymetrix GeneChip; Perlegen)、BeadArray Technologies(例、Illumina GoldenGate 及び Infinium アッセイ)、アレイタグ技術(例、Parallel)、及びエンドヌクレアーゼベースの蛍光ハイブリダイゼーション技術(Invader; ThirdWave)が含まれる。このように、当業者に利用可能な上記又は他の方法の使用によって、多型マーカー(マイクロサテライト、SNPが含まれる)又は他の種類の多型マーカーで1以上のアレルを同定することができる。

#### 【0033】

[69] ある疾患又は形質への罹患性が増加している(即ち、リスク増加)状態にある個体とは、その中で、その疾患又は形質への罹患性増加(リスク増加)を付与する1以上の多型マーカー又はハプロタイプで、少なくとも1つの特異的なアレル(即ち、リスク状態マーカーのアレル又はハプロタイプ)が同定される個体である。このリスク状態マーカー又はハプロタイプは、該疾患のリスク増加(罹患性増加)を付与するものである。いくつかの態様では、マーカー又はハプロタイプと関連する有意性が相対リスク(RR)によって測定される。いくつかの態様では、マーカー又はハプロタイプと関連する有意性がオッズ比(OR)によって測定される。さらなる態様において、その有意性は、百分率によって測定される。

#### 【0034】

[70] 本明細書に記載されるリスク状態の多型マーカー又はハプロタイプとは、少なくとも1つのマーカー又はハプロタイプの少なくとも1つのアレルが、ある形質についてリスク状態にある、例えば、鎮痛薬、特にオピオイドからの、特に術後疼痛のための治療の間の不十分な疼痛緩和又は有害作用(例、難治性であり得る、術後の悪心及び嘔吐、呼吸抑制、及び呼吸抑制による回復期の滞在の延長)のリスク状態にある個体において、比較群(対照)におけるその存在の頻度に比べて、より頻繁に存在する場合のものであって、そのマーカー又はハプロタイプの存在は、その形質への罹患性の指標となる。いくつかの態様において、対照群は、集団標本、即ち、一般集団からのランダム標本であり得る。いくつかの態様において、対照群は、1以上の追加の非遺伝リスク因子、例えば、ジェンダー、年齢、及び人種の非存在を特徴とする。いくつかの態様において、リスク因子は、少なくとも1つの追加の遺伝リスク因子を含む。

#### 【0035】

[71] 本発明のいくつかの態様では、ある形質への罹患性が減少している(即ち、リスク減少)状態にある個体とは、その中で、罹患性減少を付与する1以上の多型マーカー又はハプロタイプで、少なくとも1つの特異的なアレルが同定される個人である。リスク減少を付与するマーカーアレル及び/又はハプロタイプは、保護的であるとも言われる。いくつかの態様において、保護的なマーカー又はハプロタイプとは、ある形質の有意なリス

ク（又は罹患性）減少を付与するものである。

【 0 0 3 6 】

[72] 当業者は、研究されている集団に2つのアレルが存在するマーカー（SNPのような）では、その集団中で1つのアレルがある形質の個体群において、対照と比較して増加した頻度で見出される場合、そのマーカーの他のアレルは、その形質の個体群において、対照と比較して減少した頻度で見出されるであろうと理解されよう。そのような場合、そのマーカーの一方のアレル（その形質のある個体において増加した頻度で見出されるもの）がリスク状態アレルとなるのに対し、他のアレルは、保護的なアレルとなろう。

【 0 0 3 7 】

[73] ある形質に関連した遺伝的変異を単独で使用して、所与の遺伝子型について、その疾患のリスクを予測することができる。SNPのような二対立遺伝子マーカーでは、3つの可能な遺伝子型がある：リスク状態変異についての同型接合体、異型接合体、及びリスク状態変異の非保有者。多数の遺伝子座での変異に関連したリスクを使用して、全リスクを推定することができる。多重SNP変異では、 $k$ 通りの可能な遺伝子型がある（ $k = 3^n \times 2^p$ ；ここで $n$ は、常染色体遺伝子座の数であって、 $p$ は、生殖染色体（性染色体）遺伝子座の数である。複数のリスク変異についての全リスク評価の計算は、典型的には、異なる遺伝的変異の相対リスクを掛け合わせると仮定する、即ち、特別な遺伝子型の組合せに関連した全リスク（例、RR又はOR）は、各遺伝子座での遺伝子型についてのリスク値の積である。提示されるリスクがある個人又はある個人に特異的な遺伝子型についての、ジェンダーと民族性が同じである準拠集団と比較した相対リスクであれば、複合リスクとは、遺伝子座特異的なリスク値の積であって、それはまた、その集団と比較した全リスク推定値に対応する。ある個人のリスクがリスク状態アレルの非保有者との比較に基づくならば、複合リスクは、所与の遺伝子型の組合せがすべての遺伝子座にある個人を、その遺伝子座のどこでもリスク変異を保有しない個体群と比較する推定値に対応する。リスク状態変異の非保有者の群は、最低の推定リスクを有して、それ自身（即ち、非保有者）と比較して1.0の複合リスクを有するが、集団と比較すれば、1.0未満の全リスクを有する。明記すべきことは、非保有者の群が、特に多数の遺伝子座では、きわめて小さくなり得る可能性が高くて、その場合、その妥当性もそれに応じて小さくなることである。

【 0 0 3 8 】

[74] この乗法モデルは、通常は、複合形質のデータを十分合理的に適合させる節減（parsimonious）モデルである。多数性からの逸脱については、通常疾患についての共通変異の状況ではほとんど記載されてこなかったし、報告されたとしても、通常は示唆的なものでしかない。これは、遺伝子座間の統計学的な相互作用を証明することを可能にするのに、きわめて大きな標本サイズが典型的には必要とされるからである。

【 0 0 3 9 】

[75] 例えば、前立腺癌に関連していると記載されてきた全部で8種の変異について考察しよう（Gudmundsson, et al., Nat Genet 39:631-7 (2007); Gudmundsson, et al., Nat Genet 39:977-83 (2007); Yeager, et al., Nat Genet 39:645-49 (2007); Amundadottir, et al., Nat Genet 38:652-8 (2006); Haiman, et al., Nat Genet 39:638-44 (2007)）。これら遺伝子座の7つは常染色体上にあって、残る遺伝子座は、X染色体上にある。それで、遺伝子型の組合せの理論的な総数は、 $3^7 \times 2^1 = 4374$ である。この遺伝子型群のいくつかは、ごく稀であるがそれでも可能であって、これらを全リスク評価のために考慮することができる。多重遺伝的変異の場合に適用される乗法モデルは、遺伝的変異が「環境」因子と明白には相関しないと仮定すれば、非遺伝リスク変異と組み合わせても、正当であり得る。言い換えると、遺伝リスク状態変異と非遺伝リスク状態変異については、非遺伝リスク因子と遺伝リスク因子が相互作用しないと仮定して、乗法モデルの下で評価して、複合リスクを推定することができる。

【 0 0 4 0 】

[76] 同じ定量的アプローチを使用して、本明細書に開示するマーカー及び/又は遺伝



子多型、又はそれらと連鎖不平衡状態にあるマーカーのいずれの組合せも含まれる、有害な麻酔作用に関連した複数の変異に関連する複合又は全リスクについて評価することができる。

#### 【0041】

##### リスク計算

[77] 全遺伝リスクを計算するモデルの創出には、2つの工程が関与する：i) 単一遺伝的変異のオッズ比を相対リスクへ変換すること、及びii) 異なる遺伝子座における多重変異由来のリスクを単一の相対リスク値へ組み合わせること。

#### 【0042】

##### オッズ比からリスクを導くこと

[78] 権威のある雑誌においてこれまで公表されてきた複雑な疾患又は形質についてのほとんどの遺伝子探索研究では、その後ろ向き設定による症例対照デザインが利用されてきた。これらの研究では、症例（特定の疾患状態を有する人々）と対照個体の選択セットを標本にして遺伝子型決定する。その関心は、症例と対照におけるその頻度が有意に異なる遺伝的変異（アレル）にある。

#### 【0043】

[79] その結果は、典型的には、罹患群と対照群におけるリスク変異（保有者）対非リスク変異（非保有者）の割合（確率）の間の比について記載する、オッズ比で報告される。即ち、罹患状態に対する条件付き確率で表現される：

$$OR = (Pr(c|A) / Pr(nc|A)) / (Pr(c|C) / Pr(nc|C))$$

[80] いくつかの態様において、特定の疾患又は形質についての絶対リスクは、決定されているもの、即ち、該疾患になるリスク変異を保有する個体の割合、又は言い換えると、該疾患になる確率である。一部は「症例」対「対照」の比が典型的には一般集団におけるそれと同じでないという理由から、この数字を症例 - 対照研究において直接測定することはできない。しかしながら、ある仮定の下では、オッズ比の値からリスクを計算することができる。

#### 【0044】

##### 多重マーカーからリスクを組み合わせること

[81] 多くのSNP変異の遺伝子型を使用して個体のリスクについて評価する場合、他に述べなければ、リスクについての乗法モデルを仮定することができる。このことは、集団に対する複合した遺伝リスクが個別マーカーの対応推定値の積として計算されることを意味する。例えば、2つのマーカー、g1とg2では：

$$RR(g1, g2) = RR(g1) RR(g2)$$

[82] その根底にある仮説は、そのリスク因子が非依存的に生じて挙動するということ、即ち、同時条件付き確率を積として表し得ることである：

$$Pr(A|g1, g2) = Pr(A|g1) Pr(A|g2) / Pr(A) \text{ であって、} \\ Pr(g1, g2) = Pr(g1) Pr(g2)$$

[83] マーカーがゲノム上に近接して隔てられている、即ち、2以上のリスクアレルの同時発生が相関するような連鎖不平衡状態にある態様では、相関するSNPのすべてのアレルの組合せに対してオッズ比が規定されるハプロタイプモデリングを利用することができる。

#### 【0045】

[84] 1例として、2型糖尿病のリスクに関連した4種のマーカーでの以下の遺伝子型を、各マーカーでの集団に対するリスクとともに有する個体について考慮しよう：

第3染色体 (Chromo3) PPARG CC 算出リスク：RR(CC) = 1.03

第6染色体 (Chromo6) CDKAL1 GG 算出リスク：RR(GG) = 1.30

第9染色体 (Chromo9) CDKN2A AG 算出リスク：RR(AG) = 0.88

第11染色体 (Chromo11) TCF7L2 TT 算出リスク：RR(TT) = 1.54

[85] 組み合わせると、この個体の集団に対する全リスクは、 $1.03 \times 1.30 \times 0.88 \times 1.54 = 1.81$ である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

## リスク評価

[86] 本発明の態様は、個体由来のゲノムDNAを含んでなる試料について、有害な薬物反応、具体的には、特にオピオイドとモルヒネに関連していると本明細書に記載される変異の存在を評価する方法へ向けることができる。このような方法は、典型的には、当業者によく知られて本明細書にさらに記載される方法を使用して、少なくとも1つの多型マーカーの少なくとも1つのアレルの存在又は非存在を検出することを含み、そのような評価の結果に基づいて、その試料が由来する個体が有害な麻酔作用のリスクが増加又は減少している（罹患性が増加又は減少している）状態にあるかどうか判定する。いくつかの態様では、多型マーカーの特別なアレルを検出することを、少なくとも1つの多型マーカーの少なくとも1つのアレルが確認される特別なヒト個体に関する核酸配列データを入手することによって行うことができる。少なくとも1つのマーカーの異なるアレルは、ヒトにおけるそのような作用に対する異なる罹患性に関連している。核酸配列データを入手することはまた、単一のヌクレオチド位置での核酸配列を同定することを含み得て、このことはSNPでのアレルを同定するのに十分である。核酸配列データはまた、特に多数のヌクレオチド位置を含む遺伝子マーカーについて、他の任意数のヌクレオチド位置での配列情報を含み得て、2個～数十万個、可能であれば数百万個のヌクレオチド（特に、CNVの場合）のいずれの範囲でもあり得る。

10

## 【 0 0 4 7 】

[87] いくつかの態様において、該方法は、ある疾患又は形質に関連する少なくとも1つの多型マーカー（又は該疾患又は形質に関連する少なくとも1つのマーカーと連鎖不平衡状態にあるマーカー）の遺伝子型状態に関する情報を含んでなるデータセットの利用を含む。言い換えると、そのような遺伝子状態に関する情報を、例えば、配列データ、特定の多型マーカー又は複数のマーカー（例えば、特定のリスク状態アレルの存在又は非存在を示すもの）での遺伝子型の数、又は1以上のマーカーについての実際の遺伝子型の形式で含有するデータセットについて、本明細書に開示するような特定の多型マーカーでの特定のリスク状態アレルの存在又は非存在を検索して、該疾患又は形質に関連付けることができる。該疾患又は形質に関連した変異（例、マーカーアレル）についての陽性結果は、そのデータセットが由来する個体が該疾患への罹患性が増加した（リスク増加）状態にあることを示唆する。

20

30

## 【 0 0 4 8 】

[88] いくつかの態様では、遺伝子多型の少なくとも1つのアレルと疾患の間の相関性を含む参照表へ多型マーカーについての遺伝子型データを参照にすることによって、多型マーカーを該疾患又は形質へ相関させる。いくつかの態様において、該表は、1つの遺伝子多型についての相関性を含む。いくつかの態様において、該表は、複数の遺伝子多型についての相関性を含む。あるマーカーと疾患の間の相関性について示唆する参照表を参照することによって、試料が由来する個体において、該疾患又は形質へのリスク又は該疾患又は形質への罹患性を同定することができる。いくつかの態様において、その相関性は、統計的測定値として報告される。この統計的測定値は、相対リスク（RR）、絶対リスク（AR）、又はオッズ比（OR）のようなリスク尺度として報告することができる。

40

## 【 0 0 4 9 】

[89] 本明細書に記載するマーカーは、単独でも組み合わせても、リスク評価と診断目的のために有用であり得る。本明細書に記載のマーカーに基づいた、有害な麻酔作用を蒙るリスクの結果はまた、有害な麻酔作用についての他の遺伝子マーカー又はリスク因子のデータと組み合わせ、全リスクを確定することができる。このように、個々のマーカーによるリスクの増加が比較的小さい（例えば、10～30%のオーダーにある）場合であっても、その合体は、重大な意義を持つ可能性がある。従って、比較的共通した変異でも、全リスクへ有意な貢献をする（集団起因リスクが高い）可能性があるか、又はマーカーの組合せを使用して、マーカーの複合リスクに基づいて、有害な麻酔作用による合併症を発症する有意な複合リスク状態にある個体群を明確にすることができる。

50

## 【 0 0 5 0 】

[90] このように、いくつかの態様では、全リスク評価のために複数の変異（遺伝子マーカー、バイオマーカー、及び／又はハプロタイプ）を使用する。いくつかの態様では、本明細書に開示されるような変異からこれらの変異を選択することができる。いくつかの態様では、本明細書に開示されるような変異の、有害な麻酔作用への罹患性を診断するのに有用であることが知られている他の変異と組み合わせた使用が使用される。そのような態様では、複数のマーカー及び／又はハプロタイプ遺伝子型状態が個体において決定されて、その個体の状態を、関連する変異の集団頻度、又は臨床的に健常な被験者（同年齢の被験者又は同性の被験者のような）における該変異の頻度と比較する。引き続き、多変量解析又はジョイントリスク分析のような、当該技術分野で知られた方法や当業者に知られた他の方法を使用して、多数の遺伝子座での遺伝子型状態に基づいて付与される全リスクを決定することができる。続いて、そのような解析に基づいたリスクの評価を、本明細書に記載のような本発明の方法、使用、及びキットにおいて使用することができる。

10

## 【 0 0 5 1 】

[91] 有害な麻酔作用を蒙るリスク状態変異が同型接合である個体は、そのような作用が発現される特に高いリスク状態にあり得る。これは、同型接合の保有者のリスクが各アレルのコピーについて二乗されたリスクとして概して推定されるように、リスク状態アレルの用量依存的な効果によるものである。

## 【 0 0 5 2 】

[92] 本明細書に記載のSNPマーカーについて、麻酔剤及び鎮痛剤からの有害作用が観察される状況では、患者において過剰に見出されるアレル（リスク状態アレル）と反対のアレルが減少した頻度で見出される。このように、LDにおける、及び／又は年齢、人種、体重（又は肥満度指数、BMI）が含まれる他の因子とともにそのようなマーカーを含んでなるこれらのマーカー及びハプロタイプは、有害な麻酔及び鎮痛作用に対して保護的である、即ち、それらは、これらのマーカー及び／又はハプロタイプを保有する個体が疼痛及び／又は麻酔薬及び鎮痛薬からの有害作用を発現することへの減少したリスク又は罹患性を付与する。

20

## 【 0 0 5 3 】

[93] いくつかの態様では、あるハプロタイプが含まれる、本明細書に開示されるような変異が様々な遺伝子マーカー（例、SNPとマイクロサテライト）の組合せを含み得る。ハプロタイプを検出することは、多型部位での配列を検出するための、当該技術分野で知られている、及び／又は本明細書に記載される方法によって達成することができる。さらに、標準技術を使用して、特定のハプロタイプ又はマーカーのセットと疾患表現型の間の相関性を証明することができる。相関性についての簡易検定の代表例は、2×2表に対するフィッシャー（Fischer）の正確検定であろう。

30

## 【 0 0 5 4 】

予測モデル

[94] デシジョンツリーは、決定支援システム用の容易に解釈可能で直観的な規則を導くために使用し得る、多変量データ解析及び分類化のための標準的な機械学習技術である。デシジョンツリーは、データを簡単な論理規則によって諸層へ階層的に分ける、再帰分割アプローチとみなすことができる。デシジョンツリーの利点は、その簡明性、カテゴリー変数と数値変数だけでなく欠損値も取り扱えること、外れ値及び尺度調整（scaling）への頑健性、並びに特徴選択を層別化及び分類化と組み合わせる能力である。デシジョンツリーはまた、決定支援システム用の容易に解釈可能で直観的な規則を導くために使用し得る。

40

## 【 0 0 5 5 】

[95] デシジョンツリーを使用して、最も予測能力のあるSNPを人口統計学上、臨床上、及び他の入力特徴とともに選択して、これらを組み合わせ、患者を分類して有害作用を予測するために使用し得る簡単な論理規則として、それによって不十分な疼痛緩和とオピオイド関連の有害作用に関する確実に正確なポイント・オブ・ケア予測が可能になる。

50

そのような知識は、個別化された治療を可能にする。

【 0 0 5 6 】

[96] これまでに観測された個別層と複雑な相互作用のパターンは、オピオイドの輸送、感知、及び代謝に関与する遺伝子のような、特異的な遺伝子多型の相互作用が小児におけるモルヒネの有害作用に有意に影響を及ぼすかどうかの体系的な判定法をもたらしてきた。現行アプローチの限界により、個別化される介入へのより確実に正確な決定則を提供することができる、個別対応の解決法と拡張法へのニーズが存在する。

【 0 0 5 7 】

[97] CARTのような標準的な再帰分割（又はデシジョンツリーベースの）アプローチを初めて使用して、有害作用、疼痛感受性、及び他の臨床表現型の状況において、遺伝子 - 遺伝子相互作用の特異的なパターンに関連した個別層を同定して分析した。次いで、遺伝子型決定、人口統計、及び関連の臨床データを組み合わせて、オピオイド誘発性呼吸抑制の転帰が含まれる、有害作用のリスクが高いか又は低い患者を予測するための論理則を導いた。このようなモデルの予測能力は、固有の生物学的ノイズ、限定された標本サイズ、及び（分子レベル、ひいては臨床レベルの転帰における変動をもたらす多くの機序の代表となる）複雑な相互作用のパターンによって制限される。特異的な層の状況においてのみ出現し得る、より弱い関連性も同様に存在し得るが、検出することは難しい。

【 0 0 5 8 】

[98] アレル（加法）、優性、及び劣性モデル、並びに三分探索木（ここでは、分離した各遺伝子型の値についても実施して、個別層の同定及び解析を容易にする）を取り込むことによって、デシジョンツリーと関連した論理則を強化した。加えて、フェーズモデルと類似の集団ベースのモデルを使用して、各遺伝子についてのハプロタイプ再構築（ここで含まれるいくつかの遺伝子では、強いLDのパターンが観測される）を取り込んで、決定則の簡略化とデータにおいて観測される多くの暗示的な相互作用の説明を可能にした。古典的なデシジョンツリー、支援ベクターマシン（SVM）、及び階層型エキスパート混合（HME）モデルを統合した。

【 0 0 5 9 】

[99] HMEアプローチは、確率論的デシジョンツリーとみなすことができる（Hastie et al., 第9章とその中の参考文献を参照のこと）。例示のHMEデシジョンツリーにおいて、終端節点は、応答（例、有害作用）の個別（及び状況依存的な）予測を提供する「エキスパート」（又はエキスパートネットワーク）と呼ばれる。これらの個別予測を非終端節点のデシジョンモデル（「ゲーティングネットワーク」）によって組み合わせる。典型的には、インプットの線形結合を使用して、線形又はロジスティック回帰モデルをそれぞれの終端節点において適合させる。例えば、客観的な術後疼痛スコア（P）を遺伝子と他の予測因子の関数とする以下のモデルのように：

$$E(P|X) = \theta_0 + \theta_1(\text{年齢}) + \theta_2(\text{性別}) + \theta_3(\text{人種}) + \theta_4(GCH1) + \theta_5(COMT) + \theta_6(ABCB1) + \text{他の因子}$$

[100] 上記の式において、 $E(Y|X)$ は、予測因子変数（特徴）ベクターがXと仮定される場合のYの期待値を意味する。確実な線形SVM予測因子を使用することによって、他の好適な分類化（又は回帰）アプローチを使用して、エキスパートモデルを一般化することができる。このアプローチでは、終端SVMモデルを状況依存的なやり方で最適化されるエキスパート分類器のアンサンブルとみなすことができる（適用可能な場合は、一分類SVMが含まれる）。

【 0 0 6 0 】

[101] このことは、異なるデータのサブセットに関して最適化される分類器のアンサンブルを開発して（交差検証の文脈におけるように）、それを組み合わせてより確実な結果と関連した信頼レベル（これは、アンサンブル内の一貫性に関して定義される）を提供することと比較され得る。ここでは、標準的なデシジョンツリーを（可能であれば、リサンプリングとブースティングとともに）使用して入手される確実な個別層によってそのようなサブセットを定義した。従って、そのような拡張型HMEモデルのツリートポロジー

10

20

30

40

50

は、元のデシジョンツリー分析において同定される安定層を代表して、HMEアプローチの限界の1つ、即ち、良好なツリートポロジーを見出すための方法の不足に対処することが期待されよう。故に、得られるツリーは、決定則の解釈の容易さを保つと同時に、正確度を改善する。

【0061】

[102] ニューラルネットワーク、プロトタイプ、及びカーネルベースのアプローチが含まれる、他の標準的な統計法と機械学習法も適用して、遺伝子-遺伝子相互作用のパターンをさらに詳しく吟味して、それらの予測能力について評価した（そして、この新たなアプローチの相対的な利点を評価した）。訓練コホート全体を反復的に（そして無作為的に）訓練及び検証のサブセットへ分割する交差検証を使用して、正確度を評価して、得られる決定則と観測層の安定性について評価した。全分類化正確度が含まれる正確度、精度、リコール（recall）、及びROC曲線下面積の標準測定値を使用して、提唱される混合型再帰分割モデルに基づいて、決定則の正確度を評価した。

10

【0062】

#### アドレス可能な集団

[103] 一般的な意味において、本発明の方法及びキットは、あらゆる供給源とあらゆる個体由来の核酸物質（DNA又はRNA）を含有する試料から、又はそのような試料から導かれる遺伝子型データから利用することができる。いくつかの態様において、個体は、ヒト個体である。個体は、成人、小児、又は胎児であり得る。核酸供給源は、生体試料が含まれる、核酸物質を含んでなるどの試料であっても、それに由来する核酸物質を含んでなる試料であってもよい。本発明の態様はまた、標的集団の成員である個体においてマーカー及び/又はハプロタイプについて評価することを提供する。そのような標的集団とは、1つの態様において、例えば、遺伝的要因、バイオマーカー、生物物理パラメータ、麻酔関連合併症の既往歴、麻酔に対するアレルギー反応、麻酔関連合併症の家族歴、等といった他のパラメータに基づいて、有害な麻酔作用を発現するリスク状態にある個体の集団又は群である。

20

【0063】

[104] いくつかの態様において、標的集団には、18歳未満、16歳未満、又は12若しくは10歳未満の個体のような、特定の年齢亜群からの個体が含まれる。個体は、男性又は女性のいずれの性でもよい。

30

【0064】

[105] 本明細書に開示されるような有害な鎮痛及び/又はオピオイド作用に関連することが見出されたマーカーは、本研究において利用した集団以外の他のヒト集団でも類似の関連性を示し得ると考えられる。いくつかの態様において、ヒト被験者は、限定されないが、白人種集団、ヨーロッパ人集団、アメリカ人集団、ユーラシア人集団、アジア人集団、中央/南アジア人集団、東アジア人集団、中東人集団、アフリカ人集団、ヒスパニック系集団、及びオセアニア人集団が含まれる、1以上のヒト集団又はエスニック・グループに由来する。

【0065】

[106] 個々の被験者における人種の貢献は、遺伝子解析によっても決定することができる。Smith et al. (Am J Hum Genet 74, 1001-13 (2004)) において説明されるもののような、非関連のマイクロサテライトマーカーを使用して、家系の遺伝子解析を行うことができる。

40

【0066】

[107] 他に定義しなければ、本明細書において使用する技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。Singleton et al. 「Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (微生物学・分子生物学辞典)」第3版, J. ウィリー・アンド・サンズ (ニューヨーク州ニューヨーク, 2001); March 「Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure (先端有機化学反応: 機序と構造)」第5版, J. ウィリー・アンド・サンズ (ニューヨーク州ニューヨ

50

ク、2001)；及び、Sambrook and Russel「Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子クローニング：実験マニュアル)」第3版、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版局(ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、2001)は、当業者に対して、本出願において使用される用語の多くへの一般的な手引きを提供する。

【0067】

[108] 当業者は、本明細書に記載されるものに類似しているか又はそれと同等であって、本発明の実施において使用することができる、多くの方法及び材料を認められよう。実際、本発明は、本明細書に記載される方法及び材料に決して限定されない。

【0068】

#### 診断方法

[109] 本発明の態様では、投与される麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイドから有害作用を蒙るリスク状態にある患者を評価する方法、又はその評価を支援する方法を提供し、該方法は、そのような作用に相関する遺伝子マーカーで特別なアレルを検出することを含んでなる。いくつかの態様では、投与される麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイドへの有害作用を発現する罹患性を判定する方法を提供し、該方法は、少なくとも1つの多型マーカー(例、本明細書に記載のマーカー)の少なくとも1つのアレルを検出することを含んでなる。本明細書において開示するように、特別なマーカー又はハプロタイプの特別なアレルが、投与される鎮痛薬からの有害作用を蒙る罹患性の指標となる。そのような作用に対する患者のリスク又は罹患性を評価するための予後又は予測アッセイを使用して、麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイドの投与に関連する手技の前と間で被験者用にカスタマイズされる麻酔プロトコルを開発することもできる。

【0069】

[110] いくつかの態様では、疼痛知覚、持続的な術後/慢性疼痛、及び/又は麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイド関連の有害作用に関連した少なくとも1つの遺伝子多型の存在又は非存在について、マイクロアレイ又は遺伝子チップ技術(ここでマイクロアレイ又は遺伝子チップは、少なくとも1つの遺伝子多型を含む)を使用して試料を分析することによって、投与される麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイドから有害作用を蒙るリスク状態にある患者を同定する方法を行う。

【0070】

[111] いくつかの態様において、遺伝子チップは、低密度アレイを含む。

[112] いくつかの態様において、該方法には、疼痛療法と麻酔を特別設計して麻酔薬及び鎮痛薬関連の有害作用を最小にするための、追加の臨床情報の評価が含まれる。いくつかの態様において、該方法には、疼痛療法とオピオイドを特別設計してオピオイド及び鎮痛薬関連の有害作用を最小にするための、追加の臨床情報の評価が含まれる。このような方法における使用のための追加の臨床情報には、限定されないが、患者の年齢、人種、体重(又はBMI)、睡眠時呼吸障害、ジェンダー、アレルギー、感受性、又は送達される麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイドの投与経路に影響を及ぼす医学的状态が含まれる。例えば、民族性、治療歴、薬物相互作用、精神不安、ストレスレベル、及び生活様式といった他の因子も、該方法の一部として評価され得る。

【0071】

[113] 本発明の態様はまた、再帰分割とデシジョンツリーを使用して、遺伝子型-表現型の関連性を解析すること、そして遺伝子と他の非遺伝的変数の間に明確な相互作用パターンがある推定層を同定することへ向けられる。

【0072】

[114] 本発明の態様において、該方法は、ゲノムDNAを含有する試料を個体より分析のために入手することを含む。該試料は、例えば、口腔スワブ、唾液試料、血液試料又は、本明細書に開示されるような、ゲノムDNAを含有する他の好適な試料、等であり得る。ゲノムDNAは、例えば、ハイスループット技術、又は低密度アレイ技術、等のような、当業者に利用可能ななどの通常技術を使用しても分析し得る。引き続き、このような遺伝子型決定からの結果について、本明細書に開示される遺伝的変異のような、特別な状態

への罹患性変異であることが知られている特定の変異の存在を分析することができる。その個体に特別な遺伝子型によって付与されるリスクを計算することは、その個体の遺伝子型を、例えば（投与される麻酔薬からの有害作用についての変異のような）特別な状態又は形質についてのリスク状態変異の異型接合保有者に関して、その遺伝子型についてこれまでに決定されたリスク（例えば、相対リスク（RR）又はオッズ比（OR）として表現される）に比較することに基づくことができる。その個体について算出されるリスクは、ジェンダーと民族性が同一の平均集団と比較した、ある個人について、又はある個人の特異的な遺伝子型についての相対リスクであり得る。平均集団リスクは、準拠集団からの結果を使用して、異なる遺伝子型のリスクの加重平均として表現され得て、次いで、該集団に比したある遺伝子型群のリスクを計算するのに適した計算を実施することができる。あるいは、個体のリスクは、特別な遺伝子型の比較に基づき、例えば、あるマーカーのリスク状態アレルの異型接合保有者をそのリスク状態アレルの非保有者と比較する。いくつかの態様では、集団平均を使用することがより簡便であり得る。なぜなら、それは、ユーザーにとって解釈するのが容易である尺度、即ち、その個体のリスクを彼/彼女の遺伝子型に基づいて集団の平均と比較して与える尺度を提供するからである。

【0073】

[115] 標準的な方法を使用して、多重リスク変異についての全リスク計算を実施することができる。例えば、乗法モデルを仮定すること、即ち、個々のリスク変異のリスクを掛け合わせることで全体効果が確定されると仮定することによって、多重マーカーの全リスクの直接計算が可能になる。

【0074】

[116] 特別なハプロタイプを構成する特別な遺伝子マーカーアレルの、試料中の検出は、本明細書に記載される、及び/又は当該技術分野で知られている多様な方法によって実施することができる。例えば、遺伝子マーカーは、核酸レベルで（例、直接的なヌクレオチド配列決定によるか、又は当業者に知られた他の遺伝子型決定手段によって）、又はその遺伝子マーカーがタンパク質のコーディング配列に影響を及ぼす場合は、アミノ酸レベルで（例、タンパク質配列決定によるか又はそのようなタンパク質を認識する抗体を使用するイムノアッセイによって）検出することができる。本明細書に開示されるマーカーのアレル又はハプロタイプは、投与される麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイドの有害作用の発現に関連するゲノムセグメント（例、遺伝子）の断片に対応する。そのような断片には、問題の多型マーカー又はハプロタイプのDNA配列が含まれるが、そのマーカー又はハプロタイプと強いLD（連鎖不平衡）状態にあるDNAセグメントも含まれ得る。いくつかの態様では、そのようなセグメントが、 $0.2$ より大きい $r^2$ 、及び/又は $|D'| > 0.8$ の数値によって判定されるようなマーカー又はハプロタイプとLD状態にあるセグメントを含む。

【0075】

[117] いくつかの態様では、ハイブリダイゼーション方法を使用して、投与される麻酔薬の有害作用を発現する罹患性の判定を行うことができる（「Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学の最新プロトコル）」Ausubel, F. et al. 監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ（すべての補遺が含まれる）を参照のこと）。特異的なマーカーアレルの存在は、その特別なアレルに特異的な核酸プローブの配列特異的ハイブリダイゼーションによって示すことができる。1より多い特異的なマーカーアレル又は1つの特異的なハプロタイプの存在は、そのそれぞれが特別なアレルに特異的である、数個の配列特異的核酸プローブを使用することによって示すことができる。配列特異的プローブをゲノムDNA、RNA、又はcDNAへハイブリダイズするように指向させることができる。「核酸プローブ」は、相補配列へハイブリダイズするDNAプローブ又はRNAプローブであり得る。当業者であれば、検査試料由来のゲノム配列中に特別なアレルが存在する場合にのみ配列特異的ハイブリダイゼーションが起こるように、そのようなプローブを設計する方法を知っていよう。本発明はまた、特別な多型マーカーを遺伝子型決定するための市販の技術及び方法を含めて、どの簡便な遺伝子型決定法を使用しても実施化する

ことができる。

【 0 0 7 6 】

[118] ゲノムDNA試料のような、麻酔の有害作用に関連する核酸を含有する検査試料を少なくとも1つの核酸プローブと接触させることによって、ハイブリダイゼーション試料を生成することができる。mRNA又はゲノムDNAを検出するためのプローブの非限定的な例は、本明細書に記載のmRNA又はゲノムDNA配列へハイブリダイズすることが可能である標識核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長核酸分子又は、ストリンジェントな条件の下で適正なmRNA又はゲノムDNAへ特異的にハイブリダイズするのに十分である、少なくとも15、30、50、100、250、又は500個のヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドのような、その一部であり得る。ハイブリダイゼーションは、当業者によく知られた方法によって実施することができる（例えば、「Current Protocols in Molecular Biology（分子生物学の最新プロトコール）」Ausubel, F. et al. 監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ（すべての補遺が含まれる）を参照のこと）。いくつかの態様では、ハイブリダイゼーションが、特異的ハイブリダイゼーション、即ち、ミスマッチの無いハイブリダイゼーション（正確なハイブリダイゼーション）を意味する。いくつかの態様において、特異的ハイブリダイゼーションのためのハイブリダイゼーション条件は、高ストリンジェンシーである。

10

【 0 0 7 7 】

[119] 特異的ハイブリダイゼーションは、存在するならば、標準法を使用して検出する。特異的ハイブリダイゼーションが核酸プローブと検査試料中の核酸との間で生じるならば、該試料は、核酸プローブ中に存在するヌクレオチドに相補的であるアレルを含有する。この方法は、本明細書に開示されるようななどのマーカーについても、又は本明細書に開示されるようなハプロタイプを構成するマーカーについて繰り返すことができるか、又は多重プローブを同時に使用して、1より多いマーカーアレルを同時に検出することができる。また、特別なハプロタイプの1より多いマーカーアレルを含有する単一のプローブ（例、特別なハプロタイプを構成するマーカーの2、3、4、5個、又は全部へ相補的なアレルを含有するプローブ）を設計することができる。ハプロタイプの特別なマーカーの試料中の検出は、該試料の供給源が特別なハプロタイプ（例、ハプロタイプ）を有するが故に、投与される麻酔薬からの有害作用を蒙る罹患性があるか又はそのリスク状態にあることを示唆する。

20

30

【 0 0 7 8 】

[120] 検出プローブは、どの好適なサイズであってもよいが、好ましくは、該プローブは、相対的に短い。いくつかの態様において、該プローブは、5～100ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様において、該プローブは、10～50ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様において、該プローブは、12～30ヌクレオチドの長さである。他の長さのプローブも想定されて、平均的な当業者の技量の範囲内にある。

【 0 0 7 9 】

[121] いくつかの態様において、SNP多型を含有するDNA鋳型は、検出に先立ってポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅される。そのような態様において、増幅されたDNAは、検出プローブとエンハンサープローブのための鋳型として役立つ。

40

【 0 0 8 0 】

[122] いくつかの態様において、鋳型のPCRによる増幅のために使用される検出プローブ、エンハンサープローブ、及び/又はプライマーには、修飾Aと修飾Gが含まれる、修飾塩基の使用が含まれる。修飾塩基の使用は、ヌクレオチド分子（プローブ及び/又はプライマー）の融点を鋳型DNAに対して調整するために、例えば、低い百分率のG又はC塩基を含有する領域中の融点を上昇させるために（ここでは、その相補的なTに対して3つの水素結合を形成する能力がある修飾Aを使用することができる）、又は高い百分率のG又はC塩基を含有する領域中の融点を下降させるために（例えば、二本鎖DNA分子中の相補的なC塩基に対して2つだけの水素結合を形成する修飾G塩基を使用することによって）有用であり得る。いくつかの態様では、検出ヌクレオチドプローブの設計にお

50



いて修飾塩基を使用する。上記の方法では、当業者に知られているどの修飾塩基も選択し得て、好適な塩基の選択は、本明細書での教示に基づけば、当業者の技量の範囲内に十分にあって、既知の塩基は、当業者に知られている市販供給元より入手可能である。

【 0 0 8 1 】

[123] いくつかの態様では、本明細書に記載のハイブリダイゼーション方法において、核酸プローブに加えて、又はその代わりにペプチド核酸 (PNA) プローブを使用することができる。PNAは、N - (2 - アミノエチル) グリシン単位のようなペプチド様の無機骨格を有して、有機塩基 (A、G、C、T、又はU) がそのグリシン窒素へメチレンカルボニルリンカーを介して付いた、DNA模倣体である (例えば、Nielsen, P., et al., Bioconjug. Chem. 5: 3-7 (1994) を参照のこと)。PNAプローブは、投与される麻酔薬の有害作用と相関している1以上のマーカーアレル又はハプロタイプを含有することが疑われる試料中の分子へ特異的にハイブリダイズするように設計することができる。このように、PNAプローブのハイブリダイゼーションは、そのような作用への罹患性の診断となる。

10

【 0 0 8 2 】

[124] 本発明の態様はまた、遺伝子のセット内のSNPを検出することへ向けられ、検出の方法には、限定されないが、例えば、SNPマイクロアレイ、遺伝子チップ、動的アレル特異的ハイブリダイゼーション、分子ビーコン、制限酵素断片長多型 (RFLP) ベースの方法、PCRベースの方法、フラップエンドヌクレアーゼベースの方法、プライマーエクステンション法、5' - ヌクレアーゼベースの方法、オリゴヌクレオチドリガーゼアッセイ、一本鎖コンホメーション多型法、温度勾配ゲル電気泳動法、変性高速液体クロマトグラフィー、高解像度融解曲線分析、DNAミスマッチ結合法、キャピラリー電気泳動法、及び次世代配列決定法、等の使用が含まれる。

20

【 0 0 8 3 】

[125] 本発明の態様では、被験者より得られる、ゲノムDNAを含有する検査試料を採取して、PCRを使用して、本発明の1以上のマーカー又はハプロタイプを含んでなる断片を増幅する。本明細書に開示されるように、多様な方法 (例、配列解析、制限酵素消化による分析、特異的ハイブリダイゼーション、一本鎖コンホメーション多型アッセイ (SSCP)、電気泳動分析、等) を使用して、特別なマーカーアレル又はハプロタイプの同定を達成することができる。いくつかの態様では、発現分析によって、例えば、定量的PCR (動的熱循環) を使用することによって診断を達成する。この技術は、例えば、Ta qMan. RTM (アプライド・バイオシステムズ、カリフォルニア州フォスターシティ) のような市販の技術を利用することができる。この技術は、ポリペプチドの発現又は組成における改変、又はスプライシング変異 (複数) の存在について評価し得る。さらに、この変異 (複数) の発現は、物理的又は機能的に異なるものとして定量することができる。

30

【 0 0 8 4 】

[126] いくつかの態様において、DNA鋳型は、本明細書に記載のような特異的多型マーカーの存在についての評価に先立って、全ゲノム増幅 (WGA) 法によって増幅することができる。当業者によく知られた、WGAを実施するための標準法を利用し得て、それは本発明の範囲内にある。

40

【 0 0 8 5 】

[127] いくつかの態様では、特別なアレルが参照配列に対する制限部位の創出又は消失をもたらすならば、制限酵素消化による分析を使用して、そのアレルを検出することができる。RFLP分析は、例えば、Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学の最新プロトコール)、上記に記載のように実行することができる。関連するDNA断片の消化パターンは、特別なアレルの試料中の存在又は非存在を示す。

【 0 0 8 6 】

[128] 特異的なアレル又はハプロタイプを検出するには、配列分析も使用することができる。従って、いくつかの態様では、特別なマーカーアレル又はハプロタイプの存在又は非存在の決定が、被験者又は個体より得られるDNA又はRNAの検査試料の配列分析

50

を含む。PCR又は他の適正な方法を使用して、多型マーカー又はハプロタイプを含有する核酸の一部を増幅してから、試料中のゲノムDNAの多型部位（又はハプロタイプ中の多重多型部位）を配列決定することによって、特異的なアレルを直接検出することができる。

#### 【0087】

[129] いくつかの態様では、被験者由来の標的核酸配列セグメントへ相補的であるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを使用して、多型部位で特別なアレルを同定することができる。例えば、オリゴヌクレオチドアレイを使用し得る。オリゴヌクレオチドアレイは、典型的には、異なる既知の場所において基質の表面へ結合する、複数の異なるオリゴヌクレオチドプローブを含む。これらのアレイは、一般に、機械合成法、又はフォトリソグラフィ法と固相オリゴヌクレオチド合成法の組合せを取り込む光指向性合成法を使用して、又は当業者に知られた他の方法によって産生することができる（例えば、Bier, et al. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 109:433-53 (2008); Hoheisel, J. D., *Nat Rev Gene t.* 7:200-10 (2006); Fan, et al. *Methods Enzymol* 410:57-73 (2006); Raquoussis, J. and Elvidge, G., *Expert Rev Mol Diagn* 6:145-52 (2006); 及び Mockler, et al. *Genomics* 85:1-15 (2005) を参照のこと。このそれぞれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、このそれぞれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,858,394号、米国特許第6,429,027号、米国特許第5,445,934号、米国特許第5,700,637号、米国特許第5,744,305号、米国特許第5,945,334号、米国特許第6,054,270号、米国特許第6,300,063号、米国特許第6,733,977号、米国特許第7,364,858号、EP619321、及びEP373203には、遺伝子多型の検出のためのオリゴヌクレオチドアレイの製法と使用についての多くの追加の記載を見出すことができる。

#### 【0088】

[130] 当業者に利用可能である、核酸分析の他の方法を使用して、特別なアレルを多型部位で検出することができる。代表的な方法には、例えば、直接的なマニユアル配列決定法（Church and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1991-1995 (1988); Sanger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467 (1977); Beavis, et al., U.S. Pat. No. 5,288,644）；自動化蛍光配列決定法；一本鎖コンホメーション多型アッセイ（SSCP）；クランプ付き（clamped）変性ゲル電気泳動法（CDGE）；変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）（Sheffield, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:232-236 (1989)）、移動度シフト分析（Orita, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2766-2770 (1989)）、制限酵素分析（Flavell, et al., *Cell*, 15:25-41 (1978); Geever, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:5081-5085 (1981)）；ヘテロ二本鎖分析；化学的ミスマッチ切断法（CMC）（Cotton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4397-4401 (1985)）；RNアーゼ保護アッセイ（Myers, et al., *Science*, 230:1242-1246 (1985)）；大腸菌（*E. coli*）mutSタンパク質のような、ヌクレオチドミスマッチを認識するポリペプチドの使用；及びアレル特異的PCR、等が含まれる。当業者には、上記目的のために使用し得る他の技術がわかるはずである。

#### 【0089】

[131] 本発明の態様では、本明細書に開示されるような遺伝子マーカー（複数）又はハプロタイプ（複数）が、投与される麻酔薬への有害作用に関連する核酸によってコードされるポリペプチドの組成又は発現において変化をもたらす場合には、そのポリペプチドの発現及び／又は組成を検討することによって、投与される麻酔薬、鎮痛薬及び／又はオピオイドに対して有害作用を発現する罹患性又はリスクの判定をすることができる。このように、本発明の遺伝子マーカー又はハプロタイプが、投与される麻酔薬への有害作用の発現に関連する核酸によってコードされる上記ポリペプチドの1つ又は別のポリペプチドの組成又は発現において変化をもたらす場合には、そのポリペプチドの発現及び／又は組成を検討することによって、投与される麻酔薬、鎮痛薬、及び／又はオピオイドへの有害

作用を発現することへの罹患性の判定をすることができる。

【0090】

[132] タンパク質の発現レベルを検出するには多様な方法を使用し得て、例えば、酵素結合免疫吸着法 (E L I S A)、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、及び免疫蛍光法、等が含まれる。被験者由来の検査試料について、特別な核酸によってコードされるポリペプチドの発現における改変、及び/又は組成における改変の存在を評価することができる。該核酸によってコードされるポリペプチドの発現における改変は、例えば、定量的なポリペプチド発現 (即ち、産生されるポリペプチドの量) における改変であり得る。該核酸によってコードされるポリペプチドの組成における改変は、定性的なポリペプチド発現 (例、突然変異ポリペプチド又は異なるスプライシング変異の発現) における改変であり得る。いくつかの態様では、投与される麻酔薬への有害作用を発現することへの罹患性の判定を、そのような有害作用の発現に関連した核酸によってコードされる特別なスプライシング変異、又はスプライシング変異の特別なパターンを検出することによって行う。

10

【0091】

[133] また、そのような改変 (定量的と定性的) の両方が存在し得る。ポリペプチド発現又は組成における「改変」は、本明細書に使用するように、対照試料中のポリペプチドの発現又は組成に比較されるような、検査試料中の発現又は組成における改変を意味する。対照試料とは、検査試料 (例えば、同一の細胞種に由来する) に対応して、投与される麻酔薬への有害作用によって影響を受けない、及び/又はその発現への罹患性を有さない被験者に由来する試料である。いくつかの態様において、対照試料は、本明細書に開示されるような、投与される麻酔薬への有害作用の発現に関連したマーカーアレル又はハプロタイプを保有しない被験者に由来する。同様に、対照試料と比較した、検査試料における1以上の異なるスプライシング変異の存在、又は検査試料中の有意に異なる量の様々なスプライシング変異の存在は、投与される麻酔薬への有害作用を発現することへの罹患性を示唆する可能性がある。対照試料と比較した、検査試料中のポリペプチドの発現又は組成における改変は、特異的なアレルが対照試料中の基準に対してスプライス部位を改変させる場合において、そのアレルを示唆する可能性がある。当業者には、分光法、比色法、電気泳動法、等電点分画法、及びイムノプロットティング法 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学の最新プロトコール)、特に第10章、上記を参照のこと) のようなイムノアッセイ (例えば、David et al., 米国特許第4,376,110号) を含めて、核酸によってコードされるポリペプチドの発現又は組成を検討する様々な手段が知られていて、使用することができる。

20

30

【0092】

[134] 例えば、いくつかの態様では、投与される麻酔薬への有害作用の発現に関連した核酸によってコードされるポリペプチドへ結合することが可能である抗体 (例、検出可能な標識付きの抗体) を使用し得る。抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。インタクト抗体又はその断片 (例、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>) を使用し得る。プローブ又は抗体に関する「標識」という用語には、プローブ又は抗体へ検出可能な物質を結合させること (即ち、物理的に連結させること) による、該プローブ又は抗体の直接的な標識、並びに直接的に標識される別の試薬との反応による、プローブ又は抗体の間接的な標識が含まれる。間接的な標識の例には、標識二次抗体 (例、蛍光標識二次抗体) を使用する一次抗体の検出と、蛍光標識ストレプトアビジンでそれが検出され得るような、DNAプローブのビオチンでの末端標識が含まれる。

40

【0093】

[135] いくつかの態様において、検査試料中のポリペプチドのレベル又は量は、対照試料中のポリペプチドのレベル又は量と比較される。対照試料中のポリペプチドのレベル又は量より、その差が統計学的に有意であるように高いか又は低い、検査試料中のポリペプチドのレベル又は量は、該核酸によってコードされるポリペプチドの発現における改変を示唆して、発現においてその差を引き起こす原因となる特別なアレル又はハプロタイプの診断となる。あるいは、検査試料中のポリペプチドの組成は、対照試料中のポリペプチ

50

ドの組成と比較される。いくつかの態様では、ポリペプチドのレベル又は量とその組成のいずれについても、検査試料と対照試料において評価することができる。

【0094】

[136] いくつかの態様では、投与される麻酔薬への有害作用を発現することへの罹患性の判定が、追加のタンパク質ベース、RNAベース、又はDNAベースのアッセイと組み合わせて、本明細書に開示されるような少なくとも1つのマーカー又はハプロタイプを検出することによってなされる。いくつかの態様では、不十分な疼痛緩和への罹患性又は感受性の判定が、追加のタンパク質ベース、RNAベース、又はDNAベースのアッセイと組み合わせて、本明細書に開示されるような少なくとも1つのマーカー又はハプロタイプを検出することによってなされる。いくつかの態様では、OSAへの罹患性の判定が、追加のタンパク質ベース、RNAベース、又はDNAベースのアッセイと組み合わせて、本明細書に開示されるような少なくとも1つのマーカー又はハプロタイプを検出することによってなされる。いくつかの態様では、投与される麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイドへの有害作用を発現することへの罹患性の判定が、追加のタンパク質ベース、RNAベース、又はDNAベースのアッセイと組み合わせて、本明細書に開示されるような少なくとも1つのマーカー又はハプロタイプを検出することによってなされる、OSAの発症率を決定することによってなされる。

10

【0095】

[137] いくつかの態様では、投与されるオピオイドへの有害作用を発現する罹患性の判定が、追加のタンパク質ベース、RNAベース、又はDNAベースのアッセイと組み合わせて、本明細書に開示されるような少なくとも1つのマーカー又はハプロタイプを検出することによってなされる。いくつかの態様において、投与されるオピオイドは、モルヒネである。いくつかの態様において、投与されるオピオイドは、コデインである。いくつかの態様では、OCT1遺伝子型の特性決定を使用して、投与されるオピオイドへの有害作用を発現することへの罹患性を判定する。いくつかの態様では、UGT2B7 rs7438135アレルについて判定する。いくつかの態様では、rs622342アレルについて特性決定する。

20

【0096】

#### キット

[138] 本発明の方法に有用なキットは、例えば、核酸増幅用のプライマー、ハイブリダイゼーションプローブ、制限酵素（例えば、RFLP分析用）、アレル特異的なオリゴヌクレオチド、本明細書に開示されるような核酸（例、本発明の少なくとも1つの多型マーカー及び/又はハプロタイプを含んでなるゲノムセグメント）によってコードされる改変ポリペプチドへ、又は本明細書に記載のような本発明の核酸によってコードされる非改変（ネイティブ）ポリペプチドへ結合する抗体、投与される麻酔薬への有害作用の発現に関連した核酸の増幅用の手段、投与される麻酔薬への有害作用の発現に関連した核酸の核酸配列を分析するための手段、投与される麻酔薬への有害作用の発現に関連した核酸によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列について分析するための手段、等を含めて、本明細書に開示される方法のいずれにおいても有用な諸成分を含む。該キットには、例えば、必要な緩衝液、本発明の核酸（例、本明細書に記載のような多型マーカーの1以上を含んでなる核酸セグメント）を増幅するための核酸プライマー、及びそのようなプライマーと必要な酵素（例、DNAポリメラーゼ）を使用して増幅される断片のアレル特異的な検出用の試薬、等を含めることができる。加えて、キットは、本明細書に開示されるような方法と組み合わせて使用し得るアッセイ用の試薬、例えば、投与される麻酔薬への有害作用の発現への罹患性を判定するための他の診断アッセイでの使用のための試薬を提供し得る。いくつかの態様では、この試薬キットに、WGAを実施するための試薬が含まれる。

30

40

【0097】

[139] いくつかの態様では、投与される麻酔薬、鎮痛薬、及び/又はオピオイドへの有害作用を被験者において発現することへのリスク又は罹患性を検出するために被験者由

50

来の試料についてアッセイするためのキットを提供し、ここで該キットは、本明細書に開示されるような少なくとも1つの遺伝子多型の少なくとも1つのアレルを個体のゲノムにおいて選択的に検出するのに必要な試薬を含む。いくつかの態様において、該試薬は、本明細書に開示されるような少なくとも1つの遺伝子多型を含んでなる個体のゲノムの断片へハイブリダイズする、少なくとも1つの連続したオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、該試薬は、被験者より入手されるゲノムセグメントの反対の鎖へハイブリダイズする、少なくとも1対のオリゴヌクレオチドを含み、ここでそれぞれのオリゴヌクレオチドプライマー対は、投与される麻酔薬への有害作用を発現することに関連した少なくとも1つの遺伝子多型が含まれる、個体のゲノムの断片を選択的に増幅するように設計される。いくつかの態様では、試薬が、被験者より入手されるゲノムセグメントの反対の鎖へハイブリダイズする、少なくとも1対のオリゴヌクレオチドを含み、ここでそれぞれのオリゴヌクレオチドプライマー対は、投与されるオピオイドへの有害作用を発現することに関連した少なくとも1つの遺伝子多型が含まれる、個体のゲノムの断片を選択的に増幅するように設計される。いくつかの態様において、その断片は、少なくとも20塩基対のサイズである。そのようなオリゴヌクレオチド又は核酸（例、オリゴヌクレオチドプライマー）は、投与される麻酔薬への有害作用を発現するリスクに関連している遺伝子多型（例、SNP又はマイクロサテライト）の傍らにある核酸配列の諸部分を使用して設計することができる。いくつかの態様において、該キットは、1以上の特異的多型マーカー又はハプロタイプのアレル特異的な検出の可能な1以上の標識核酸、並びに、その標識の検出用試薬を含む。好適な標識には、例えば、放射性同位体、蛍光標識、酵素標識、酵素補因子標識、磁気標識、スピン標識、エピトープ標識、等が含まれる。

10

20

【0098】

[140] 特定の態様において、該キットは、該キットを含んでなる試薬を使用するための説明書のセットをさらに含む。

#### 鎮痛薬

[141] 鎮痛薬には、パラセタモール（アセトアミノフェンとも呼ばれる）、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）（例えば、サリチル酸塩が含まれる）、及びオピオイド薬（モルヒネ、フェンタニル、ヒドロモルホン、コデイン、オキシコドン、ヒドロコドン、トラマドール、オンダンセトロン、デキサメタゾン、メタドン、アルフェンタニル、レミフェンタニル、及びこれらの誘導体のような）、並びに、非オピオイド鎮痛薬（アセトアミノフェン、NSAIDが含まれる）と、これら組合せ及び派生物が含まれる。

30

【0099】

[142] 本発明について詳しく記載してきたが、付帯の特許請求項において明確化される本発明の範囲より逸脱することなく、様々な修飾態様、変更態様、及び均等態様が可能であることが明らかであろう。本開示における実施例は、いずれも非限定的な実施例として提供される。

【0100】

#### システム

[143] 図20は、本明細書に記載される1以上の特徴を実施することができるシステムの例を図解する。ここで、システム（200）には、プロセッサ（210）とメモリ（220）が含まれる。システム（200）には、例えば、1以上の入力デバイス（260）と1以上のディスプレイ（270）を通してユーザーがこのシステムと相互作用することを可能にする、ユーザーインターフェース（250）も含まれる。

40

【0101】

[144] システム（200）には、本明細書に記載の1以上の特徴を実施する1以上のモジュール及び/又はエンジンも含めることができる。例えば、システム（200）には、リスク群割り当てエンジン（Risk Group Assignment Engine）（230）が含まれ得て、これは、少なくとも1つの遺伝的変異についての患者の遺伝子型に基づいて、患者をリスク群へ割り当てることができる。システム（200）には、医薬品選択エンジン（Medication Selection Engine）（240）も含めてよく、これは、患者の割り当てられたり

50

スク群に基づいて、該患者への医薬品を選択することができる。

【0102】

[145] いくつかの態様では、遺伝子型判定装置(280)より患者のデータを受容するようにシステム(200)を構築することができる。いくつかの態様では、該システムへデータ連結によって連結しているデータ保存又はデータベース(290)に1以上の患者データを保存することができる。

【0103】

[146] 本明細書に記載される主題の1以上の側面又は特徴は、デジタル電子回路、集積回路、特別設定された特定用途向け集積回路(ASIC)、フィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)コンピュータハードウェア、ファームウェア、ソフトウェア、及び/又はこれらの組合せにおいて実現することができる。これらの様々な側面又は特徴には、保存システムよりデータ及び命令を受容して、データ及び命令をそれらへ伝達するように結合される(特殊用途でも一般用途でもあり得る)少なくとも1つのプログラマブルプロセッサ、少なくとも1つの入力デバイス、及び少なくとも1つの出力デバイスが含まれるプログラマブルシステムにおいて実行可能及び/又は解釈可能である1以上のコンピュータプログラムにおける実行が含まれ得る。このプログラム可能なシステム又は計算システムには、クライアントとサーバーを含めてよい。一般に、クライアントとサーバーは、互いに離れていて、典型的には、コミュニケーションネットワークを介して相互作用する。クライアントとサーバーの関係は、それぞれのコンピュータで作動して、互いへのクライアント-サーバー関係を有するコンピュータプログラムによって生じる。

【0104】

[147] プログラム、モジュール、モデルジェネレータ、コンピュータ命令、ソフトウェア、ソフトウェアアプリケーション、アプリケーション、コンポーネント、又はコードとも言及され得る、これらのコンピュータプログラムには、プログラマブルプロセッサへの機械命令が含まれて、高レベル手続き型言語、オブジェクト指向プログラミング言語、関数型プログラミング言語、論理プログラミング言語、及び/又はアセンブリ/機械言語において実行することができる。本明細書に使用するように、「機械読取り可能媒体」という用語は、機械命令及び/又はデータをプログラマブルプロセッサへ提供するために使用される、例えば、磁気ディスク、光ディスク、メモリ、及びプログラマブルロジックデバイス(PLD)のような、あらゆるコンピュータプログラム製品、装置、及び/又はデバイスに言及し、機械命令を機械読取り可能シグナルとして受容する機械読取り可能媒体が含まれる。「機械読取り可能シグナル」という用語は、機械命令及び/又はデータをプログラマブルプロセッサへ提供するために使用されるあらゆるシグナルを意味する。機械読取り可能媒体は、例えば、非一時的な固体状態メモリ又は磁気ハードドライブ又はあらゆる記憶媒体がそうであるように、そのような機械命令を非一時的に保存することができる。あるいは、又は追加的に、機械読取り可能媒体は、例えば、プロセッサキャッシュ、又は1以上の物理プロセッサコアに関連した他のランダムアクセスメモリがそうであるように、そのような機械命令を一時的なやり方で保存することができる。

【0105】

[148] ユーザーとの相互作用をもたらすために、本明細書に記載される主題の1以上の側面又は特徴を、例えば、情報をユーザーへ表示するための陰極線管(CRT)又は液晶ディスプレイ(LCD)又は発光ダイオード(LED)モニターのような表示装置とキーボード、並びに、それによってユーザーがコンピュータへ入力を提供し得る、例えばマウス又はトラックボールのようなポインティングデバイスを有するコンピュータで実行することができる。ユーザーとの相互作用をもたらすには、他の種類のデバイスも同様に使用し得る。例えば、ユーザーへ提供されるフィードバックは、例えば、視覚フィードバック、聴覚フィードバック、又は触覚フィードバックのような、どんな形式の感覚フィードバックであってもよくて、ユーザーからの入力は、限定されないが、音響入力、音声入力、又は触覚入力が含まれる、どんな形式で受容されてもよい。他の可能な入力装置には、限定されないが、タッチスクリーン、又はシングル又はマルチポイント抵抗膜式又は静電

容量式トラックパッドのような他のタッチセンサ装置、音声認識ハードウェア及びソフトウェア、光学式スキャナー、光学式ポインター、デジタル画像キャプチャデバイスと関連の解釈ソフトウェア、等が含まれる。

【実施例】

【0106】

[149] 以下の非限定的な実施例を提供して、本明細書に開示される本発明の態様をさらに例解する。当業者には、以下に続く実施例において開示される技術が本発明の実践において十分機能することが見出されたアプローチを代表するものであるので、その実践モードの例を構成するとみなし得ることが理解されよう。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、開示される具体的態様において多くの変更をなし得て、それでもそれらが本発明の精神及び範囲より逸脱することなく、同等又は類似の結果を入手し得ることを理解されよう。

【0107】

実施例1：FAAH遺伝的変異と術後中枢オピオイド関連有害事象の間の新規な関連性

[150] 本実施例では、小児における周術期オピオイド関連有害作用に対する、ゲノムワイドアレイ由来の脂肪酸アミドヒドロラーゼ（FAAH）のすべての重要な遺伝的変異の影響について評価した。本実施例は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Sahasivam et al., The Pharmacogenomics Journal (2015) 1-7 として後に公表された。

【0108】

研究デザイン、参加者、及び手順

[151] これは、外来アデノイド口蓋扁桃摘出術を標準的な周術期麻酔、外科及び看護ケアで施行中の小児の大規模コホートにおける、前向き遺伝子型盲検の臨床観察研究であった。この研究は、clinicaltrials.gov, NCT01140724 で登録された、「Personalizing Perioperative Morphine Analgesia in Children（小児における周術期モルヒネ鎮痛の個別化）」と題した、より大規模な進行中の臨床研究の一環である。標準的な周術期ケアでのこの大規模な前向き臨床試験（臨床治療チームには、患者の遺伝子型を知らせない）によって、小児での周術期オピオイドに対する鎮痛及び有害作用反応における個体間変動に寄与する因子を評価した。この研究は、施設内審査委員会によって承認されて、書面によるインフォームドコンセントを両親より得て、7歳を超える小児からは、登録前に適宜同意を得た。

【0109】

[152] 選択外来の扁桃摘出術又はアデノイド口蓋扁桃摘出術を施行中の6～15歳の小児を本研究のために手術の当日に登録した。標本選択基準は、再発性扁桃炎、アデノイド口蓋扁桃肥大、又は閉塞性睡眠時無呼吸（OSA）の故に扁桃摘出術又はアデノイド口蓋扁桃摘出術の予定がある、米国麻酔学会（ASA）の身体状態1又は2を有すると指定される小児であった。いびき+10秒以上続く睡眠休止又は日中の眠気の既往歴がある睡眠時呼吸障害の小児は、術前外科記録に文書化するように、OSAの臨床症状として考慮し、これらの小児における扁桃摘出術の適応は、OSAの臨床診断であった。加えて、実証済みのツールである小児用睡眠問診表（PSQ）（Chervin R. et al., Sleep Med, 1: 21-32 (2000); Chervin R. et al., Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 133:216-22 (2007)）を使用して、小児の睡眠障害を評価した。PSQ中の22の質問の内8以上に被験小児の両親が「はい」と報告すれば、その小児は、OSAを有するとみなした。

【0110】

[153] 小児又はその両親が英語を話せなければ、彼らを除外した。試験薬に対してアレルギーがあるか又は発達障害、肝臓又は腎臓の疾患、又は鎮痛薬を必要とする術前疼痛（例、慢性扁桃炎）を有する小児も除外した。本研究への研究コーディネーターの利用に限りがあったので、本研究では、簡便な標本抽出をもたらし有資格被験者をすべて登録し得たわけではなかった。

【0111】

[154] すべての参加者が、標準化された外科技術と麻酔技術が含まれる、同質の周術

10

20

30

40

50

期ケアを受けた。セボフルランを使用して麻酔を誘導し、プロポフォール (2 mg / kg) ボーラスを続けて、気管内挿管を容易にした。麻酔は、神経筋肉遮断を使用せずにセボフルランで維持した。患者は、外科的切開に先立って、モルヒネを受容した。OSA既往歴のある小児が0.1 mg / kgのモルヒネを受容したのに対して、OSA診断のない小児は、0.2 mg / kgを受けた。外科的切開と焼灼に続く疼痛 (心拍数及び血圧の臨床的に有意な増加) が示唆されるどんな徴候でもあれば、臨床麻酔チームは、術中に必要に応じて追加のモルヒネを0.05 mg / kgの増分で提供した。すべての小児が予防用オンドанセトロン (0.1 mg / kg) 及びデキサメタゾン (0.1 mg / kg) を術中に受容した。顔の表情; 脚の動き; 活動性; 泣き声; 及び機嫌 (FLACC) の疼痛スコア (Merkel S. et al., *Pediatr. Nurs.*, 23: 293-7 (1997)) で測定される有意な術後疼痛が4 / 10以上であれば、術後麻酔回復室 (PACU) においてモルヒネ (0.05 mg / kgの増分) の救助的投与で管理した。

10

#### 【0112】

##### 臨床転帰の測定

[155] 各参加者について、鎮痛作用とオピオイド関連有害作用の測定結果 (metrics) を記録した。この研究では、2つのオピオイド関連有害作用の転帰: 臨床呼吸抑制 (RD) と難治性PONVに注目した。鎮痛作用の尺度として総モルヒネ要求量 (mg / 体重kg) も検討した。本研究では、RDを、臨床的に明白な上気道閉塞の非存在下での、1分あたり10回未満の呼吸という持続的な (1分を超える) 呼吸数、又は92%より高いSpO<sub>2</sub>を維持するのに酸素補充を必要とする92%未満の酸素脱飽和として定義した。PONVは、制吐薬の介入を必要とする、実際の嘔吐エピソード及び/又は自己申告性の持続的な悪心のエピソードとして定義した。

20

#### 【0113】

##### 遺伝子解析

[156] FAAH SNPの遺伝子型決定をするために、手術室において麻酔下での静脈ライン確保時に、DNA用に血液を吸引した。同じ日にDNAを単離して、-20で冷凍した。これまでに研究された6種のよくあるSNPを選択して、TaqMan アレル識別システムアッセイ (ライフ・テクノロジーズ、アプライド・バイオシステムズ、カリフォルニア州フォスターシティ) を使用して、遺伝子型決定をした。これには、rs932816、rs4141964、rs3766246、rs324420、rs324419、及びrs2295632が含まれた。加えて、Illumina Human Omni 5 Genome-Wide Human Array を使用して、ゲノムワイドの遺伝子型決定を実施した。全部で3097個のSNPについて遺伝子型決定をして、これを使用して、PLINKにおいてメジアン 2統計量より遺伝的インフレ係数 ( ) を推定した。3097個のSNPの中で、rs3766246とrs324420を含めて、66個がFAAH遺伝子中にある。このアレイでは、244種の家系情報マーカー (AIM) についても遺伝子型決定して、これを使用して自己申告性の人種を検証して、遺伝的家系マーカーによる集団の層別化及び検証を是正した。

30

#### 【0114】

[157] 自己申告性の白人種及び黒人種が遺伝的家系へ良好に適合するかどうかについて評価するために、1397名のHapMap 被験者を準拠集団として使用した。遺伝子型決定した244種のAIMのうち218種がHapMap データに見出された。故に、SVS7.7.6 (Golden Helix, マサチューセッツ州ボーズマン) を使用して、218種のAIMで主成分 (PC) 分析を実施した。統計モデリングには10個までのPCも使用して、集団層別化による潜在的交絡について検定した。

40

#### 【0115】

##### 統計解析

[158] 統計解析ソフトウェア (Statistical Analysis Software, SAS)、バージョン9.3, JMP Genomics, バージョン6.0 (SAS Institute 社、ノースカロライナ州ケリー)、及びRを使用して、統計解析を実施した。

50



## 【0116】

[159] 解析に先立って、データの質を確認した。アフリカ系アメリカ人の小児と白人種の小児において、患者の特徴とSNPの特性についてそれぞれ検討した。ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) (Stern C., Science, 97:137-8 (1943)) について検定した。RDとPONVの対立項目比率を解析するために、ロジスティック回帰を実施した。総モルヒネ用量について解析するには、線形回帰を使用した。FAAH変異の評価に先立って、共変数の影響について検定した。総モルヒネ用量について、年齢、性別、BMI zスコア、及びOSAを評価した。RDとPONVの有害作用転帰については、総モルヒネ量を追加の共変数とみなした。最良の適合モデルを選択するために、対数尤度、赤池ベイズ情報量基準 (Akaike and Bayesian Information criterion) を比較して、残差を検討した。モデル適合度を有意に ( $p < 0.05$ ) 改善する共変数を後続の遺伝子解析用に保持した。この転帰と単一SNPの関連性について評価するために加法モデルを使用し、ここでは遺伝子型を記録して、連続変数として検定した。コホート全体のマイナーアレルの数に従って、遺伝子型を0、1、及び2へ記録した。白人患者と黒人患者をそれぞれ用いて、統計モデリングを実行した。

10

## 【0117】

結果

[160] 人口統計。参加者は主に白人で、男性より女性がわずかに多かった。白人小児に比べて、黒人小児はやや体重が重くて、より高いOSA頻度を有した。研究対象とした269名のアフリカ系アメリカ人の小児と白人種の小児において、自己申告性の人種は、出身の遺伝的家系とよく関連した。

20

## 【0118】

[161] FAAH SNP特性。FAAH遺伝子中の全70種のSNPについて、TaqMan又はOmni5技術によって、遺伝子型決定をした。SNP rs3766246とSNP rs324420について両方の方法によって遺伝子型決定をしたところ、同一の遺伝子型が観測され、遺伝子型データの信頼性が示唆された。白人患者と黒人患者の両方で、70種のSNPのうち39種が0.05以上のマイナーアレル頻度 (MAF) を有した。ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) に関する検定は、これら39種のSNPがいずれも  $= 0.001$  水準でのHWEにあることを示した (39種の検体のボンフェローニ補正)。故に、39種のSNPを遺伝的関連解析に含めた。

30

## 【0119】

[162] 自己申告性の人種と遺伝的家系。自己申告された白人種と黒人種について、218のAIMより推定される遺伝的家系と比較した。全部で259名の患者のうち250名 ( $> 95\%$ ) の患者において、自己申告された人種は、CEUとアフリカ系の家系によく集中した。主成分 (PC) 1と2によって、白人種と黒人種を成功裡に分離した。本研究では、解析結果を自己申告性の人種によって層別したが、そのほうが臨床医にとってAIMと比べて容易に利用可能だからである。

## 【0120】

[163] 臨床転帰との遺伝的関連性。PONV、RD、及び総モルヒネ用量と単一SNPとの関連性について、白人と黒人でそれぞれ検定した。黒人患者の方がより高い総モルヒネ用量を必要として ( $p < 0.05$ , t検定)、PONVの発症率がより低い傾向にあった ( $p = 0.159$ , フィッシャーの正確検定) が、RDの発症率は、黒人と白人の間で同等であった ( $p = 0.376$ , フィッシャーの正確検定)。

40

## 【0121】

[164] 単一SNP関連検定の結果を表1と図1に要約する。白人患者では、PONVと3種のSNP (rs324420、rs2295632、及びkgp12517369) の間に、そして総モルヒネ用量とrs647325の間に有意な関連が検出された。加えて、数個の名義関連性が観測された。しかしながら、黒人患者では、上記転帰のいずれについても、名義関連性しか検出されなかった (表1)。

## 【0122】

50

【表 1 - 1】

表 1. 単一SNPの関連性

転帰	SNP	位置	マイナー アレル	P	白人 P	OR (95% CI)	マイナー アレル	P	黒人 P	OR (95% CI)	推定機能
			(%)	HWE	関連性	B±SE	(%)	HWE	関連性	B±SE	
	rs4141964	46865040	A (0.39)	0.127	0.0014	2.41 (1.41, 4.16)					イントロン
	rs3766246	46865671	T (0.39)	0.127	0.0014	2.41 (1.41, 4.16)					イントロン
	rs324420	46870761	A (0.23)	0.008	0.0003	2.73 (1.58, 4.73)					ミスセンス
	rs2295633	46874383	A (0.38)	0.103	0.0028	2.26 (1.32, 3.85)					イントロン
PONV											
	rs11576941	46875067	A (0.31)	0.867	0.0311	0.49 (0.26, 0.94)					イントロン
	rs2295632	46879562	A (0.29)	0.029	0.0005	2.61 (1.52, 4.47)					下流
	kgp12517369	46882118	A (0.29)	0.029	0.0005	2.61 (1.52, 4.47)					
	rs6687300	2.01E+08	C (0.28)	0.614	0.0339	1.86 (1.05, 3.29)					イントロン
	rs1416467	80758728					G (0.41)	0.835	0.0309	0.07 (0.01, 0.78)	不明
	rs4141964	46865040	A (0.39)	0.127	0.0402	1.57 (1.02, 2.41)					イントロン
	rs3766246	4686571	T (0.39)	0.127	0.0402	1.57 (1.02, 2.41)					イントロン
	rs324420	46870761	A (0.23)	0.008	0.0473	1.61 (1.01, 2.59)					ミスセンス
	rs2295632	46879562	A (0.29)	0.029	0.0343	1.62 (1.04, 2.54)					下流
RD											
	kgp12517369	46882118	A (0.29)	0.029	0.0343	1.62 (1.04, 2.54)					
	rs3118378	68849687	G (0.33)	0.26	0.0243	1.73 (1.07, 2.79)	G (0.40)	0.646	0.0455	0.34 (0.12, 0.98)	不明

【 0 1 2 3 】

10

20

30

【表 1 - 2】

転帰	SNP	位置	マイナー アレル	P	白人 P	OR (95% CI)	マイナー アレル	P	黒人 P	OR (95% CI)	推定機能
			(%)	HWE	関連性	B±SE	(%)	HWE	関連性	B±SE	
	rs4336881	1.07E+8	A (0.10)	0.514	0.014	2.35 (1.19, 4.63)					不明
	rs4642918	2.48E+08					C (0.42)	0.809	0.0489	0.34 (0.11, 1.00)	不明
総モル ヒネ量	rs647325	18170886	G (0.24)	0.356	0.0004	0.03 ±0.01					不明
	rs3844253	2.42E+08	A (0.07)	0.072	0.0053	0.04 ±0.01					不明
	rs6687300	2.01E+8					A (0.30)	0.96	0.0315	0.05 ±0.02	イントロン
	rs316873	2.42E+08					A (0.14)	0.288	0.0092	-0.08 ±0.03	イントロン

10

## 【 0 1 2 4 】

[165] 単一SNP関連検定に基づいて、46865040bp～46882118bpに及び興味深い領域を同定した(図1)。白人では、この領域に存在する11種のSNPのうち7種がPONVと関連して、5種がRDと関連していた。連鎖分析は、高いD'とR<sup>2</sup>を明らかにして、この11種のSNPが1つのハプロタイプブロックに属することを示唆した。

20

## 【 0 1 2 5 】

[166] ゲノムインフレーション。白人小児において、PONVとの有意な遺伝的関連性に対する混合の影響について評価するために、3097種のSNPゲノムワイドを使用して、ゲノムインフレ係数( )について評価した。この分析は、 が1であることを見出して、集団層別化による強い交絡が存在しないことを示唆した。10までのPCで補正するとき、白人におけるPONVとの遺伝的関連性は、有意なままであった。

## 【 0 1 2 6 】

[167] PONVとのFAAH遺伝的関連性の信頼性。FAAH SNP、rs324420とPONVの間の生物学的及び統計学的に有意な関連性の故に、その関連性を検証するために、我々は、類似のプロトコルで扁桃摘出術をすでに受けたさらに66名の白人小児との関連性を再解析した。より大きなコホート(元のコホートの216名の白人小児+66名の追加の白人小児)は、以下の常に有意な関連性を再現した。FAAH SNPのrs324420は、PONVと有意に関連して(P=0.0053)、1コピーのマイナーアレル(A)を追加するとORが2.0倍増加し;それは、PACU滞在延長をもたらすPONVとも関連して(P=0.0209)、1コピーのマイナーアレル(A)を追加するとORが2.2倍増加した。統計学的に有意ではないが、rs324420 AA遺伝子型の小児は、CC及びCA遺伝子型の小児(83.9(79.9～88.2分、P=0.072))より全般的に長く(97.9(84.3～113.6)分)PACUに滞在し、このことは、一般的な外来外科手術に続いて、臨床的かつ経済的に重要である。

30

40

## 【 0 1 2 7 】

[168] 我々の研究は、FAAH遺伝子多型と一般的な外来外科手術の扁桃摘出術に続く難治性PONVの間に有意な関連性を示した。加えて、白人小児群では、オピオイド誘発性RDとPONVによる回復室滞在の延長の特異的FAAH SNPとの名義関連性が同定された。具体的には、白人小児において、rs4141964、rs3766246、rs324420、rs2295632、及びkgp12517369の1コピーのマイナーアレルを加えると、PONVのオッズがそれぞれ2.42、2.42、2.73、2.61、及び2.61倍増加した(P<0.0018、表1)。ミスセンス遺伝子多型のrs324420が含まれる、上記5種のFAAH SNPは、オピオイド関連のRD

50

と難治性 P O N V による P A C U での滞在延長に名義関連性を有して、オピオイドと内在性カンナビノイド経路の間に生物学的に相乗的な相互作用があり得ることをはっきりさせた。

#### 【 0 1 2 8 】

[169] 未知の遺伝リスク因子（例、超迅速代謝者におけるコデイン）は、他の点では健常な患者でも、呼吸抑制、無酸素症、及び死亡のリスクを高める可能性がある（Kelly L. et al., Pediatrics, 129:e1343-7 (2012); Sadhasivam S. and Myer C., Pain Med., 13:982-3, author reply 4 (2012)）。事前のリスク同定、層別化、及び予防手段は、オピオイド関連の呼吸抑制と P O N V のような他の有害作用という負の影響を最小にするのに重要である。P O N V は、予防的な制吐薬があるにもかかわらず、依然として麻酔後の重大問題であって、オピオイドに関連することが多い。

10

#### 【 0 1 2 9 】

[170] 要約すると、扁桃摘出術を施行中の小児において、F A A H 遺伝子多型と術後のオピオイド関連の呼吸抑制、P O N V、及び P A C U での滞在延長の間に、新たな関連性を見出した。メジャー脊椎固定術を施行中の、より高齢の若年者の異なる集団において上記の関連性を検証した。これらの結果は、F A A H の特異的な遺伝的変異が小児における外科手術後のオピオイド誘発性呼吸抑制、P O N V、及び P A C U での滞在延長と常に関連していることを実証し、このことは、類似のエスニック背景と医学的背景の成人へ外挿し得るだろう。小児の疼痛を管理する場合、臨床医は、特定の F A A H 遺伝的変異のある小児においてオピオイド誘発性の呼吸抑制と P O N V が潜在的により高い確率で発症することを予測する必要がある。

20

#### 【 0 1 3 0 】

実施例 2：A B C C 3 と O C T 1 の遺伝子型は、モルヒネの薬物動態に影響を及ぼす。

[171] 我々は、主要な輸送体及び酵素をコードする遺伝子（O C T 1、A B C C 3、A B C B 1、A B C C 2、及び U G T 2 B 7 が含まれる）のよくある機能欠損遺伝子多型がモルヒネとその代謝産物の P K を実質的に改変させる可能性があるかと仮定した。この前向き臨床研究の目的は、主要な輸送体及び酵素の選択した遺伝的変異が静脈内モルヒネ P K に及ぼす潜在的な影響を、扁桃摘出術を施行中の小児の拡大された均質コホートにおいて評価することであった。本実施例は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Venkatasubramanian et al., Pharmacogenomics (2014) 15(10): 1297-1309 として後に公表された。

30

#### 【 0 1 3 1 】

##### 研究デザイン、参加者、及び手順

[172] この研究は、clinicaltrials. gov、(NCT01140724) で登録された、「Personalizing Perioperative Morphine Analgesia in Children（小児における周術期モルヒネ鎮痛の個別化）」と題した、より大規模な進行中の臨床観察研究の一環である。現行の薬物動態 - 薬理ゲノム学研究には、既報の被験者に加えた、被験者の拡張コホートが含まれる（Fukuda, T. et al., Pharmacogenomics, 14: 1141-51 (2013)、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。本研究は、周術期オピオイドへの鎮痛及び有害作用反応における個体間変動に寄与する因子を評価するための、標準的な周術期ケアを伴う外来アデノイド口蓋扁桃摘出術を施行中の小児の大規模コホートにおける前向きの遺伝子型盲検試験として設計された。この研究は、シンシナチ小児病院医療センターでの施設内審査委員会によって承認されて、書面によるインフォームドコンセントを両親より登録前に得て、7 歳を超える小児からは、適宜同意を得た。

40

#### 【 0 1 3 2 】

[173] 本研究には、再発性扁桃炎、アデノイド口蓋扁桃肥大、又は O S A の故に扁桃摘出術又はアデノイド口蓋扁桃摘出術の予定がある、米国麻酔学会の身体状態 1 又は 2 を有する 6 歳 ~ 15 歳の若年者と小児が登録された。モルヒネアレルギー、誕生後の発育遅延、肝 / 腎疾患、術前疼痛による慢性的な鎮痛薬要求を有する小児と、英語を話すことができない小児又は両親は、本研究から除外した（Fukuda, T. et al., Pharmacogenomics,

50

14:1141-51 (2013); Sadhasivam, S., et al., Pediatrics, 129:832-8 (2012); Sadhasivam, S., et al., J. Opioid Manag., 8:217-26 (2012) )。本研究に登録した小児は、 $0.2 \text{ mg/kg}$  の術中麻酔薬モルヒネ用量 (但し、OSAの小児は、 $0.1 \text{ mg/kg}$  の用量を受容した) とともに、標準的な周術期ケアを受けた。

#### 【0133】

##### 薬物動態試験用の試料採取と分析

[174] 各小児より連続血液試料を入手して、モルヒネとその活性代謝産物、M3G及びM6Gの全身濃度を定量した。IVモルヒネボラス投薬前に静脈内ラインより投薬前試料を入手した。初回のボラスモルヒネ静脈内投薬から0～5分、10～15分、及び30～45分後に、静脈留置針を使用して、さらなる試料を入手した。倫理的な理由から、モルヒネ投薬後に入手する血液試料 (番号: 1～3) は、その小児が回復室において麻酔から完全に回復する前に採取した。確立されて検証済みの半自動式液体クロマトグラフィー-質量分析法/質量分析法アッセイを使用して、EDTA血漿中のモルヒネ、M3G、及びM6Gを定量した。この分析法の詳細については、他所に記載されてきた (Clavijo, C. et al., Anal. Bioanal. Chem., 400:715-28 (2011))。信頼し得る定量限界は、モルヒネに関して $0.25 \sim 1000 \text{ ng/ml}$  ( $r^2 > 0.99$ ) で、M3GとM6Gに関しては、ともに $1 \sim 1000 \text{ ng/ml}$  ( $r^2 > 0.99$ ) であった。全不正確性は、15%未満であった。日間正確度は、85～115%内であった。分析物の定量に干渉する、持越し、マトリックス干渉、又はイオン抑制/増大はなかった。

#### 【0134】

##### 遺伝子型決定と遺伝子サンプリング

[175] 関連する多型の遺伝子型決定をするために、麻酔用に確保した静脈内ラインを使用して、手術室において血液試料を採取した。同じ日にDNAを単離し、 $-20^\circ\text{C}$  で凍結して、機能的に重要な遺伝子 (OCT1、ABCC3、ABCB1、及びUGT2B7) の予選択リスト内の特異的SNPについて検査して、市販のTaqMan SNP遺伝子型決定アッセイを使用して決定した。Human Omni 5 Genome-Wide Human Array を使用して、上記選択遺伝子における追加の重要なSNPを同定した。この参加者では、OCT1遺伝子中の4つの非同義SNPについて遺伝子型決定をした。これらは、OCT1輸送活性の低下又は喪失を引き起こし、Arg61Cys (rs12208357)、Gly401Ser (rs34130495)、Gly465Arg (rs34059508) とMet420の欠失 (rs72552763) が含まれる。加えて、核内因子の結合に影響を及ぼすmRNA発現を改変させることが知られている、ABCC3のプロモーター領域中のSNPである、rs4793665 ( $-211\text{C} > \text{T}$ ) の遺伝子型決定をした。さらに含めたのは、ABCB1 3435Tアレル (癌関連疼痛におけるより高いモルヒネ鎮痛作用と慢性疼痛の混合集団におけるより低いモルヒネ用量要求量へ関連付けられてきたので) と、UGT2B7 ( $-161\text{C} > \text{T}$ ) (CC遺伝子型被験者がラモトリギンのクリアランス増加と関連したので) である。

#### 【0135】

##### モルヒネPKモデル開発と評価

[176] PsN-Toolkit (バージョン3.5.3) をインターフェースとするNONMEM (バージョン7.2, ICON Dev. Soln., メリーランド州、アメリカ) を使用して、モルヒネデータ用に非線形、混合作用集団の薬物動態モデルを開発した。統計パッケージR (バージョン2.15) を使用して、データの前処理、後処理、及び可視化を実施した。2-コンパートメント構造を使用して、モルヒネ濃度-時間プロファイルについて記載した。このモデルでは、モルヒネの仮説コンパートメントへの輸送における遅延の遅延コンパートメントを取り込んで、代謝産物生成がその仮説コンパートメント中のモルヒネ濃度に依存するとしてモデル化した。

#### 【0136】

[177] 体重を共変数として使用することの影響について初めに検定して、アロメトリック (allometric) モデル付きの薬物動態モデルに含めた。個々のパラメータの推定は、

平均の集団パラメータと、対数正規分布をとる基本的な個体間変動性に依存するようにモデル化した。詳細は、Venkatasubramanian et al., Pharmacogenomics (2014) 15(10): 1297-1309 を参照のこと。

#### 【 0 1 3 7 】

[178] 目的関数値 (OFV)、残差診断、及びブートストラップ検証技術を使用するモデル安定性考慮が含まれる様々な判定基準を使用して、モデルの質について評価した。異なるモデル間の初期比較は、ネスティド (nested) モデル間で統計学的に有意とみなされる、3.84 の OFV ( $p < 0.05$ , DOF = 1) の棄却に基づいた。OFV 改善に加えて、診断用の適合度プロットを使用してモデルについて評価して、モデル不適切性を示唆する可能な傾向を同定するために検討し、 $\chi^2$  - 分布ヒストグラムを検討して単一様態性を確認した。このモデルを 1000 の無作為抽出したブートストラップデータセットへ再適合させることによって、最終のモデル安定性を評価した。

10

#### 【 0 1 3 8 】

##### 薬理ゲノム学分析

[179] 選択した遺伝子型の、体重正規化 (a) モルヒネクリアランス; 及び (b) M3G / (c) M6G 生成クリアランスの個々のアドホックベイズ推定値についてのカテゴリー型共変量としての有意性を検定するために、共変量解析も実施した。 $p < 0.05$  を統計学的に有意とみなす、フィッシャーの片側分散分析を使用して、予備的な薬理遺伝学 - 薬物動態分析を行った。次いで、モルヒネクリアランスと代謝産物生成クリアランスのカテゴリー型共変量としてその遺伝子型を取り込むことによって、有意な共変数について、NONMEMにおいて正式に検定した。モルヒネ PK 中の共変数としての遺伝子型の有意性は、(a) ネスティドモデル間の 3.84 ( $p < 0.05$ , 自由度 = 1) の OFV の棄却と (b) 加法共変数パラメータ推定値の精度が含まれる、様々な判定基準によって判定した。

20

#### 【 0 1 3 9 】

##### 結果

[180] 登録被験者の人口統計学的属性、本研究に登録された 223 名の被験者よりモルヒネ投薬後採取した、モルヒネ、M3G、及び M6G の時間及び濃度プロファイル、並びにアロメトリックに (体重) スケール調整したモルヒネ及び代謝産物の集団 PK モデルの NONMEM モデルパラメータ推定値の詳細については、Venkatasubramanian et al., Pharmacogenomics (2014) 15(10): 1297-1309 に記載されている。簡潔には、220 名の登録被験者のうち、179 名が白人種、38 名がアフリカ系アメリカ人であって、残る 6 名の被験者には、アジア系の小児 1 名、アジア系インド人の小児 1 名、及び 4 名の二人種小児 (一方が白人種で他方がアフリカ系アメリカ人の両親) が含まれた。白人種とアフリカ系アメリカ人のコホート間で、年齢、体重、又は身長に有意差は観測されなかった。

30

#### 【 0 1 4 0 】

[181] 下記の表に SNP 遺伝子型の分布を示す。被験者を、先に記載のように、OCT1 遺伝子型に基づいて、3 つの群へ分けた (Fukuda, T. et al., Pharmacogenomics, 14:1141-51 (2013); Fukuda, T. et al., Clinical Pharmacology & Therapeutics, 93:S49-S49 (2013); Tzvetkov, M. et al., Biochemical Pharmacology, 86:666-678 (2013))。遺伝子型決定の結果に基づく、58% の小児が OCT1 野生型であり、36% が OCT1 異型接合であり、そして 5.4% が OCT1 同型接合であった。同型接合の遺伝子型である 12 名の小児のうち 11 名が白人種で、1 名がヒスパニックであって、アフリカ系アメリカ人の子孫はいなかった。ABCB1C3435T 遺伝子型では人種の不均質性も観測されたが、ABCC3 の -211C > T 位置での遺伝子多型においては、人種差を観測しなかった。

40

#### 【 0 1 4 1 】

【 表 2 】

表 2. 本研究において観測された異なる人種間の O C T 1 遺伝子型とその頻度のリスト

rs#	rs72552763	rs12208357	rs34130495	rs34059508	全人種			白人種			アフリカ系 アメリカ人	
					N	Ntot	割合	N	Ntot	割合	N	Ntot
ヌクレオチド	1365GAT>del	286C>T	1306G>A	1498G>C								
アミノ酸変化	Met420 の欠失	Arg61Cys	Gly401Ser	Gly465Arg								
野生型	GAT	C	G	G	130	130	0.58	97	97	0.54	31	31
異型接合	GAT/del	C	G	G	43	81	0.36	37	71	0.4	4	7
	GAT/del	C	G	G/C	8			6			1	
	GAT	C	G/A	G	7			7			0	
	GAT	C/T	G	G	22			20			2	
	GAT	C/T	G/A	G	1			1			0	
同型接合	del	C	G	G/C	1	12	0.05	1	11	0.06	0	0
	del	C	G	G	2			2			0	
	GAT/del	C	G/A	G	2			2			0	
	GAT	C	A	G	1			1			0	
	GAT/del	C/T	G	G	6			5			0	
				総数	223			179			38	

【 0 1 4 2 】

10

20

30

40

【 3 3 】

表3. 今回の研究において異なる人種間で観測された (A) ABCC3-211C>T (rs4793665) と (B) ABCB1C3435T (rs1045642) の頻度

A. ABCC3-211C>T (rs4793665)

32rs#	rs4793665	全人種		白人種		アフリカ系アメリカ人	
	ヌクレオチド						
アミノ酸変化	-211C>T						
	N/A	N	割合	N	割合	N	割合
	T	73	0.327	61	0.341	11	0.289
	C/T	112	0.502	90	0.503	19	0.5
同型接合	C	38	0.17	28	0.156	8	0.211
		223		179		38	

B. ABCB1C3435T (rs1045642)

rs#	rs1045642	全人種		白人種		アフリカ系アメリカ人		
	ヌクレオチド							
アミノ酸変化	サイレント	N	割合	N	割合	N	割合	
	野生型	T	64	0.287	62	0.346	2	0.053
	異型接合	C/T	87	0.39	72	0.402	11	0.289
	同型接合	C	72	0.323	45	0.251	25	0.658
		223			179		38	

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40



【 表 4 】

表 4. 単純片側 ANOVA 及び NONMEM 共変量解析を使用して、モルヒネクリアランス (CLM) と代謝産物生成クリアランス (CLFM3G 及び CLFM6G) に対する OCT1、ABCC3、及び ABCB1 遺伝子型の影響を研究する薬理遺伝学的な共変量解析の結果  
# 平均 [下限 95% CI - 上限 95% CI]

輸送体	解析法	パラメータ	モルヒネ	モルヒネ-3-グルクロニド	モルヒネ-6-グルクロニド
1-Oct	Anova	$\Delta CL^{\#}$	0.114 [0.003:0.225]	0.509 [0.179:0.839]	0.613 [-0.144:1.37]
	Nonmem	$\Delta CL^{\#}$	0.163 [0.046:0.28]	0.475 [0.3:0.651]	0.574 [0.476:0.670]
		dOFV	-4	-9.39	-2.87
ABCC3	Anova	$\Delta CL^{\#}$	0.047 [-0.019:0.114]	0.301 [0.107:0.501]	0.283 [0.041:0.526]
	Nonmem	$\Delta CL^{\#}$	0.079 [-0.008:0.167]	0.476 [0.055:0.896]	0.432 [-0.037:0.90]
		dOFV	-1.92	-9.54	-5.29
ABCB1	Anova	$\Delta CL^{\#}$	-0.018 [-0.074:0.038]	0.178 [0.006:0.349]	0.101 [-0.119:0.32]
	Nonmem	$\Delta CL^{\#}$	-0.021 [-0.093:0.052]	0.246 [0.004:0.491]	0.133 [-0.149:0.416]
		dOFV	-0.4	-4.33	-0.85

【 0 1 4 4 】

[182] モルヒネの薬物動態については、その全身クリアランス (CL) に個体間変動性がある 2 - コンパートメントモデルを使用して記載した。代謝産物プロフィールは、生成クリアランスに個体間変動性がある単一コンパートメントモデルを使用して把握した。代謝産物の分布容積とクリアランスは、以前の報告 (Bouwmeester, N. et al., Br. J. Anaesth., 92:208-17 (2004)) に基づいて固定したが、これは、今回のプロフィールでは、短い試料採取時間によるその生成に関する情報しか含有しないからである。モルヒネクリアランスと M3G 生成クリアランスに関する - 収縮は低かった (16.5% と 20%

10

20

30

40

50

）が、M 6 G 生成クリアランスでは高く（31.8%）、このデータセットではM 6 G 生成に関する情報が限られていることを示した（Savic, R. and Karlsson, M., AAPS J., 11:558-69 (2009)）。代謝産物の生成は、仮説コンパートメント中のモルヒネ濃度に依存し、これは中心コンパートメントに停滞して、代謝産物生成の遅延をもたらした。遅延コンパートメントを加えると、より早期での、そしてより後期での予測下での代謝産物レベルの過剰予測の除去をもたらして、有意により優れたモデル（ $dOFV = -305$ ）をもたらした。クリアランス及び容積に対する体重の影響を説明するためにアロメトリックスケーリングを0.75と1の指数で取り込むと、モデル適合度が有意に改善される（ $dOFV = -184$ ）ことが見出された（Anderson, B. and Holford, N., Br. J. Clin. Pharmacol., 72:518-20; author reply 521-3 (2011)）。モルヒネクリアランスに対する人種の影響を含めると、このモデルが改善されて、アフリカ系アメリカ人は白人種より8%高い平均クリアランスを有した（Sadhasivam, S. et al., J. Opioid Manag., 8: 217-26 (2012)）。同様に、ジェンダーもモルヒネの薬物動態に影響を及ぼして、女兒は、男児より5%高いクリアランスを有する。

#### 【0145】

[183] 体重正規化したモルヒネクリアランスと両方の代謝産物の生成クリアランスの事後（ad-hoc）ベイズ推定値に関する片側ANOVAを使用して、予め選択した機能遺伝子型の貢献についての予備的な共変量解析を実施した。体重による貢献を正規化した後に得られるこれらの推定値は、交絡因子としてのサイズの非存在下での個別のクリアランス値を表す。モルヒネクリアランスの個別の事後ベイズ推定値（図2）を外観視察すると、我々の研究コホートでは、同型接合のOCT遺伝子型被験者が野生型と異型接合群を合わせたものより低い平均CLMを有したと示唆される。M3G生成クリアランスでも類似の傾向が観測され、ここでは、OCT1同型接合群が他群より約50%低い平均値を有した。同型接合群におけるより低い（約55%）M6G生成クリアランスの証拠は、統計学的に有意ではない（ $p = 0.09$ ）ものの、実質的なものであった。この予備的なANOVA分析に一致して、NONMEM共変量解析は、OCT1同型接合群がCLMとCLFM3Gについて有意な共変数（ $dOFV > 3.84$ ）であって、同型接合体が他のものより16%と48%低いクリアランスを有することを明らかにした。M6G濃度を定量したのは、12名の同型接合被験者のうち2名だけであり（LOQ未満の濃度と分析上の問題による）、異なる群間でのM6G生成における差異に関する定量的な情報の不足をもたらした。

#### 【0146】

[184] ABC C3（-211C>T）遺伝子型に関して、個別のクリアランスについての事後ベイズ推定値の変動（図2）を外観視察すると、被験者では、Cアレルの数が増加するにつれて代謝産物生成クリアランスとモルヒネクリアランスが進行的に高くなることが示される。二者択一的なグルーピング（即ち、（1）TT+CT対CCと、（2）TT対CT+CC）を使用して行った予備的な片側ANOVA分析は、前者のグルーピングでの証拠の方が、すべての変数についての検定全体で後者より統計学的に有意であることを示唆した（Mizuno, T. et al., Clinical Pharmacology & Therapeutics, 93:S63-S63 (2013)）。このABC C3遺伝子型を潜在的な共変数としてNONMEMモデルにおいて評価すると、CC遺伝子型が有意に高いCLFM3Gを有して、それを含めると、モデル適合度が有意に改善されることが明らかになった（ $dOFV = -9$ ）。同様に、ABC C3遺伝子型は、片側ANOVA（ $p = 0.03$ ）とNONMEMモデルにおける共変数包含（ $dOFV = -4.86$ ）に基づいて、CLFM6Gに有意な共変数であることが見出された。このNONMEMモデル推定値に基づく、CC遺伝子型は、TT遺伝子型とCT遺伝子型を合わせたものより46%（95%CI：4.3%～88%）高いCLFM3Gを有した。CLFM6Gの増加についての推定値はCLFM3Gに類似していたが、このパラメータに関する精度は、より低かった。1000個のブートストラップ推定値に基づくノンパラメトリック変数信頼区間推定値を使用してさらに評価すると、CLFM6Gの増加が47%のメジアンと2%～100%の95%CIでかなりよく推定されることが確かめられた。同型接合のCC遺伝子型がより高い代謝産物生成を有するとする証拠は強いもの

の、モルヒネクリアランスに対するその影響はさほど明白でなかった。A B C C 3 遺伝子型を潜在的な共変数として含めると、モデル適合度が改善された ( $d O F V = - 2$ ) が、他より適度に高い ( $8.1\%$ ;  $95\% C I: - 0.7\% \sim 16.8\%$ ) モルヒネクリアランスを有すると推定される C C 遺伝子型では、このモデルを有意には改善しなかった。

【0147】

[185] 個別のクリアランス (C L M / C L F M 6 G) についての事後推定における変動 (図 2) は、A B C B 1 C 3 4 3 5 T 遺伝子型が C L M と C L F M 6 G に対して識別可能な影響力の無いことを示す。しかしながら、C T 遺伝子型と T T 遺伝子型を合わせた被験者は、T T 遺伝子型の被験者より高い C L F M 3 G を有するように思われた (図 2)。これらの傾向は、片側 ANOVA 分析に基づいて、統計学的に有意であることが確かめられ、それは、C T + T T 遺伝子型が T T より  $18.4\%$  高い C L F M 3 G を有する ( $p = 0.04$ ) 一方で、C L M に対するその影響はほとんど無い ( $1\%$ ) ことを明らかにした。上記のことは、C 3 4 3 5 T 遺伝子型を、C L M と C L F M 6 G に対してではなくて、C L F M 3 G に対して有意な共変数 ( $d O F V = - 4.32$ ) として同定した NON MEM 解析からの結果と一致した。

【0148】

#### 考察

[186] 最近、オピオイド処方が増加に伴って、オピオイド応答における変動性に対する様々な薬理遺伝学 (P G) 因子の貢献を定量することへの関心の高まりが認められている (Branford, R. et al., Clin. Genet., 82:301-10 (2012); Cohen, M. et al., Curr. Opin. Anaesthesiol., 25:419-27 (2012); Sadhasivam, S. and Myer, C., Pain Med., 13:982-3, author reply 984 (2012); Eissing, T. et al., Mol. Diagn. Ther., 16:43-53 (2012))。本研究の現下の関心は、オピオイド応答への遺伝的変動性の貢献の一部が薬力学 (P D) 因子によるものであるとしても、モルヒネ薬物動態 (P K) に対する P G の役割を把握することである。我々は、本章で、モルヒネとその代謝産物の時間プロファイルを把握するための NON MEM モデルの成功裡の開発を示す。事後の個別推定値での簡便な片側 ANOVA ベースのアプローチを使用して、予め選択した SNP について、C L M、C L F M 3 G、及び C L F M 6 G に対する潜在的な影響をスクリーニングした。次いで、NON MEM ベースの共変量解析を使用して、モルヒネ P K 及び / 又はその代謝産物へ有意に貢献する、3 種の異なる遺伝子 (O C T 1、A B C C 3、及び A B C B 1) 全体で SNP を同定したが、U G T 2 B 7 遺伝子型又は A B C C 2 遺伝子型との関連性はいずれも見出せなかった。

【0149】

[187] このより大規模なコホート研究の結果は、O C T 1 同型接合群が野生型と異型接合を合わせたものより約  $17\%$  低いクリアランスを有することを示す我々の初期の結果 (Fukuda, T. et al., Pharmacogenomics, 14: 1141-51 (2013); Fukuda, T. et al., Clinical Pharmacology & Therapeutics, 93: S49-S49 (2013)) を追認した。我々の結果と一致して、別の臨床研究では、2 以上の機能欠損アレルがある被験者が他者より有意に低いモルヒネクリアランスを有することが実証された (Tzvetkov, M. et al., Biochemical Pharmacology, 86: 666-678 (2013))。今回提示された結果は、機能欠損 O C T 1 遺伝子型の肝細胞へのモルヒネの限られた取込みがモルヒネ C L に直接影響を及ぼすというさらなる証拠を提供する。より低い C L の観測結果と一致して、本研究はまた、O C T 1 同型接合の被験者が両方の代謝産物、M 3 G と M 6 G のより低い変換を有したことを初めて実証する。これらの被験者では、肝細胞へのモルヒネ取込みが限られるために、下流のモルヒネの代謝プロセスに影響を及ぼして、より低いモルヒネグルクロニド産生をもたらした。同型接合の被験者でのより低いモルヒネ C L 並びに M 3 G / M 6 G 生成の関連した観測結果は、モルヒネの肝細胞への O C T 1 取込みがモルヒネの P K において重要な役割を担うことのより強固な証拠を提供する。

【0150】

[188] 生理学的な pH で、モルヒネは、アミド基が帯電したイオン化状態 ( $p K a =$

10

20

30

40

50

8.4) にあって、それにより OCT1 の好適な基質になると予測される。これまでの試験管内 (in vitro) 研究では、モルヒネの輸送体非依存性の透過性が低くて、モルヒネの肝細胞への輸送体依存性の取込みが取込み全体の約 60% を占めることが示唆された。さらに、これらの研究はまた、モルヒネ取込みが野生型 OCT1 を過剰発現している肝細胞において濃度依存的であるが、機能喪失の遺伝子多型が存在する場合は、取込み率が実質的に (75 ~ 100%) 低下することを示した。上記の結果に基づく、欠損型アレルの存在の影響は、モルヒネクリアランス (約 16%) より代謝産物生成 (約 45%) において高く、2 以上の欠損型アレルがある被験者において観測された、37% 低い AUC とより一致している。OCT1 の基質であるモルヒネについては十分に特性決定されているが、グルクロニド代謝産物の取込みにおける OCT1 の役割については、これまで知られていない。上記の結果は、モルヒネクリアランスに対する OCT1 の作用が現在推定されている 16% よりずっと高い可能性があることを示し、同型接合の被験者では、モルヒネ投薬へ応答して、より良好な鎮痛作用であるがより悪い有害反応を受けることを意味する。

10

#### 【0151】

[189] 加えて、本研究は、rs4793665 (ABCC3) で C/C 遺伝子型の小児が 46% 高い M6G 生成と 41% 高い M3G 生成を有することを示し、C/T 遺伝子型と T/T 遺伝子型を合わせたものと比較して、M6G の血漿への流出が増加していることを示唆した。初期の研究では、本研究からの被験者のサブセット中の C/T 及び T/T 遺伝子型の患者において、M3G のモルヒネに対する比と M6G のモルヒネに対する比が有意に低いことを報告した (Mizuno, T. et al., Clinical Pharmacology & Therapeutics, 93:S63-S63 (2013))。現行の NONMEM ベースの解析では、投薬と体重による研究全体の変動性が以前よりよく説明され (Mizuno, T. et al., Clinical Pharmacology & Therapeutics, 93:S63-S63 (2013))、それによって本結果のより機序的な解釈が容易になる。遺伝子型によって代謝産物生成が明らかに改変されることが観測されたが、被験者間のモルヒネクリアランスの増加も観測された。モルヒネの血漿への流出は、ABCC3 によるのではないかと思索されてきたが、モルヒネが ABCC3 の基質であるとする明確な証拠は存在しない (Tzvetkov, M. et al., Biochemical Pharmacology, 86:666-678 (2013))。

20

#### 【0152】

[190] モルヒネ投薬後の有害作用の発症率は、アフリカ系アメリカ人の小児より白人種の小児において、そして非ラテン系の小児よりラテン系の小児において高いと報告されてきた (Sadhasivam S. et al., Pediatrics, 129:832-8 (2012); Sadhasivam S. et al., J. Opioid Manag., 8:217-26 (2012); Jimenez, N. et al., J. Health Care Poor Underserved, 21:229-36 (2010))。我々は、アフリカ系アメリカ人の小児が白人種の小児と比較してより多くのモルヒネを要求するという、臨床で観察されるモルヒネ要求量の人種差について報告したことがある。我々は、白人種がアフリカ系アメリカ人より 8% 低いモルヒネ CL を有して、OCT1 遺伝子型を人種とともに共変数として含めるときは、これがさらに 7% へ低下することを見出した。また、我々の PK/PD 関連性は、多数派の人種 (白人種: 80%) 間で検定することによって集団層別化の影響を限定するとき、矛盾無く再現された。我々が先に報告したように、アフリカ系アメリカ人と比較して白人種の間に OCT1 同型接合群の頻度 (約 5%) がより高いことは、白人種の小児におけるより低いモルヒネ CL の背後にある理由の 1 つで有り得よう。

30

40

#### 【0153】

[191] 結論として、今回の大規模な小児の薬物動態及び薬理遺伝学研究により、モルヒネとその代謝産物の薬物動態では、体重に加えて、OCT1 と ABCC3 の同型接合の遺伝子型が有意な役割を担うことが実証される。具体的には、ABCC3 rs4793665 同型接合 C/C 遺伝子型の小児は、野生型と異型接合遺伝子型を合わせたものより約 46% 高い M6G 生成速度を有して、血漿中への増加した M6G 輸送をもたらし、同型接合の C/C 遺伝子型では、常に 41% 高い M3G 生成も観測された。OCT1 同型接合

50

の遺伝子型 (  $n = 12$  ) は、有意に低いモルヒネクリアランス ( 約 17% ) を有することが見出された。白人種の集団では、より高い頻度の A B C C 3 r s 4 7 9 3 6 6 5 C / C と O C T 1 同型接合の遺伝子型が観察された。この知見は、アフリカ系アメリカ人より白人種においてモルヒネクリアランスがより低くて、モルヒネでの有害作用の発症率がより高いことを一部説明する。女兒と男児の間でモルヒネクリアランスにわずかな差があることも観測された。

【 0 1 5 4 】

実施例 3 : A B C C 3、A B C B 1、及び F A A H 変異の検証

[192] A B C C 3 についての上記結果を拡張して検証するために、さらなる研究を行った。薬物動態モデルと解析法は、上記に考察した通りであった。上記に記載の扁桃摘出術コホート ( T & A 研究 ) に加えて、今回の研究では、脊椎後方固定術を施行中の若年者の異なる外科手術集団 ( 脊椎研究 ) も含めた。この脊椎研究群には、脊椎後方固定術を施行した 88 名の特発性側湾症の非肥満若年者を含めた。すべての患者が術後にモルヒネの患者制御鎮痛作用を受けて、48 時間追跡された。モルヒネ消費、術後疼痛スコア、ジアゼパムの使用、及び他の鎮痛薬に関するデータを記録した。登録被験者は、11 ~ 19 歳で ; 59% が女性で、85% が白人種であった。

10

【 0 1 5 5 】

[193] アロメトリックスケーリングを伴うモルヒネと代謝産物の集団 P K モデルについてのモデルパラメータの推定値を下記の表に示す。

【 0 1 5 6 】

20

【表 5】

表5：アロメトリックにスケール調整したモルヒネ及び代謝産物の集団PKモデルについてのモデルパラメータ推定値。

パラメータ表記法：CL：クリアランス；Q：コンパートメント間クリアランス；V：容積；FCL：生成クリアランス； $\omega$  2：被験者間偏差； $\varepsilon$ ：比例誤差係数；添字：M：モルヒネ；c：中枢；p：末梢。

パラメータ	T&A 研究		脊椎研究	
	推定値	95%CI**	推定値	95%CI**
集団平均パラメータ				
CL	1.25	[1.08,1.416]	1.62	[1.43,1.80]
V <sub>1</sub>	7.05	[3.33,10.77]	9.823FIX	-
Q	2.24	[1.45,2.63]	1.33	[1.01,1.65]
V <sub>2</sub>	30.8	[21.27,40.32]	34.9	[24.55,45.29]
FCL <sub>M3G</sub>	0.89	[0.52,1.27]	1.3	[1.06,1.54]
V <sub>M3G</sub> <sup>#</sup>	23FIX	-	23FIX	-
CL <sub>M3G</sub> <sup>#</sup>	0.29FIX	-	0.29FIX	-
FCL <sub>M6G</sub>	0.0751	[0.04,0.109]	0.215	[0.18,0.25]
V <sub>M6G</sub> <sup>#</sup>	30FIX	-	30FIX	-
CL <sub>M6G</sub> <sup>#</sup>	0.097FIX	-	0.097FIX	-
$\gamma$ CLM	0.72	[0.56,0.88]	0.75FIX	-
$\gamma$ M3G	1.5	[1.26,1.74]	1.39	[0.91,1.868]
$\gamma$ M6G	1.26	[0.925,1.595]	1.39	[0.99,1.79]
K <sub>遅延,M3G</sub>	0.043	[0.015,0.071]	0.12	[0.073,0.167]
K <sub>遅延,M6G</sub>			0.074	[0.052,0.095]
個体間変動性				
$\omega^2_{CL,M}$	0.053	[0.03,0.076]	-	-
$\omega^2_{V1,M}$	-	-	0.85	[0.32,1.4]
$\omega^2_{FCL,M3G}$	0.22	[0.15,0.28]	0.22	[0.04,0.29]
$\omega^2_{FCL,M6G}$	0.33	[0.20,0.46]	0.09	[0.042,0.16]
残差誤差				
$\varepsilon_M$	0.21	[0.19,0.23]	0.52	[0.43,0.62]
$\varepsilon_{M3G}$	0.45	[0.40,0.50]	0.48	[0.38,0.58]
$\varepsilon_{M6G}$	0.50	[0.43,0.57]	0.33	[0.25,0.37]

<sup>#</sup>上記のパラメータは、これまでの報告に基づいて固定して、NONMEMによって推定しなかった。  
<sup>††</sup>ブーストラップパラメータ推定値の2.5thパーセンタイルと97.5thパーセンタイル  
<sup>\*\*</sup>標準誤差推定値に基づいて推定した信頼区間

## 【0157】

[194] 図3Aは、我々の研究において観測されたABC C3 rs4793665遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物(M3G/M6G)生成クリアランス(FCLM3G及びFCLM6G)における個体間変動を示す。全般的に、rs4793665遺伝子型は、CC遺伝子型が他の型よりそれぞれ38%と46%高い生成を有するNONMEM共変量解析に基づいて、FCLM6GとFCLM3G(それぞれ、dOFV=-8.41、及び-7.44)にとって有意な共変数であることが見出された。CC遺伝子型の被験者はまた、脊椎研究において有意に高いM6G生成CL(38%高い；29%RSE)を有することがわかった。同様の傾向は、有意ではなかったものの、アデノイド口蓋扁桃摘出

術の被験者の間でも観測された。両研究を通して、CC遺伝子型は、より高いM3G生成CLと有意に関連して、アデノイド口蓋扁桃摘出術の研究(46%高い; 46%RSE)と脊椎研究(57%高い; 38%RSE)より類似した推定値を得た。

【0158】

[195] 図3Bは、我々の研究において観測されたABCC3 rs4148412遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物(M3G/M6G)生成クリアランス(FCLM3G及びFCLM6G)における個体間変動を示す。rs4148412 AA遺伝子型は、AA遺伝子型が36%(95%CI[-0.002; 0.71])高い生成を有するNONMEM共変量解析に基づいて、FCLM3G(dOFV=-6.54)にとって有意な共変数であることが見出された。rs4148412 AA遺伝子型の脊椎被験者の間では一貫したPK-PG関連性が見出されて、NONMEMを使用する共変量解析に基づいて、FCLM3G(dOFV=-3.8)にとって有意な共変数の強い傾向を示した。脊椎被験者の間で、rs4148412 AA遺伝子型は、他の遺伝子型より48%(95%CI[0.21; 1.06])高い生成を有すると推定された。要約すると、AA遺伝子型の被験者は、アデノイド口蓋扁桃摘出術の研究において、有意に高いM3G生成CL(36%高い; 51%RSE)を有することが見出された。脊椎研究においても、AA遺伝子型が52%高い(60%RSE)生成を有し、有意性へ傾く同様の傾向(p=0.06)が観測された。両研究を通して、AA遺伝子型は、より高いM6G生成の傾向を示した。

10

【0159】

[196] 図4Aは、我々の研究において観測されたABCC3 rs733392遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物(M3G/M6G)生成クリアランス(FCLM3G及びFCLM6G)における個体間変動を示す。rs733392遺伝子型は、AA被験者が他者より57%低い生成を有する脊椎被験者の間では、M3G生成にとって有意な共変数であった。しかし、rs733392遺伝子型は、より大規模なT&A研究においては、有意な共変数ではなかった。ABCC3 rs739923遺伝子型とモルヒネCL及び代謝産物生成CLの間に有意な遺伝的関連性が見出されなかったからである。

20

【0160】

[197] 図4Bは、我々の研究において観測されたABCC3 kgp8560677遺伝子型でのモルヒネCLと代謝産物(M3G/M6G)生成クリアランス(FCLM3G及びFCLM6G)における個体間変動を示す。ABCC3 kgp8560677遺伝子型とモルヒネCL及び代謝産物生成CLの間に有意な遺伝的関連性は見出されなかった。これらの結果を下記の表に要約する。

30

【0161】

【表 6】

表 6 : A B C C 3 変異の追跡研究からの結果の要約

SNP	研究	パラメータ	モルヒネ	モルヒネ-3- グルクロニド生成	モルヒネ-6- グルクロニド生成
rs4793665 CC 対 CT+TT	T&A	$\Delta CL^{\#}$	-0.07(66%)	<b>0.463(46%)</b>	0.17(62%)
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-1.86	<b>-9.54</b>	-1.33
	脊椎	$\Delta CL^{\#}$	-	<b>0.57(37.9)</b>	0.38
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-	<b>-7.44</b>	-8.74
rs4148412 GG+AG 対 AA	T&A	$\Delta CL^{\#}$	0.04(139%)	<b>-0.36(51%)*</b>	-0.27(84%)
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-0.588	<b>-6.54</b>	-2.41
	脊椎	$\Delta CL^{\#}$	-	-0.52(60%)	0.13(146%)
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-	-3.74	-0.62
kgp8560677 GG+AG 対 AA	T&A	$\Delta CL^{\#}$	0.07(67%)	0.05(202%)	0.06(326%)
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-1.71	-0.159	-0.117
	脊椎	$\Delta CL^{\#}$	-	0.136(144%)	0.09(199%)
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-	-0.455	-0.491
rs739923 GG+AG 対 AA	T&A	$\Delta CL^{\#}$	0.03(232%)	0.16	-0.26
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-0.26	-2.0	-1.26
	脊椎	$\Delta CL^{\#}$	-	0.35	0.00
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-	-1.86	-0.0
rs733392 GG+AG 対 AA	T&A	$\Delta CL^{\#}$	0.097(84%)	0.125(99%)	-0.417(82%)
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-2.1	-0.86	-2.38
	脊椎	$\Delta CL^{\#}$	-	-0.57	-0.09(154%)
		$\Delta OFV^{\dagger}$	-	-4.49	-0.09
! $\Delta OFV=OFV_{Cov}-OFV_{NoCov}$					
#-平均(RSE %)					
太字で強調した結果は、統計学的に有意であることが見出された					
* $p<0.1$					

## 【 0 1 6 2 】

【198】 上記 2 つの研究からのモルヒネと代謝産物の薬物動態について、モルヒネの中心及び末梢コンパートメント、各代謝産物について 1 つの分布コンパートメント、及び代謝産物生成の遅延を説明するためのコンパートメントが含まれる、同じ構造 P K モデルを使用して、十分に記載した。このモルヒネ P K モデルパラメータは、両研究の間で類似していたが、モデルパラメータは、脊椎被験者の方が T & A 被験者より高いことがわかった。両研究からのモルヒネモデルにおける差は、( a ) 集団 ( b ) 併用医薬品、及び ( c ) 薬物動態用試料の採取法における差により生じる研究間の偏差に起因する可能性があった。M 3 G の生成クリアランスの M 6 G モルヒネクリアランス推定値に対する比は、脊椎研究において 7 . 2 であり、T & A 研究において 9 . 6 であることがわかった。このことは、M 3 G 代謝産物生成が M 6 G 生成の 7 ~ 1 0 倍であるという他の報告に一致する。

## 【 0 1 6 3 】

【199】 初期の研究において、我々は、rs 4 7 9 3 6 6 5 ( A B C C 3 ) の C / C 遺



伝子型の小児が、C / TとT / T遺伝子型を合わせたものより46%高いM6G生成と41%高いM3G生成を有して、代謝産物の血漿への流出増加が示唆されることを示した。今回の分析において、我々は、A B C C 3 r s 4 1 4 8 4 1 2 A A 遺伝子型がより高いM3G生成を有することを示した。r s 4 1 4 8 4 1 2における遺伝的変異がA B C C 3の機能に及ぼす影響についての基本機序については十分に理解されてはいない。A B C C 3は、主に肝細胞の側基底面において発現されることが見出されて、モルヒネグルクロニドへの高い親和性を有すると報告されてきた。その遺伝子型は、代謝産物生成を明らかに改変させることが観測されたが、モルヒネクリアランスに対する有意な影響は観測されなかった。

【0164】

10

[200] A B C C 3 S N Pの意義をさらに決定するために、我々は、それらを臨床転帰に対して検証した。図6は、脊椎後方固定手術を施行中の若年者におけるA B C C 3 r s 7 3 3 3 9 2と呼吸抑制の間の関連性の検証を示す。

【0165】

[201] 下記の表は、A B C C 3の指定の変異の検証を臨床転帰とともに示す。c h r 1 7 : 4 8 7 1 0 k bとc h r 1 7 : 4 8 7 7 0 k bの間の全65種のS N Pが含まれる、G W A S A B C C 3データに関するP l i n k分析は、品質検査を合格した。このモデルでは、他の有意な共変数と同様に、白人種とアフリカ系アメリカ人の集団を合わせて補正した。これらの解析では、オッズ比を「同型接合の突然変異体」対「h e t (異型接合) / h e t」対「野生型」として計算した；P O N V = 術後の悪心及び嘔吐；及びp l o n g R D = P A C U滞在延長をもたらす呼吸抑制。

20

【0166】

【表 7】

表 7 : 臨床転帰と ABCC3 変異の関連性

遺伝子	臨床転帰	関連する SNP	p値	オッズ比	ゲノム位置	被験者数
ABCC3	PONV	kgp8560677	0.005114	1コピーのAによりオッズが3.117増加する	48755388	316
ABCC3	plongrd	rs739923	0.008311	1コピーのAによりオッズが0.3069減少する	48735774	316
ABCC3	plongrd	rs4148412	0.008421	1コピーのAによりオッズが2.232増加する	48733815	313
ABCC3	総モルヒネ量	rs11568607	0.023	1コピーのアレルAにより総モルヒネ量が0.050mg/kg増加する	48745787	315
ABCC3	総モルヒネ量	kgp8560677	0.047	1コピーのアレルAにより総モルヒネ量が0.026mg/kg増加する	48755388	315
ABCC3	combineRD	kgp12040773	0.04	1コピーのアレルCによりオッズが1.665倍増加する	48713568	313
ABCC3	combineRD	kgp3814620	0.046	1コピーのアレルGによりオッズが0.6417倍減少する	48739543	313
ABCC3	PONV	rs872793	0.01494	1コピーのGによりオッズが2.606増加する	48761880	316
ABCC3	PONV	rs17563146	0.019	1コピーのAによりオッズが0.3234減少する	48769329	314
ABCC3	PONV	rs4148416	0.02303	1コピーのAによりオッズが2.37増加する	48753423	316
ABCC3	PONV	kgp5563788	0.03162	1コピーのAによりオッズが0.3578増加する	48757911	316
ABCC3	オピオイド介入	kgp9196732	0.02161	1コピーのAによりオッズが0.1622減少する	48720999	316
ABCC3	plongrd	kgp12280761	0.01574	1コピーのAによりオッズが0.4603減少する	48744612	315
ABCC3	plongrd	rs1978153	0.01804	1コピーのGによりオッズが0.449減少する	48737861	316
ABCC3	plongrd	rs3785911	0.02523	1コピーのCによりオッズが1.939増加する	48767431	316
ABCC3	plongrd	kgp3814620	0.02815	1コピーのGによりオッズが0.4396減少する	48739543	316
ABCC3	plongrd	rs733392	0.0301	1コピーのAによりオッズが0.4018減少する	48736403	313
ABCC3	plongrd	kgp5563788	0.04473	1コピーのAによりオッズが0.2255減少する	48757911	316
ABCC3	plongrd	kgp2507665	0.04768	1コピーのCによりオッズが0.4705減少する	48740116	316
ABCC3	plongrd	kgp1777110	0.04906	1コピーのAによりオッズが0.4836減少する	48748185	316

## 【0167】

[202] 以下の表は、クリティカル領域中の ABCC3 SNP について、呼吸抑制による PACU 滞在延長との関連性を、オッズ比 (OR) 及び 95% 信頼区間として表示される作用とともに示す。オッズ比は、マイナーアレル (合わせた人種) が 1 コピー増加した場合の比を示す。図 9 は、Human Illumina Omni5 GWAS チップからの術後呼吸抑制と ABCC3 SNP の間の関連性を示す。

## 【0168】

10

20

30

40

【 表 8 】

表 8. 重要領域中のABCC3 SNPとRDによるPACU滞在延長の関連性

転帰	SNP		位置	マイナーアレル(%)			P 値 関連性	OR(95%CI)	推定機能
	IlluminaID	rs#		白人	黒人	全人種			
RD による PACU 滞在延長	kgp9079579	rs35364174	48731392	G(0.483)	A(0.429)	G(0.497)	0.0496	1.80(1.00,3.24)	イントロン
		<b>rs4148412</b>	48733815	A(0.385)	A(0.367)	<b>A(0.382)</b>	<b>0.0061</b>	2.36(1.28,4.37)	イントロン
		<b>rs739923</b>	48735774	A(0.255)	A(0.225)	<b>A(0.250)</b>	<b>0.0050</b>	0.27(0.11,0.68)	イントロン
		rs733392	48736403	A(0.258)	A(0.174)	A(0.244)	0.0239	0.38(0.17,0.88)	イントロン
		rs1978153	48737861	G(0.388)	G(0.296)	G(0.373)	0.0152	0.44(0.23,0.85)	イントロン
	kgp388163	rs2301837	48738266	A(0.088)	A(0.133)	A(0.095)	0.4262	0.64(0.22,1.91)	イントロン
	kgp3814620	rs7216383	48739543	G(0.238)	A(0.418)	G(0.291)	0.0316	0.45(0.21,0.93)	イントロン
	kgp2507665	rs61479331	48740116	C(0.227)	A(0.490)	C(0.271)	0.0524	0.48(0.23,1.01)	イントロン
		rs16949202	48743275	G(0.148)	G(0.051)	G(0.133)	0.8366	0.91(0.38,2.17)	イントロン
	kgp12280761	rs886493	48744612	A(0.468)	A(0.449)	A(0.465)	0.0134	0.44(0.23,0.85)	イントロン

註：呼吸抑制(RD)による PACU 滞在延長のオッズ比(OR)と 95% CI として影響を示す。OR は、マイナーアレル(人種合算)が 1 コピー増加した場合のオッズ比を示した。

【 0 1 6 9 】

[203] 加えて、我々は、上記に考察した A B C B 1、F A A H、及び O P R M 1 のデ

10

20

30

40

50

ータをより大きな標本で解析した。下記の表に詳述されるように、A B C B 1 r s 9 2 8 2 5 6 4 の P A C U 滞在延長をもたらす呼吸抑制 ( p l o n g R D ) との関連と、F A A H r s 3 2 4 4 2 0 の術後の悪心及び嘔吐 ( P O N V ) との関連の有意性を 0 . 0 0 0 2 と 0 . 0 1 4 3 の p 値で検証した。この結果は、各症例においてマイナーアレルを有する患者が、そのオッズ比によって示唆されるように、これら有害事象のより高いリスクを有することを示した。

【 0 1 7 0 】

【表 9】

表 9：臨床転帰と変異の関連性

遺伝子	SNP	転帰	マイナーアレル	標本 (N)	p 値	オッズ比(95% CI)
OPRM1	rs1799971(A118G)	RD	G	339	0.1586	
OPRM1	rs1799971(A118G)	総モルヒネ量	G	339	0.3552	
OPRM1		RD	GG+GA	339	0.3159	
OPRM1		総モルヒネ量	GG+GA	339	0.2264	
ABCB1	rs9282564	plongRD	G	339	0.0002	4.27(1.97-9.23)
FAAH	rs324420	PONV	A	339	0.0143	1.74(1.12-2.71)

【 0 1 7 1 】

実施例 4：若年者における脊椎固定術に続くモルヒネ誘発性呼吸抑制のリスクと O P R M 1 A 1 1 8 G 変異の関連性

[204] 本研究は、O P R M 1 A 1 1 8 G 変異がモルヒネ誘発性呼吸抑制 ( M I R D ) への罹患性に影響を及ぼし得るかどうかを判定するために実行した。本実施例は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Chidambaran et al. The Pharmacogenomic Journal (2014) 1-8 として後に公表された。

【 0 1 7 2 】

[205] I R B 承認と同意の後で、脊椎後方固定術を施行された 8 8 名の特発性側湾症の非肥満若年者において前向き遺伝子型盲検試験を実行した。すべての患者が術後にモルヒネ患者制御鎮痛を受けて、4 8 時間追跡された。M I R D 転帰を「1 分間に 8 回未満の R R が術後に出現して、3 分より長い間の是正処置が必要とされること」として定義した。モルヒネ消費、術後疼痛スコア、ジアゼパムの使用、及び他の鎮痛薬に関するデータを記録した。患者について、O P R M 1 A 1 1 8 G 変異の遺伝子決定をした。O I R D に影響を及ぼす因子についての回帰分析には、人種、性別、モルヒネ要求量、及び遺伝子型が含まれた。遺伝子型サブ群における疼痛スコアと関連の変数を比較した。登録被験者は、1 1 ~ 1 9 歳で；5 9 % が女性で、8 5 % が白人であった。O P R M 1 遺伝的変異に基づくと、6 7 名が野生型の同型接合 ( A A ) で、2 1 名が変異の異型接合 / 同型接合 ( A G / G G ) であった。A A 遺伝子型の 3 7 % が P O D 1 / 2 に M I R D を有したのに対し、G G / A G 遺伝子型で M I R D を有したのは 9 % にすぎなかった ( 図 7 A )。A A 遺伝子型の患者における M I R D は、変数について補正した後で、G アレルを保有する患者と比較して、有意に ( > 5 倍 ) 高かった ( O R 9 5 % C I : 1 . 5 ~ 4 0 . 6 , p = 0 . 0 2 7 ) ( 図 7 B )。A A 遺伝子型と比較して、A G / G G 遺伝子型の小児は、P O D 1 / 2 に有意により高い疼痛スコア ( p = 0 . 0 2 ) とより高いモルヒネ要求量を有した ( 図 7 C )。

【 0 1 7 3 】

[206] これは、O P R M 1 A A 遺伝子型では、A G / G G 遺伝子型よりもモルヒネ要求量が少ないにもかかわらず呼吸抑制のリスクがより高いことを示した最初の前向き臨床試験である。A 1 1 8 G 変異での G アレルの存在は、M I R D に対する保護効果を有した。この遺伝子型 - 呼吸抑制の関連性は、より高いリスク状態にある小児を予測して重篤

10

20

30

40

50

な有害作用の見込みを最小にする一方で、疼痛緩和を最大にするように小児におけるモルヒネの使用を個別化することの重要な一歩である。

【 0 1 7 4 】

実施例 5：小児の扁桃摘出術に続くオピオイド誘発性呼吸抑制の遺伝リスクシグネチャー

[207] 遺伝子研究の知見を臨床診療と遺伝リスク因子の重要な意義のより良い臨床適応性へ翻案するためには、多変量予測因子に基づいた、容易に適用可能な臨床決定則を開発しなければならない。本研究の目的は、遺伝的要因と非遺伝的要因を使用して、モルヒネ誘発性呼吸抑制への罹患性の予測のための信頼し得る安定したモデルを開発することであった。本実施例は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Biesiada et al., *Pharmacogenomics* (2014) 15(14): 1749-1762 として後に公表された。

10

【 0 1 7 5 】

[208] 呼吸抑制についての遺伝リスク因子を同定することは、遺伝子 - 遺伝子相互作用（個々の遺伝子 / マーカーの R D との関連性は弱い）によって、そして人種と家系、O S A のような様々な臨床病態、そしてさらに文化的背景（これは、疼痛忍容性と、疼痛を改善するために使用されるオピオイドの最終用量に影響を及ぼす可能性がある）との相互作用によって複雑化される。結果として、別個のサブタイプへ患者を層別化するための戦略は、S N P（又は他のマーカー）と R D との間の関連性のより強い（そしておそらくは各サブタイプにおいて明瞭な）パターンを同定するのに役立つ可能性がある。

【 0 1 7 6 】

20

[209] 本研究では、上記の目標を達成するために、教師付き（supervised）アプローチと教師無し（unsupervised）アプローチの両方を使用した。デシジョンツリーを使用する再帰分割法は、データ固有の層別化を提供して、予測 S N P（とそれらの組合せ）の選択と全体の正確度を最適化する。加えて、デシジョンツリーは、臨床決定支援の基礎として使用し得る、解釈するのが容易な決定則を提供する。教師無しクラスタリングアプローチは、多数の S N P でのアレルだけでなく、上記に言及した複雑な相互作用を把握することに関連し得る他の特徴を共有する患者のクラスターへのコホートの二者択一的な層別化を提供することができる。個別のクラスターを定義することに最も貢献する S N P（と O S A のような臨床変数）は、例えば、癌の分子サブタイプを定義する遺伝子シグネチャーに喩えて、それらクラスター（サブタイプ）の「S N P シグネチャー」とみなすことができる。

30

【 0 1 7 7 】

[210] 捕捉的な分類化（再帰分割）及びクラスタリング（S N P シグネチャー）の戦略を使用することで、結果の検証を容易にして、データ中に隠れた構造を解明することもできる。本研究では、この 2 つのアプローチの結果が概ね一致した結果を生むことを見出した。有意に異なる R D のリスクを特徴とする、別個のクラスターの両方へ貢献する数個の S N P を見出した。特異的な層の内部で比較的高い正確度で R D を予測するために使用し得る決定則も確定した。これらの結果を下記に要約する。

【 0 1 7 8 】

研究デザイン、参加者、及び手順

40

[211] 適正な I R B 承認と同意の後で、扁桃摘出術を施行中で、標準的な周術期ケアの一環としてモルヒネを受容する 6 ~ 15 歳の 273 名の小児において前向きな遺伝子型盲検試験を実行した。すべての患者について、回復室において、モルヒネ要求量、疼痛転帰と R D の発生、研究対象とした主要転帰を観測した。臨床的に明白な上気道閉塞の非存在下での、1 分あたり 10 回未満の呼吸という呼吸数、又は 92 % より高い S p O<sub>2</sub> を維持するのに酸素補充を必要とする 92 % 未満の持続的な酸素飽和として R D を定義した。すべての患者について、TaqMan アッセイを使用して、モルヒネ薬物動態と呼吸抑制経路に関与することが知られている 15 種の遺伝子中 48 個の一塩基多型（S N P）の遺伝子型決定をした。遺伝的要因と非遺伝的要因（人種、性別、O S A）について R D のリスクとの関連性を解析して、簡単な論理則及びデシジョンツリーのアプローチを使用して、

50

段階的なリスクベースのアルゴリズムを構築した。

【 0 1 7 9 】

#### 結果

[212] 本研究では、疼痛を改善するために追加の術後モルヒネ投薬を必要とした患者（273名の患者のうち170名、このうち45名がRDを有した）において、RDのリスクを考慮した。このやり方で解析を層別化することで、この解析において、より高い疼痛感受性、人種、及びOSA（より高い有害作用リスクのために、OSAの患者は、予防措置として、モルヒネをより低い用量から開始する）の間の相互作用をより良く考慮することが可能になった。高用量のモルヒネ（非OSA患者への0.2mg/kgのベースラインとOSA患者への0.1mg/kgと対照的に、0.3mg/kgより高いと定義される）を受けた患者のサブセットでも定性的に類似した結果が得られ、RDの予測リスクがあれば、そのように確定される決定則を使用して、モルヒネの追加用量に関する臨床決定を導くことが可能であることを示唆した。

10

【 0 1 8 0 】

[213] 教師無しクラスタリングアプローチとこの解析に含まれるすべてのSNP（互いと高いLD状態にあるものは除く）を使用して、RDのリスクが「低リスククラスター」の約10%から「高リスククラスター」の約40%へ徐々に増加する、5つのクラスターを同定した（図8A）。この段階では、人種、OSA、及び性別が含まれる、いくつかの臨床/人口統計変数を使用したことに注目すべきである。しかしながら、これらの変数は、クラスタリング結果を偏らせるものの、同定したクラスターとの明白な関連性は示さなかった。そのような定義クラスターの重心（centroids）を使用すること（癌サブタイプ分類化のための「遺伝子シグネチャー」ベースのアプローチに似ている；ここでは、SNPシグネチャーを使用して、リスクサブタイプを判定する）で、「高い」対「中間」対「低い」リスクの評価について約82%の正確度を得た。

20

【 0 1 8 1 】

[214] このように入手した諸層の解析は、ほとんどの識別シグナルがほんの一握りのSNPに由来することを明らかにする。このことは、3種のSNP、即ち、rs2295632（FAAH）、rs1045642（ABCB1）、及びrs1042713（ADRB2）の組合せにより、単変量解析と比べてRD症例の識別が改善されるという事実によってはっきりされる。図8Bに示すデシジョンツリーから導かれる簡単な決定則を使用すると、（最も識別力のあるSNP rs2295632単独での0.0002とは対照的に）0.000003のp値が得られ、術後介入を必要とした患者のセットに対して約70%の平均（balanced）正確度で、「低リスク層」対「高リスク層」を同定することが可能になる：

30

IF [(rs2295632=CC) OR (rs1045642=CC) OR (rs1042713=AA)] THEN RD=NO (low risk of RD)

ELSE RD=YES (high risk of RD)

( [(rs2295632=CC) 又は (rs1045642=CC) 又は (rs1042713=AA) ] であれば、RD=無し (RDの低リスク)

さもなければ、RD=有り (RDの高リスク) )。

40

【 0 1 8 2 】

[215] 上記の決定則は、全3つの遺伝子座にリスクアレルを有する患者を高リスク患者として同定する（図8Bのツリーの右端のリーフ、RD=有りの26症例とRD=無しの24症例）。ここで提示した「SNPシグネチャー」は、教師無しアプローチを使用して導いた（そしてそれ故に、モデル中のパラメータの訓練セットに対する最適化を必要としなかった）が、このことは、その一般化にとって吉兆である。このデータの階層的クラスタリングについては、本研究の公表版である、Pharmacogenomics, 15(14): 1749-1762 (2014) に示されている。

【 0 1 8 3 】

[216] SNP選択、コーディングアレル（「アレル」対「優性 - 劣性」ベース）、追

50

加の層別化判定基準（例、「高用量のモルヒネ」対「必要とされる介入」）の包含の影響について検定することによって、上記の知見を検証した。P V C L U S T も使用してブートストラップを実施して、観測されたクラスタリングパターンの安定性についてさらに評価した。主たる5つのクラスターへの支援は高いものの、それらの全体順位はずっと不安定であって低い支援を有し、さらなる改善が達成し得ることを示唆した。

#### 【0184】

[217] 独立的な検証では、本プロジェクトの第一相の結論が出てからそのデータが利用可能になった、74名の患者のセットを使用した。274名の患者の訓練セットと一緒にこの新しいデータ点をクラスタリングすると、274名の訓練セットだけで観測されるクラスタリングパターンが再現された。介入を必要とした、対照セット由来の新しい患者では、低リスククラスターへ割り当てられた患者が、高リスククラスターへ割り当てられた患者（30%）と比較して、2倍少ないRD症例（16%）を有した。加えて、2つの極端なクラスター（RDの最高リスクと最低リスク）は、実のところ、いくらか良く分離したものの、さらにより多くのデータが利用可能になるときは、さらなる改善が達成される可能性があることを示唆した（図10）。適正で独立した検証の後には、遺伝子型ベースの決定アルゴリズムが根底にあるリスクを事前に判定して周術期の管理を特別設計するのに役立って、個別化鎮痛の臨床実施における重要な基礎ステップとなる可能性がある。

#### 【0185】

実施例6：外科手術を施行中の小児におけるオピオイド関連の有害作用：女児に対する不公平な重荷

[218] オピオイドに対する、鎮痛作用と有害作用の観点からの性特異的な応答について研究する、小児における臨床研究は無い。

#### 【0186】

[219] 小児集団におけるモルヒネ作用の性差についての研究は、その根底にある機序が生理学的因子、発育因子、及びホルモン因子（これらは、思春期前の小児、若年者、及び成人の間で変動し得る）によって影響を受ける可能性があるので、特に重要である。異なる外科手術を施行中で異なる周術期医薬品を服用している、様々な合併症を抱えた成人と比べて、1種類の外科手術を標準化された周術期管理で施行中の、比較的多数の健常な小児は、オピオイドに関連した個体間変動を研究するのにより良好な集団である。本研究では、小児の性別が、オピオイドの使用に伴う術後の鎮痛転帰と有害作用転帰に影響を及ぼすと仮定した。故に、我々の研究の目的は、扁桃摘出術を施行中の小児においてモルヒネの鎮痛特性と有害作用を決定することにおける、小児の性の役割を判定することであった。多様なオピオイド応答へ貢献する因子に関する知識は、将来において、オピオイド投薬、鎮痛転帰を最適化して、有害作用の防止戦略を知らせるのに役立つであろう。

#### 【0187】

##### 研究デザイン、参加者、及び手順

[220] これは、扁桃摘出術集団内で標準的な周術期麻酔と外科診療、及び標準的な術後看護ケアを使用する、前向き臨床観察研究であった。本研究は、シンシナチ小児病院メディカルセンター（オハイオ州シンシナチ、アメリカ）の施設内審査委員会によって承認されて、書面のインフォームドコンセントと同意をすべての両親と参加児童より適宜入手した。本プロジェクトでは、特定の人種への選択はなかったが、この病院での扁桃摘出術又はアデノイド口蓋扁桃摘出術（T/T A）の手術患者の人口統計からすると、大多数の患者は、白人であった（図11）。多数の人種についてのデータが利用可能であったが、非白人の男児及び女児の標本サイズが小さいことから、以前の研究（Sadhasivam S. et al., Pediatrics, 129: 832-8 (2012)）では、小児におけるオピオイド関連有害事象における人種による差異（白人小児のほうが黒人小児より相対的に多くの有害作用を受ける）が示されたので、本研究は、白人小児に絞って、白人小児における性の影響について検討した。

#### 【0188】

[221] 本試験に資格がある、選択外来T/T Aを施行中の6～15歳の小児に交渉し

て、2008年8月と2012年2月の間の手術日に登録した。人種は、両親が子供のいずれかによる自己申告性であって、人種を確定するための自己報告を受け入れる(Boehmer U. et al., American Journal of Public Health, 92: 1471-2 (2002); Dahan A. et al., Anesthesiology, 88: 903-13 (1998))。標本選択基準は、再発性扁桃炎、アデノイド口蓋扁桃肥大、又はOSAの故にT/TAの予定がある、米国麻酔学会(ASA)の身体状態1又は2を有すると指定される小児であった。OSA指定の臨床診断には、いびき+10秒以上続く睡眠休止又は日中の眠気の既往歴がある睡眠時呼吸障害が含まれた。小児又はその両親が英語を話せなければ、彼らを本研究から除外した。モルヒネに対してアレルギーがあるか又は発達障害、肝臓又は腎臓の疾患、又はオピオイド鎮痛薬を必要とする術前疼痛(例、慢性扁桃炎)を有する小児も除外した。本研究への研究コーディネーターの利用に限りがあったので、有資格被験者をすべて登録し得たわけではなかった(図11)。

10

#### 【0189】

[222] 本研究施設でのT/TA標準診療の一環として、すべての小児は、予防用のオンドンセトロン(0.1mg/kg)とデキサメタゾン(0.1mg/kg)を術中に服用する。セボフルラン吸入誘導により麻酔を誘導し、プロポフォール(2mg/kg)ボラスを続けて気管内挿管を容易にする。麻酔は、神経筋肉遮断を使用せずにセボフルランで維持した。患者は、外科的切開に先立って、予防的な(pre-emptive)鎮痛のためにモルヒネを受容する。OSA既往歴のある小児が0.1mg/kgのモルヒネを受容するのに対して、OSA診断のない小児は、0.2mg/kgを受容する。外科的切開と焼灼に続く疼痛(心拍数及び血圧の臨床的に有意な増加)が示唆されるどんな徴候でもあれば、臨床麻酔チームは、術中に必要に応じて追加のモルヒネを提供する。

20

#### 【0190】

##### 転帰

[223] 鎮痛作用とオピオイド関連有害作用についての転帰を回収した。鎮痛作用の転帰には、術後疼痛スコア、モルヒネ用量(mg/kg)、静脈内鎮痛介入の必要(有り/無し)、疼痛によるPACU滞在延長(>90分)(有り/無し)、及び与えた全鎮痛介入の回数が含まれた。加えて、0~10の数値評価スケール(NRS)(Voepel-Lewis T. et al., Anesth. Analg., 112: 415-21 (2011))と0~10のFLACC(顔の表情; 脚の動き; 活動性; 泣き声; 及び機嫌)スケール(Merkel S. et al., Pediatr. Nurs., 23: 293-7 (1997))をそれぞれ使用して、主観的疼痛スコアと客観的疼痛スコアについて評価した。PACUでは、モルヒネ(0.05mg/kg)の救助的投与で有意な術後疼痛(NRS又はFLACCが4/10以上)を管理した。最大のNRSスコアとFLACCスコアについて検討した。

30

#### 【0191】

[224] 1)RD、悪心/嘔吐(PONV)、及び掻痒が含まれるオピオイド関連の副作用; 2)呼吸抑制又は悪心/嘔吐に続発するPACU滞在延長という2組の二元転帰によって有害作用を測定した。我々の研究では、RDを、臨床的に明白な上気道閉塞と1分以上の人為的結果の非存在下での、1分あたり10回未満の呼吸という持続的な呼吸数、又は92%より高いSpO2を維持するのに酸素補充を必要とする92%未満の持続的な酸素飽和として定義した。

40

#### 【0192】

[225] PACU滞在の期間(PACU退院準備を達成するための時間)を、以下の退院判定基準に達する前のPACU中の時間として定義した。意識レベル: 容易に覚醒可能であるか又は覚醒している、気道: 十分な空気交換が可能、深部体温: 36.3以上、許容疼痛レベル(4未満の疼痛スコア)、血行力学的に安定している、PONVや呼吸抑制のような有意なオピオイド関連有害作用無し、及び外科手術部位に出血も合併症も無いこと。この退院準備時間は、社会的な理由(例、乗車待ち、等)による遅延を含めなかったため、実際のPACU退院時間とは異なるものである。

#### 【0193】

50



### 統計解析

[226] 解析に先立って、データの質を検討した。アフリカ系アメリカ人が44名で、他の人種も10名しか含まれなかったため、白人に対して解析を実施した。性別の影響について評価するために、初めに転帰測定値をOSA層別化の有り無しで男児と女児の間で比較した。t検定又はウィルコクソン(Wilcoxon)順位和検定を使用して連続変数を比較して、フィッシャーの正確検定を使用してカテゴリ変数を比較した。モルヒネ作用について解析するために、術中モルヒネ用量(mg/kg)と総モルヒネ用量(mg/kg)を低、中、及び高用量(術中モルヒネでは、0.1以下、0.1~0.2、0.2以上、総モルヒネでは、0.2未満、0.2~0.3、及び0.3以上)へ分類した。スピアマン(Spearman)相関係数を使用して、モルヒネ用量と転帰との関係を性別で評価した。

10

#### 【0194】

[227] 次に、多変量統計モデリングを実施して、共変数効果について考慮しながら、性別の影響と性ホルモン用量の相互作用について正式に検定した。鎮痛作用の転帰では、術中モルヒネ用量を共変数として使用し、副作用の転帰では、総モルヒネ要求量(術中モルヒネ用量と術後モルヒネ用量の和として計算される)を共変数として使用した。年齢、体重、BMI zスコア、及びOSAの影響についても、すべての転帰の共変数として検定した。有意な影響が検出された( $p < 0.05$ )場合、共変数を最終モデルに含めた。ロジスティック回帰を使用して、二元転帰を解析した。線形回帰を使用して、最大NRSを解析した。スコアの過剰頻度の故に、ゼロ過剰負の二項分布モデルを使用することによって、最大FLACCスコアを解析した。鎮痛介入の総数は、ポアソン分布に従ったので、一般化線形モデルを使用して解析した。介入を必要とした患者において、線形回帰を使用して、術後モルヒネ用量を解析した。

20

#### 【0195】

[228] 副作用と総モルヒネ用量の間の変化が年齢によって異なるのかどうかを検討するために、女性患者を3つの年齢群(8歳未満、8~13歳、及び13歳以上の年齢)へ群分けして、正式のタナー分類(Tanner staging)の代わりに、女性を思春期前、思春期、及び思春期後として分類した。この解析では、モルヒネの潜在的な閾値効果の故に、総モルヒネ要求量を0.3又は $< 0.3$  mg/kgの用量範囲へ二分した。この3つの年齢群において別々に、総モルヒネ用量とPONV、RD、PONVとRDによるPACU滞在延長の間の線形傾向について評価した。次に、この仮説を、多変量ロジスティックモデルを使用して正式に検定した。

30

#### 【0196】

[229] 統計解析ソフトウェア、バージョン9.3(SAS Institute社、ノースカロライナ州ケリー)を使用して、統計解析を実施した。0.26の平均スピアマン相関係数で11種の相関転帰を検討した。相関性補正したボンフェローニ補正(<http://www.quantitativeskills.com/sisa>)により、0.008の有意閾値を生じた。0.05の閾値に近づく関連性についても報告した。このことは、将来の研究のために潜在的な関連性を同定するのに役立ち得るが、第一種過誤率の上昇による上記結果を解釈する場合には、注意を払わなければならない。

40

#### 【0197】

### 結果

[230] コソートダイアグラムでは、有資格で、交渉されて登録した研究被験者を図解する(図11)。非白人小児の相対的に少ない標本サイズ(44名のアフリカ系アメリカ人と10名の他の人種、又は二人種)のために、本研究は、219名の白人小児(114名の女児と105名の男児)に焦点を当てた。平均年齢と平均体重は同等であったが、OSAの発症率は女児の方が高かった(50%対36%,  $p = 0.04$ ) (表10)。年齢とBMIは、男児と女児の間で同等であった。

#### 【0198】

[237] すべての総モルヒネ用量を一括の群にまとめると、単変量解析(表11)又は多変量モデリング(データ示さず)において、鎮痛作用とオピオイド関連の有害転帰のい

50

ずれにおいても、有意差を検出しなかった。OSAによる層別化は、上記の結果に影響しなかった。

【 0 1 9 9 】

【 表 1 0 】

表 1 0 . 人口統計の特性と周術期のモルヒネ使用

	女性(N=114)	男性(N=105)	P 値
年齢(歳)	8.4(7.1,11.6)	8.4(6.9,10.4)	0.16
体重(Kg)	36.1(26.0,48.0)	33.3(25.8,43.6)	0.25
BMI zスコア	0.9(-0.2,1.6)	0.6(-0.2,1.6)	0.93
術中モルヒネ(mg/kg)	0.19(0.16,0.21)	0.19(0.18,0.21)	0.42
総モルヒネ量(mg/kg)	0.23(0.19,0.29)	0.25(0.20,0.29)	0.13
年齢群			
・ >13 歳	15(13%)	8(8%)	0.39
・ 8-13 歳	52(46%)	49(47%)	
・ <8 歳	47(41%)	48(46%)	0.86
術中モルヒネ量群			
・ 0.1-0.2mg/kg	71(62%)	68(65%)	
・ >0.2mg/kg	43(38%)	37(35%)	0.71
総モルヒネ量群			
・ <0.2mg/kg	41(36%)	33(31%)	
・ 0.2-0.3mg/kg	50(44%)	47(45%)	
・ >0.3mg/kg	23(20%)	25(24%)	
OSA			0.039
・ 無し	57(50%)	67(64%)	
・ 有り	57(50%)	38(36%)	

BMI zスコアは、CDC 成長チャートを使用して計算した。

年齢、体重、BMI zスコア、術中モルヒネ、及び総モルヒネ要求量を研究コホート全体のメジアンと IQR として示して、ウィルコクソン順位和検定を使用して比較する。年齢群、術中モルヒネ量群、及び総モルヒネ量群、及びOSAを数値と比率として示して、ピアソン  $\chi^2$  乗検定を使用して比較する。

OSA＝閉塞性睡眠時無呼吸

【 0 2 0 0 】

10

20

30

【表 1 1】

表 1 1. 鎮痛作用とオピオイド有害作用の転帰における性差

		無し	P 値	有り	P 値	合計	p 値
術後モルヒネ (mg/Kg)	F	0.08±0.04	0.31	0.09±0.06	0.89	0.09±0.05	0.60
	M	0.09±0.05		0.09±0.05		0.09±0.05	
最大 NRS	F	6(3-9)	0.25	5(2-9)	0.92	6(2-9)	0.38
疼痛スコア	M	6(3-8)		5(2-8)		5(3-8)	
最大 FLACC	F	2(0-4)	0.84	2(0-5)	0.08	2(0-5)	0.25
疼痛スコア	M	2(0-5)		4(1-7)		2(1-5)	
鎮痛介入の 回数	F	1(0-1)	0.3	1(0-1)	0.26	1(0-1)	0.88
	M	1(0-1)		1(0-2)		1(0-1)	
疼痛による PACU 滞在延長	F	21(17%)	1	16(17%)	0.82	37(17%)	0.78
	M	24(19%)		12(13%)		36(16%)	
PACU における鎮 痛介入の必要性	F	35(28%)	0.36	32(34%)	0.28	67(31%)	1.00
	M	35(28%)		26(27%)		61(28%)	
RD	F	9(7%)	0.81	11(12%)	0.79	20(9%)	1.00
	M	12(10%)		6(6%)		18(8%)	
PONV	F	11(9%)	0.20	11(12%)	1.00	22(10%)	0.28
	M	7(6%)		7(7%)		14(6%)	
掻痒	F	41(33%)	0.54	47(50%)	0.30	88(41%)	0.75
	M	51(41%)		28(30%)		79(36%)	
RD による PACU 滞在延長	F	5(4%)	0.77	6(6%)	0.75	11(5%)	0.53
	M	8(6%)		5(5%)		13(6%)	
PONV による PACU 滞在延長	F	2(2%)	0.29	8(8%)	0.31	10(5%)	0.81
	M	6(5%)		2(2%)		8(4%)	

術後モルヒネ量を平均+SDとして示して、t検定を使用して比較した。これを検討したのは、術後モルヒネを必要とした患者だけである。

鎮痛介入の回数、最大NRS、及びFLACCスコアをメジアン(IQR)として示して、ウィルコクソン順位和検定を使用して比較した。

二分(dichotomous)変数を症例数(比率)として示して、フィッシャーの正確検定を使用して比較した。

F:女性;M:男性、PACU:麻酔後回復室、RD:呼吸抑制、PONV:術後の悪心及び嘔吐

【0201】

10

20

30

40

## 【表 1 2】

表 1 2. 有害作用と総モルヒネ用量の性特異的な関連性

総モルヒネ量/体重 (mg/kg)

		<0.2 症例数(%)	0.2-0.3 症例数(%)	≥0.3 症例数(%)	p 値
RD	F	5(12)	3(6)	12(52)	0.001
	M	4(12)	6(13)	8(32)	0.079
PONV	F	4(10)	8(16)	10(43)	0.003
	M	6(18)	7(15)	1(4)	0.172
搔痒	F	29(73)	42(84)	17(74)	0.636
	M	24(73)	35(76)	20(80)	0.521
RD による PACU 滞在延長	F	2(5)	1(2)	8(35)	0.002
	M	5(15)	3(6)	5(20)	0.841
PONV による PACU 滞在延長	F	2(5)	3(6)	5(22)	0.068
	M	4(12)	3(6)	1(4)	0.295

\*: スピアマン相関係数に基づく正確検定

F: 女性; M: 男性; PACU: 麻酔後回復室、RD: 呼吸抑制、PONV: 術後の悪心及び嘔吐

10

## 【 0 2 0 2 】

## 【表 1 3】

表 1 3. 鎮痛作用と総モルヒネ用量の性特異的な関連性

		術中モルヒネ量/体重 (mg/kg)			p 値*
		≤0.1	>0.1-0.2	>0.2	
		平均±SD	平均±SD	平均±SD	
		メジアン(IQR) 症例数(%)	メジアン(IQR) 症例数(%)	メジアン(IQR) 症例数(%)	
術後モルヒネ量(mg/Kg)	F	0.07+0.03	0.09+0.05	0.10+0.05	0.90
	M	0.07+0.04	0.10+0.05	0.09+0.05	0.83
最大 NRS 疼痛スコア	F	8(6-10)	5(2-8)	6(3-9)	0.75
	M	6(5-9)	5(2-8)	6(4-7)	0.95
最大 FLACC 疼痛スコア	F	3(3-4)	2(0-5)	1(0-5)	0.24
	M	3(1-5)	3(1-7)	2(0-5)	0.20
鎮痛介入の回数	F	1(1-2)	1(0-1)	1(0-1)	0.22
	M	1(1-2)	1(0-1)	1(0-1)	0.40
疼痛による PACU 滞在延長	F	3(60)	22(33)	12(28)	0.28
	M	2(33)	22(35)	12(32)	0.85
PACU における鎮痛介入必要性	F	5(100)	40(61)	22(51)	0.10
	M	5(83)	36(58)	20(54)	0.35

\*: スピアマン相関係数に基づく正確検定

術後モルヒネ量を平均+SDとして示して、術後モルヒネを必要とした患者において検討した。

鎮痛介入の回数、最大NRS、及びFLACCスコアをメジアン(IQR)として示した。

二分変数を症例数(比率)として示した。

F: 女性; M: 男性; PACU: 麻酔後回復室、NRS=数値評価スケール

20

30

40

## 【 0 2 0 3 】

【表 1 4】

表 1 4. 総モルヒネ量で群分けした「低年齢」対「高年齢」女児におけるオピオイド関連有害作用

オピオイド関連有害作用	年齢	総モルヒネ量/体重(mg/kg)		p 値*
		<0.3 症例数(%)	≥0.3 症例数(%)	
呼吸抑制(RD)	>13	1(9)	2(50)	0.15
	8-13	4(9)	5(56)	0.0045
	<8	3(8)	5(50)	0.0067
RD による PACU 滞在延長	>13	0(0)	1(25)	0.27
	8-13	1(2)	3(33)	0.0138
	<8	2(5)	4(40)	0.0139
PONV	>13	1(9)	0(0)	
	8-13	2(5)	1(11)	
	<8	7(19)	6(60)	0.0175
PONV による PACU 滞在延長	>13	1(9)	0(0)	1.00
	8-13	2(5)	1(11)	1.00
	<8	2(5)	4(40)	0.0139

PACU:麻酔後回復室、PONV:術後の悪心及び嘔吐

\*: スピアマン相関係数に基づく正確検定

## 【 0 2 0 4 】

[231] この単変量解析は、総モルヒネ量を連続変数として使用する、モルヒネ作用を性別によって正式に検定する多変量モデルによって支持された。PONV ( $p = 0.001$ ) と PONV による PACU 滞在延長 ( $p = 0.010$ ) において、有意な性特異的なモルヒネ作用が検出された。女児では、これらの有害作用を有する確率が総モルヒネ用量の増加とともに高まったが、一方男児では、総モルヒネ用量の増加に伴って有害作用を有する確率において、有意な変化を検出しなかった(図 1 2 A 及び 1 2 B)。

## 【 0 2 0 5 】

[232] 表 1 2 に示すデータは、女児において、総モルヒネが  $0.3 \text{ mg/kg}$  を超えるときにほとんどの副作用が起きることを示した。この閾値モルヒネ作用について、多変量モデルを使用して検定した。副作用の確率は、2つの低モルヒネ群の間で異ならなかった。しかしながら、モルヒネが  $0.3 \text{ mg/kg}$  を超えると、掻痒以外のすべてのオピオイド有害作用の確率が有意に ( $p < 0.05$ ) 増加した。

## 【 0 2 0 6 】

[233] 女児において、呼吸抑制を有する確率は、総モルヒネ用量の増加に伴って高まった ( $p = 0.001$ ) (図 1 3 A 及び 1 3 B)。男児では、総モルヒネ用量の増加に伴って RD を有する確率において、有意な変化を検出しなかった ( $p = 0.079$ , 表 1 2)。より若年の女児(8歳未満と8~13歳)では、RDとより高い総モルヒネ用量( $0.3 \text{ mg/kg}$ 以上)の間に統計学的に有意な関連性が検出された(表 1 3)。

## 【 0 2 0 7 】

[234]  $0.3 \text{ mg/kg}$  以上の総モルヒネを受容した白人女児は、 $0.3 \text{ mg/kg}$  未満の総モルヒネを受容した女児 ( $82.2 \pm 3.3$  分) より長く PACU に滞在した ( $111 \pm 6.6$  分) (図 1 4)。<  $0.3 \text{ mg/kg}$  未満のモルヒネを受容した男児が PACU に  $88.3 \pm 3.6$  分間滞在したのに対し、 $0.3 \text{ mg/kg}$  以上の総モルヒネを受容した白人男児は、PACU に  $99.7 \pm 6.4$  分間滞在した(図 1 3)。この PACU 退院準備時間における差は、年齢、体重、OSA の既往歴を補正した後で、統計学的有意性に達しなかった ( $p = 0.09$ ) もの、より高い総モルヒネ用量を受容した白人女児において、より低い用量より滞在時間が約 30 分長いことは、外来扁桃摘出術の後で臨床的及び経済的に重要である。性別によって層別化した解析において、高用量の女児における PACU 滞在延長が男児のそれと統計学的有意性 ( $p = 0.09$ ) で異ならなかったものの、高用量の女児は、低用量の女児より長い PACU 滞在を有し ( $p = 0.0002$ )、一方男児では、その差は、統計学的に有意でない ( $p = 0.11$ ) (図 1 4)。

## 【 0 2 0 8 】

[235] 単変量モデリングと多変量モデリングのいずれを使用しても、鎮痛転帰に対す

10

20

30

40

50

る性特異的なモルヒネ作用についての証拠は無かった（表 1 3）。鎮痛作用に関しては、性別による、モルヒネへの差示的な応答は無かった。

【 0 2 0 9 】

[236] 要約すると、女児では、PONV、RD、PONVとRDによるPACU滞在延長について、総モルヒネ用量との有意な関連性が検出された。この関連性が年齢（即ち、思春期後の女児におけるホルモンの影響）によって影響を受けるかどうかを検定するために、8歳未満、8～13歳、及び13歳より上の女児を比較した（表 1 3）。より若年の女児（8歳未満と8～13歳）は、RD、PONV、及びPACU滞在延長との関連性を示した。しかしながら、この年齢効果だけを多変量モデルにおいて検定すると、おそらくは標本サイズが小さいために、統計学的に有意な年齢差異は検出されなかった（データ示さず）。

10

【 0 2 1 0 】

[237] 本研究は、同様の鎮痛作用を受けるものの、白人女児は、総モルヒネ用量が増加するにつれて、男児よりもオピオイド有害作用に対して敏感であったことを実証する。白人女児は、男児に比べて、オピオイド関連有害作用のより高い発症率と外来手術後の入院延長という不公平な重荷をもたらす、より高い総モルヒネ用量への差示的な応答を有する。具体的には、女児でのモルヒネ用量の増加は、男児に比べて、RD、PONVの増加と、オピオイド関連の呼吸抑制とPONVによる回復室での滞在延長に関連した。総モルヒネを低用量、中用量、及び高用量へ層別しない場合、小児における周術期モルヒネ使用での安全性と鎮痛転帰は、性別によって異ならなかった。上記の知見は、年齢、BMI、及び外科技術に関連しなかった。女児では、男児に比べて、より高用量のオピオイドでより多くのオピオイド関連のRD及びPONVを受けて、より長期の入院につながる可能性がある。上記の知見には、有意な臨床及び経済上の影響がある。

20

【 0 2 1 1 】

[238] モルヒネ用量を高めることは、男児ではなく女児において、副作用の増加をもたらすことが見出された。具体的には、最高のモルヒネ用量カテゴリー（0.3 mg/kg）を受容した女児は、高用量カテゴリーではない女児に比べて、有意により多いRD、PONV、RDによるPACU滞在延長、及びPONVによるPACU滞在延長を有した。しかしながら、男児では、モルヒネ用量が副作用と関連しなかった。重要にも、上記作用は、このコホート中の女児においてOSAの発症率が相対的に高いにもかかわらず、OSAに関連しなかった。成人集団では、男性に比べ、女性が、呼吸抑制を含めてより高率のオピオイド関連有害作用を体験すると文献が裏付けている（Fillingim R. et al., J Pain, 6:116-24 (2005); Zacny J. Drug Alcohol Depend., 63:23-8 (2001); Zun L. et al., Am. J. Emerg. Med., 20:151-4 (2002); Cepeda M. et al., Clin. Pharmacol. Ther., 74:102-12 (2003); Franconi F. et al., Pharmacol. Res., 55:81-95 (2007)）。モルヒネ誘発性呼吸抑制に伴う性差に注目した少数の成人研究（Sarton E. et al., Anesthesiology, 93:1245-54 (2000); Sarton E. et al., Anesthesiology, 90:1329-38 (1999)）は、男性に比べて、女性が呼吸抑制を発現するより高いリスク状態にあることを示した。しかしながら、オピオイド関連有害作用に対する性の影響を小児において検討したデータはほとんど存在しない。

30

40

【 0 2 1 2 】

[239] 研究コホートの拡大された退院後フォローアップでは、機能的なCYP2D6表現型のある女児が、退院前のPACUの女児に見られる、より高用量の静脈内モルヒネ投薬に関連した有害作用に類似及び一致した有害作用を、最初の術後2～3日目に自宅での経口コデイン（モルヒネプロドラッグ）で、有意により高い頻度で発症したことが観測されている（Prows C. et al., The Laryngoscope, DOI: 10.1002/lary.24454 (2013)）。静脈内モルヒネと経口コデインでの有害作用が病院と家庭の状況で女児の間でより高率に発症するという上記の一貫した知見は、これまでの知見を追認するだけでなく、女児に対する拡大されて不公平な臨床及び潜在的に経済上の諸影響を示すものである。呼吸抑制における性関連の差異は、中枢媒介性の作用ではなくて、末梢の

50

化学反射ループによって媒介される作用に続いて生じることが示されている (Sarton E. et al., *Anesthesiology*, 93:1245-54 (2000))。

【 0 2 1 3 】

[240] 本研究では、性別、モルヒネ用量、及び鎮痛作用の間にいかなる関連性も見出せなかった。女児の思春期年齢カテゴリーによる、疼痛の差示的な関連性も見出せなかった。これは、女性の方がオピオイドでのより良好な疼痛制御を体験することを示唆するいくつかのヒト成人研究と対照的である (Campesi I. et al., *Handb. Exp. Pharmacol.* 265-78 (2012))。疼痛体験全体では、性によって異なる知覚を有する場合がある (Toomey M. AANA J., 76:355-9 (2008))。加えて、男性と女性では、薬物動態において有意差 (ほぼ 40%) が存在し、このことは、男性よりも女性において体内全水分量が少ないこと、並びに筋肉に対する脂肪百分率が高いことに起因する (Anderson G. J. *Womens Health (Larchmt)*, 14:19-29 (2005))。薬物代謝に必要な酵素の異なる発現も、これらの差異の原因であるかもしれない (Anderson G. J. *Womens Health (Larchmt)*, 14:19-29 (2005)); Schwartz J. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 82:87-96 (2007); Franconi F. et al., *Curr. Pharm. Des.*, 17:1095-107 (2011))。モルヒネクリアランスが含まれるモルヒネの薬物動態については以前に報告されたことがある (Sadhasivam S. et al., *J. Opioid Manag.*, 8:217-26 (2012))。性別は、モルヒネクリアランスの共変数として含まれたが、小児におけるモルヒネ薬物動態の変動性への主要な予測因子であるとは見出されなかった (Sadhasivam S. et al., *J. Opioid Manag.*, 8:217-26 (2012))。

【 0 2 1 4 】

[241] 本研究では、オピオイド関連の有害作用が、高い総モルヒネ用量 ( $> 0.3 \text{ mg / kg}$ ) が投与される場合に、女児においてより頻繁に出現する傾向にあって、一方男児においては、総モルヒネ用量に伴ってオピオイド有害作用が増加するというそのような線形の傾向を観測しなかった (表 12)。男児と女児の間のホルモンの違いによって、オピオイド有害作用における性差を潜在的に説明することができるのではないかと仮定された。オピオイド有害作用における性差の背後にある機序を潜在的に説明するために、女児の一般的な思春期年齢を思春期に関連した異なるホルモンレベルの代用因子として使用して、女児の 3 つの年齢カテゴリー： $< 8$  歳 (思春期前)、 $8 \sim 13$  歳 (思春期)、 $> 13$  歳 (思春期後) について解析した。女児では、PONV、RD、及び PONV と RD による PACU 滞在延長と総モルヒネ用量の有意な関連性が検出された；より高用量のモルヒネで、より若年の女児が有意により多い RD 及び PONV を有したのである (表 14)。興味深いことに、年齢も OSA 発症率 (より若年の女児及び男児においてより高い頻度) も、年齢と OSA の影響を多変量モデルにおいて検定すると、モルヒネ用量への女児の感受性に関連しなかった (おそらくは、各年齢と総モルヒネ用量のカテゴリーにおいて女児の数が少ないためであろう)。高モルヒネ用量 ( $0.3 \text{ mg / kg}$ ) でのオピオイド有害作用の高い発症率は、3 つの年齢カテゴリー全体で明らかである (特に、より若年の女児において) ので、上記のデータは、女児におけるホルモン媒介性の差異を支持しない。しかしながら、タナー分類を実施しなかったため、この年齢カテゴリー化が思春期の良好な測定基準で無かった可能性はある。

【 0 2 1 5 】

[242] 上記の解析が自己申告性だけの白人集団に限定されたことに留意することは重要である。これまでの諸研究で、副作用のリスクに人種差があることが実証されてきた (Sadhasivam S. et al., *Pediatrics*, 129: 832-8 (2012)) ので、人種によって解析することが重要であった。人種そのものは本研究の主眼でなかったが、我々の研究では、自己申告性の人種と家系情報マーカーの間に 95% より高い相関性があった。人種の自己申告は、臨床医が即座に利用可能であるので、祖先の遺伝子マーカーよりも使用するのが容易である。意味のある解析のために利用可能な少数派の小児の数が相対的に少ないために、本結果は、白人小児に絞られた。上記の差異が非白人集団においてもやはり認められるかどうかは明らかでない。上記のデータに基づくと、白人女児は、白人女児のためのより積極的な PONV 及び RD 予防戦略より利益を受ける可能性がある。

## 【 0 2 1 6 】

[243] 結論として、白人小児では、用量関連性のオピオイド有害作用リスクについての性差が存在する。白人女児は、外科手術を施行中の男児より、より高用量のモルヒネでオピオイド関連性の呼吸抑制及びPONVとオピオイド有害作用によるPACUでの滞在延長を受けるより高いリスクを有する。この差異は、思春期年齢でもOSAを示唆する病歴でも説明できなかった。小児を治療する場合、男児と類似の鎮痛を経験しながらも、白人女児は、より高用量のオピオイドに対して相対的により敏感であって、より高率にオピオイド関連有害事象を有してPACUにより長く滞在することに留意すべきである。この知識は、小児において好ましくない臨床的及び経済的な周術期転帰を防ぐのに役立つことだろう。

10

## 【 0 2 1 7 】

実施例 7：オピオイド誘発性の呼吸抑制：ABC B1 輸送体の薬理ゲノム学

[244] モルヒネの作用は、脳幹、特に延髄（これは、鎮痛作用だけでなく高炭酸症への喚起応答性の原因となるミュー受容体を豊富に含有する）に存在するミュー（ $\mu$ ）オピオイド受容体によって媒介される（Zhang, Z., et al., *Anesthesiology*, 107:288-297 (2007); Pattinson, K. Br. J. Anaesth., 100:747-758 (2008)）。加えて、オピオイドは、呼吸を制御する皮質中枢に深い影響を及ぼして、それにより脳幹におけるそれらの作用が強化される（Pattinson, K. et al., *J. Neurosci.*, 29: 8177-8186 (2009)）。従って、脳中へのモルヒネ輸送の変動性は、モルヒネに対する個体間応答を説明するのに役立つ可能性がある。モルヒネの脳中濃度は、血液脳関門にあるP-糖タンパク質輸送体、ABC B1によって影響を受ける。ABC B1の遺伝子多型、c. 3435 C > Tは、成人におけるモルヒネの血液脳関門輸送活性に関連付けられていて、同型接合のTT遺伝子型は、他の遺伝子型より高いモルヒネの最大CSF濃度に関連していた（Meineke, I. et al., *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54:592-603 (2002)）。以前から、同じABC B1遺伝子多型のc. 3435 C > Tは、別のオピオイド、フェンタニルを服用中の韓国の成人での呼吸抑制増加と関連付けられてきた（Park, H. et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 81:539-546 (2007)）。しかしながら、小児におけるモルヒネ誘発性呼吸抑制にABC B1変異が関連しているかどうかは、知られていない。

20

## 【 0 2 1 8 】

[245] 本研究では、ABC B1中の遺伝的変動性が小児におけるモルヒネの安全性及び臨床効果に有意に影響を及ぼすと仮定した。本研究は、扁桃摘出術を施行中の米国小児の均質な大集団において、術後鎮痛に加えて呼吸抑制の臨床測定値を使用して、よくあるABC B1遺伝的変異と静脈内モルヒネ誘発性術後呼吸抑制の間の特異的な関連性を判定することを目標とした。本実施例は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Sadhavivam et al., *The Pharmacogenomics Journal* (2014) 1-8 として後に公表された。

30

## 【 0 2 1 9 】

研究デザイン、参加者、及び手順

[246] 扁桃摘出術を施行中の273名の小児における前向き臨床観察研究を、標準的な周術期の麻酔及び外科診療、並びに標準的な術後看護ケアで実行した。本研究は、シンシナチ小児病院メディカルセンターの施設内審査委員会によって承認されて、書面のインフォームドコンセントと同意（11歳を超える小児より）をすべての両親と参加児童より入手した。本研究にはすべての人種の小児を登録したが、我々の病院での扁桃摘出術患者の人口統計からすると、大多数の小児は、白人であった（図15）。

40

## 【 0 2 2 0 】

[247] 選択外来扁桃摘出術を施行中の6～15歳の小児が本試験に資格があって、手術日に登録した。人種は、両親か子供のいずれかによる自己申告性であって、人種を確定するための自己報告を十分に受け入れる（Boehmer, U. et al., *American Journal of Public Health*, 92: 1471-1472 (2002); Lalovic, B. et al., *Drug Metab. Dispos.*, 32: 447-454 (2004)）。標本選択基準は、再発性扁桃炎、アデノイド口蓋扁桃肥大、又はOSAの故に扁桃摘出術の予定がある、米国麻酔学会（ASA）の身体状態1又は2を有する

50



と指定される小児であった。OSA 指定の臨床診断には、いびき + 10 秒以上続く睡眠休止又は日中の眠気の既往歴がある睡眠時呼吸障害が含まれた。小児又はその両親が英語を話せなければ、彼らを除外した。モルヒネに対してアレルギーがあるか又は発育遅延、肝臓又は腎臓の疾患、又はオピオイド鎮痛薬を必要とする術前疼痛（例、慢性扁桃炎）を有する小児も除外した。

#### 【0221】

[248] すべての参加者が標準の周術期ケアを受けた。セボフルランを使用して麻酔を誘導し、プロポフォール（2 mg / kg）ボラスを続けて、気管内挿管を容易にした。麻酔は、神経筋肉遮断を使用せずにセボフルランで維持した。患者は、外科的切開に先立って、モルヒネを受容した。OSA 既往歴のある小児が 0.1 mg / kg のモルヒネを受容したのに対して、OSA 診断のない小児は、0.2 mg / kg を受けた。外科的切開と焼灼に続く疼痛（心拍数及び血圧の臨床的に有意な増加）が示唆されるどんな徴候でもあれば、臨床麻酔チームは、術中期に必要な応じて追加のモルヒネを 0.05 mg / kg の増分で提供した。すべての小児が予防用オンダンセトロン（0.1 mg / kg）及びデキサメタゾン（0.1 mg / kg）を術中期に受けた。FLACC 疼痛スコア（Merkel, S. et al., *Pediatr. Nurs.*, 23: 293-7 (1997)）で測定される有意な術後疼痛が 4 / 10 以上であれば、PACUにおいてモルヒネ（0.05 mg / kg の増分）の救助的投与で管理した。

#### 【0222】

[249] PACU 滞在の期間（PACU 退院準備を達成するための時間）を、以下の退院判定基準に達する前の PACU 中の時間として定義した。意識レベル：容易に覚醒可能であるか又は覚醒している、気道：十分な空気交換が可能、深部体温：36.3 以上、許容疼痛レベル（4 未満の疼痛スコア）、血行力学的に安定している、PONV や呼吸抑制のような有意なオピオイド関連有害作用無し、及び外科手術部位に出血も合併症も無いこと。この退院準備時間は、社会的な理由（例、乗車待ち）による遅延を含めなかったもので、実際の PACU 退院時間とは異なるものである。

#### 【0223】

[250] 登録した 273 名の小児のうち、219 名が白人小児で、44 名が黒人小児であった。ABCB1 SNP の異なるアレル頻度と他の人種からの小児数が少ないことのために、本解析は、白人と黒人の小児に絞った。他の人種の小児と二人種の小児については、解析しなかった（図 15）。参加者は主に白人で、男性より女性がわずかに多かった。白人小児に比べて、黒人小児はやや体重が重くて、より高い OSA 頻度を有した（表 14）。

#### 【0224】

#### 【表 15】

表 15. 参加者の特性

	白人 (N=219)	黒人 (N=44)
年齢(歳)(メジアン(IQR))	8.4(7.1-11.0)	8.8(7.2-10.8)
体重(kg)(メジアン(IQR))	34.2(25.8-46.5)	35.6(27.2-54.0)
BMI z スコア	0.8(-0.2-1.6)	1.2(0.1-2.0)
術中モルヒネ必要量(mg/kg)(メジアン(IQR))	0.19(0.17-0.21)	0.20(0.16-0.20)
総モルヒネ必要量(mg/kg)(メジアン(IQR))	0.24(0.19-0.29)	0.29(0.21-0.35)
性別(N,%)		
男性	105(48%)	19(43%)
OSA(N,%)		
有り	95(43%)	30(68%)

年齢、体重、BMI z スコア、術中モルヒネ必要量、総モルヒネ必要量をメジアンと四分位数範囲（IQR）として示し、性別とOSAを頻度と比率として示す。CDC 成長チャートを使用して、BMI z スコアを計算した。

10

20

30

40

50

## 【0225】

転帰

[251] 各参加者について、鎮痛作用とオピオイド関連有害作用の測定結果 (metrics) を記録した。オピオイド関連有害作用の測定結果のために、本研究は、2つの臨床的及び経済的に重要な転帰：臨床RDと、研究コーディネーターによって不断に評価される、呼吸抑制に続発するPACU滞在延長 (> 90分) に注目した。本研究では、RDを、臨床的に明白な上気道閉塞の非存在下での、1分あたり10回未満の呼吸という呼吸数と、1分間以上持続して、92%より高いSpO<sub>2</sub>を維持するのに酸素補充を必要とする92%未満の酸素飽和として定義した。

## 【0226】

[252] 鎮痛作用の測定結果には、最大術後疼痛スコア、PACUにおける静脈内鎮痛介入 (有り / 無し)、及び鎮痛介入が必要とされる患者における術後モルヒネ用量 (mg / kg) が含まれた。各小児についての最大術後疼痛スコアは、0 ~ 10のFLACC疼痛尺度 (Merkel, S. et al., *Pediatr. Nurs.*, 23: 293-297 (1997)) を使用して、PACUにおいて多数の時点で評価される術後疼痛スコアより作成した。

## 【0227】

遺伝子型

[253] 各参加者より手術室において麻酔下で血液を採取して同じ日にDNAを単離して、-20℃で保存した。すべての研究参加者に関する臨床データを入力した後で、バッチ式の遺伝子型決定を実施した。TaqMan アレル識別システムアッセイと Genotyper Software Version 1.0.1 (ライフ・テクノロジーズ、アプライド・バイオシステムズ、カリフォルニア州フォスターシティ) を使用して、以下のABCB1遺伝子多型について分析して報告した：rs1045642、rs2032582、rs1128503、rs2229109、及びrs9282564。

## 【0228】

統計解析

[254] 解析に先立って、データの質を検討した。ABCB1変異では、アレルと遺伝子型頻度について、白人患者と黒人患者でそれぞれ評価して、ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) について検定した。二元転帰 (RD、RDに続発するPACU滞在延長、及び鎮痛介入の必要性) について解析するために、ロジスティック回帰を実施した。術後モルヒネ用量では、用量が正規分布しているので、線形回帰を使用した。最大FLACCスコアは、26%の患者が疼痛を経験しない、ゼロ過剰負の二項分布を明示した。このように、ゼロ過剰負の二項分布を使用して最大FLACCスコアを解析して、この変数の分布を適正に把握した。ABCB1変異の評価に先立って、共変数 (年齢、性別、BMIスコア、OSA、術中モルヒネ (鎮静転帰用)、及び総モルヒネ (有害作用転帰用)) の影響を評価した。最良の適合モデルを選択するために、対数尤度、赤池ベイズ情報量基準を比較して、残差を検討した。この転帰と単一SNPの関連性について評価するために加法モデルを使用し、ここでは遺伝子型を記録して、連続変数として検定した。4種の二対立遺伝子SNPについて、マイナーアレルの数に従って、遺伝子型を0、1、及び2へ記録した。rs2032582では、GG遺伝子型を0と記録し；GA遺伝子型とGT遺伝子型を合わせて1と記録して、TT遺伝子型とTA遺伝子型を2と記録した。白人患者と黒人患者で別々に統計モデリングを実行して、組み合わせた。人種を組み合わせた場合、人種と人種 \* SNP相互作用の影響について検定した。

## 【0229】

[255] 本研究では、ABCB1の5種のSNPの、2種の主要副作用転帰と3種の二次鎮痛転帰との関連性について検証した。この5種のSNPの間の平均相関係数は、0.40であった。主要転帰間のスピアマン相関係数と二次転帰間のスピアマン相関係数は、それぞれ0.49と0.74であった。多重検定用にp値を補正するために、この転帰とSNPの相関特性を確認した。相関性補正したボンフェローニ補正 (<http://www.quantitativeskills.com/sisa>) によって、主要副作用転帰に関

する検定では 0.013 の有意閾値を得て、二次転帰に関する検定では 0.014 の閾値を得た。0.05 の閾値に近づく関連性についても名義的に関連するものとして報告する。統計解析は、統計解析ソフトウェア (SAS)、バージョン 9.3 と JMP Genomics, バージョン 6.0 (SAS Institute 社、ノースカロライナ州ケリー) を使用して実施した。

#### 【0230】

[256] 並べ替え検定：遺伝子関連研究では、低いアレル頻度 ( $< 0.1$ ) が関連性を推進する少数の個別値をもたらす可能性がある。従って、0.1 未満のマイナーアレル頻度と有意に関連していると同定された変異について、両方の人種を合わせて使用して、並べ替え検定を実施した。R プログラミング言語を使用して、共変数と転帰の間の関連性を  
10  
変えないまま遺伝子型を無作為にシャッフルすることによって、1000 の反復データを作成した。次いで、上記に記載したのと同じ共変数を補正した同じ方法を使用して、それぞれの反復データについて解析した。

#### 【0231】

[257] 自己確認性の人種と遺伝的家系の間の相関性 - 感度分析：自己申告性の白人種と黒人種が遺伝的家系へ十分適合するかどうかを評価するために、Golden Helix ソフトウェアを使用して、218 種の家系情報マーカー (AIM) で主成分分析を実施した。1397 の HapMap 被験者を分析用の準拠集団として使用した。

#### 【0232】

[258] 検定力分析：本研究の解析に先立って、Quanto を使用して、遺伝子効果を検出するための統計的検出力を推定した。マイナーアレル頻度 (MAF) は、我々の変異の変動性を捉えるために 0.03 から 0.5 へ変化させて、  
20  
は、多重検定を説明するために 0.013 へ固定した。主要な有害作用転帰である、呼吸抑制をもたらす呼吸抑制 (頻度 11%) については、263 名の小児という我々の全標本を使用し、80% 検出力を使用して、2.6 (MAF = 0.3)、2.8 (MAF = 0.2)、3.6 (MAF = 0.10)、及び 7.3 (MAF = 0.03) に等しいオッズ比を検出した。主要な鎮痛転帰である術後モルヒネ要求量については、鎮痛介入を必要とする個体だけを含めた ( $n = 162$ )。80% 検出力を使用して、9% ほどの小さな変動 (範囲: 0.37 ~ 1.09 の標準偏差単位) を説明する影響を検出した。

#### 【0233】

##### 結果

[259] ABCB1 SNP とアレル頻度。検討した 5 種の SNP の中で、1 つ (rs2032582) は三対立遺伝子であり；1 つ (rs2229109) は、白人と黒人の両方で低頻度であり；1 つ (rs1045642) は、白人と黒人に入り込んだメジャー及びマイナーアレルに共通している。すべての SNP が HWE (Stern, C. Science, 97: 137-138 (1943)) 状態にあって、高い連鎖不平衡を示した (表 15 と表 16)。  
30

#### 【0234】

【表 1 6】

表 1 6. A B C B 1 遺伝子多型、アレル頻度、及びHWE検定

SNP		機能	アレル	白人		黒人	
別名				頻度	P (HWE)	頻度	P (HWE)
rs1045642	3435C>T	同義変異	T	0.548	0.25	0.227	0.53
			C	0.452		0.773	
	2677T>A (S893T)	非同義変異	A	0.018		0.011	
rs2032582	2667>G(S893A)	同義変異	T	0.441	0.26	0.091	0.9
			G	0.541		0.898	
rs1128503	1236T>C (G412G)	同義変異	T	0.448	0.39	0.25	0.55
			C	0.552		0.75	
rs2229109	1692G>A (S400N)	非同義変異	A	0.032	0.63	0.011	0.94
rs9282564	554A>G(N21D)	非同義変異	C	0.968	0.57	0.989	0.81
			G	0.114		0.034	
			A	0.886		0.966	

A T P 結合カセット B 1 (A B C B 1) の 5 種の SNP についてのアレル頻度とハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE) 検定。解析は、人種 (白人と黒人) によって層別化した。

【 0 2 3 5 】

【表 1 7】

表 1 7. 白人小児と黒人小児における A B C B 1 SNP 間の連鎖 ( $D'$  /  $R^2$ ) .

		rs1045642	rs2032582	rs1128503	rs2229109	rs9282564
白人	rs1045642					
	rs2032582	0.935/0.572				
	rs1128503	0.832/0.463	0.923/0.827			
	rs2229109	1/0.040	1/0.090	1/0.027		
	rs9282564	0.8425/0.075	0.949/0.147	0.9475/0.143	1/0.004	
黒人	rs1045642					
	rs2032582	1/0.340				
	rs1128503	0.6338/0.354	1/0.300			
	rs2229109	1/0.003	1/0.001	1/0.004		
	rs9282564	1/0.12	1/0.353	1/0.106	1/0.000	

A T P 結合カセット B 1 (A B C B 1) の 5 種の SNP 間の連鎖  
解析は、人種 (白人と黒人) によって層別化して、 $D'$  と  $R^2$  として提示した。

【 0 2 3 6 】

【表 18】

表 18. 遺伝子型による、RDとRDによるPACU滞在延長

SNP		N	RD%	白人 P	RDによる PACU延 長(%)	P	N	RD%	黒人 P	RDによる PACU延長 (%)	P
rs1045642	TT	70	16	0.87	10	0.12	3	33	0.44	33	0.25
	TC	100	19		15		14	43		21	
	CC	49	16		4		27	22		7	
rs2032582	TT	46	11	0.53	9	0.73	0	-	0.35	-	0.40
	TA	1	0		0		0	-		-	
	GA	7	29		0		1	0		0	
rs1128503	GT	100	18	0.24	14	0.69	8	50	0.30	25	0.22
	GG	65	20		9		35	26		11	
	TT	47	11		11		2	50		50	
rs2229109	TC	102	17	0.07	13	0.66	18	39	1.00	17	1.00
	CC	70	23		9		24	21		8	
	CA	14	36		14		1	0		0	
rs9282564	CC	205	16	0.04	11	<0.01	43	30	0.20	14	0.04
	GG	2	100		100		0	-		-	
	GA	46	17		20		3	67		67	
	AA	171	16		8		41	27		10	

オピオイド関連RDとRDによる回復室での滞在延長。頻度と比率を遺伝子型によって提示して、フィッシャーの正確検定を使用して検定した。

【0237】

【表 19】

表 19. ABCB1 遺伝子型による術後鎮痛測定値

SNP		N	最大 FLACC	P	白人 Analges. %	P	術後 モルヒネ (mg/kg)	P	N	最大 FLACC	P	黒人 Analges. %	P	術後 モルヒネ (mg/kg)	P
rs1045642	TT	70	2(1-5)	0.29	57	0.42	0.10±0.05	0.61	3	8(3-8)	0.89	100	1.00	0.12±0.11	0.99
	TC	100	2(0-4)		52		0.09±0.05		14	7(1-8)		86		0.12±0.05	
	CC	49	4(0-6)		63		0.09±0.03		27	5(4-8)		89		0.12±0.07	
Rs2032582	TT	46	1(1-5)	0.52	52	0.87	0.09±0.04	0.14	0	-	0.75	-	0.32	-	0.80
	TA	1	8(8-8)		100		0.21±		0	-		-		-	
	GA	7	2(1-5)		43		0.09±0.05		1	4(4-4)		100		0.08±	
Rs1128503	GT	100	2(0-5)	0.40	57	0.92	0.09±0.05	0.43	8	8(2-9)	0.81	75	1.00	0.11±0.04	0.64
	GG	65	4(0-6)		58		0.09±0.04		35	5(3-8)		91		0.12±0.07	
	TT	47	1(0-5)		53		0.08±0.04		2	4(0-8)		100		0.08±0.03	
Rs2229109	TC	102	2(0-5)	0.69	57	0.78	0.10±0.05	0.06	18	6(3-9)	0.57	89	1.00	0.13±0.05	0.23
	CC	70	3(0-5)		57		0.09±0.04		24	5(4-8)		88		0.12±0.08	
	CA	14	2(1-4)		50		0.06±0.02		1	8(8-8)		100		0.04±	
Rs9282564	CC	205	2(0-5)	0.18	57	0.62	0.09±0.05	0.13	43	5(3-8)	0.05	88	1.00	0.12±0.06	0.52
	GG	2	7(6-7)		100		0.16±0.07		0	-		-		-	
	GA	46	2(0-4)		54		0.09±0.05		3	8(8-10)		100		0.10±0.00	
	AA	171	2(0-5)		56		0.09±0.04		41	5(3-8)		88		0.12±0.07	

最大FLACCスコアをメジアン(IQR)として示して、正確ウィルコクソン順位和検定によって検定する；介入必要性を頻度と比率として示して、フィッシャーの正確検定によって検定する；少なくとも1回の術後介入を有した患者において、術後モルヒネ要求量を検討する。それらを平均±SDとして示して、ANOVAを使用して検定する。

Analges.%は、鎮痛介入(%)を表す。

【0238】

[260] ABCB1と呼吸抑制。263名の患者のうち51名(19%)がRDを有して、30名(11%)がRDによるPACU滞在延長を有した。ABCB1 SNPの遺伝子効果を評価するために、初めに、生の転帰測定値を遺伝子型によって要約した。いくつかの潜在的な関連性、特に、白人患者と黒人患者の両方における、呼吸抑制によるPACU滞在延長とrs9282564の間の関連性(表17と表18)が観測された。この遺伝子効果をさらに確認するために、転帰に対して有意な影響を示す共変数を補正した、統計モデリングを実行した。白人では、呼吸抑制によるPACU滞在延長に対して、rs9282564の統計学的に有意な効果が検出された( $p = 0.0012$ )(図16A)。この知見は、黒人でも再現された( $p = 0.0251$ )(図16B)。人種を合わせて補正すると、ABCB1 SNPのrs9282564は、呼吸抑制によるPACU滞在延長と強く関連していた( $p = 0.0002$ )(図16C)。rs9282564のマイ

10

20

30

40

50

ナーアレル ( G ) の 1 コピーを加えると、P A C U 滞在延長のオッズが白人と黒人でそれぞれ 4 . 1 倍 ( 9 5 % C I : 1 . 7 ~ 9 . 9 ) と 1 3 . 9 倍 ( 9 5 % C I : 1 . 1 ~ 1 7 5 . 8 ) 増加した。人種を合わせたとき、マイナーアレル ( G ) の 1 コピーを加えると、P A C U 滞在延長のオッズが 4 . 7 倍 ( 9 5 % C I : 2 . 1 ~ 1 0 . 8 ) 増加した ( 図 1 7 ) 。呼吸抑制による P A C U 滞在延長に対して、人種特異的な r s 9 2 8 2 5 6 4 の効果は検出されなかった。他の変異は、人種特異的な分析においても複合解析においても、R D 又は R D による P A C U 滞在延長との名義関連性に達しなかった。r s 9 2 8 2 5 6 4 と R D による P A C U 滞在延長との間の関連性については、1 0 0 0 の反復値のうち 1 検体だけが 0 . 0 0 0 2 の観測 p 値未満の p 値を示し、0 . 0 0 2 の経験的 p 値を生じて、この知見の重要性を裏付けた。

10

## 【 0 2 3 9 】

[261] A B C B 1 と鎮痛転帰：最大 F L A C C スコア、介入必要性、及び介入 ( 複数 ) を必要とした患者における術後モルヒネ用量という、3 種の鎮痛転帰について検討した。最大 F L A C C スコアのメジアンは、0 . 6 の I Q R で 3 であった。2 6 3 名の患者のうち、1 6 2 名 ( 6 2 % ) が鎮痛介入 ( 複数 ) を必要とした。平均して、術後モルヒネ介入を必要とした患者は、0 . 1 0 ± 0 . 0 5 m g / k g のモルヒネを受容した。モルヒネの救助的投与を受容した患者では、r s 2 2 2 9 1 0 9 と術後モルヒネ用量の間に関連性が検出された。その関連性は、白人において名義的であった ( p = 0 . 0 5 ) が、黒人において、それは統計学的に有意であった ( p = 0 . 0 1 ) 。人種を組み合わせたとき、術後モルヒネと r s 2 2 2 9 1 0 9 の関連性が依然として検出され ( p = 0 . 0 2 ) ; マイ

20

## 【 0 2 4 0 】

[262] 自己申告性の人種と遺伝的家系：自己申告された白人種と黒人種を 2 1 8 の A I M より推定される遺伝的家系と比較した。図 1 9 に示されるように、2 5 0 名 ( > 9 5 % ) の小児において、自己申告された人種は、C E U 及びアフリカ系の家系によく集中した。主成分 ( P C ) 1 と 2 によって、白人種と黒人種を成功裡に分離した ( 図 1 9 ) 。本研究において自己申告性の人種を使用したのは、そのほうが臨床医にとって A I M と比べて容易に利用可能だからである。しかしながら、自己申告性の人種と有意な臨床転帰で観測された相関性を確かめるには、遺伝的家系を使用した。P C 1 及び 2 について補正したモデルを使用して、術後モルヒネ要求量と r s 2 2 2 9 1 0 9 の間の関連性 ( p = 0 . 0 3 ) に加えて、P A C U 滞在延長をもたらす呼吸抑制と r s 9 2 8 2 5 6 4 の間の関連性 ( p < 0 . 0 0 0 1 ) をさらに確認した。

30

## 【 0 2 4 1 】

[263] 本研究は、一般麻酔下で通常の外科手技を施行中の 2 6 3 名の米國小児の均質群における、A B C B 1 遺伝子多型と、( 回復室での滞在延長をもたらす ) 臨床的に重要なオピオイド関連の呼吸抑制と術後モルヒネ要求量の間の関連性を示した。重要にも、本研究は、白人 ( p = 0 . 0 0 1 2 ) 、黒人 ( p = 0 . 0 2 5 1 ) 及び両人種を合わせたもの ( p = 0 . 0 0 0 2 ) において、A B C B 1 S N P の r s 9 2 8 2 5 6 4 が呼吸抑制による P A C U 滞在延長と関連していることを実証した。A B C B 1 S N P 、 r s 9 2 8 2 5 6 4 のマイナーアレル ( G ) のそれぞれの追加コピーを保有する効果は、P A C U 滞在延長をもたらす呼吸抑制のオッズを 4 . 7 倍 ( 9 5 % C I : 2 . 1 ~ 1 0 . 8 ) 増加させた。このことは、オピオイド誘発性呼吸抑制との関連性についての新しい報告であって、この効果量は、薬理遺伝学的な臨床検査に利用されてきた既知の遺伝的変異における効果量に匹敵する。

40

## 【 0 2 4 2 】

[264] 本研究において観測された別の臨床的に重要な関連性は、A B C B 1 S N P

50

の rs2229109 と ABCB1 SNP、rs2229109 のマイナーアレル (A) のそれぞれの追加コピーは、術後モルヒネ用量を  $0.04 \text{ mg/kg}$  (95%CI:  $0.01 \sim 0.07$ ) 減少させて、AA 遺伝子型の小児がモルヒネに敏感であって、さほどモルヒネを必要としないことを示唆した。ABCB1 SNP の rs2229109 は、ミスセンス遺伝子多型でもあって；核酸の 1692 位での G から A へのアレル変化が ABCB1 タンパク質におけるアミノ酸残基の変化 (Ser → Asn) を引き起こす。最近、この変異は、本研究に含まれる他の変異と共同して、ハプロタイプの一部としてメタドンの薬物動態に影響を及ぼすことが示唆されている (Barratt, D. et al., Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 5: 53-62(2012))。

10

## 【0243】

[265] これまで、比較的大規模で均質のアメリカ人集団、特に小児において、モルヒネ関連の有害転帰に対する、ABCB1 遺伝子の多型の影響への調査はなかった。本研究は、これまでの限界の多くを最少化する一方でこれまでの学術研究 (Leschziner, G. et al., The Pharmacogenomics Journal, 7:154-179 (2007)) に立脚することを試みて、通常の ABCB1 SNP に加えて追加の非同義 SNP を含めた (図 18)。

## 【0244】

[266] 本研究に対しては、いくつかの限界がある。被験者登録の地理的位置のために、上記の知見を他の人種へ一般化するほど多くの非白人小児がいなかった。それでも、その知見は、アフリカ系アメリカ人でもやはり再現された。臨床医にとっての使用のし易さとその容易な利用可能性のために、自己申告性の人種を使用した。しかしながら、自己申告性の人種と遺伝的家系の間には、きわめて高い相関性 ( $> 95\%$ ) が観測された (図 19)。異なる家系由来の小児が含まれる、大規模な多施設試験であれば、異なる人種における ABCB1 遺伝子型の影響を研究するのに役立つであろう。本研究において臨床転帰と関連付けられた ABCB1 SNP は、非同義でアミノ酸変化と関連しているが、それらは、原因であり得るというよりは、呼吸抑制と術後モルヒネ用量の原因マーカーと連鎖状態にあるのかもしれない (図 18)。ABCB1 の配列決定又は緻密な SNP 分析は、「高」対「低」リスクをよりよく識別する他の変異があるかどうかを決定することに役立つであろう。

20

## 【0245】

[267] 結論として、扁桃摘出術を施行中の小児において、ABCB1 遺伝子多型と、術後オピオイド関連の呼吸抑制とオピオイド要求量の間に新規の関連性を見出した。ABCB1 rs9282564 GG 同型接合体は、入院延長をもたらす呼吸抑制の増加リスクを有して、ABCB1 rs2229109 CC 同型接合体は、術後の鎮痛介入が必要とされるときにより多くのモルヒネを必要とした。上記の知見には、小児外科患者における術後疼痛管理に重要な意義がある。オピオイド関連の呼吸抑制の負の影響を最小にするには、事前のリスク同定、層別化、及び予防手段が重要である。今回の ABCB1 遺伝子関連データを臨床診療へ適用する前には、潜在的な遺伝子 - 遺伝子相互作用についてのさらなる検証及び検討が必要であろう。

30

## 【0246】

[268] 上記に記載した様々な方法及び技術は、本出願を実行するためのいくつかの方法を提供する。記載した目標又は利点の必ずしもすべてが本明細書に記載の特別な態様に従って達成されるわけではないことを理解されたい。従って、例えば、当業者は、本方法が、本明細書において教示された 1 つの利点又は一群の利点を達成又は最適化するやり方で実施し得ても、本明細書において教示又は示唆された他の目的又は利点を必ずしも達成し得ないことを認められよう。本明細書では、様々な代替態様が言及されている。1 つの特徴、別の特徴、又はいくつかの特徴が特に含まれる好ましい態様がある一方で、1 つの特徴、別の特徴、又はいくつかの特徴が特に除外される態様もあること、一方、1 つの、別の、又はいくつかの有利な特徴の包含によって特別な特徴が薄まる態様もあることを理解されたい。

40

50

## 【 0 2 4 7 】

[269] さらに、当業者は、異なる態様からの様々な特徴の適用可能性を認めるであろう。同様に、上記に考察した様々な要素、特徴、及び工程、並びにそのような要素、特徴、及び工程のそれぞれについての他の既知の均等物を様々な組合せにおいて利用して、当業者は、本明細書に記載の原理に従って本方法を実施することができる。様々な要素、特徴、及び工程の中には、多様な態様において特に含まれるものもあれば、特に除外されるものもある。

## 【 0 2 4 8 】

[270] 本出願を特定の態様及び実施例の文脈で開示してきたが、当業者には、本出願の態様が具体的に開示した態様を超えて、他の代替態様及び／又は使用とその修飾態様及び均等物へ拡張されることが理解されよう。

10

## 【 0 2 4 9 】

[271] いくつかの態様において、本出願の特定の態様について記載して特許請求するために使用される、成分量、分子量のような特性、反応条件、等を表す数字は、いくつかの事例において、「約」という用語によって修飾されると理解されたい。従って、いくつかの態様において、明細書と付帯の特許請求項において明記される数値パラメータは、概数であって、特別な態様によって得られることが希求される所望の特性に依存して変動する可能性がある。いくつかの態様において、数値パラメータは、報告される有効数字の数に照らして、そして通常の丸め技術を適用することによって解釈されるべきである。本出願のいくつかの態様の広範囲を明記する数値範囲及びパラメータが概数であっても、具体的な態様において明記される数値は、実践可能なほど正確に報告されている。

20

## 【 0 2 5 0 】

[272] いくつかの態様において、本出願の特別な態様について記載する文脈において（特に、以下の特許請求項のいくつかの文脈において）使用される、「a（１つの）」及び「an（１つの）」（不定冠詞）と「the（その）」（定冠詞）という用語と類似の参照句には、単数と複数の両方が含まれると解釈され得る。本明細書における数値の範囲の引用は、その範囲内に入るそれぞれ別の値へ個別に言及することの簡略表記法として役立つことを単に企図している。本明細書において他に断らなければ、それぞれの個別値は、それが本明細書において個別に引用されるかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されるすべての方法は、本明細書において他に示されなければ、又は状況によって明らかに矛盾しなければ、どの好適な順序でも実施することができる。本明細書の特定の態様に関して提供される、ありとあらゆる実施例、又は例示言語（例えば、「～のような」）の使用は、本出願をより明確化することを単に企図するのであって、他のやり方で特許請求される本出願の範囲に制限を加えるものではない。本明細書中のどの言語も、本出願の実施に必須な特許請求されない要素を示すものと解釈してはならない。

30

## 【 0 2 5 1 】

[273] 本明細書では、本出願の好ましい態様が、本出願を実行するための、本発明者に知られた最良の形式を含めて記載される。当業者には、先述の記載を読めば、これら好ましい態様に対する変更態様が明らかになろう。当業者は、そのような変更態様を適正なものとして利用し得て、本出願は、本明細書に具体的に記載されるものとは別のやり方で実施することができる。従って、本出願の多くの態様には、準拠法によって許容されるような、本明細書に付帯される特許請求項において引用される本主題のすべての修飾態様と均等物が含まれる。さらに、上記に記載の要素のあらゆる組合せが、そのすべての可能なバリエーションにおいて、本明細書において他に示されなければ、又は状況によって明らかに矛盾しなければ、本出願に含まれる。

40

## 【 0 2 5 2 】

[274] 本明細書において参照される、すべての特許、特許出願、特許出願の公開公報、並びに、論文、書籍、明細書、公表物、文書、事物、及び／又は同等物のような他の素材は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるが、それに関連したあらゆる審査ファイル履歴、本明細書と一致しないか又は矛盾するもの、又は本明

50



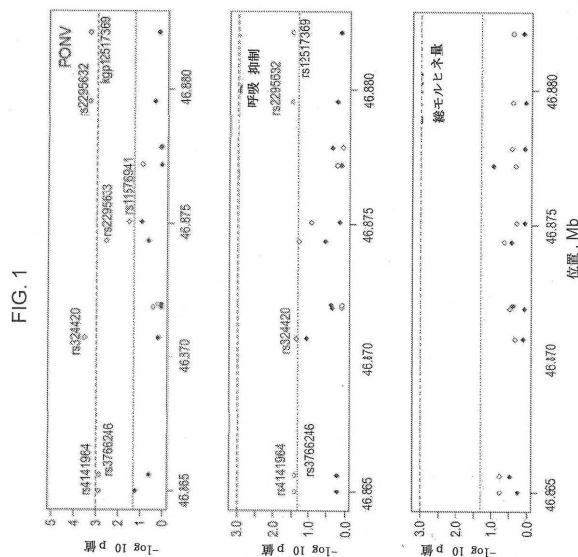
細書と現在又は後に関連する特許請求項の最も広い範囲に対して限定的な効果を有し得るものは、いずれも除外される。例えば、その組み込まれる素材のいずれにも関連する用語の説明、定義、及び／又は使用と、本文書に関連するそれとの間に不一致又は矛盾があるとすれば、本文書における用語の説明、定義、及び／又は使用が優先されよう。

【 0 2 5 3 】

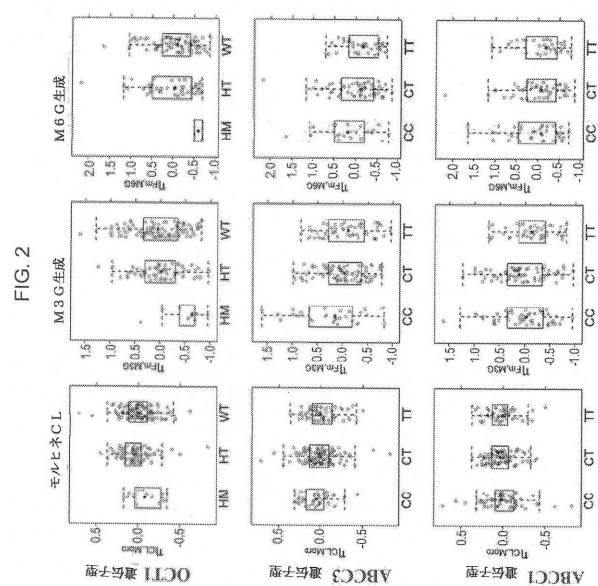
[275] 最後に、本明細書に開示される本出願の態様は、本出願の態様の諸原理を例解するものであると理解されたい。利用し得る他の修飾態様も本発明の範囲内にあり得る。このように、例示であって、限定ではない、本出願の態様の代替構造も、本明細書の教示に従って利用することができる。従って、本出願の態様は、ここで示して記載したものに正確に限定されない。

10

【 図 1 】

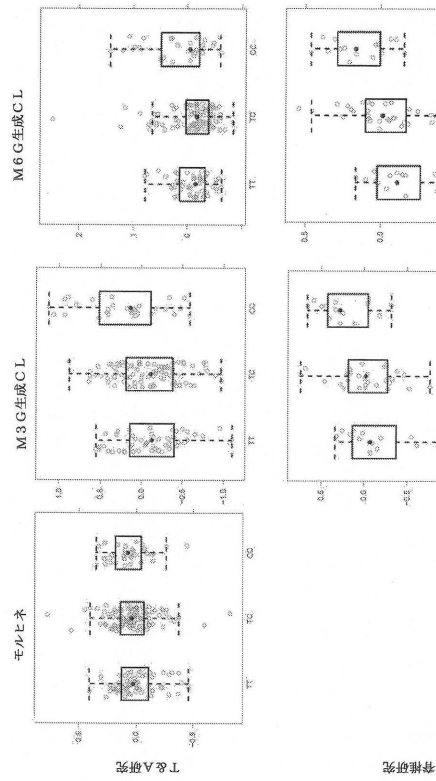


【 図 2 】



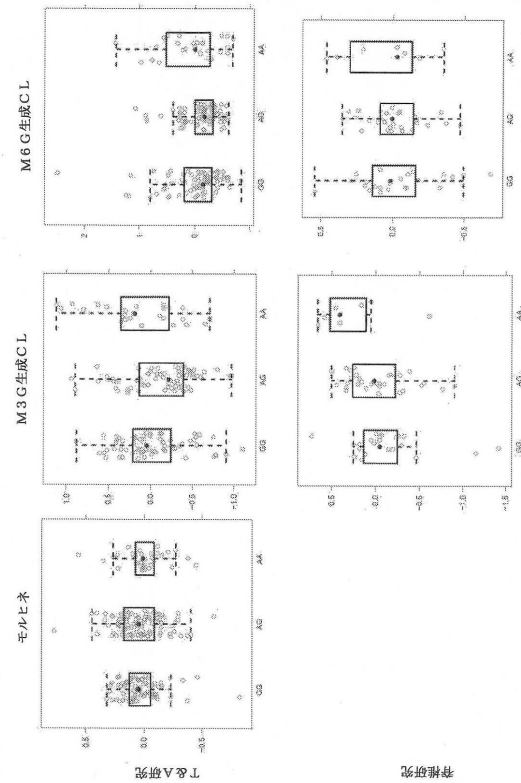
【図 3 A】

FIG. 3A



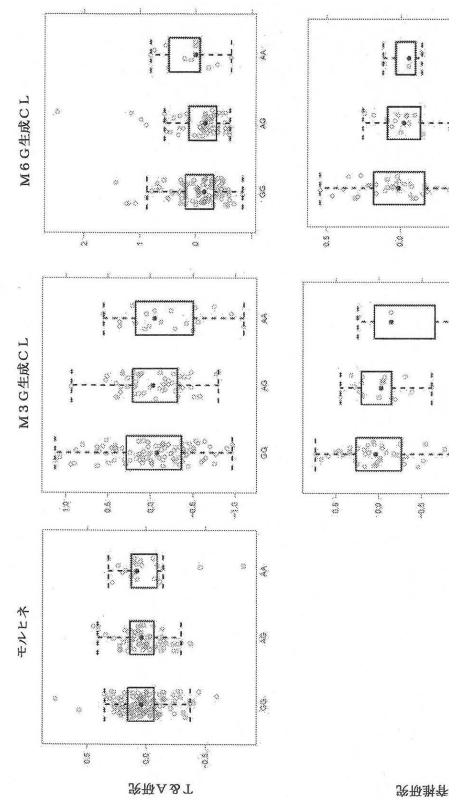
【図 3 B】

FIG. 3B



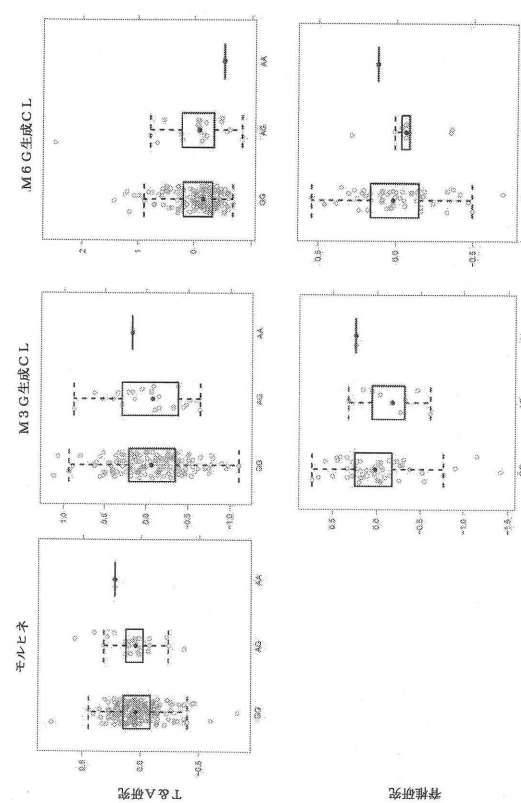
【図 4 A】

FIG. 4A



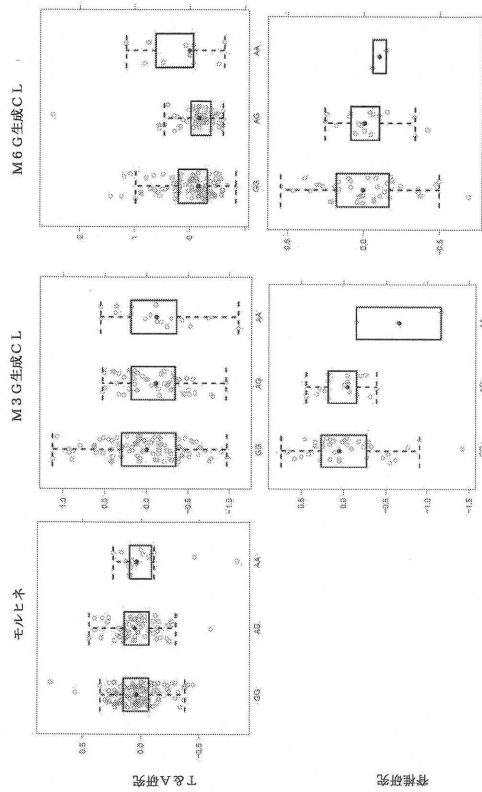
【図 4 B】

FIG. 4B



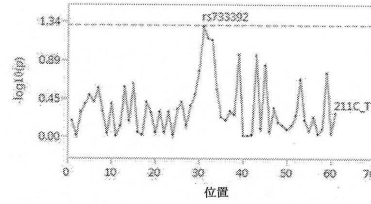
【図 5】

FIG. 5



【図 6】

FIG. 6



【図 7】

FIG. 7A

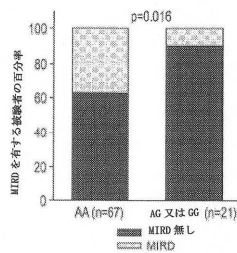


FIG. 7B

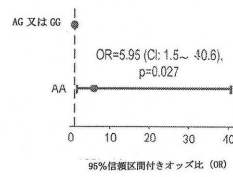
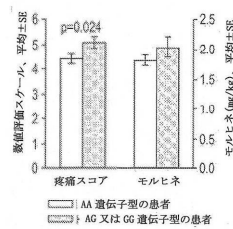


FIG. 7C



【図 8】

FIG. 8A

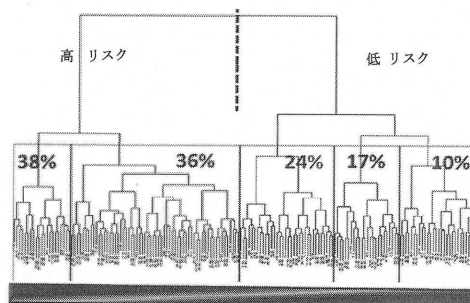
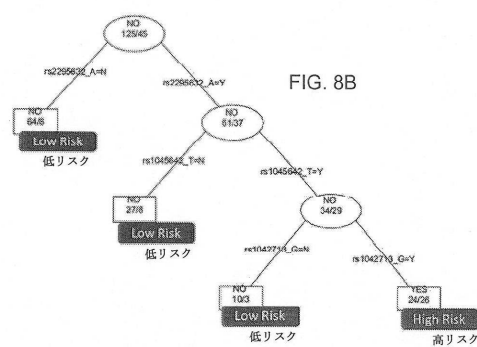
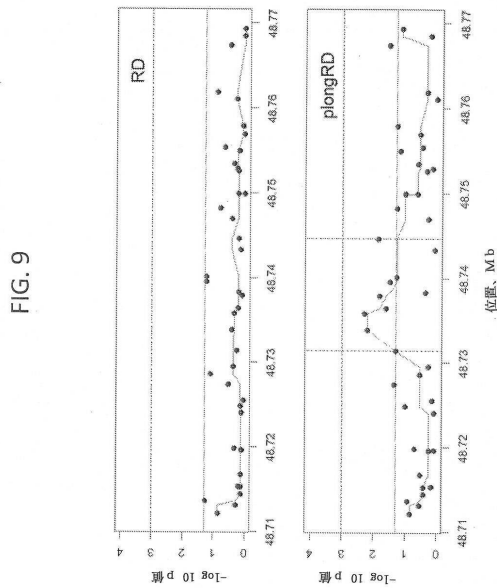


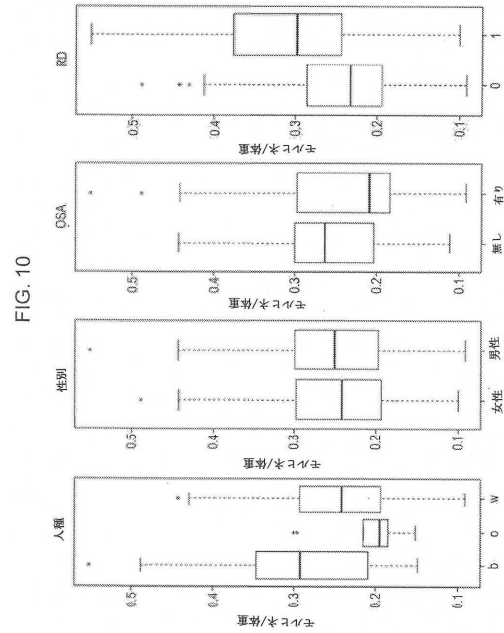
FIG. 8B



【図 9】

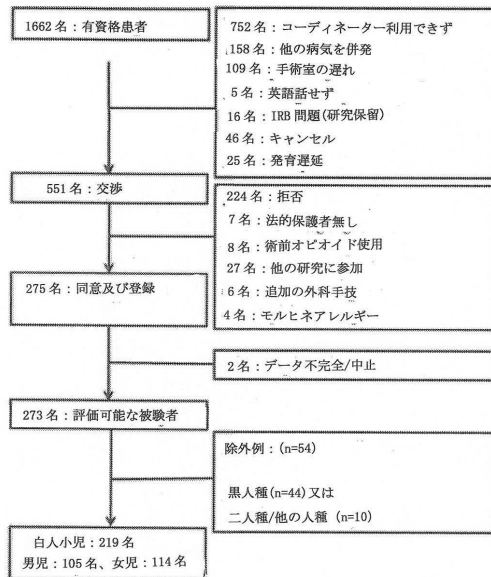


【図 10】



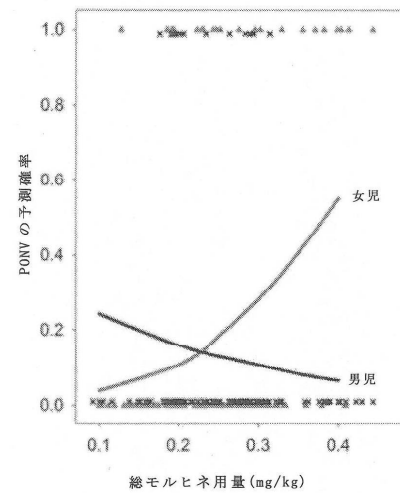
【図 11】

FIG. 11



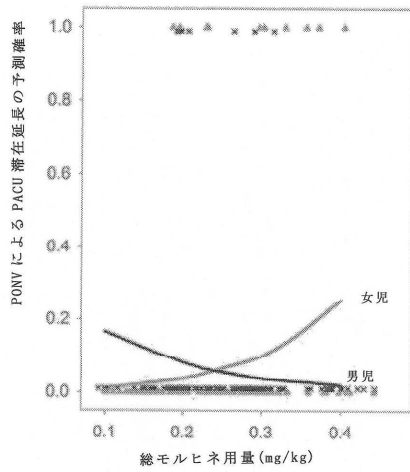
【図 12 A】

FIG. 12A



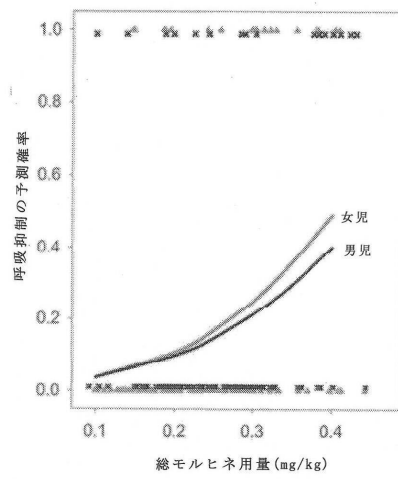
【図 1 2 B】

FIG. 12B



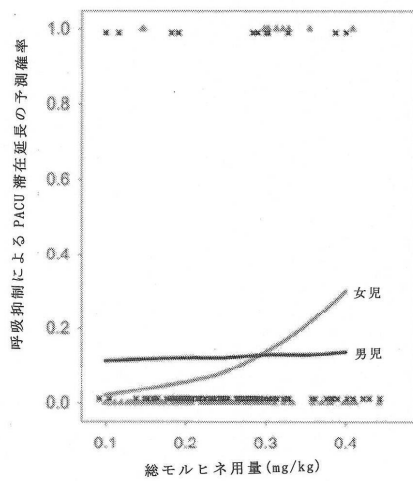
【図 1 3 A】

FIG. 13A



【図 1 3 B】

FIG. 13B



【図 1 4】

FIG. 14

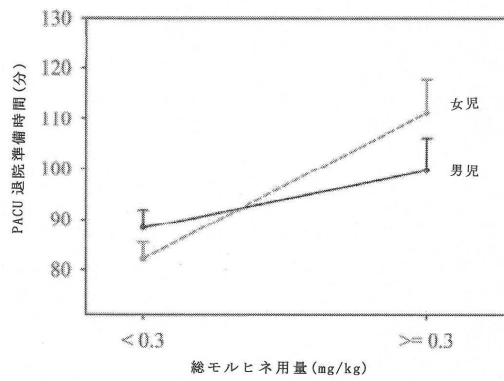


FIG. 15

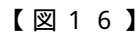


FIG. 16A

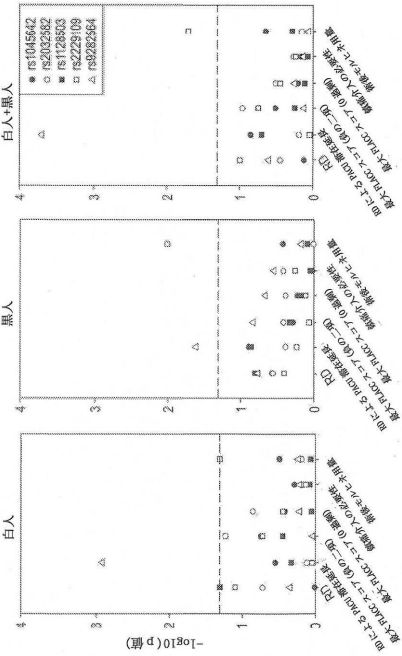


FIG. 17

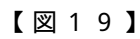
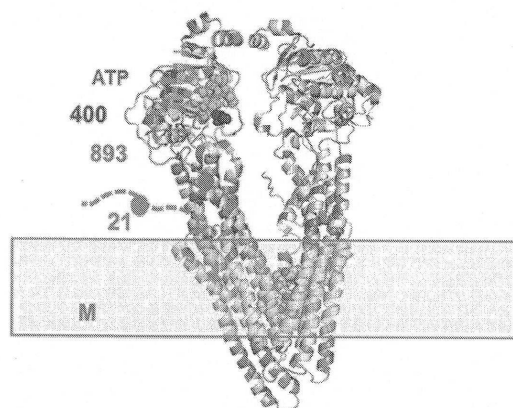


FIG. 18



【図 20】

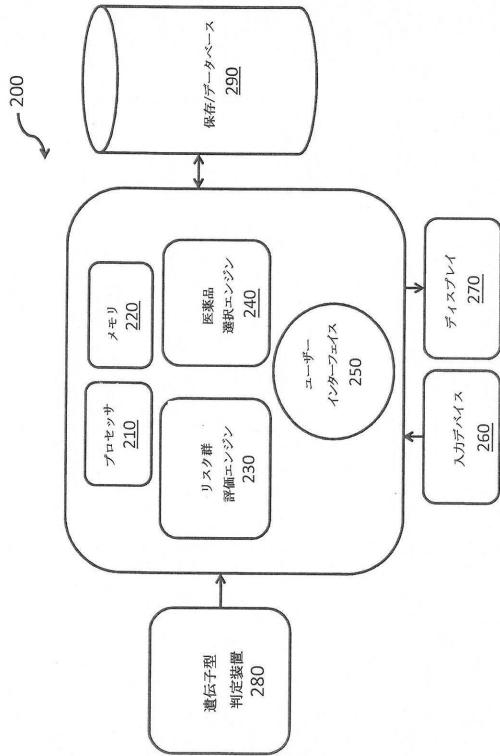


FIG. 20

## フロントページの続き

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100122644

弁理士 寺地 拓己

(72)発明者 サダシヴァム, センティルクマール

アメリカ合衆国オハイオ州45040, メーソン, メーブルデール・ウェイ 5357

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 国際公開第2013/082308(WO, A1)

国際公開第2005/095601(WO, A1)

Journal of Clinical Oncology, 2012年, vol. 30, no. 14, p. 1699-1704, Appendix Table. A1

Pharmacogenomics J., 2017年, vol. 17, no. 2, p. 162-169

CREWS, K.R. et al., CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, 2014年 1月29日, VOL: 95, NR:4, PAGE(S):376 - 382, URL, <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2013.254>

Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2013年, vol. 14, p. 2937-2943

Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2014年, vol. 95, no. 4, p. 376-382

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C12Q