

平成 11 年 4 月 7 日

厚生大臣 宮下 創平 殿

住 所  
 フリカ ナ オクムラ カツヒコ  
 研究者 氏 名 奥村 勝彦  
 (所属施設 神戸大学医学部附属病院薬剤部)

平成 10 年度厚生科学研究費補助金 ( 医薬安全総合 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

薬物代謝酵素の遺伝子型を利用した医薬品の有効性・安全性の評価と  
 研究課題名 (課題番号) : 使用基準の確立に関する研究 (H10-医薬-035)

国庫補助金精算所要額 : 金 3,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執 筆 者 氏 名
(1) 月刊薬事, 40(13), 2959~2962 : これからの医療におけるTDMの重要性	平成10年11月	薬業時報社	奥村勝彦
(2) 月刊薬事, 40(13), 2975~2979 : 遺伝子多型へのTDMへの応用	平成10年11月	薬業時報社	喜多知子, 奥村勝彦
(3) 臨床検査, 43(1), 55~60 : 遺伝子解析と薬物体内動態	平成11年1月 15日	医学書院	喜多知子, 奥村勝彦
(4) 日本臨床, 57(1), 43~52 : H. pylori除菌治療における抗菌剤の種類と必要条件	平成11年1月		青山伸郎, 白坂大輔 阪井俊介, 白川勝朗
(5) 日本内科学会雑誌, 87(5), 868~880 : H. pylori除菌法とその効果判定	平成10年5月 10日	日本内科学会	青山伸郎
(6) 臨床検査, 42(12), 1561~1564 : 薬物代謝酵素の遺伝子多型	平成10年11月 15日	医学書院	谷川原祐介
(7) TDM研究, 印刷中 : CYP2C遺伝子型判定における制限 酵素消化の陽性対照の設計	未定	日本TDM学会	渡辺和英, 谷口律子, 川上英治, 荒木博陽, 五味田裕, 清水憲二

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況  
該当無し

研究費の名称=厚生科学研究費

研究事業名=医薬安全総合研究事業

研究課題名=薬物代謝酵素の遺伝子型を利用した医薬品の有効性・安全性の評価と使用基準の確立に関する研究

国庫補助金清算所要額=3,000,000

研究期間=1998-2000

主任研究者名=奥村勝彦（神戸大学医学部附属病院）

分担研究者名=青山伸郎（神戸大学医学部附属病院），谷川原祐介（慶應義塾大学病院），五味田裕（岡山大学医学部附属病院）

研究目的=薬物を代謝する能力には大きな個人差があることが知られている。この原因の一つとして、特定の薬物代謝酵素に関してその活性が欠損または著しく弱い個体が存在する、即ち遺伝的多型性を示すことがあげられる。あらかじめこれらの遺伝子型がわかれば患者の薬物代謝能力が予測でき、処方設計のための有力な情報となることが考えられる。現在、血液中の DNA より薬物代謝酵素の遺伝子型を決定して、患者の薬物代謝能力を予測しようとする研究が行われている。

ここで、PCR-RFLP 法は、操作が簡便であることから遺伝子型の決定に繁用されているが、制限酵素が抗悪性腫瘍薬、SH 基含有化合物や過剰の PCR プライマー等により阻害される事が知られている。そこでまず、我々は制限酵素の不完全消化による誤判定を避ける目的で、CYP2C19 および 2C9 遺伝子型判定において制限酵素消化の陽性対照（制限酵素の認識部位を持つ他の DNA 断片）を設計し、その有用性を検討した。

次に、遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 N-アセチル転移酵素 (NAT) 及び CYP2C19 について、遺伝子型とサラゾスルファピリジン (SASP) 又はプロトンポンプ阻害剤（オメプラゾール (OPZ) 並びにランソプラゾール (LPZ)）の薬物代謝能との相関性について健常人での検討を行う。

さらに上記薬物服用患者について、遺伝子型と薬効・毒性との相関解析も行った。

研究方法=まず、CYP2C19 および 2C9 遺伝子型判定時の制限酵素消化陽性対照として、CYP2C19 は、制限酵素 Sma I および Bam HI の認識部位を持つヒト癌遺伝子 N-myc のエキソン 1-イントロン 1 の領域に、CYP2C9 では、Ava II および Kpn I の認識部位を持つヒト CYP1A1 遺伝子の 3'下流領域にプライマーの設計を行った。ヒト血液より抽出したゲノム DNA を用いバンドの位置を確認した後、制限酵素阻害物質 アドリアマイシンを最終濃度 15 または 30 $\mu$ M となる様に添加し、RFLP への影響を検討した。

次に NAT 遺伝子型或いは CYP2C19 遺伝子型の判明している健常人において、サラゾスルファピリジン (SASP) 及びプロトンポンプ阻害剤（オメプラゾール (OPZ)、ランソプラゾール (LPZ)）の単回投与試験を行った。投与後、経時的に採血・採尿を行い、スルファピリジン (SP) 並びにアセチル体、そして OPZ 又

は LPZ の未変化体並びに水酸化体の血漿中・尿中濃度は HPLC 法により測定した。また、プロトンポンプ阻害剤については、薬物服用時、胃内 pH モニタリングも併せて行い、胃酸分泌抑制作用と遺伝子型との関連性について検討した。

さらに、SASP 服用経験のある潰瘍性大腸炎患者 13 例に対し、NAT 遺伝子タイピングを行った後、服薬状況、薬理効果・副作用等について問診を行い、カルテにて調査した。また、プロトンポンプ阻害剤 (OPZ 又は LPZ) と抗生剤の併用療法 (投与期間: 1 週間) を行った *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 除菌治療患者 (計 141 例) に対し、除菌治療効果と *CYP2C19* 遺伝子型との関連性を検討した。さらに、投与開始 7 日目の朝薬物服用後のプロトンポンプ阻害剤未変化体及び水酸化体・スルホン体の濃度は HPLC 法により測定した。

## 結果と考察

*CYP2C19* 及び *CYP2C9* の陽性対照は共に各制限酵素処理により切断され、RFLP の DNA 断片とゲル上で明確に判別できた。また、アドリアマイシンをサンプル DNA に加えた場合、RFLP のバンドのみからはヘテロ接合体または変異型のホモ接合体と判定する可能性があったが、未消化の陽性対照 (590bp) が残っていたため消化が阻害されていることが容易に確認でき、誤判定を避けることが可能であった。薬物代謝酵素の遺伝子タイピングに用いられる PCR 法は未精製のサンプルを用いても増幅が可能のため、血液からの鑄型 DNA 調製も簡便な方法で行われる場合が多い。この場合、制限酵素の阻害物質が除去されずに混入して誤った遺伝子型の判定をもたらす可能性がある。従って、今回検討した制限酵素の陽性対照は、より確実な判定を下すための有効な方法であると考えられる。今後は、これらの陽性対照を用いて *CYP* 遺伝的多型の抗てんかん薬薬物動態への影響を検討する予定である。

次に、健常人における SASP 及び OPZ、LPZ 単回投与試験の結果、NAT 遺伝子型と SP のアセチル化代謝能、そして *CYP2C19* 遺伝子型と各プロトンポンプ阻害剤の水酸化能とに良好な相関性が認められ、変異遺伝子型同士の組み合わせの場合、未変化体濃度/代謝物 AUC 比が高値を示した。また、OPZ 並びに LPZ 単回投与後、胃内 pH は上昇し、その程度は *CYP2C19* 遺伝子型が変異遺伝子同士の場合、より顕著であった。よって、SASP 並びに OPZ、LPZ において、NAT 及び *CYP2C19* の遺伝子タイピングによる健常人での薬物代謝能の予測は可能であると考えられた。また、*CYP2C19* 遺伝子型と OPZ 及び LPZ の胃酸分泌抑制作用とが相関したことから、薬理作用の予測も可能であると考えられた。

さらに、SASP 服用経験のある潰瘍性大腸炎患者 13 例のうち、NAT 遺伝子型が変異遺伝子同士であった 1 例で副作用発現 (膝炎) が見られたが、その他の遺伝子型の場合、副作用は薬物アレルギーによる発疹 (4 例) のみであった。また *H. pylori* 除菌治療において、*CYP2C19* 遺伝子型が正常遺伝子を含む場合に 41%~88% の除菌成功率であったのに比べ、変異遺伝子同士の患者の場合、全例が除菌に成功した。一方、LPZ 併用群では、除菌治療効果における *CYP2C19* 遺伝子型の違いは認められなかった (正常遺伝子を含む遺伝子型の患者の除菌率: 90%、変異遺伝子同士の遺伝子型の患者での除菌率: 82%)。なお、両薬物共に、副作用 (消化器症状) における遺伝子型の違いは認められなかった。

以上、患者での SASP 及び OPZ による薬物治療において、SASP の副作用発現と NAT 遺伝子型、OPZ 併用群の *H. pylori* 除菌治療成績と *CYP2C19* 遺伝子型とに関連性が見られた。一方、同じ *CYP2C19* により代謝される LPZ 併用群での *H. pylori* 除菌治療成績においては、遺伝子型による違いが認められなかった。この理由として①LPZ は、OPZ に比べ、代謝過程における *CYP2C19* の寄与率が低いこと、②副代謝経路 *CYP3A4* を介した抗生剤クラリスロマイシンとの相互作用等、が挙げられる。今後、これらの点に

ついて in vitro 肝ミクロゾーム系を用いて詳細に検討を行いたい。

結論=今回設計した CYP2C19 および 2C9 遺伝子型判定時の制限酵素消化の陽性対照は、制限酵素の阻害又は失活による誤判定を確認できる事から、遺伝子診断を確実にを行うための簡便で有用な方法である。

健常人における薬物単回投与試験の結果、薬物代謝酵素の遺伝子型と薬物代謝能・薬理作用とに良い相関が認められた。また、SASP 及び OPZ 服用患者において、副作用発現或いは除菌治療効果と、各々の薬物代謝酵素 (NAT 及び CYP2C19) の遺伝子型とに関連性が見られた。しかしながら、LPZ のように必ずしも、CYP2C19 遺伝子型から除菌治療効果の予測ができない場合も見られた。

今後も引き続き、「薬物療法における遺伝子解析の応用」を目的としてさらなる検討を行いたい。

薬物代謝酵素の遺伝子型を利用した医薬品の有効性・安全性の評価と使用基準の確立に関する研究

主任研究者 奥村 勝彦 神戸大学医学部附属病院薬剤部教授・薬剤部長

研究要旨

まず、チトクローム P450 (CYP) 遺伝的多型の抗てんかん薬体内動態への影響を検討するにあたり、遺伝子型の判定を確実にする方法を検討した。遺伝子型の判定に用いられている PCR-RFLP 法に用いる制限酵素は、一部の阻害物質により遺伝子型の判定を誤る可能性がある。この対策として、反応液中に制限酵素消化の陽性対照を添加してその切断を確認すれば、誤判定を避けることができる。そこで、CYP2C 遺伝子型判定時の制限酵素消化の陽性対照を設計し、その有用性を検討した結果、陽性対照により制限酵素阻害物質添加時の誤判定を避けることが可能であった。

次に 遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 N-アセチル転移酵素 (NAT) 及び CYP2C19 について、各酵素により代謝される薬物、サラゾスルファピリジン又はプロトンポンプ阻害剤 (オメプラゾール (OPZ) 又はランソプラゾール (LPZ)) を用いた健常人での単回投与試験を行った。その結果、遺伝子型と薬物代謝能とに良好な相関性が認められ、変異遺伝子同士のみ組み合わせの場合、血漿中未変化体濃度が高値を示した。

さらに、上記薬物について、患者治療上の薬効・毒性と各々の遺伝子型との関連性を検討した。その結果、サラゾスルファピリジン服用経験のある潰瘍性大腸炎治療患者において、NAT 遺伝子型が変異遺伝子同士の場合にのみ、痔炎が発現していた。又、OPZ 又は LPZ を用いた *Helicobacter pylori* 除菌治療において、CYP2C19 遺伝子型と OPZ 併用群での除菌治療効果とが相関したが、LPZ 併用群の場合、CYP2C19 遺伝子型による除菌治療効果の差異は認められなかった。

分担研究者：

青山 伸郎

神戸大学医学部附属病院光学医療診療部  
助教授・部長

谷川原 祐介

慶應義塾大学病院薬剤部  
教授・薬剤部長

五味田 裕

岡山大学医学部附属病院薬剤部  
教授・薬剤部長

すことがあげられる。あらかじめこれらの遺伝子型がわかれば患者の薬物代謝能力が予測でき、処方設計のための有力な情報となることが考えられる。現在、血液中の DNA より薬物代謝酵素の遺伝子型を決定して、患者の薬物代謝能力を予測しようとする研究が行われている。

ここで、PCR-RFLP 法は、操作が簡便であることから遺伝子型の決定に繁用されているが、制限酵素が抗悪性腫瘍薬、SH 基含有化合物や過剰の PCR プライマー等により阻害される事が知られている。そこでまず、我々は制限酵素の不完全消化による誤判定を避ける目的で、CYP2C19 および 2C9 遺伝子型判定において制限酵素消化の陽性対照（制限酵素の認識部位を持つ他の DNA 断片）を設計し、その有用性を検討した。

次に、遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 N-

A. 研究目的

薬物を代謝する能力には大きな個人差があることが知られている。この原因の一つとして、特定の薬物代謝酵素に関してその活性が欠損または著しく弱い個体が存在する、即ち遺伝的多型性を示

アセチル転移酵素(NAT)及び CYP2C19 について、遺伝子型とサラゾスルファピリジン(SASP)又はプロトンポンプ阻害剤(オメプラゾール(OPZ)並びにランソプラゾール(LPZ))の薬物代謝能との相関性について健常人での検討を行う。

さらに上記薬物服用患者について、遺伝子型と薬効・毒性との相関解析も行った。

## B. 研究方法

まず、CYP2C19 および 2C9 遺伝子型判定時の制限酵素消化陽性対照として、CYP2C19 は、制限酵素 Sma I および Bam HI の認識部位を持つヒト癌遺伝子 N-myc のエキソン1-イントロン1の領域に、CYP2C9 では、Ava II および Kpn I の認識部位を持つヒト CYP1A1 遺伝子の3'下流領域にプライマーの設計を行った。ヒト血液より抽出したゲノム DNA を用いバンドの位置を確認した後、制限酵素阻害物質アドリアマイシンを最終濃度 15 または 30 $\mu$ M となる様に添加し、RFLP への影響を検討した。

次に NAT 遺伝子型或いは CYP2C19 遺伝子型の判明している健常人において、サラゾスルファピリジン(SASP)及びプロトンポンプ阻害剤(オメプラゾール(OPZ)、ランソプラゾール(LPZ))の単回投与試験を行った。投与後、経時的に採血・採尿を行い、スルファピリジン(SP)並びにアセチル体、そして OPZ 又は LPZ の未変化体並びに水酸化体の血漿中・尿中濃度は HPLC 法により測定した。また、プロトンポンプ阻害剤については、薬物服用時、胃内 pH モニタリングも併せて行い、胃酸分泌抑制作用と遺伝子型との関連性について検討した。

さらに、SASP 服用経験のある潰瘍性大腸炎患者 13 例に対し、NAT 遺伝子タイピングを行った後、服薬状況、薬理効果・副作用等について問診を行い、カルテにて調査した。また、プロトンポンプ阻害剤(OPZ 又は LPZ)と抗生剤の併用療法(投与期間: 1 週間)を行った *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)除菌治療患者(計 141 例)に対し、除菌治療効果と CYP2C19 遺伝子型との関連性を検討した。さらに、投与開始7日目の朝薬物服用後のプロトンポンプ阻害剤未変化体及び水酸化体・スルホン体の濃度は HPLC 法により測定した。

## C. 研究結果

CYP2C19 及び CYP2C9 の陽性対照は共に各制限酵素処理により切断され、RFLP の DNA 断片とゲ

ル上で明確に判別できた。また、アドリアマイシンをサンプル DNA に加えた場合、RFLP のバンドのみからはヘテロ接合体または変異型のホモ接合体と判定する可能性があったが、未消化の陽性対照(590bp)が残っていたため消化が阻害されていることが容易に確認でき、誤判定を避けることが可能であった。

次に、健常人における SASP 及び OPZ、LPZ 単回投与試験の結果、NAT 遺伝子型と SP のアセチル化代謝能、そして CYP2C19 遺伝子型と各プロトンポンプ阻害剤の水酸化能とに良好な相関性が認められ、変異遺伝子型同士の組み合わせの場合、未変化体濃度/代謝物 AUC 比が高値を示した。また、OPZ 並びに LPZ 単回投与後、胃内 pH は上昇し、その程度は CYP2C19 遺伝子型が変異遺伝子同士の場合、より顕著であった。

さらに、SASP 服用経験のある潰瘍性大腸炎患者 13 例のうち、NAT 遺伝子型が変異遺伝子同士であった1例で副作用発現(膝炎)が見られたが、その他の遺伝子型の場合、副作用は薬物アレルギーによる発疹(4例)のみであった。

また *H. pylori* 除菌治療において、CYP2C19 遺伝子型が正常遺伝子を含む場合に 41%~88%の除菌成功率であったのに比べ、変異遺伝子同士の患者の場合、全例が除菌に成功した。一方、LPZ 併用群では、除菌治療効果における CYP2C19 遺伝子型の違いは認められなかった(正常遺伝子を含む遺伝子型の患者の除菌率: 90%、変異遺伝子同士の遺伝子型の患者での除菌率: 82%)。なお、両薬物共に、副作用(消化器症状)における遺伝子型の違いは認められなかった。

## D. 考察

薬物代謝酵素の遺伝子タイピングに用いられる PCR 法は未精製のサンプルを用いても増幅が可能のため、血液からの鋳型 DNA 調製も簡便な方法で行われる場合が多い。この場合、制限酵素の阻害物質が除去されずに混入して誤った遺伝子型の判定をもたらす可能性がある。従って、今回検討した制限酵素の陽性対照は、より確実な判定を下すための有効な方法であると考えられる。今後は、これらの陽性対照を用いて CYP 遺伝的多型の抗てんかん薬薬物動態への影響を検討する予定である。

次に、健常人薬物単回投与試験の結果、薬物代謝酵素の遺伝子型と薬物代謝能とに相関性が認められたことから、SASP 並びに OPZ、LPZ において、NAT 及び CYP2C19 の遺伝子タイピングによる健常

人での薬物代謝能の予測は可能であると考えられた。また、CYP2C19 遺伝子型と OPZ 及び LPZ の胃酸分泌抑制作用とが関連したことから、薬理作用の予測も可能であると考えられた。

さらに、SASP 及び OPZ による薬物治療において、SASP の副作用発現と NAT 遺伝子型、OPZ 併用群の *H. pylori* 除菌治療成績と CYP2C19 遺伝子型とに関連性が見られた。一方、同じ CYP2C19 により代謝される LPZ 併用群での *H. pylori* 除菌治療成績においては、遺伝子型による違いが認められなかった。この理由として①LPZ は、OPZ に比べ、代謝過程における CYP2C19 の寄与率が低いこと、②副代謝経路 CYP3A4 を介した抗生剤クラリスロマイシンとの相互作用等、が挙げられる。今後、これらの点について in vitro 肝ミクロゾーム系を用いて詳細に検討を行いたい。

#### E. 結論

今回設計した CYP2C19 および 2C9 遺伝子型判定時の制限酵素消化の陽性対照は、制限酵素の阻害又は失活による誤判定を確認できる事から、遺伝子診断を確実にするための簡便で有用な方法である。

健常人における薬物単回投与試験の結果、薬物代謝酵素の遺伝子型と薬物代謝能・薬理作用とに良い相関が認められた。また、SASP 及び OPZ 服用患者において、副作用発現或いは除菌治療効果と、各々の薬物代謝酵素 (NAT 及び CYP2C19) の遺伝子型とに関連性が見られた。しかしながら、LPZ のように必ずしも、CYP2C19 遺伝子型から除菌治療効果の予測ができない場合も見られた。

今後も引き続き、「薬物療法における遺伝子解析の応用」を目的としてさらなる検討を行いたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1)奥村勝彦：これからの医療における TDM の重要性, *月刊薬事*, 40(13), 2959~2962, (1998).
- (2)喜多知子, 奥村勝彦：遺伝子多型への TDM への応用, *月刊薬事*, 40(13), 2975~2979, (1998).
- (3)喜多知子, 奥村勝彦：遺伝子解析と薬物体内動態, *臨床検査*, 43(1), 55~60, (1999).
- (4)渡辺和英, 谷口律子, 川上英治, 荒木博陽, 五味田裕, 清水憲二：CYP2C 遺伝子型判定における制限酵素消化の陽性対照の設計. *TDM 研究*, 印刷中.

##### 2. 学会発表

1. 喜多知子, 喰田崇, 駒田富佐夫, 谷川原祐介, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人：CYP2C19 遺伝子多型とオメプラゾールの体内動態・治療効果との関連, 要旨 p. 170, 日本薬学会第 118 年会, 京都, 1998 年 4 月.
2. 喜多知子, 郷原学, 駒田富佐夫, 谷川原祐介, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人：ヒトにおける N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子型とスルファピリジンのアセチル化代謝との関連性, 要旨 p. 57, 第 15 回日本 TDM 学会・学術大会, 神戸, 1998 年 5 月.
3. 渡辺和英, 谷口律子, 川上英治, 荒木博陽, 五味田裕, 清水憲二：CYP2C 遺伝子型判定における制限酵素消化の陽性対照の設計. 第 15 回日本 TDM 学会・学術大会, 神戸, 1998 年 5 月.
4. 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人, 喜多知子, 奥村勝彦, 谷川原祐介：プロトンポンプ阻害剤の薬物動態・*H. pylori* 除菌効果に及ぼす CYP2C19 遺伝子多型の関与, 要旨 p. 65, 第 8 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 札幌, 1998 年 6 月.
5. 阪井俊介, 青山伸郎：プロトンポンプ阻害剤の薬物動態と *H. pylori* 除菌効果に及ぼす CYP2C19 遺伝子多型の関与, 要旨 p. 251, 第 40 回日本消化器病学会大会, 東京, 1998 年 10 月.
6. 喜多知子, 喰田崇, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人, 駒田富佐夫, 谷川原祐介：CYP2C19 遺伝子型によるプロトンポンプ阻害剤の体内動態・除菌治療効果の予測, 要旨 p. 92, 第 48 回日本薬学会近畿支部大会, 兵庫, 1998 年 10 月.
7. 喜多知子, 喰田崇, 奥村勝彦, 青山伸郎, 阪井俊介, 春日雅人, 駒田富佐夫, 谷川原祐介：CYP2C19 遺伝子多型とプロトンポンプ阻害剤の体内動態・除菌治療効果との関連性, 要旨 p. 115, 第 19 回日本臨床薬理学会, 大分, 1998 年 11 月.

#### G. 知的所有権の取得状況

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

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担 研究報告書

薬物代謝酵素の遺伝子型を利用した医薬品の有効性・安全性の評価と使用基準の確立に関する研究

主任研究者 奥村 勝彦 神戸大学医学部附属病院薬剤部教授・薬剤部長

研究要旨

遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 N-アセチル転移酵素 (NAT) 及び CYP2C19 について、健常人での単回投与試験を行った。その結果、遺伝子型と薬物代謝能とに良好な相関性が認められ、変異遺伝子同士の組み合わせの場合、血漿中未変化体濃度が高値を示した。また潰瘍性大腸炎治療患者において、NAT 遺伝子型とサラゾスルファピリジンによる副作用発現とに関連性が見られたことから、サラゾスルファピリジンの薬物治療において NAT の遺伝子タイピングは重要であることが示された。

分担研究者：

青山 伸郎

神戸大学医学部附属病院光学医療診療部  
助教授・部長

谷川原 祐介

慶應義塾大学病院薬剤部  
教授・薬剤部長

五味田 裕

岡山大学医学部附属病院薬剤部  
教授・薬剤部長

血漿中・尿中濃度は HPLC 法により測定した。また、プロトンポンプ阻害剤については、薬物服用時、胃内 pH モニタリングも併せて行い、胃酸分泌抑制作用と遺伝子型との関連性について検討した。

さらに SASP 服用経験のある潰瘍性大腸炎患者 13 例に対し、NAT の遺伝子タイピングを行った後、服薬状況、薬理効果、副作用等について問診を行い、カルテにて調査した。

C. 研究結果

健常人における SASP 及び OPZ、LPZ 単回投与試験の結果、NAT 遺伝子型と SP のアセチル化代謝能、そして CYP2C19 遺伝子型と各プロトンポンプ阻害剤の水酸化能とに良好な相関性が認められ、変異遺伝子同士の組み合わせの場合、未変化体濃度/代謝物 AUC 比が高値を示した。また、OPZ 並びに LPZ 単回投与後、胃内 pH は上昇し、その程度は CYP2C19 遺伝子型が変異遺伝子同士の場合、より顕著であった。

次に、SASP 服用経験のある潰瘍性大腸炎患者 13 例のうち、NAT 遺伝子型が変異遺伝子同士の 1 例で副作用発現（腭炎）が見られたが、その他の遺伝子型の場合、副作用は薬物アレルギーによる発疹（4 例）のみであった。

D. 考察

健常人薬物単回投与試験の結果、薬物代謝酵素の遺伝子型と薬物代謝能とに相関性が認められたことから、SASP 並びに OPZ、LPZ において、NAT 及び CYP2C19 の遺伝子タイピングによる健常人の

A. 研究目的

遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 N-アセチル転移酵素 (NAT) 及び CYP2C19 について、健常人での遺伝子型と薬物代謝能との相関性について検討する。さらに薬物服用患者における遺伝子型と薬効・毒性との相関解析を行う。

B. 研究方法

NAT 並びに CYP2C19 の遺伝子タイピング法は、ヒト血液サンプル(0.5ml)からゲノム DNA を抽出した後 PCR-RFLP 法に従って行った。

次に、NAT 遺伝子型或いは CYP2C19 遺伝子型の判明している健常人において、サラゾスルファピリジン (SASP) 及びプロトンポンプ阻害剤 (オメプラゾール (OPZ)、ランソプラゾール (LPZ)) の単回投与試験を行った。投与後、経時的に採血・採尿を行い、スルファピリジン (SP) 並びにアセチル体、そして OPZ 又は LPZ の未変化体並びに水酸化体の



薬物代謝能の予測は可能であると考えられた。また、CYP2C19 遺伝子型と OPZ 及び LPZ の胃酸分泌抑制作用とが相関したことから、薬理作用の予測も可能であると考えられた。

次に、患者での薬物治療の結果、SASP の副作用発現と NAT 遺伝子型とに関連性が見られた。これは、血漿中 SP 濃度が 50 µg/ml 以上の場合、副作用が発現しやすいと報告されており、健常人 study での結果からも推察される。よって、SASP 治療において、服用前に NAT の遺伝子タイピングが可能であれば、遺伝子型が変異遺伝子同士の場合に SP を含まない 5-アミノサリチル酸製剤を選択でき、副作用発現の防止につながると考えられる。

#### E. 結論

健常人においては、薬物代謝酵素の遺伝子型と薬物代謝能・薬理作用とに良い相関が認められ、SASP 服用患者においても副作用発現との関連性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1)奥村勝彦：これからの医療における TDM の重要性, 月刊薬事, 40(13), 2959~2962, (1998).

(2)喜多知子, 奥村勝彦：遺伝子多型への TDM への応用, 月刊薬事, 40(13), 2975~2979, (1998).

(3)喜多知子, 奥村勝彦：遺伝子解析と薬物体内動態, 臨床検査, 43(1), 55~60, (1999).

##### 2. 学会発表

1. 喜多知子, 喰田崇, 駒田富佐夫, 谷川原祐介, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人: CYP2C19 遺伝子多型とオメプラゾールの体内動態・治療効果との関連, 要旨 p. 170, 日本薬学会第 118 年会, 京都, 1998 年 4 月.

2. 喜多知子, 郷原学, 駒田富佐夫, 谷川原祐介, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人: ヒトにおける N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子型とスルファピリジンのアセチル化代謝との関連性, 要旨 p. 57, 第 15 回日本 TDM 学会・学術大会, 神戸, 1998 年 5 月.

3. 喜多知子, 喰田崇, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人, 駒田富佐夫, 谷川原祐介: CYP2C19 遺伝子型によるプロトンポンプ阻害剤の体内動態・除菌治療効果の予測, 要旨 p. 92, 第 48 回日本薬学会近畿支部大会, 兵庫, 1998 年 10 月.

4. 喜多知子, 喰田崇, 奥村勝彦, 青山伸郎, 阪井

俊介, 春日雅人, 駒田富佐夫, 谷川原祐介: CYP2C19 遺伝子多型とプロトンポンプ阻害剤の体内動態・除菌治療効果との関連性, 要旨 p. 115, 第 19 回日本臨床薬理学会, 大分, 1998 年 11 月.

#### G. 知的所有権の取得状況

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

薬物代謝酵素の遺伝子型を利用した医薬品の有効性・安全性の評価と使用基準の確立に関する研究

分担研究者 谷川原 祐介 慶應義塾大学病院薬剤部教授・薬剤部長

### 研究要旨

遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 N-アセチル転移酵素(NAT)及び CYP2C19 について、健常人での単回投与試験を行った結果、遺伝子型と薬物代謝能とに良好な相関性が認められた。またオメプラゾールを用いた *H. pylori* 除菌治療において、CYP2C19 遺伝子型と除菌治療効果とに相関性が見られたが、ランソプラゾールでは、遺伝子型による違いは認められなかった。

#### A. 研究目的

遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 N-アセチル転移酵素(NAT)及び CYP2C19 について、健常人での遺伝子型と薬物代謝能との相関性について検討する。さらにプロトンポンプ阻害剤服用患者における遺伝子型と除菌治療効果・副作用発現との相関解析を行う。

#### B. 研究方法

NAT 並びに CYP2C19 の遺伝子タイピング法は、ヒト血液サンプルからゲノム DNA を抽出した後 PCR-RFLP 法に従い行った。

次に、NAT 遺伝子型と CYP2C19 遺伝子型の判明している健常人において、薬物単回投与試験を行った。投与後経時的に採血・採尿を行い、スルファピリジン(SP)並びにアセチル体、そしてプロトンポンプ阻害剤（オメプラゾール(OPZ)、ランソプラゾール(LPZ)）並びに水酸化体の血漿・尿中濃度は HPLC 法により測定した。また、プロトンポンプ阻害剤については、薬物服用後、胃内 pH モニタリングも併せて行い、胃酸分泌抑制作用について検討した。

さらに胃炎・消化性潰瘍患者に対して行った抗生剤と OPZ 又は LPZ 併用の *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)除菌治療において、CYP2C19 の遺伝子型と除菌治療効果・副作用発現との関連性について問診を行った。

#### C. 研究結果

健常人における SASP 及び OPZ、LPZ 単回投与試験の結果、NAT 遺伝子型と SP のアセチル

化代謝能、そして CYP2C19 遺伝子型と各プロトンポンプ阻害剤の水酸化能とに良好な相関性が認められた。また、OPZ 並びに LPZ 単回投与後、胃内 pH は上昇し、その程度は CYP2C19 遺伝子型が変異遺伝子同士の場合、より顕著であった。

次に、プロトンポンプ阻害剤を用いた *H. pylori* 除菌治療において、OPZ 併用群は、CYP2C19 遺伝子型が正常遺伝子を含む場合に 41%~88%の除菌成功率であったのに比べ、変異遺伝子同士の患者の場合、全例が除菌に成功した。一方、LPZ 併用群では、除菌治療効果における CYP2C19 遺伝子型の違いは認められなかった。なお、両薬物共に、副作用（消化器症状）における遺伝子型の違いは認められなかった。

#### D. 考察

健常人薬物単回投与試験の結果、薬物代謝酵素の遺伝子型と薬物代謝能とに相関性が認められたことから、SASP 並びに OPZ、LPZ において、NAT 及び CYP2C19 の遺伝子タイピングによる薬物代謝能の予測は可能であると考えられた。また、CYP2C19 遺伝子型と OPZ 及び LPZ の胃酸分泌抑制作用とが相関したことから、薬理作用の予測も可能であると考えられた。

次に、OPZ 併用群の *H. pylori* 除菌治療成績において CYP2C19 遺伝子型が変異遺伝子型の場合、とに相関性が見られた。一方、LPZ 併用群での *H. pylori* 除菌治療成績において、CYP2C19 遺伝子型による違いは認められなかった。この理由として LPZ は、OPZ に比べ、代謝過程における

CYP2C19の寄与率が低いこと等が挙げられるが、次年度においてLPZより代謝過程におけるCYP2C19の寄与が小さいラベプラゾール(RPZ)について、同様の検討を行い比較したい。

#### E. 結論

健常人においては、薬物代謝酵素の遺伝子型と薬物代謝能・薬理作用とに相関性が認められたが、患者において、必ずしも薬理効果において、遺伝子型と相関しない場合が見られた。今後は、「遺伝子解析を利用した薬物療法の設定」を目標にさらなる検討したい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

谷川原祐介：薬物代謝酵素の遺伝子多型，臨床検査，42(12): 1561-1564 (1998).

##### 2. 学会発表

1. 喜多知子，喰田崇，駒田富佐夫，谷川原祐介，奥村勝彦，阪井俊介，青山伸郎，春日雅人：CYP2C19遺伝子多型とオメプラゾールの体内動態・治療効果との関連，要旨 p. 170，日本薬学会第118年会，京都，1998年4月。

2. 喜多知子，郷原学，駒田富佐夫，谷川原祐介，奥村勝彦，阪井俊介，青山伸郎，春日雅人：ヒトにおけるN-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子型とスルファピリジンのアセチル化代謝との関連性，要旨 p. 57，第15回日本TDM学会・学術大会，神戸，1998年5月。

3. 喜多知子，喰田崇，奥村勝彦，阪井俊介，青山伸郎，春日雅人，駒田富佐夫，谷川原祐介：CYP2C19遺伝子型によるプロトンポンプ阻害剤の体内動態・除菌治療効果の予測，要旨 p. 92，第48回日本薬学会近畿支部大会，兵庫，1998年10月。

4. 喜多知子，喰田崇，奥村勝彦，青山伸郎，阪井俊介，春日雅人，駒田富佐夫，谷川原祐介：CYP2C19遺伝子多型とプロトンポンプ阻害剤の体内動態・除菌治療効果との関連性，要旨 p. 115，第19回日本臨床薬理学会，大分，1998年11月。

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

薬物代謝酵素の遺伝子型を利用した医薬品の有効性・安全性の評価と使用基準の確立に関する研究

分担研究者 青山 伸郎 神戸大学医学部附属病院光学医療診療部助教授・部長

#### 研究要旨

遺伝的多型性を示す N-アセチル転移酵素 (NAT) 及び CYP2C19 により代謝される薬物、サラゾスルファピリジンとプロトンポンプ阻害剤（オメプラゾール (OPZ) 又はランソプラゾール (LPZ)）について、治療上の薬効・毒性と各々の遺伝子型との関連性を検討した。その結果、サラゾスルファピリジン服用経験のある潰瘍性大腸炎治療患者において、NAT 遺伝子型が変異遺伝子同士の場合にのみ、膝炎が発現していた。又、OPZ 又は LPZ を用いた *Helicobacter pylori* 除菌治療において、CYP2C19 遺伝子型と OPZ 併用群での除菌治療効果とが相関したが、LPZ 併用群の場合、CYP2C19 遺伝子型による除菌治療効果の差異は認められなかった。

#### A. 研究目的

薬物治療上、有効性・安全性の個人差の原因として、遺伝的代謝多型性が挙げられる。今回、我々は、多型性を示す肝薬物代謝酵素 N-アセチル転移酵素 (NAT) と CYP2C19 により代謝される薬物サラゾスルファピリジン (SASP) とプロトンポンプ阻害剤（オメプラゾール (OPZ) 並びにランソプラゾール (LPZ)）について、遺伝子型と薬効・毒性との相関解析を行う。さらに、プロトンポンプ阻害剤服用患者について、1 点での血漿中濃度測定も行い、CYP2C19 遺伝子型と薬物代謝能との相関性について検討する。

#### B. 研究方法

N-アセチル転移酵素 (NAT) 並びに CYP2C19 の遺伝子タイピング法は、患者血液サンプル (0.5ml) からゲノム DNA を抽出した後 PCR-RFLP 法に従い行った。

まず、SASP 服用経験のある潰瘍性大腸炎患者 13 例に対し、NAT 遺伝子タイピングを行った後、服薬状況、薬理効果・副作用等について問診を行い、カルテにて調査した。

次に、プロトンポンプ阻害剤 (OPZ 又は LPZ) と抗生剤の併用療法（投与期間：1 週間）を行った *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 除菌治療患者（計 141 例）に対し、除菌治療効果と CYP2C19 遺伝子型との関連性を検討した。さらに、投与開

始 7 日目の朝薬物服用 3 時間後のプロトンポンプ阻害剤未変化体及び水酸化体・スルホン体の濃度は HPLC 法により測定した。

#### C. 研究結果

SASP 服用経験のある潰瘍性大腸炎患者 13 例のうち、NAT 遺伝子型が変異遺伝子同士であった 1 例で副作用発現（膝炎）が見られたが、その他の遺伝子型の場合、副作用は薬物アレルギーによる発疹（4 例）のみであった。

また *H. pylori* 除菌治療において、OPZ 併用群では、CYP2C19 遺伝子型が正常遺伝子を含む場合に 41% (OPZ+抗生剤 1 剤) または 88% (OPZ+抗生剤 2 剤) の除菌成功率であったのに対し、変異遺伝子同士の患者の場合、全例が除菌に成功した。一方、LPZ 併用群では、除菌治療効果における CYP2C19 遺伝子型の違いは認められなかった（正常遺伝子を含む遺伝子型の患者の除菌率：90%、変異遺伝子同士の遺伝子型の患者での除菌率：82%）。なお、両薬物共に、副作用（消化器症状）における遺伝子型の違いは認められなかった。さらに血中濃度測定の結果、OPZ の未変化体とスルホン体の濃度は、変異遺伝子同士の患者の場合、正常遺伝子を含む場合の 5 倍以上になっていたが、逆に CYP2C19 より代謝された水酸化体では、正常遺伝子を含む場合の方が高値を示した。この傾向は LPZ でも見られたが、OPZ ほど顕著ではなかった

た。

#### D. 考察

SASP 及び OPZ による薬物治療において、SASP の副作用発現と *NAT* 遺伝子型、OPZ 併用群の *H. pylori* 除菌治療成績と *CYP2C19* 遺伝子型とに関連性が見られた。一方、同じ *CYP2C19* により代謝される LPZ 併用群での *H. pylori* 除菌治療成績においては、遺伝子型による違いが認められなかった。この理由として①LPZ は、OPZ に比べ、代謝過程における *CYP2C19* の寄与率が低いこと、②副代謝経路 *CYP3A4* を介した抗生剤クラリスロマイシンとの相互作用等、が挙げられる。今後、これらの点について *in vitro* 肝ミクロソーム系を用いて詳細に検討を行いたい。

#### E. 結論

SASP 及び OPZ による薬物治療において、副作用発現或いは除菌効果と、患者の薬物代謝酵素の遺伝子型とに関連性が見られた。しかしながら、LPZ のように必ずしも、*CYP2C19* 遺伝子型から薬効の予測ができない場合も見られた。今後は、「遺伝子解析を利用した薬物療法の設定の可能性」についてさらに検討したい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) 青山伸郎: *H. pylori* 除菌法とその効果判定, 日本内科学会誌, 87, 868~880, (1998).
- (2) 青山伸郎, 白坂大輔, 阪井俊介, 白川勝朗: *H. pylori* 除菌治療における抗菌剤の種類と必要条件, 日本臨床, 57(1), 43~52, (1998).

##### 2. 学会発表

1. 喜多知子, 喰田崇, 駒田富佐夫, 谷川原祐介, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人: *CYP2C19* 遺伝子多型とオメプラゾールの体内動態・治療効果との関連, 要旨 p. 170, 日本薬学会第 118 年会, 京都, 1998 年 4 月.
2. 喜多知子, 郷原学, 駒田富佐夫, 谷川原祐介, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人: ヒトにおける *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子型とスルファピリジンのアセチル化代謝との関連性, 要旨 p. 57, 第 15 回日本 TDM 学会・学術大会, 神戸, 1998 年 5 月.
3. 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人, 喜多知子, 奥村勝彦, 谷川原祐介: プロトンポンプ阻害剤の薬物動態・*H. pylori* 除菌効果に及ぼす *CYP2C19* 遺伝子多型の関与, 要旨 p. 65, 第 8 回日本ヘリコバク

ター学会学術集会, 札幌, 1998 年 6 月.

4. 阪井俊介, 青山伸郎: プロトンポンプ阻害剤の薬物動態と *H. pylori* 除菌効果に及ぼす *CYP2C19* 遺伝子多型の関与, 要旨 p. 251, 第 40 回日本消化器病学会大会, 東京, 1998 年 10 月.
5. 喜多知子, 喰田崇, 奥村勝彦, 阪井俊介, 青山伸郎, 春日雅人, 駒田富佐夫, 谷川原祐介: *CYP2C19* 遺伝子型によるプロトンポンプ阻害剤の体内動態・除菌治療効果の予測, 要旨 p. 92, 第 48 回日本薬学会近畿支部大会, 兵庫, 1998 年 10 月.
6. 喜多知子, 喰田崇, 奥村勝彦, 青山伸郎, 阪井俊介, 春日雅人, 駒田富佐夫, 谷川原祐介: *CYP2C19* 遺伝子多型とプロトンポンプ阻害剤の体内動態・除菌治療効果との関連性, 要旨 p. 115, 第 19 回日本臨床薬理学会, 大分, 1998 年 11 月.

#### G. 知的所有権の取得状況

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

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担 研究報告書

薬物代謝酵素の遺伝子型を利用した医薬品の有効性・安全性の評価と使用基準の確立に関する研究

一分担研究項目：遺伝子型解析法の確立

分担研究者	五味田裕（岡山大学医学部附属病院薬剤部教授・部長）
共同研究者	荒木博陽（岡山大学医学部附属病院薬剤部）
	渡辺和英（岡山大学医学部附属病院薬剤部）
	谷口律子（岡山大学医学部附属病院薬剤部）
	清水憲二（同附属分子細胞医学研究施設）

研究要旨

チトクローム P450 (CYP) 遺伝的多型の抗てんかん薬体内動態への影響を検討するにあたり、遺伝子型の判定を確実に行う方法をまず検討した。遺伝子型の判定に用いられているポリメラーゼ連鎖反応—制限断片長多型 (PCR-RFLP) 法は、PCR で増幅した DNA を制限酵素で消化して断片の長さにより変異を検出する方法である。しかし、制限酵素は種々の物質により阻害されるため、これら阻害物質がサンプルへ混入することにより遺伝子型の判定を誤る可能性がある。この対策として、反応液中に制限酵素消化の陽性対照を添加してその切断を確認すれば、誤判定を避けることができる。そこで、CYP2C 遺伝子型判定時の制限酵素消化の陽性対照を設計し、その有用性を検討した。各陽性対照は制限酵素の消化により完全に切断され、消化後のバンドは遺伝子型判定に用いる RFLP の DNA 断片とゲル上で明確に判別することが可能であった。また、この陽性対照により制限酵素阻害物質添加時の誤判定を避けることが可能であった。今後はこれらの陽性対照を用いて遺伝子型の判定を行う。

A. 研究目的

薬物を代謝する能力には大きな個人差があることが知られている。この原因の一つとして、特定の薬物代謝酵素に関してその活性が欠損または著しく弱い個体が存在する、即ち遺伝的多型性を示すことがあげられる。あらかじめこれらの遺伝子型がわかれば患者の薬物代謝能力が予測でき、処方設計のための有力な情報となることが考えられる。現在、血液中の DNA より薬物代謝酵素の遺伝子型を決定して、患者の薬物代謝能力を予測しようとする研究が行われている。

遺伝子型を決定する際に広く用いられているポリメラーゼ連鎖反応—制限断片長多型 (PCR-RFLP) 法は、PCR で増幅した DNA を制限酵素で消化して断片の長さにより点突然変異を検出する方法である。この PCR-RFLP 法は簡便で極めて高感度の検出法であるが、誤った結果をもたらす要因が種々存在する。PCR に関連する要因としては、

混入汚染および PCR の非特異的増幅が代表的なものである。混入汚染の対策としては、PCR 反応液を調製する部屋と電気泳動を行う部屋を別々にすることや PCR を行う際には試料 DNA を反応液に加えられない陰性対照を入れることなどが、また、非特異的増幅の対策としてはホットスタート法等が有効とされている。

一方、制限酵素は抗悪性腫瘍薬、SH 基含有化合物や過剰の PCR プライマー等の多くの物質により阻害される。前述した PCR 関連の要因に比べるとその重要性が見過ごされがちであるが、制限酵素の阻害物質がサンプルへ混入することにより遺伝子型の判定を誤る可能性がある。CYP2C19 の例では、野生型のホモ接合体 (ww) の被験者のサンプルに阻害物質が混入すると消化が不完全になりヘテロ接合体 (wm1) または変異型のホモ接合体 (m1m1) と誤って判定する恐れがある。この対策として、RFLP を行う反応液中に制限酵素の認識

部位を持つ他の DNA 断片を陽性対照として添加してその断片の切断を確認すれば、制限酵素の不完全消化による誤判定を避けることができると考えられる。そこで今回、CYP2C19 および 2C9 遺伝子型判定時の制限酵素消化の陽性対照を設計し、その有用性を検討した。

## B. 研究方法

試料としてはヒト血液より抽出したゲノム DNA を用い CYP2C19 のエキソン 4 および 5 の変異と CYP2C9 の Arg<sub>144</sub>→Cys および Ile<sub>359</sub>→Leu 変異検出時の制限酵素消化の陽性対照を設計した。CYP2C19 は de Morais らの方法により、また CYP2C9 は Stubbins らおよび Wang らの方法により遺伝子型を判定した。

CYP2C19 の陽性対照としては、制限酵素 Sma I および Bam HI の認識部位を持つ領域を検索した結果、ヒト癌遺伝子 N-myc のエキソン 1-イントロン 1 の領域を選択した。その後、Sma I または Bam HI 消化後の断片が、それぞれの RFLP の DNA 断片と明確に判別できるようなプライマーの設計を行った。同様に、CYP2C9 の陽性対照としては、Ava II および Kpn I の認識部位を持つヒト CYP1A1 遺伝子の 3' 下流領域にプライマーの設計を行った。

各陽性対照を増幅するためのプライマーの配列および PCR 条件は以下の通りである。なお、DNA ポリメラーゼとしては Perkin Elmer 社の AmpliTaq Gold® を用いた。

CYP2C19 陽性対照：

forward 5'-TGGGTGGATGCGGGGGCT-3'

reverse 5'-TGGAGCAGCCGTGACCCAGA-3'

PCR 条件

95°C 9 分加熱後、94°C 1 分（変性）および 65°C 1 分（アニーリング、伸長）を 40 サイクル、その後 72°C 10 分

CYP2C9 陽性対照：

forward 5'-AACCCAGGTATCCAAAAATGTG

-3'

reverse 5'-GCGCTAAGACAGCACAGTGA-3'

PCR 条件

95°C 9 分加熱後、94°C 1 分（変性）、57°C 1 分（アニーリング）および 72°C 1 分（伸長）を 40 サイクル、その後 72°C 10 分

あらかじめ各陽性対照を上記条件で PCR により調製しておき、RFLP を行う反応液に陽性対照を等容量添加した後、制限酵素で消化しアガロースゲル電気泳動で各断片を分離した。泳動パターン

により遺伝子型の判定および制限酵素の完全消化の確認を行った。

次に、制限酵素阻害物質の RFLP への影響を検討した。Anthracycline 系の抗悪性腫瘍剤は Sma I や Ava II 等の制限酵素を阻害することが報告されているので、今回アドリアマイシンを阻害剤として用いた。2C19 エキソン 5 に関して野生型のホモ接合体と判明している被験者のサンプル DNA にアドリアマイシンを最終濃度 15 または 30 μM となるように、それぞれ添加した後、遺伝子型判定を行った。

なお、制限酵素認識部位の検索は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの計算機システムを用いて GCG (Genetic Computer Group's Software Wisconsin Sequence Analysis Package) により行った。

## C. 研究結果

CYP2C19 の陽性対照（配列長 590 bp）は Sma I 消化により 275 および 315 bp の断片に、また、Bam HI 消化により 142 および 448 bp の断片にそれぞれ完全に切断された。これらのバンドは、遺伝子型判定に用いる RFLP の DNA 断片（エキソン 5 : 169, 120 および 49 bp、エキソン 4 : 329, 233 および 96 bp）とゲル上で明確に判別することが可能であった。

同様に、CYP2C9 の陽性対照（配列長 538 bp）は Ava II 消化により 248 および 290 bp の断片に、また、Kpn I 消化により 255 および 283 bp の断片にそれぞれ切断され、RFLP の DNA 断片（コドン 144 : 172, 107 および 65 bp、コドン 359 : 131, 110 および 21 bp）とゲル上で明確に判別できた。

次に、アドリアマイシンをサンプル DNA に加えて CYP2C19 エキソン 5 の遺伝子型判定を行った。アドリアマイシンを加えない場合、サンプルは 120 と 49bp の 2 本のバンドを示し、陽性対照も完全に消化された。アドリアマイシンを 15 または 30 μM 加えた場合、RFLP のバンドのみからはヘテロ接合体または変異型のホモ接合体と判定する可能性があったが、未消化の陽性対照（590bp）が残っていたため消化が阻害されていることが容易に確認でき、誤判定を避けることが可能であった。

## D. 考察

制限酵素は抗悪性腫瘍薬など実際の臨床に用いられている薬物によって阻害されることが報告されている。PCR は未精製のサンプルを用いても増

幅が可能なため、血液からの鋳型 DNA 調製も簡便な方法で行われることが多い。この場合、制限酵素の阻害物質が除去されずに混入して誤った遺伝子型の判定をもたらす可能性がある。制限酵素の失活も同様の結果をもたらす。薬物代謝酵素の遺伝子型判定は遺伝子診断の一つであるため、誤判定の要因は極力除く必要がある。従って、制限酵素の陽性対照を用いることはより確実な診断を下すための有効な方法であると考えられる。

#### D. 結論

今回、設計した CYP2C19 および 2C9 遺伝子型判定時の制限酵素消化の陽性対照は遺伝子診断を確実に行うための簡便で有用な方法である。今後は、これらの陽性対照を用いて CYP 遺伝的多型の抗てんかん薬薬物動態への影響を検討する予定である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

渡辺和英、谷口律子、川上英治、荒木博陽、五味田裕、清水憲二：CYP2C 遺伝子型判定における制限酵素消化の陽性対照の設計。TDM 研究 印刷中。

##### 2. 学会発表

渡辺和英、谷口律子、川上英治、荒木博陽、五味田裕、清水憲二：CYP2C 遺伝子型判定における制限酵素消化の陽性対照の設計。第 15 回日本 TDM 学会・学術大会，神戸，1998

#### F. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし