ワルファリン治療個別化に利用可能な 簡易・同時遺伝子診断法の確立

有吉範高^{*}, 中澤一純[△], 北田光一
千葉大学医学部附属病院薬剤部

Development of Simple, Simultaneous Genotyping Method Applicable to Individualized Warfarin Therapy

Noritaka Ariyoshi^{*}, Kazuyoshi Nakazawa[△] and Mitsukazu Kitada

Division of Pharmacy, University Hospital, Chiba University School of Medicine

[Received March 2, 2009]
[Accepted May 21, 2009]

Identification of the gene encoding human vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*VKORC1*), the main target molecule of coumarin derivatives, has contributed to clarifying racial differences in susceptibility to warfarin (Wf). However, although the discovery of genetic polymorphisms of the *VKORC1* gene greatly aided understanding of the causes of great inter-individual variation in the response to Wf, a means of determining the optimal maintenance dose of the drug for each patient has not yet been established.

From the viewpoint of application to both research and routine laboratory testing in the near future, we established a rapid and simple, simultaneous genotyping method for 2 known critical genetic factors, *VKORC1* and *CYP2C9*. The basic principle of this method is multi-primer PCR in which the genotypes of these genes are determined within 2 hr using a single thermal cycling condition. The intensity of the band amplified from the *CYP2C9**3 allele is much greater than that obtained with the method currently used, indicating that the new method would be advantageous in visual diagnosis. Furthermore, since this method was applicable to non-blood derived samples, it would be suitable for a wide variety of patients whose blood is hard to collect, such as small children suffering from Kawasaki disease, or those with few leucocytes due to the adverse effects of chemotherapy with anti-cancer agents.

Key words Warfarin therapy, genotyping method, *VKORC1*, *CYP2C9*

緒 言

ワルファリン(Wf)は、世界的に最も繁用されている抗凝固薬であり、わが国では長期投与可能な唯一の経口抗凝固薬として年間約70万人が服用していると推定されている。効果が高い反面、治療域が狭いため、過量では出血、過少投与では血栓予防に失敗という、いずれも重篤な事象を引き起こすことから米国では副作用で救急外来を訪れる患者の原因薬物の第2位となっている¹⁾。また、医師にとっては処方時に特に注意を払っている薬物であり、一度出血事象を経験した医師は、その後の投与量を平均で2割控えめにするとの報告もある²⁾。Wf治療を困難にしている主たる理由の一つに投与量の著しい個体差があり、それは患者の年齢や体格など身体的要因、V.

K摂取等の環境要因、および遺伝的要因によってもたらされる。2005年にWf標的分子、ビタミンKエポキシド還元酵素(VKOR)複合体1(VKORC1)のヒトにおける遺伝子が単離された³⁾。VKORは、ビタミンK(V.K)サイクルにおいて、血液凝固因子の活性化に必須な還元型V.Kを酸化型V.Kより再生する反応を触媒する酵素であり、Wfの薬物動態を規定する因子ではない。しかし、このVKORC1の遺伝子多型がWf維持用量と関連することが示され⁴⁾て以来、Wf維持用量を事前に推定するための方法論の研究が全世界で精力的に行われている。しかし現時点においてWf維持用量との関連性が示されたすべての因子を考慮しても個体差の5~6割を説明できないに過ぎない⁵⁻⁷⁾。したがって今後もさらなる因子の探索研究とそれら因子を組み合わせた投与量予測アルゴリズムの構築・確立のための臨床研究が必要である。

^{*} 千葉市中央区亥鼻1-8-1; 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba, 260-8677 Japan

[△] 現) : 長野赤十字病院薬剤部(長野市若里5-22-1; 5-22-1, Wakasato, Nagano-shi, Nagano, 380-8582 Japan)

われわれは以上の観点から、今後のワルファリン治療個別化研究へ利用するとともに近い将来の医療現場におけるルーチンな遺伝子診断への応用を視野に入れ、既知の遺伝的因子の中で遺伝子診断が必須となることが想定される *VKORC1* と *CYP2C9* の簡便な同時遺伝子多型診断法を確立することとした。

材料および方法

1. 標準遺伝子多型診断法

図1に *VKORC1* の代表的な遺伝子多型を示す。遺伝子上の一塩基多型(SNPs)の位置を示す番号の使い方が研究者によってさまざまであり、論文を参照する上で混乱を招くため図に要約した。下向き矢印で示した6箇所のSNPs、または上向きで示す4箇所のSNPsはそれぞれ高度に連鎖不平衡の関係にあるため^{8,9)}、通常はどれか一つのSNPの判定が行われている。多くは-1639 G>Aか、1173 C>Tのいずれかであるため、われわれは後者を選択した。開発当時までに報告されていた論文では簡便な方法の典型であるPCR-RFLPでの判定法が見つからなかったため、本研究で開発する新規多型診断法の構築に先立ち、その評価に用いる標準多型診断法から作製した。なお、野生型および多型を有する *VKORC1* 遺伝子は、日本人健康者ボランティアの血液検体より得たゲノムDNAを用いてスクリーニングした。血液からのゲノムDNA抽出は、Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)を用いメーカーのマニュアルに従って行った。健康者検体の研究利用は、ヒト・ゲノム遺伝子解析研究の倫理指針に準拠した千葉大学医学部生命倫理審査委員会における審査後、医学研究院長の承認(「千大医総第524号」)の下に実施した。1173 C>T多型の判定は、以

下のプライマーセットを用いたPCR-RFLP法とした。*VKOR S*, 5'-GAGACTTACTTAAGGTCTAAGATG-3'; *VKOR AS*, 5'-ATTGATTGAGGATGCTGTC-3'。各プライマーのゲノムDNA(GenBank AccNo. AY 587020)上の位置はそれぞれ、6,341 6,362(*VKOR S*)、6,662 6,681(*VKOR AS*)である。rTaq DNA polymerase(TaKaRa)を用い、PCRの条件は、94℃、3分間の熱変性、95℃、20秒のサイクル熱変性、56℃、20秒のアニーリング、72℃、30秒の伸長反応を35サイクルとした。制限酵素は *EcoT14 I*(TaKaRa)を用いて37℃で一晩消化した。判定は、2.5%(W/V)アガロースゲルを用いた電気泳動法により行った。

一方 *CYP2C9**3の判定法は、汎用されているNasuら¹⁰⁾のPCR-RFLP法を用いて行った。

2. *VKORC1* 1173C>T 新規診断法の構築

上で作製した *VKORC1* 1173C>T多型の標準多型診断法のために設計したプライマーを流用し、以下の2種類のプライマーを追加したマルチプライマーPCR法とした。*VKORm*, 5'-TCCCATCCTAGTCCAAGA-3'; *VKORw*, 5'-CAGGAGATCATCGACC-3'。各プライマーのゲノムDNA(GenBank AccNo. AY 587020)上の位置はそれぞれ、6,484 6,501(*VKORm*)、6,469 6,484(*VKORw*)である。AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems Japan)を用い、PCRの条件は、94℃、3分間の熱変性、95℃、10秒のサイクル熱変性、47.5℃、15秒のアニーリング、72℃、10秒の伸長反応を40サイクルとした。判定は2.5%(W/V)アガロースゲルを用い、泳動は100 V 定電圧下10~15分間行った。

図1. *VKORC1* 遺伝子上で連鎖不平衡関係にある SNPs

ボックス内の番号1~3はexon。最上段はAccNo. AY 587020としてGenBankに登録されている *VKORC1* 遺伝子に基づく番号。2段目の括弧内の番号はもっとも頻用されている翻訳領域の塩基配列に基づく番号。最下段において野生型遺伝子と多型遺伝子の塩基が上段の対応するSNPと逆転しているのは、日本人では頻度が高い多型遺伝子を野生型として記載しているためである。

3. *CYP2C9**3 新規診断法の構築

Nasu ら¹⁰⁾が設計したプライマー D に、以下の 3 種類のプライマーを追加したマルチプライマー PCR 法とした .2C9 S ,5'-GTTTGCATATACTTCCAGCAC-3'; 2C9w ,5'-ACGAGGTCCAGAGATAC A-3'; 2C9 m ,5'-GGGAG-AAGGTCAAGG-3'. 各プライマーのゲノム DNA (GenBank AccNo. AL 359672.19) 上の位置はそれぞれ、42,676 42,698(D), 42,363 42,383(2C9 S), 42,597 42,614(2C9w), および 42,613 42,627(2C9m) である. Taq DNA polymerase, PCR の条件, および判定泳動の条件は, *VKORC1* 多型との同時判定を達成するために, 上述した *VKORC1* 1173C>T 多型の条件と全く同じとした.

4. 非血液検体の遺伝子診断

Ariyoshi ら¹¹⁾の方法に従い尿からゲノム DNA を抽出し, 上述した新規多型診断法を用いて判定を行った.

結 果

1. 新規遺伝子診断法

図 2 に *VKORC1* 1173C>T 多型の, 図 3 には *CYP2C9**3 の新規多型診断法と標準多型診断法を用いた場合における, 野生型ホモ接合体, ヘテロ接合体, および多型ホモ接合体の判定泳動像を比較した結果を示す. 新規多型診断法では, 矢印で示したバンドの位置と本数で明瞭に判定することが可能であった. なお *VKORC1* の場合, ヘテロ接合体の場合には, 矢頭で示したバンドが特徴的に強く現れる現象が再現性をもって認められた(図 2).

判定に要した時間は, 標準多型診断法で行った場合, PCR に 2 時間, 増幅確認の泳動に 10 分, 制限酵素消化に 5 時間~一晩(*VKORC1*), 3 時間~一晩(*CYP2C9*), 判定泳動に 20 分要したのに対し, 新規多型診断法で行った場合は, PCR に 1 時間 40 分, 判定泳動に 10 分のみであり, 標準多型診断法の PCR を行っている時間内に結果を得ることが可能であった.

2. 血液から抽出された DNA を用いた判定

健常者ボランティア 10 名の血液より抽出したゲノム DNA を用いて *VKORC1* 1173C>T の判定を行った結果を図 4 A に, *CYP2C9**3 の判定を行った結果を図 4 B に示す.

VKORC1 1173C>T の判定では, 野生型ホモ接合体が 1 名, ヘテロ接合体が 1 名検出され, 判定結果は標準多型診断法のそれと完全に一致した(図 4 A). なお, 図 2 の陽性対照を用いた場合の結果とは若干異なり, 野生型ホモ接合体で目的とするバンドの下に未知の薄いバンドが現れたが, 視認できるバンドが 3 本現れるヘテロ接合体のパターンとは明らかに異なるため, 容易に区別することが可能であり, 判定に支障をきたすことはなかった.

一方 *CYP2C9**3 の判定では, ヘテロ接合体が 3 名検出

され, 判定結果は標準多型診断法の結果と完全に一致した(図 4 B). 新規多型診断法では矢印で示す *CYP2C9**3 に由来するバンドの強度がかなり強いことが特徴であり, 標準多型診断法における *CYP2C9**3 に由来するバンド(矢頭)よりも明らかに視認性に優れていた(図 4 B).

3. 非血液検体を用いた判定

考察に記載したように臨床現場では非血液検体に適用可能な遺伝子診断法を確立しておくことは有用である. そこで本研究では, 無侵襲で容易に得られる患者検体である尿から抽出されるゲノム DNA を試料とした場合でも開発した新規多型診断法が適用可能か否かを検討した. 図 5 に数名の健常者ボランティアから提供された尿検体を用いた判定結果を示す. 血液検体(図 4)の場合と異なり, 黒矢頭で示した未反応のプライマーに起因する低分子量のバンドが新たにみられたが, 判定には全く問題がなかった.

考 察

平成 20 年 11 月に塩酸イリノテカンによる重篤な副作用のリスクが高い患者を予測するため, わが国初の体外診断用医薬品が国に認可された. このことは, 遺伝子診断が医薬品適正使用を推進する手段の一つとして有用であることが正式に認められ, 研究段階という従来の枠を越え, いよいよ医療現場で使われる時代が到来したことを意味する.

国は, 平成 19 年 4 月に医薬品・医療機器等安全性情報を介して *VKORC1* と *CYP2C9* の多型を紹介し, Wf 治療への将来的応用の可能性を示している¹²⁾. 一方海外では, 米国 FDA が Wf 適正使用と出血リスクの低減に遺伝子診断が一定の有用性があるとして 2007(平成 19)年 8 月に Wf 添付文書¹³⁾の改訂を承認している. 上述したイリノテカンの副作用を予測する遺伝子多型診断キットが米国に続きわが国でも数年後に承認された経緯を考えると, わが国で Wf 治療における遺伝子診断の医療現場での適用も遠くはないと考えられる.

後述するように, われわれは薬の有効性や副作用と関連する遺伝子検査は薬剤師が実施すべきとの観点から, これまでさまざまな遺伝子診断を開発してきた. その際の共通コンセプトは正確・簡便・低コストである. 理想的な遺伝子診断法が具備すべき条件として速さ(迅速性)が必要以上に強調される場合があるが, 遺伝子診断を臨床現場で行う際, 最も時間のかかるステップは患者への同意取得である. したがって, 判定結果が出るまでの時間は短いほうが望ましいことに異論はないが, 迅速性は必ずしも“最優先”要件ではない. 最も重視すべきものは判定結果が治療方針の方向性を直接左右することから遺伝子診断の正確性である. また, 医療スタッフが不慣れな遺伝子診断をルーチン業務として新たに展開しよう

図2. *VKORC1* 遺伝子 1173C>T 多型診断法

C アレルが野生型, T アレルが多型対立遺伝子. 新規多型診断法では理論上, 矢頭で示す 340 bp のバンドのほかに, 矢印で示す野生型アレルに由来する 214 bp と多型アレルに由来する 160 bp のバンドが生じる. 標準多型診断法では, 340 bp の増幅産物を制限酵素 *EcoT141* で消化すると, 野生型アレルでは 143, 119, および 78 bp に切断され, 多型アレルでは 221 と 119 bp に切断される. ただし制限酵素の量が不足していると, 図のような明瞭なバンドパターンにはならない. なお, 鋳型 DNA は, 遺伝子組換えで作出した陽性対照を用いた.

図3. *CYP2C9**3 の多型診断法

新規多型診断法では理論上 336 bp のバンドのほかに, 矢印で示す多型アレルに由来する 265 bp と, 野生型アレルに由来する 102 bp のバンドが生じる. 標準多型診断法では, 105 bp の増幅産物を制限酵素 *Kpn*I で消化すると, 野生型アレルでは切断されないが, 多型アレルでは 85 と 20 bp に切断される. 通常 20 bp のバンドは短すぎて確認されないため, 図では 105 と 85 bp の領域のみを示す. ヘテロ接合体 (*CYP2C9**1/*3) の場合, 制限酵素での消化に用いる増幅産物の量が少ない, あるいは泳動時間が長すぎると 85 bp のバンドは見にくい. なお, 鋳型 DNA は, 遺伝子組換えで作出した陽性対照を用いた.

図4．開発した新規多型診断法の臨床検体を用いた場合の評価

(A) *VKORC1* 1173 C > T, (B) *CYP2C9**3 の判定結果．それぞれ上段四角枠内が本研究で開発した新規多型診断法，下段が標準多型診断法(PCR-RFLP)での結果である．鋳型 DNA として血液より kit で抽出したゲノム DNA を用いた．

図5．開発した新規多型診断法への非血液検体の適用結果

(A) *VKORC1* 1173 C > T, (B) *CYP2C9**3 の判定結果．*CYP2C9**3 の判定の際，理論上現れる 336 bp のバンド(図3の新規多型診断法の最上段，および本図の陽性対照の白矢頭で示すバンド)は検出されなかったが，図3中矢印で示している判定に必要な2本のバンド(多型アレルに由来する 265 bp と野生型アレルに由来する 102 bp のバンド)の観察に問題はなかった．

とする場合、可及的に人手がかからず単純な方法が望ましい。さらに試薬が安くランニングコストがかからない方法は保険適用となった後でも病院経営の面から有利である。本研究で標準多型診断法として用いた PCR-RFLP 法は従来、正確・簡便・低コストな方法の代表として主に研究領域で使用されてきた。しかし、RFLP 法には消化時間や制限酵素添加量の不足による切れ残りが起こる可能性があり、迅速に結果を出そうとすると正確性で不利な場合があり、また、遺伝子増幅の有無、および増幅量の確認泳動が必要な点、消化反応を行うチューブへの移し替え操作でサンプルの取り違えが起こる危険性があるなど、検体数が増すにつれ、操作が煩雑で人手がかかり簡便性が低下する。さらに制限酵素という追加試薬や、正確性を重視する際には最長一晩のインキュベーションが必要など、コストや迅速性の面では必ずしも優れた方法とはいえない。これに比べ、本研究で確立した方法は、わずか 1 回の PCR と電気泳動で同時に *VKORC1* と *CYP2C9* の遺伝子型の判定結果を正確・簡便・低コストかつ迅速で得ることが可能である。*CYP2C9**3 判定法について追記すれば、標準多型診断法として用いられている Nasu ら¹⁰⁾の判定法では誤診断されてしまった日本人の症例が報告されている¹⁴⁾が、当該 SNP をもつ患者検体でも本方法であれば正しい判定結果を得ることができる。

医療現場では新生児、血管が細い女性や肥満者など採血が難しい患者、がん化学療法や免疫抑制療法の影響で白血球数が著しく低下し、血液からのゲノム DNA の回収が困難な患者、さらには造血幹細胞移植後の患者¹¹⁾のように血液から抽出した DNA を用いた遺伝子診断が意味を成さない患者などさまざまな症例に遭遇する。したがって採血することなく、できるだけ低侵襲な方法で良質なゲノム DNA を得、その試料で実施できる遺伝子診断法を確立しておくことは意義があり、本研究で開発した新規多型診断法はその点でも満足する結果が得られた(図 5)。しかし Wf 感受性は、遺伝的要因のみならず患者の生理的要因や、食事・併用薬物などの環境要因によっても著しい影響を受ける。したがって *VKORC1* や *CYP2C9* の遺伝子多型情報だけでは患者の維持投与量の正確な事前予測は困難であり、本研究で開発した遺伝子診断法等を利用したさらなる研究が必要である。

今後、遺伝子診断は薬の副作用のみならず、腫瘍組織の *EGFR* 変異診断のように有効性を予測するツールとしても活用されることが期待されている。したがってこれまで薬物血中濃度を根拠とし TDM によって医薬品適正使用を推進してきた薬剤師が、患者遺伝子情報を根拠とし遺伝子診断によって医薬品適正使用に貢献することは重要であり、昨今の医療現場における薬剤師の職能拡大の動きに呼応した自然な流れと考えられる。国だけでなく病院薬剤師自身も遺伝子診断は検査部業務(臨床検査技師)の領域と考えているが、遺伝性疾患の確定診断

を目的とした従来の遺伝子診断と異なり、薬効や副作用の予測のための遺伝子診断は、その判定結果が直接処方の作成や変更にかかわるものであり、薬剤師が行ってこそ真の有用性を発揮できると考えられる¹⁵⁾。

イリノテカンによる重篤な副作用と *UGT1A1* の遺伝子多型の関連性が示されてからインペーダー[®]*UGT1A1* アッセイが臨床現場に出てくるまでにわが国では約 10 年の歳月が必要であった。日本が最初に発信した情報が世界中で追試され、米国で先に臨床応用されたことは、単に遺伝子診断キットの承認に係わる審査体制の整備が欧米に比して遅れたことだけが原因ではなく、遺伝子多型の頻度や種類の人種差、国民を形成する民族の数、医療保険システムの違いなどさまざまな要因が複合した結果と考えられる。しかしながら、患者遺伝子情報を利用した薬物治療の個別適正化の実現を阻んでいる最大の課題点は、臨床でのエビデンス不足であると考えている。薬の有効かつ安全な使用(医薬品適正使用)の推進を責務として臨床現場で活躍している薬剤師が、遺伝子診断を新たな業務として始めた場合、ルーチン業務として実施するだけに留まって満足せず、日本人におけるエビデンスを蓄積する研究に積極的に取り組み、遺伝子診断の臨床応用におけるさらなる可能性の拡大に貢献することが期待される。

謝辞 本研究の実施にあたり、研究費の一部を助成していただいた財団法人臨床薬理研究振興財団に深謝申し上げます。

引用文献

- 1) D.S. Budnitz, D.A. Pollock, K.N. Weidenbach, A.B. Mendelsohn, T.J. Schroeder, J.L. Annest, National surveillance of emergency department visits for outpatient adverse drug events., *JAMA*, **296**, 1858-1866 (2006).
- 2) N.K. Choudhry, G.M. Anderson, A. Laupacis, D. Ross-Degnan, S.-L.T. Normand, S.B. Soumerai, Impact of adverse events on prescribing warfarin in patients with atrial fibrillation: matched pair analysis., *BMJ*, **332**, 141-145 (2006).
- 3) T. Li, C.-Y. Chang, D.-Y. Jin, P.-J. Lin, A. Khvorov, D.W. Stafford, Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase., *Nature*, **427**, 541-544 (2004).
- 4) G. D'Andrea, R.L. D'Ambrosio, P. Di Perna, M. Chetta, R. Santacroce, V. Brancaccio, E. Grandone, M. Margaglione, A polymorphism in the *VKORC1* gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin., *Blood*, **105**, 645-649 (2005).
- 5) E.A. Sconce, T.I. Khan, H.A. Wynne, P. Avery, L. Monkhouse, B.P. King, P. Wood, P. Kesteven, A.K. Daly, F. Kamali, The impact of *CYP2C9* and *VKORC1* genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen., *Blood*, **106**, 2329-2333 (2005).
- 6) C.L. Aquilante, T.Y. Langaee, L.M. Lopez, H.N. Yarandi, J.

- S. Tromberg, D. Mohuczy, K.L. Gaston, C.D. Waddell, M.J. Chirico, J.A. Johnson, Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **79**, 291 302(2006).
- 7) K. Obayashi, K. Nakamura, J. Kawana, H. Ogata, K. Hanada, M. Kurabayashi, A. Hasegawa, K. Yamamoto, R. Horiuchi, *VKORC1* gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **80**, 169 178 (2006).
- 8) T. Mushiroda, Y. Ohnishi, S. Saito, A. Takahashi, Y. Kikuchi, S. Saito, H. Shimomura, Y. Wanibuchi, T. Suzuki, N. Kamatani, Y. Nakamura, Association of *VKORC1* and *CYP2C9* polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients., *J. Hum. Genet.*, **51**, 249 253 (2006).
- 9) Y. Wang, W. Zhang, Y. Zhang, Y. Yang, L. Sun, S. Hu, J. Chen, C. Zhang, Y. Zheng, Y. Zhen, K. Sun, C. Fu, T. Yang, J. Wang, J. Sun, H. Wu, W.C. Glasgow, R. Hui, *VKORC1* haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease, and aortic dissection), *Circulation*, **113**, 1615 1621 (2006).
- 10) K. Nasu, T. Kubota, T. Ishizaki, Genetic analysis of *CYP2C9* polymorphism in a Japanese population., *Pharmacogenetics* **7**, 405 409 (1997).
- 11) N. Ariyoshi, K. Sho-no, M. Nishimura, M. Ito, H. Nakamura, T. Asai, Y. Saitoh, T. Ishizaki, M. Kitada, The use of urine to clarify the genotype of a patient with toxic phenytoin concentrations who had undergone oerioheral blood stem cell transplantation., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **58**, 225 226 (2004).
- 12) ファーマコゲノミクスの展望, 厚生労働省医薬食品局, 平成 19 年 4 月 26 日発行, 医薬品・医療機器等安全性情報 No.235, pp.22 23.
- 13) COUMADIN® TABLETS and COUMADIN® FOR INJECTION, Package Insert, Bristol-Myers Squibb Company, Revised in August 2007.
- 14) T. Okuda, H. Izumoto, M. Nishiki, K. Matsuura, K. Matsuzaki, T. Uemichi, T. Suzuki, A novel *CYP2C9* variant that caused erroneous genotyping in a patient on warfarin therapy., *Pharmacogenetics* **14**, 707 709 (2004).
- 15) 有吉範高; チーム医療のための遺伝カウンセリング入門”, 野村文夫, 羽田明編著, 中外医学社, 2007, pp.136 145.