
厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)
平成11年度報告書

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
分担研究者: 青山 伸郎 神戸大学医学部附属病院光学診療部
谷川原祐介 慶應義塾大学病院薬剤部
五味田 裕 岡山大学医学部附属病院薬剤部

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

遺伝的多型を示す3種類の薬物代謝酵素 N-acetyltransferase2 (NAT2)、CYP2C9、CYP2C19 について、その遺伝子解析 (genotyping) の臨床への応用を目的に以下の検討を行った。

まず、CYP2C9 および 2C19 遺伝的多型がフェニトイン (PHT) の薬物動態におよぼす影響を検討した結果、両酵素とも変異している場合 PHT 代謝能の著しい低下を生じたが、CYP2C9 のみの変異では PHT の有意な代謝能の低下は認められなかった。また、PHT とゾニサミド (ZNS) との薬物間相互作用における CYP2C9 遺伝子型の関与については、2C9*3 変異を有する患者で血中 PHT 濃度が顕著に高値を示した。さらに *in vitro* の CYP2C9 発現系において、ZNS による PHT 主代謝過程の阻害が認められたことから、CYP2C9*3 変異を有する患者の PHT 血中濃度が、ZNS 併用時に有意に上昇したのは、ZNS の CYP2C9 阻害作用が主原因であると考えられた。

また NAT2 により代謝されるサラゾスルファピリジン (SASP) について健康人反復投与後の薬物動態学的解析を行い、単回投与時の体内動態パラメータと比較した。その結果、投与1日目及び8日目ともに、NAT2 の遺伝子型と表現型 (血漿中 SP 並びに AcSP 濃度、AcSP/SP 尿中排泄量比) の一致を認めた。また、遺伝子型が intermediate type では、rapid type と比べて SP から AcSP への変換が遅いことが示された。よって SASP 反復投与後の体内動態は、NAT2 genotyping により予測できることが示され、臨床 genotyping は有用であることが示唆された。

さらに、プロトンポンプ阻害剤を用いた *Helicobacter pylori* 除菌治療効果に及ぼす CYP2C19 遺伝的多型の影響をみる目的で、ラベプラゾール (RPZ) について、薬物血中濃度並びに *H. pylori* 除菌治療効果・副作用と CYP2C19 遺伝子型との関連性を検討した。その結果、RPZ を用いた *H. pylori* 除菌治療では、RPZ 血中濃度並びに除菌治療効果・副作用における CYP2C19 遺伝子型の差異は認められず、同じプロトンポンプ阻害剤のオメプラゾール及びランソプラゾールで同様に行った検討結果と異なった。よって、RPZ の代謝における CYP2C19 の寄与は小さく、RPZ を用いた *H. pylori* 除菌治療では CYP2C19 遺伝子型による治療効果の差はないと推察された。

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

A. 研究目的

薬物血中濃度並びに薬効・毒性の個体差の原因の一つとして、薬物代謝酵素の遺伝的多型が挙げられ、中でも N-acetyltransferase2 (NAT2)、CYP2C9 及び CYP2C19 が有名である。近年、これら代謝酵素の遺伝子上の変異部分が明かとなり、遺伝子型と表現型との相関性に関する検討が進められている。ここで表現型は、健康人単回投与後の血中又

は尿中薬物濃度による判定が主である。我々は、薬物代謝酵素の遺伝子解析 (genotyping) を臨床へ応用することを目的に、以下の検討を行った。すなわち、①フェニトイン (PHT) 服用患者における PHT 血中濃度と、CYP2C9 および 2C19 の遺伝的多型との相関性、並びに、PHT とゾニサミド (ZNS) との薬物間相互作用におよぼす両酵素遺伝子型の影響、に関する検討。②サラゾスルファピリジン (SASP) の健常人反復投与試験における NAT2 遺伝子型と薬物体内動態パラメータ値との相関性及び単回投与時との比較検討。③オメプラゾール (OPZ)、ランソプラゾール (LPZ) もしくはラベプラゾール (RPZ) を用いた *H. pylori* 除菌治療における、CYP2C19 遺伝子型と薬物血中濃度、治療効果・副作用との相関解析。

B. 研究方法

NAT2、CYP2C9、CYP2C19 の genotyping は、血液サンプル (0.5ml) からゲノム DNA を抽出した後、polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法により行った。

①PHT の血中濃度が定常状態にある 15 歳以上のてんかん患者のうち、研究の趣旨に同意した 44 名を対象とした。被験者からの採血は PHT 服用 2~5 時間後に行い、血中 PHT 濃度は蛍光偏光免疫測定法 (TDX) により測定した。PHT の最大消失速度 (V_{max}) および Michaelis 定数 (K_m) は Mamiya らの母集団パラメータを用いて算出した。また遺伝子型の判定は、被験者の血液より抽出した DNA を試料とし、CYP2C9*3 変異と、CYP2C19*2 および*3 変異について、PCR-RFLP 法により行った。その後、判定された遺伝子型により Table 1 に示すように被験者を群分けし、血中 PHT 濃度/投与量比、 K_m および V_{max} に対する遺伝子型の影響を検討した。

Table 1 CYP2C9/19 遺伝子型

群	CYP2C19	CYP2C9
A	*1/*1	*1/*1
B	*1/*2 or *1/*3	*1/*1
C	*2/*2, *3/*3 or *2/*3	*1/*1
D	*1/*1	*3/*1
E	*2/*1 or *3/*1	*3/*1

次に、PHT が処方された後に ZNS の併用を開始した患者 10 名について、ZNS を併用する前後の PHT

血中濃度の変化率を算出し、遺伝子型の影響を検討した。遺伝子型以外の因子として、ZNS の投与量、血中 ZNS 濃度、および ZNS 併用前の PHT の K_m 、 V_{max} 値が血中 PHT 濃度の変化率に与える影響を検討した。

また、ヒトリンパ芽球様細胞系の CYP2C9、2C19 および 3A4 発現系マイクロゾーム (GENTEST 社製) を用いて、PHT の in vitro 代謝実験を行い、主代謝物である S-および R-5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (HPPH) 産生に及ぼす ZNS の影響について検討した。基質として 80 μ M の PHT を含む反応液に様々な濃度の ZNS を加え、NADPH、マイクロゾームを添加し、37°C 2 時間反応させた後、HPLC により S-および R-HPPH 産生量を測定した。

②SASP (サラゾピリン錠 (吉富製薬)) を 1 日 1 回朝食前に 1g ずつ 8 日間反復経口投与し、投与 1 日目および 8 日目の SASP 投与後 3、6、9、12、24 時間後に血液並びに尿を採取した。なお、投与 5 日目の投与直前にも採血した。SASP 並びに腸内細菌分解物スルファピリジン (SP)、さらに NAT2 による代謝物アセチルスルファピリジン (AcSP) の各試料中濃度は HPLC 法により測定した。解析においては、ヒト体内を black box と仮定し、SASP の経口投与を入力関数として、SP および AcSP の血漿中濃度並びに尿中排泄量の時間推移を出力関数と定義した。また、SP および AcSP を独立変数としてとらえ、それぞれについて物質収支式をたて、Runge-Kutta-Gill 法に基づき最小二乗回帰解析を行った。

③*H. pylori* 除菌治療は、*H. pylori* 抗体陽性の消化性潰瘍もしくは胃炎患者 45 例を対象に、RPZ (10 又は 20 mg \times 2/日) と抗生剤 (アモキシシリン (500 mg \times 4/日) + クラリスロマイシン (200 mg \times 4/日)) の一週間併用療法を行った。*H. pylori* 除菌治療効果の判定は、培養、組織及び尿素呼気試験法により行ない、除菌率を CYP2C19 遺伝子型との関連性を検討した。さらに、除菌治療最終日の朝、薬物服用 3 時間後に採血を行い、RPZ 未変化体及び代謝物 (チオエーテル体及びスルホン体) の血中濃度を HPLC 法により測定した。

C. 研究結果

①85 名の健常人における CYP2C9 遺伝子型を診断した結果、変異型遺伝子は CYP2C9*3 の 1 タイプのみが検出され、CYP2C9*3 をヘテロ接合で保有する頻度は約 7%、ホモ接合で有する被験者は見つからなかった。次に、44 名のてんかん患者に

において、PHTの血中濃度/投与量比(C/D比)は、CYP2C9および2C19の両方の変異を有する患者(E群)において、他群より有意に高い値を示した。また、薬物動態パラメータに関しては、E群の V_{max} が他の遺伝子型の患者より有意に低い値を示したが、CYP2C9のみに変異を有する患者(D群)の V_{max} は、他の患者と比較して有意な差が見られなかった。また、 K_m は各群間に差は見られなかった。

次に、10名のZNS併用被験者における、ZNS併用前後の血中PHT濃度の平均値はそれぞれ12.0(7.3-18.3) $\mu\text{g/ml}$ および14.9(6.1-29.8) $\mu\text{g/ml}$ であり、両者間に有意な差は認められなかった。また、ZNS併用前後での血中PHT濃度の変化率は、-23.3~148.8%と大きくばらついていた。CYP2C9遺伝子型で分類したところ、変異を有する*3/*1群(n=2)の平均変化率は100.8%で、変異を有さない*1/*1群(n=8)の平均変化率0.57%に比し、著しく高い値を示した。さらに、CYP2C19遺伝子型の影響を見たところ、CYP2C9の変異を有する被験者のうち、2C19 *3/*1の患者のPHT変化率は148.8%であり、2C19 *1/*1の患者は52.7%であった。CYP2C9の変異を有さない被験者については、CYP2C19遺伝子型の影響は見られなかった。一方、ZNSの投与量、血中ZNS濃度およびZNS併用前のPHTの K_m 、 V_{max} 値と血中PHT濃度の変化率との間には、いずれも有意な相関はみられなかった。

次にCYP発現系を用いた実験では、3A4発現系においてはHPPHは産生されなかったが、2C9および2C19発現系においてはS-およびR-HPPHが産生された。ZNSは2C9発現系におけるS-HPPHの産生を濃度依存的に阻害したが、2C19発現系におけるHPPHの産生には影響を与えなかった。

②被験者7名はgenotypingにより、代謝の速い個体(rapid type (NAT2*4/NAT2*4))4名、やや代謝の遅い個体(intermediate type (NAT2*4/NAT2*6A, NAT2*4/NAT2*7B))3名に大別された。なお、rapid type及びintermediate typeの両群において、年齢、体重、身長、 AUC_{0-24} に有意な差はなかった。

rapid typeと比較してintermediate typeでは、投与1日目及び8日目とも血漿中SP並びにAcSP濃度が高く、尿中排泄量も多かった。また、血漿中AcSP/SP濃度比並びにAcSP/SP尿中排泄量比は低値を示す傾向にあり、特に投与8日目の血漿中AcSP/SP濃度比は有意に低値を示した。

投与1日目と比較して8日目では、両typeと

もSP並びにAcSPの血漿中濃度、尿中排泄量が増大する傾向がみられた。ただし、rapid typeにおける血漿中SP濃度のみ投与1日目と8日目とで不変であった。また、血漿中AcSP/SP濃度比はrapid typeで増大傾向であったが、intermediate typeでは減少傾向を示した。AcSP/SP尿中排泄量比は両typeとも増大傾向であった。

薬物動態学的解析においては、入力関数を1次関数と仮定した場合と比較して、0次関数の方がfittingは良好であった。0次関数としての解析の結果、両typeでは投与後約5日で定常状態に達していることが示された。

また、SPおよびAcSPの血漿中からの消失過程においては、両typeで有意な差は認められないことが示された。しかしながら、rapid typeと比較してintermediate typeでは、SPからAcSPへの変換が遅いことが示された。

③RPZを用いた*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(Extensive Metabolizers (EM))に90%(10mg \times 2/日)または89%(20mg \times 2/日)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(Poor Metabolizers (PM))、75%(10mg \times 2/日)または100%(20mg \times 2/日)となり、いずれの用量ともに遺伝子型による違いは認められなかった。また、副作用(主に消化器症状)での遺伝子型による違いは認められなかった。さらにRPZ血中濃度値は、投与後3時間後でばらつきは大きかったものの、CYP2C19遺伝子型毎の有意な差は認められなかった。

D. 考察

①CYP2Cファミリーに属するCYP2C9は、TDM(薬物治療モニタリング)の対象となっているフェニトイン、カルバマゼピンをはじめ、トルブタミド、ワルファリンなどの代謝に関与する重要な酵素である。日本人のてんかん患者を対象にフェニトインの代謝能とCYP2C9および2C19の遺伝子型の関係を調べた研究では、CYP2C9の変異遺伝子(CYP2C9*3)を有する患者において著しい代謝能低下が認められた。フェニトインは有効血中濃度域が10-20 $\mu\text{g/ml}$ と狭いため、CYP2C9*3を保有する患者での代謝能低下には注意が必要である。一方、CYP2C9のPoor Metabolizersでは、糖尿病薬トルブタミドの代謝能が低下することも報告されている。さらに、至適用量に10倍以上の著しい個人差(0.5~60mg/day)が認められるワルフ

ァリンについても CYP2C9 遺伝多型の関与が示されている。ワルファリン低用量 (1.5 mg/day 以下) を服用している患者には変異遺伝子保有者が多く、出血の合併症を引き起こす確率が高い。日本人では、変異遺伝子 (CYP2C9*3) のホモ接合タイプはほとんど存在しないものの、約7%に認められるヘテロ接合タイプにおいて、ワルファリン代謝能の低下が認められることから、今後は血液凝固能検査に加え、genotyping も治療方針に加えていくことが望ましいと考えられる。

②健常人薬物反復投与試験の薬物動態学的解析結果より、消化管内での SASP の分解過程における飽和が示唆された。また、SASP 単回投与時において、NAT2 の遺伝子型と表現型が一致することが明らかとなった。従って、SASP 反復投与後の体内動態は NAT2 genotyping により予測できることが示された。

③RPZ を用いた *H. pylori* 除菌治療において、薬物血中濃度並びに除菌治療効果・副作用と CYP2C19 遺伝子型との関連性は認められなかった。この結果は、*H. pylori* 除菌治療において、薬物血中濃度並びに除菌治療効果・副作用と CYP2C19 遺伝子型との関連性がほぼ認められた OPZ もしくは LPZ の場合と異なる。よって、RPZ の血中動態に及ぼす遺伝子型の影響がなかったことから、RPZ の代謝における CYP2C19 の寄与は小さく、RPZ を用いた *H. pylori* 除菌治療では CYP2C19 遺伝子型による治療効果の差異はないと考えられた。今後、各プロトンポンプ阻害剤について、代謝過程における CYP2C19 の寄与、並びに副代謝経路 CYP3A4 を介した抗生剤クラリスロマイシンとの相互作用等について in vitro 肝ミクロゾームを用いて詳細な検討を加えたい。

E. 結論

肝薬物代謝酵素 CYP2C9 について、健常日本人で変異遺伝子発現頻度を検討した結果、約7%が変異型の CYP2C9*3 をヘテロ接合で有していることが判明した。CYP2C9 の一塩基変異多型は、フェニトイン、カルバマゼピン、ワルファリンの有効性・安全性に影響を及ぼす可能性があると考えられた。今回の結果より、CYP2C9 および 2C19 の両方の変異を有する患者は PHT の代謝能が著しく低下し、ゾニサミドを併用すると薬物相互作用の影響を受けやすいことが明らかとなった。しかし、PHT 代謝能の個体差は CYP2C 遺伝子型のみでは十分説明できず、今回検討した遺伝的多型以外の要

因もあると考えられる。今後、他の遺伝子の変異を含めて、PHT の代謝に影響を与える因子を検索する予定である。

また SASP 反復投与後の体内動態は NAT2 genotyping により予測できることが示され、臨床上 genotyping は有用であることが示唆された。さらにプロトンポンプ阻害剤 (OPZ、LPZ、RPZ) は CYP2C19 により代謝されるが、薬物血中濃度並びに *H. pylori* 除菌治療効果・副作用と CYP2C19 遺伝子型との相関性が認められたのは OPZ のみであり、LPZ、RPZ を用いた除菌治療の効果・副作用は、CYP2C19 遺伝子型による違いが認められなかった。その原因として、代謝経路における CYP2C19 の寄与率の違いが考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Tanigawara, N. Aoyama, T. Kita, K. Shirakawa, F. Komada, M. Kasuga, K. Okumura: CYP2C19 genotype-related efficacy of omeprazole for the treatment of infection caused by *Helicobacter pylori*, Clin. Pharmacol. Ther., 1999; 66: 528-34.
- (2) N. Aoyama, Y. Tanigawara, T. Kita, T. Sakai, K. Shirakawa, D. Shirasaka, F. Komada, K. Okumura, M. Kasuga: Sufficient effect of 1-week omeprazole and amoxicillin dual treatment for *Helicobacter pylori* eradication in cytochrome P450 2C19 poor metabolizers., J. Gastroenterol., 1999; 34: 80-3.
- (3) Y. Tagawa, K. Miwa, K. Yamashita, R. Tsukuda, Y. Yoshimura, S. Tanayama, Y. Tanigawara. Possible Factor for Nonlinear Pharmacokinetics of TAK-603, a New Antirheumatic Agent, in Rats. *Biopharm. Drug Disposition*, 20(1): 11-18 (1999).
- (4) Y. Tagawa, K. Miwa, R. Tsukuda, Y. Yoshimura, S. Tanayama, Y. Tanigawara, Effect of its Demethylated Metabolite on the Pharmacokinetics of Unchanged TAK-603, A New Antirheumatic Agent, in Rats. *Drug Metabolism Disposition*, 27(4): 495-501 (1999).
- (5) Komada, K. Nishiguchi, Y. Tanigawara, S. Iwakawa, K. Okumura. Effects of Secretable SOD Delivered by Genetically Modified Cells on Xanthine/Xanthine Oxidase and Paraquat-Induced Cytotoxicity in Vitro. *Biol. Pharm.*

Bull., 22(8): 846-853 (1999).

(6) K. Takara, Y. Tanigawara, F. Komada, K. Nishiguchi, T. Sakaeda, K. Okumura, Cellular Pharmacokinetic Aspects of Reversal Effect of Itraconazole on P-Glycoprotein-Mediated Resistance of Anticancer Drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, 22(12): 1355-1359 (1999).

(7) K. Shirakawa, K. Takara, Y. Tanigawara, N. Aoyama, M. Kasuga, F. Komada, T. Sakaeda, K. Okumura, Interaction of Docetaxel ("Taxotere") with Human P-Glycoprotein. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.

(8) T. Sakai, N. Aoyama, K. Satonaka, S. Shigeta S, H. Yoshida, Y. Shinoda, D. Shirasaka, M. Miyamoto, Y. Nose, M. Kasuga, HLA-DQB1 locus and the development of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection., *J Gastroenterol.* 1999;34 Suppl 11:24-7.

(9) Y. Matsushima, N. Aoyama, H. Fukuda, Y. Kinoshita, A. Todo, S. Himeno, S. Fujimoto, M. Kasuga, H. Nakase, T. Chiba, Gastric ulcer formation after the Hanshin-Awaji earthquake: a case study of *Helicobacter pylori* infection and stress-induced gastric ulcers., *Helicobacter.* 1999 Jun;4(2):94-9.

(10) N. Aoyama, D. Shirasaka, T. Sakai, K. Shirakawa, [Characteristics of anti-microbial agents and its clinical choice for *H. pylori* treatment]., *Nippon Rinsho.* 1999 Jan;57(1): 43-52. Review.

(11) 柴田敏之, 奥村勝彦, 病院薬剤師—21世紀への挑戦—遺伝子レベルからみた薬物治療の個別化, 月刊薬事, 1999, 41巻, 195~200頁

(12) 喜多知子, 柴田敏之, 奥村勝彦, I. ヒトにおける薬物動態とその変動要因の基礎知識 3. 生体側の要因で変動する薬物動態 1) 薬物代謝酵素の遺伝的多型 (4: アセチル化酵素) と薬物動態, 月刊薬事臨時増刊号「医薬品適正使用のための臨床薬物動態」, 2000, 42巻, 872~880頁

2. 学会発表

1. T. Kita, T. Sakaeda, F. Komada, N. Aoyama, T. Sakai, M. Kasuga, Y. Tanigawara, Okumura K.: Cytochrome P450 2C19 genotype and antimicrobial efficacy in anti- *Helicobacter*

pylori therapy., ODD '99, 1999: 176.

2. T. Kita, M. Kakumoto, T. Sakaeda, N. Aoyama, T. Sakai, M. Kasuga, K. Okumura: Role of cytochrome P450 2C19 genotypes in anti-*Helicobacter pylori* with proton pump inhibitors., 11th International Conference on cytochrome P450, 1999: 121.

3. Y. Tanigawara: Population PK/PD and Formulation Design, *Strategies for Optimizing Oral Drug Delivery: Scientific to Regulatory Approaches*, Kobe, April 1999.

4. Y. Tanigawara: Population Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Approach for Global Drug Development, *Formulation Optimization and Clinical Pharmacology*, Tokyo, April 1999.

5. Y. Tanigawara, The Role of P-glycoprotein in Drug Disposition, *6th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*, Cairns, September 1999.

6. 谷川原祐介: Docetaxel の体内動態と臨床薬理, 第37回日本癌治療学会, 岐阜, 1999年10月.

7. 谷川原祐介:ブリッジング評価における統計学的考察—PK/PDを中心に—, 第7回計量生物セミナー, 1999年10月.

8. 渡辺和英, 谷口律子, 佐竹理早, 平松洋子, 荒木博陽, 五味田裕, 大塚頌子, 岡鋈次, 清水憲二: フェニトインの薬物動態におよぼすCYP2C遺伝的多型の影響. 第38回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 高知, 1999.

9. 平松洋子, 渡辺和英, 谷口律子, 佐竹理早, 荒木博陽, 五味田裕, 大塚頌子, 岡鋈次, 江藤精二, 野田浩司: 血中フェニトイン濃度のゾニサミド併用による変化とCYP2C9遺伝子型との関連. 第20回日本臨床薬理学会, 横浜, 1999.

10. 白坂大輔, 青山伸郎, 白川勝朗, 吉田寛: *Helicobacter pylori* 抗VacA抗体に関する検討, 第85回日本消化器病学会総会, 1999: A80.

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

H10 年度に我々は、N-Acetyltransferase2 (NAT2) により代謝されるサラゾスルファピリジン (SASP) について健常人単回投与試験を行い、NAT2 の genotype と phenotype とがほぼ一致することを確認した。本年度では、健常人反復投与試験を行い、薬物動態学的解析から単回投与時と比較検討した。その結果、rapid type と比較して intermediate type では、投与 1 日目及び 8 日目とも血漿中 SP 並びに AcSP 濃度が高く、尿中排泄量も多かった。また、血漿中 AcSP/SP 濃度比並びに AcSP/SP 尿中排泄量比は低値を示す傾向にあり、特に投与 8 日目の血漿中 AcSP/SP 濃度比は有意に低値を示したことから、NAT2 の genotype と phenotype の一致を認めた。また、SP および AcSP の血漿中からの消失過程においては、両 type で有意な差は認められないことが示された。しかしながら、rapid type と比較して intermediate type では、SP から AcSP への変換が遅いことが示された。よって、SASP 反復投与後の体内動態は NAT2 genotyping により予測できることが示され、臨床 genotyping は有用であることが示唆された。

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

のに、薬物を実際に服用し、尿中或いは血中濃度を測定する phenotyping 法が用いられてきた。この方法では、薬物服用による副作用発現等の危険性があり、また採血、蓄尿など被験者に対する負担も大きい。

ところで、遺伝子工学の発展に伴い、一部の遺伝的多型性を示す薬物代謝酵素の遺伝子変異点の解析が可能となった (genotyping 法)。この方法は、薬物服用の必要が無く、微量の血液、爪、毛髪などから容易に判定できるため被験者への負担が少なく臨床上有用である。さらに近年、数種類の薬物について遺伝子型 (genotype) と表現型 (phenotype) とが一致するという報告がなされたことから¹⁾、genotyping 法の臨床応用への期待が急速に高まっている。しかしながら、これら報告のほとんどは単回投与での検討にとどまっており、反復投与を通常とする臨床治療に応用するためには不十分な情報であるといえる。すなわち、反復投与においては、代謝酵素の誘導、トランスポーター蛋白の誘導、肝肥大、肝血流量・胆汁量の増加などが起こることが報告されており²⁾、反

A. 研究目的

常用量の薬物を同じ条件で同量投与したにもかかわらず、その薬物の血中濃度に大きな個体差が認められ、一部のヒトに異常反応（副作用・効き過ぎ）が起こることは、臨床の場ではそれほど稀なことではない。このような薬理効果の個体差の原因として、薬物代謝酵素の個体差が挙げられ、代表的なものに N-Acetyltransferase2 (NAT2) がある。従来、薬物代謝酵素の個体差を判定する

復投与後の体内動態は単回投与後の体内動態からは必ずしも予測し得ない。

平成 10 年度において我々は、NAT2 により代謝を受ける潰瘍性大腸炎治療薬サラゾスルファピリジン (SASP) をモデル薬物とし、健康人単回投与試験を行い、結果、NAT2 の genotype と phenotype がほぼ一致することを報告した*。そこで今回、反復投与においても NAT2 の genotype と phenotype が一致するか検討するために、8 日間の健康人反復投与試験を行った。また、本試験から得られた結果を用いて薬物動態学的解析を行い、genotyping 法の臨床における有用性を検証した。

B. 研究方法

文書により同意を得た健康男子志願者 7 名の genotyping は、Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法により行った³⁾。また、SASP (サラゾピリン錠 (吉富製薬)) を 1 日 1 回朝食前に 1g ずつ 8 日間反復経口投与し、投与 1 日目および 8 日目の SASP 投与後 3、6、9、12、24 時間後に血液並びに尿を採取した。なお、投与 5 日目の投与直前にも採血した。SASP 並びに腸内細菌分解物スルファピリジン (SP)、さらに NAT2 による代謝物アセチルスルファピリジン (AcSP) の各試料中濃度は HPLC 法により測定した。解析においては、ヒト体内を black box と仮定し、SASP の経口投与を入力関数として、SP および AcSP の血漿中濃度並びに尿中排泄量の時間推移を出力関数と定義した (図 1)。

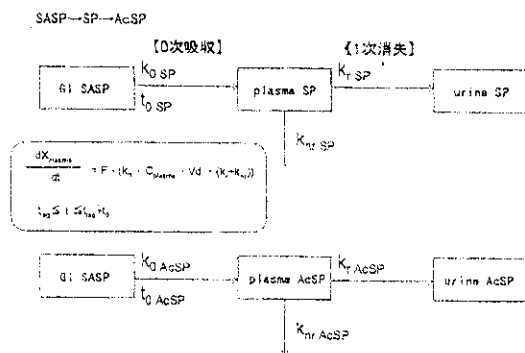


図1. 薬物動態学的モデル

また、SP および AcSP を独立変数としてとらえ、それぞれについて物質収支式をたて、Runge-Kutta-Gill 法に基づき最小二乗回帰解析を行った。

C. 研究結果

被験者 7 名は genotyping により、代謝の速い個体 (rapid type (NAT2*4/NAT2*4)) 4 名、やや代謝の遅い個体 (intermediate type (NAT2*4/NAT2*6A, NAT2*4/NAT2*7B)) 3 名に大別された。なお、rapid type 及び intermediate type の両群において、年齢、体重、身長、 $AUC_{SASP\ 0-24}$ に有意な差はなかった (表 1)。

表1. 被験者背景

	Rapid Type	Intermediate Type
genotype	NAT2*4/*4 (n=4)	NAT2*4/*6A (n=2) NAT2*4/*7B (n=1)
sex	male	male
age	29.0±5.5	26.7±6.2
height (cm)	168.5±4.4	165.3±2.1
weight (kg)	59.5±7.8	59.7±10.6
$AUC_{SASP\ 0-24}$ ($\mu g \cdot hr/ml$)	279.5±183.7	175.5±60.7

rapid type と比較して intermediate type では、投与 1 日目及び 8 日目とも血漿中 SP 並びに AcSP 濃度が高く、尿中排泄量も多かった。また、血漿中 AcSP/SP 濃度比並びに AcSP/SP 尿中排泄量比は低値を示す傾向にあり、特に投与 8 日目の血漿中 AcSP/SP 濃度比は有意に低値を示した (表 2)。

表2. SASP投与24時間後のSP並びにAcSP血中濃度値

	Rapid Type		Intermediate Type	
	Day 1	Day 8	Day1	Day8
SASP ($\mu g/ml$)	3.0±2.1	3.8±3.8	1.8±0.7	2.3±1.1
SP ($\mu g/ml$)	2.0±1.1	2.0±1.2	3.6±0.5	5.2±0.6**
AcSP ($\mu g/ml$)	6.1±2.1	7.5±2.2	8.3±3.9	10.3±4.6
AcSP/SP	3.4±1.6	4.2±1.1	2.3±0.9	1.9±0.6*

Each value represents mean±S.D.
* p<0.05 compared with day1
** p<0.01 compared with day8 in rapid type
*** p<0.05 compared with day8 in rapid type

投与 1 日目と比較して 8 日目では、両 type とも SP 並びに AcSP の血漿中濃度、尿中排泄量が増大する傾向がみられた。ただし、rapid type における血漿中 SP 濃度のみ投与 1 日目と 8 日目とで不変であった。また、血漿中 AcSP/SP 濃度比は rapid type で増大傾向であったが、intermediate type では減少傾向を示した。AcSP/SP 尿中排泄量比は両 type とも増大傾向であった。

薬物動態学的解析においては、入力関数を 1 次関数と仮定した場合と比較して、0 次関数の方が

fitting は良好であった。0 次関数としての解析の結果、両 type では投与後約 5 日で定常状態に達していることが示された (図 2)。

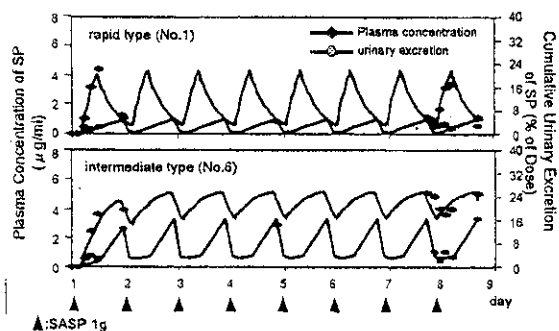


図 2. SP 血中濃度推移並びに尿中排泄量のシミュレーショングラフ (Subject No. 1, 6)

また、SP および AcSP の血漿中からの消失過程においては、両 type で有意な差は認められないことが示された。しかしながら、rapid type と比較して intermediate type では、SP から AcSP への変換が遅いことが示された (表 3)。

表 3. SP 並びに AcSP 体内動態パラメータ

	Rapid Type (n=4)		Intermediate Type (n=3)	
	SP	AcSP	SP	AcSP
k_t+k_{tr} (hr ⁻¹)	0.12±0.05	0.11±0.09	0.13±0.05	0.13±0.03
t_{lag} (hr)	5.4±3.1	5.5±3.4	4.2±0.5	5.1±0.8
$t_{lag AcSP} - t_{lag SP}$ (hr)		0.31±0.36		0.83±0.15*

Each value represents mean±S.D.
*: p=0.064 compared with rapid type.

D. 考察

健康人薬物反復投与試験の薬物動態学的解析結果より、消化管内での SASP の分解過程における飽和が示唆された。また、SASP 単回投与時において、NAT2 の genotype と phenotype が一致することが明らかとなった。従って、SASP 反復投与後の体内動態は NAT2 genotyping により予測できることが示された。

E. 結論

SASP 反復投与後の体内動態は NAT2 genotyping により予測できることが示され、臨床上 genotyping は有用であることが示唆された。

【引用文献】

1. 田中千賀子, 加藤隆一, NEW 薬理学, 584-590, 南江堂, 1996

2. Klaassen CD., Watkins JB., Pharmacol. Rev., 36, 1-67, 1984

3. K. Okumura, T. Kita, S. Chikazawa, F. Komada, S. Iwakawa, Y. Tanigawara, Clin. Pharmacol. Ther., 61, 509-517, 1997.

※参考: 第 15 回日本 TDM 学会・学術大会, 1998. 5.

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tanigawara Y, Aoyama N, Kita T, Shirakawa K, Komada F, Kasuga M, Okumura K: CYP2C19 genotype-related efficacy of omeprazole for the treatment of infection caused by *Helicobacter pylori*, Clin. Pharmacol. Ther., 1999; 66: 528-34.

(2) Aoyama N, Tanigawara Y, Kita T, Sakai T, Shirakawa K, Shirasaka D, Kodama F, Okumura K, Kasuga M: Sufficient effect of 1-week omeprazole and amoxicillin dual treatment for *Helicobacter pylori* eradication in cytochrome P450 2C19 poor metabolizers., J. Gastroenterol., 1999; 34: 80-3.

(3) 柴田敏之, 奥村勝彦, 病院薬剤師—21世紀への挑戦—遺伝子レベルからみた薬物治療の個別化, 月刊薬事, 1999, 41 巻, 195~200 頁

(4) 喜多知子, 柴田敏之, 奥村勝彦, I. ヒトにおける薬物動態とその変動要因の基礎知識 3. 生体側の要因で変動する薬物動態 1) 薬物代謝酵素の遺伝的多型 (4: アセチル化酵素) と薬物動態, 月刊薬事臨時増刊号「医薬品適正使用のための臨床薬物動態」, 2000, 42 巻, 872~880 頁

2. 学会発表

1. Kita T, Sakaeda T, Komada F, Aoyama N, Sakai T, Kasuga M, Tanigawara Y, Okumura K: Cytochrome P450 2C19 genotype and antimicrobial efficacy in anti-*Helicobacter pylori* therapy., ODD '99, 1999: 176.

2. Kita T, Kakumoto M, Sakaeda T, Aoyama N, Sakai T, Kasuga M, Okumura K: Role of cytochrome P450 2C19 genotypes in anti-*Helicobacter pylori* with proton pump inhibitors., 11th International Conference on cytochrome P450, 1999: 121.

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

プロトンポンプ阻害剤を用いた *Helicobacter pylori* 除菌治療効果に及ぼす CYP2C19 遺伝的多型性の影響をみる目的で、今年度は、ラベプラゾール (RPZ) について、薬物血中濃度並びに *H. pylori* 除菌治療効果・副作用と CYP2C19 遺伝子型との関連性を検討した。その結果、RPZ を用いた *H. pylori* 除菌治療では、RPZ 血中濃度並びに除菌治療効果・副作用における CYP2C19 遺伝子型の差異は認められず、同じプロトンポンプ阻害剤のオメプラゾール (OPZ) 及びランソプラゾール (LPZ) で同様に行った検討結果と異なった。よって、RPZ の血中動態に及ぼす遺伝子型の影響がなかったことから、RPZ の代謝における CYP2C19 の寄与は小さく、RPZ を用いた *H. pylori* 除菌治療では CYP2C19 遺伝子型による治療効果の差異はないと考えられた。

A. 研究目的

平成 10 年度に我々は、オメプラゾール (OPZ) もしくはランソプラゾール (LPZ) を用いた *H. pylori* 除菌治療効果と、遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 CYP2C19 の遺伝子型との相関解析を行った。本年度は他のプロトンポンプ阻害剤であるラベプラゾール (RPZ) について、昨年度と同様、除菌治療効果・副作用と CYP2C19 遺伝子型との相関解析を行う。さらに、これら除菌治療患者について、採血も行い、CYP2C19 遺伝子型と薬物血中濃度との相関性について検討する。

B. 研究方法

CYP2C19 の遺伝子解析は、患者血液サンプル (0.5ml) からゲノム DNA を抽出した後、PCR-RFLP 法を用いて行った。

H. pylori 除菌治療は、*H. pylori* 抗体陽性の消化性潰瘍もしくは胃炎患者 45 例を対象に、RPZ (10 又は 20 mg×2/日) と抗生剤 (アモキシシリン (500 mg×4/日) + クラリスロマイシン (200 mg×4/日)) の一週間併用療法を行った。*H. pylori* 除菌治療効果の判定は、培養、組織及び尿素呼気試験法により行ない、除菌率を CYP2C19 遺伝子型との関連性を検討した。さらに、除菌治療最終日の朝、薬物服用 3 時間後に採血を行い、RPZ 未変

化体及び代謝物 (チオエーテル体及びスルフォン体) の血中濃度を HPLC 法により測定した。

C. 研究結果

RPZ が 10 mg×2/日又は 20 mg×2/日を用いた *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 (Extensive Metabolizers (EM)) に 90% (10 mg×2/日) または 89% (20 mg×2/日) 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 (Poor Metabolizers (PM)), 75% (10 mg×2/日) または 100% (20 mg×2/日) となり、いずれの用量ともに遺伝子型による違いは認められなかった。また、副作用 (主に消化器症状) での遺伝子型による違いは認められなかった。さらに RPZ 血中濃度値は、投与後 3 時間後ではばらつきは大きかったものの、CYP2C19 遺伝子型毎の有意な差は認められなかった (表)。

RPZ dose	CYP2C19 genotype	RPZ mean conc. (μg/mL)	RPZ-SLF conc. (μg/mL)	Thi-RPZ conc. (μg/mL)
10mg×2	EM	69.7	0.0	59.6
10mg×2	PM	57.2	0.0	69.6
20mg×2	EM	360.0	2.1	147.4
20mg×2	PM	343.3	3.0	246.1

D. 考察

RPZ を用いた *H. pylori* 除菌治療において、薬物血中濃度並びに除菌治療効果・副作用と *CYP2C19* 遺伝子型との関連性は認められなかった。この結果は、*H. pylori* 除菌治療において、薬物血中濃度並びに除菌治療効果・副作用と *CYP2C19* 遺伝子型との関連性がほぼ認められた OPZ もしくは LPZ の場合と異なる。よって、RPZ の血中動態に及ぼす遺伝子型の影響がなかったことから、RPZ の代謝における *CYP2C19* の寄与は小さく、RPZ を用いた *H. pylori* 除菌治療では *CYP2C19* 遺伝子型による治療効果の差異はないと考えられた。今後、各プロトンポンプ阻害剤について、代謝過程における *CYP2C19* の寄与、並びに副代謝経路 *CYP3A4* を介した抗生剤クラリスロマイシンとの相互作用等について in vitro 肝ミクロゾームを用いて詳細な検討を加えたい。

E. 結論

プロトンポンプ阻害剤(OPZ, LPZ, RPZ)は *CYP2C19* により代謝されるが、薬物血中濃度並びに *H. pylori* 除菌治療効果・副作用と *CYP2C19* 遺伝子型との相関性が認められたのは OPZ のみであり、LPZ、RPZ を用いた除菌治療の効果・副作用は、*CYP2C19* 遺伝子型による違いが認められなかった。その原因として、代謝経路における *CYP2C19* の寄与率の違いが考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Aoyama N, Tanigawara Y, Kita T, Sakai T, Shirakawa K, Shirasaka D, Kodama F, Okumura K, Kasuga M., Sufficient effect of 1-week omeprazole and amoxicillin dual treatment for *Helicobacter pylori* eradication in cytochrome P450 2C19 poor metabolizers., *J Gastroenterol.* 1999;34 Suppl 11:80-3.

(2) Sakai T, Aoyama N, Satonaka K, Shigeta S, Yoshida H, Shinoda Y, Shirasaka D, Miyamoto M, Nose Y, Kasuga M., HLA-DQB1 locus and the development of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection., *J Gastroenterol.* 1999;34 Suppl 11:24-7.

(3) Tanigawara Y, Aoyama N, Kita T, Shirakawa

K, Komada F, Kasuga M, Okumura K., *CYP2C19* genotype-related efficacy of omeprazole for the treatment of infection caused by *Helicobacter pylori*., *Clin Pharmacol Ther.* 1999 Nov;66(5):528-34.

(4) Matsushima Y, Aoyama N, Fukuda H, Kinoshita Y, Todo A, Himeno S, Fujimoto S, Kasuga M, Nakase H, Chiba T., Gastric ulcer formation after the Hanshin-Awaji earthquake: a case study of *Helicobacter pylori* infection and stress-induced gastric ulcers., *Helicobacter.* 1999 Jun;4(2):94-9.

(5) Aoyama N, Shirasaka D, Sakai T, Shirakawa K., [Characteristics of anti-microbial agents and its clinical choice for *H. pylori* treatment]., *Nippon Rinsho.* 1999 Jan;57(1):43-52. Review.

2. 学会発表

1. 白坂大輔, 青山伸郎, 白川勝朗, 吉田寛: *Helicobacter pylori* 抗 VacA 抗体に関する検討, 第 85 回日本消化器病学会総会, 1999: A80.

2. Kita T, Sakaeda T, Komada F, Aoyama N, Sakai T, Kasuga M, Tanigawara Y, Okumura K.: Cytochrome P450 2C19 genotype and antimicrobial efficacy in anti-*Helicobacter pylori* therapy., ODD '99, 1999: 176.

3. Kita T, Kakumoto M, Sakaeda T, Aoyama N, Sakai T, Kasuga M, Okumura K.: Role of cytochrome P450 2C19 genotypes in anti-*Helicobacter pylori* with proton pump inhibitors., 11th International Conference on cytochrome P450, 1999: 121.

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 医学部 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 CYP2C9 について、健常日本人で変異遺伝子発現頻度を検討した結果、約 7% の被験者が *CYP2C9*3* 変異をヘテロ接合で有していることが判明した。次に、*CYP2C9* の一塩基変異多型が医薬品の有効性・安全性に及ぼす影響を検討する目的で、研究対象とすべき薬物について文献調査を実施した。さらに、患者血液を用いる遺伝子診断を実施するための同意・説明文書を作成し、インフォームドコンセントを得る手続きについて検討した。

A. 研究目的

遺伝的多型性を示す肝薬物代謝酵素 CYP2C9 について、変異遺伝子発現頻度を健常日本人を対象として実施する。さらに患者血液を用いる遺伝子診断を実施するための同意・説明文書を作成し、インフォームドコンセントを得る手続きを確立する。

B. 研究方法

まず、遺伝子診断実施に関する同意・説明文書を作成し、健常人 85 名から書面により同意を得た。*CYP2C9* の遺伝子タイピングは、85 名それぞれの血液サンプルからゲノム DNA を抽出した後 PCR-RFLP 法に従って行った。

次に、*CYP2C9* を主代謝経路とする薬物についての文献検索を行い、*CYP2C9* の一塩基変異が薬物の治療効果にどのような影響を与えているか、それぞれの薬物について調査をおこなった。

C. 研究結果

85 名の健常人における *CYP2C9* 遺伝子型を診断した結果、変異型遺伝子は *CYP2C9*3* の 1 タイプのみが検出され、*CYP2C9*3* をヘテロ接合で保有する頻度は約 7%、ホモ接合で有する被験者は見つからなかった。欧米人について報告されている *CYP2C9* の対立遺伝子頻度は *CYP2C9*1* (野生型)、*CYP2C9*2* (変異型)、*CYP2C9*3* (変異型) がそれぞれ 0.79、0.125、0.085 であり、人種差の存在が明らかになった。

D. 考察

CYP2C9 ファミリーに属する *CYP2C9* は、TDM (薬物治療モニタリング) の対象となっているフェニトイン、カルバマゼピンをはじめ、トルブタミド、ワルファリンなどの代謝に関与する重要な酵素である。日本人のてんかん患者を対象にフェニトインの代謝能と *CYP2C9* および *2C19* の遺伝子型の関係を調べた研究では、*CYP2C9* の変異遺伝子 (*CYP2C9*3*) を有する患者において著しい代謝能低下が認められた。フェニトインは有効血中濃度域が 10~20 $\mu\text{g/ml}$ と狭いため、*CYP2C9*3* を保有する患者での代謝能低下には注意が必要である。一方、*CYP2C9* の Poor Metabolizers では、糖尿病薬トルブタミドの代謝能が低下することも報告されている。さらに、至適用量に 10 倍以上の著しい個人差 (0.5~60 mg/day) が認められるワルファリンについても *CYP2C9* 遺伝多型の関与が示されている。ワルファリン低用量 (1.5 mg/day 以下) を服用している患者には変異遺伝子保有者が多く、出血の合併症を引き起こす確率が高い。日本人では、変異遺伝子 (*CYP2C9*3*) のホモ接合タイプはほとんど存在しないものの、約 7% に認められるヘテロ接合タイプにおいて、ワルファリン代謝能の低下が認められることから、今後は血液凝固能検査に加え、遺伝子診断も治療方針に加えていくことが望ましいと考えられる。

E. 結論

肝薬物代謝酵素 *CYP2C9* について、健常日本

人で変異遺伝子発現頻度を検討した結果、約7%が変異型の *CYP2C9*3* をヘテロ接合で有していることが判明した。*CYP2C9* の一塩基変異多型は、フェニトイン、カルバマゼピン、ワルファリンの有効性・安全性に影響を及ぼす可能性があると考えられた。さらに、患者血液を用いる遺伝子診断を実施するためには、事前に十分な説明と文書による同意が必要であり、そのひな型となる同意説明文書を作成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Tagawa, K. Miwa, K. Yamashita, R. Tsukuda, Y. Yoshimura, S. Tanayama, Y. Tanigawara. Possible Factor for Nonlinear Pharmacokinetics of TAK-603, a New Antirheumatic Agent, in Rats. *Biopharm. Drug Disposition*, 20(1): 11-18 (1999).
- 2) Y. Tagawa, K. Miwa, R. Tsukuda, Y. Yoshimura, S. Tanayama, Y. Tanigawara, Effect of Its Demethylated Metabolite on the Pharmacokinetics of Unchanged TAK-603, A New Antirheumatic Agent, in Rats. *Drug Metabolism Disposition*, 27(4): 495-501 (1999).
- 3) Komada, K. Nishiguchi, Y. Tanigawara, S. Iwakawa, K. Okumura. Effects of Secretable SOD Delivered by Genetically Modified Cells on Xanthine/Xanthine Oxidase and Paraquat-Induced Cytotoxicity in Vitro. *Biol. Pharm. Bull.*, 22(8): 846-853 (1999).
- 4) K. Takara, Y. Tanigawara, F. Komada, K. Nishiguchi, T. Sakaeda, K. Okumura, Cellular Pharmacokinetic Aspects of Reversal Effect of Itraconazole on P-Glycoprotein-Mediated Resistance of Anticancer Drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, 22(12): 1355-1359 (1999).
- 5) Y. Tanigawara, N. Aoyama, T. Kita, K. Shirakawa, F. Komada, M. Kasuga, K. Okumura, *CYP2C19* genotype-related efficacy of omeprazole for the treatment of infection caused by *Helicobacter pylori*. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 66(5): 528-534 (1999).
- 6) K. Shirakawa, K. Takara, Y. Tanigawara, N. Aoyama, M. Kasuga, F. Komada, T. Sakaeda, K. Okumura, Interaction of Docetaxel ("Taxotere") with Human P-Glycoprotein. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.

2. 学会発表

- 1) Y. Tanigawara: Population PK/PD and Formulation Design, *Strategies for Optimizing Oral Drug Delivery: Scientific to Regulatory Approaches*, Kobe, April 1999.
- 2) Y. Tanigawara: Population Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Approach for Global Drug Development, *Formulation Optimization and Clinical Pharmacology*, Tokyo, April 1999.
- 3) Y. Tanigawara, The Role of P-glycoprotein in Drug Disposition, *6th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*, Cairns, September 1999.
- 4) 谷川原祐介: Docetaxel の体内動態と臨床薬理, 第37回日本癌治療学会, 岐阜, 1999年10月.
- 5) 谷川原祐介:ブリッジング評価における統計学的考察-PK/PDを中心に-, 第7回計量生物セミナー, 1999年10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
— 分担研究項目：チトクローム P450 2C 遺伝的多型の抗てんかん薬フェニトイン薬物動態に対する影響 —

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・薬剤部長）
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）
岡 鉄次（岡山大学医学部小児神経科）
清水憲二（同附属分子細胞医学研究施設）

研究要旨

てんかん患者においてチトクローム P450 (CYP) 2C9 および 2C19 遺伝的多型が抗てんかん薬フェニトイン (PHT) の薬物動態におよぼす影響を検討した。その結果、CYP2C9 および 2C19 の両方の変異は PHT の代謝能の著しい低下をもたらしたが、2C9 のみの変異では PHT の有意な代謝能の低下は見られなかった。次に、PHT とゾニサミド (ZNS) の薬物間相互作用におよぼす CYP2C 遺伝子型の影響を検討した。ZNS 併用による血中 PHT 濃度変化率には大きな個人差がみられ、2C9*3 変異を有する患者で著しく高い値を示した。また、*in vitro* の実験で、2C9 発現系において、弱いながらも、ZNS は濃度依存的に PHT の主代謝物の産生を阻害した。以上のことから、CYP2C9*3 変異を有する患者が、ZNS を併用されると PHT の血中濃度が大きく上昇することが示され、ZNS の CYP2C9 に対する阻害作用が原因の一つである可能性が示唆された。

今回の結果より、PHT の代謝能の個体差は CYP2C 遺伝子型および相互作用で一部は説明できたが、これらでは説明できない患者も多く見られた。今後、他の遺伝子の変異を含めて、その要因を検索することが必要と思われる。

A. 研究目的

平成 10 年度に制限酵素陽性対照を用いた CYP2C 遺伝子タイピング法を確立したので、今年度はこの方法を用いて、てんかん患者における遺伝的多型の薬物動態への影響を検討する。

抗てんかん薬フェニトイン (PHT) は治療域が狭く、代謝の飽和による非線形性を示すため血中濃度の個人差が極めて大きい薬物である。PHT の代謝には CYP2C サブファミリーが関与し、最近、CYP2C9 および 2C19 遺伝子に変異を有する患者において PHT の代謝能が低下していることが報告された¹⁾。しかし、PHT の体内動態は年齢や併用薬の影響を受けやすく、血中濃度の個人差を遺伝的多型で説明できるかどうか不明である。

そこで今回、てんかん患者の CYP2C9 および 2C19 に関する遺伝子型を決定し、遺伝的要因が PHT の血中濃度におよぼす影響を検討した。また、PHT と抗てんかん薬ゾニサミド (ZNS) の薬物間相互

作用におよぼす CYP2C 遺伝子型の影響も併せて検討した。

B. 研究方法

岡山大学病院小児神経科外来を受診し、PHT の血中濃度が定常状態にある 15 歳以上のてんかん患者のうち、研究の趣旨に同意した 44 名を対象とした。

被験者からの採血は PHT 服用 2~5 時間後に行い、血中 PHT 濃度は蛍光偏光免疫測定法 (TDX) により測定した。PHT の最大消失速度 (V_{max}) および Michaelis 定数 (K_m) は Mamiya ら²⁾ の母集団パラメータを用いて算出した。また遺伝子型の判定は、被験者の血液より抽出した DNA を試料とし、CYP2C9*3 変異と、CYP2C19*2 および*3 変異について、PCR-RFLP 法により行った。その後、判定された遺伝子型により Table 1 に示すように被験者を群分けし、血中 PHT 濃度/投与量比、 K_m および V_{max}

に対する遺伝子型の影響を検討した。

Table 1 CYP2C9/19 遺伝子型

群	CYP2C19	CYP2C9
A	*1/*1	*1/*1
B	*1/*2 or *1/*3	*1/*1
C	*2/*2, *3/*3 or *2/*3	*1/*1
D	*1/*1	*3/*1
E	*2/*1 or *3/*1	*3/*1

次に、PHT が処方された後に ZNS の併用を開始した患者 10 名について、ZNS を併用する前後の PHT 血中濃度の変化率を算出し、遺伝子型の影響を検討した。遺伝子型以外の因子として、ZNS の投与量、血中 ZNS 濃度、および ZNS 併用前の PHT の Km、Vmax 値が血中 PHT 濃度の変化率に与える影響を検討した。

また、ヒトリンパ芽球様細胞系の CYP2C9、2C19 および 3A4 発現系マイクロゾーム (GENTEST 社製) を用いて、PHT の in vitro 代謝実験を行い、主代謝物である S-および R-5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (HPPH) 産生に及ぼす ZNS の影響について検討した。基質として 80 μ M の PHT を含む反応液に様々な濃度の ZNS を加え、NADPH、マイクロゾームを添加し、37 $^{\circ}$ C 2 時間反応させた後、HPLC により S-および R-HPPH 産生量を測定した。

C. 研究結果

44 名のてんかん患者において、PHT の血中濃度/投与量比 (C/D 比) は、CYP2C9 および 2C19 の両方の変異を有する患者 (E 群) において、他群より有意に高い値を示した (Table 2)。また、薬物動態パラメータに関しては、E 群の Vmax が他の遺伝子型の患者より有意に低い値を示したが、CYP2C9 のみに変異を有する患者 (D 群) の Vmax は、他の患者と比較して有意な差が見られなかった (Table 3)。また、Km は各群間に差は見られなかった。

Table 2 遺伝子型別の血中濃度/投与量比

群	血中濃度/投与量比
A	3.67 \pm 0.49
B	3.97 \pm 0.84
C	3.76 \pm 1.00
D	4.51 \pm 0.30
E	6.92 \pm 0.04*, **

**p < 0.01 Group E VS A, B and C

*p < 0.05 Group E VS Group D

Table 3 遺伝子型別の Km および Vmax

群	Km (μ g/ml)	Vmax (mg/kg/day)
A	3.41 \pm 1.32	6.27 \pm 0.53
B	5.01 \pm 1.42	6.45 \pm 0.68
C	4.69 \pm 1.61	6.05 \pm 0.50
D	3.10 \pm 0.54	5.57 \pm 0.30
E	5.19 \pm 2.08	4.00 \pm 0.24*, **

**p < 0.01 Group E VS A, B and C

*p < 0.05 Group E VS Group D

次に、10 名の ZNS 併用被験者における、ZNS 併用前後の血中 PHT 濃度の平均値はそれぞれ 12.0 (7.3-18.3) μ g/ml および 14.9 (6.1-29.8) μ g/ml であり、両者間に有意な差は認められなかった。また、ZNS 併用前後での血中 PHT 濃度の変化率は、-23.3~148.8%と大きくばらついていた。CYP2C9 遺伝子型で分類したところ、変異を有する *3/*1 群 (n=2) の平均変化率は 100.8%で、変異を有さない *1/*1 群 (n=8) の平均変化率 0.57%に比し、著しく高い値を示した。さらに、CYP2C19 遺伝子型の影響を見たところ、CYP2C9 の変異を有する被験者のうち、2C19 *3/*1 の患者の PHT 変化率は 148.8%であり、2C19 *1/*1 の患者は 52.7%であった。CYP2C9 の変異を有さない被験者については、CYP2C19 遺伝子型の影響は見られなかった。一方、ZNS の投与量、血中 ZNS 濃度および ZNS 併用前の PHT の Km、Vmax 値と血中 PHT 濃度の変化率との間には、いずれも有意な相関はみられなかった。

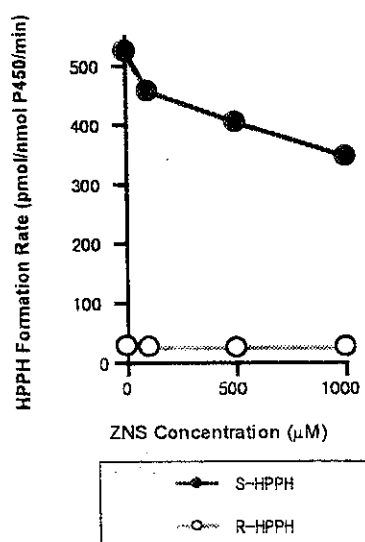
次に CYP 発現系を用いた実験では、3A4 発現系においては HPPH は産生されなかったが、2C9 および 2C19 発現系においては S-および R-HPPH が産生された (Table 4)。ZNS は 2C9 発現系における S-HPPH の産生を濃度依存的に阻害したが (Fig. 1)、2C19 発現系における HPPH の産生には影響を与えなかった。

Table4 ヒトリンパ芽球様細胞系における HPPH の産生速度

分子種	産生速度 (pmol/nmol P450/min)	
	S-HPPH	R-HPPH
2C9	525 ± 6.3	28 ± 0.4
2C19	100 ± 6.25	40 ± 7.5
3A4	n. d.	n. d.

n. d. : not detectable

Fig.1 CYP2C9 発現系における ZNS の HPPH 産生への影響



D. 考察

44 名のてんかん患者において CYP2C9 および 2C19 の両方の変異は PHT の代謝能の著しい低下をもたらしたが、2C9 のみの変異では PHT の代謝能の有意な低下は見られなかった。この原因として、CYP2C9 に変異を有する患者では代償機能として CYP2C19 における代謝が賦活している可能性のあること、また、A-C 群には V_{max} が著しく他の患者より低下している患者が数名見られることが考えられる。これらの患者では、CYP2C19*2 および*3、CYP2C9*3 変異以外の原因で代謝能が低下していると考えられ、今後その要因を検索することが必要と思われる。

一方、PHT は、ZNS との併用により一部の患者において血中濃度が上昇することが報告されている³⁾。今回の結果においても、ZNS 併用による血中 PHT 濃度変化率には大きな個人差がみられ、

2C9*3 変異を有する患者で著しく高い値を示した。遺伝子型以外の因子で、血中 PHT 濃度の変化率に影響を与えるものは認められなかった。また、2C9 発現系において、弱いながらも、ZNS は濃度依存的に S-HPPH 産生を阻害した。以上のことから、CYP2C9*3 変異を有する患者が、ZNS を併用されると PHT の血中濃度が大きく上昇することが示され、ZNS の CYP2C9 に対する阻害作用が原因の一つである可能性が示唆された。

E. 結論

今回の結果より、CYP2C9 および 2C19 の両方の変異を有する患者は PHT の代謝能が著しく低下し、ゾニサミドを併用すると薬物相互作用の影響を受けやすいことが明らかとなった。しかし、PHT 代謝能の個体差は CYP2C 遺伝子型のみでは十分説明できず、今回検討した遺伝的多型以外の要因もあると考えられる。今後、他の遺伝子の変異を含めて、PHT の代謝に影響を与える因子を検索する予定である。

[参考文献]

- 1) Odani A. et al. : Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther* 62: 287-92,
- 2) Mamiya, K. et al. : The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: Studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. *Epilepsia*, 39: 1317-1323 (1998).
- 3) Mimaki, T. et al. : Zonisamide-phenytoin interaction *Jap. J. TDM*, 9: 49-55 (1992).

F. 研究発表

1. 学会発表

- ① 渡辺和英、谷口律子、佐竹理早、平松洋子、荒木博陽、五味田裕、大塚頌子、岡鍬次、清水憲二：フェニトインの薬物動態におよぼす CYP2C 遺伝的多型の影響. 第38回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、高

知, 1999

- ②平松洋子、渡辺和英、谷口律子、佐竹理早、
荒木博陽、五味田裕、大塚頌子、岡鏑次、江
藤精二、野田浩司：血中フェニトイン濃度の
ゾニサミド併用による変化と CYP2C9 遺伝子
型との関連. 第 20 回日本臨床薬理学会, 横
浜, 1999