

20010294

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

**高齢者の薬物治療における薬物代謝酵素遺伝子
多型情報のシステム化と有用性の評価**

平成13年度総括・分担研究報告書

主任研究者 大橋 京一

(浜松医科大学医学部教授)

平成14(2002)年4月

厚生科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

高齢者の薬物治療における薬物代謝酵素遺伝子多型情報のシステム化と
有用性の評価

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大橋 京一

平成14(2002)年4月

目次

I 総括研究報告

高齢者の薬物治療における薬物代謝酵素遺伝子多型情報の システム化と有用性の評価	1
大橋 京一	

II 分担研究報告

1. 遺伝子多型情報の臨床的有用性の検討	8
渡辺 裕司	
2. 高齢者の薬物治療における薬物代謝酵素遺伝子多型情報の 有害反応モニタリングへの応用	11
山田 浩	
3. FRET を利用した微量 DNA 検体での SNP 測定	13
平松 光夫	
4. 遺伝子多型情報のシステム化	15
橋本 久邦	
資料：「薬物の体内動態及び反応性に関連する遺伝子検査の実施に関するアンケート」	

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

高齢者の薬物治療における薬物代謝酵素遺伝子多型情報のシステム化と
有用性の評価

主任研究者 大橋 京一 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨：高齢者における薬物代謝酵素遺伝子多型情報の有用性を検討した。CYP2C19 遺伝子多型情報は *H.pylori* 除菌の薬物治療の個別化を決定するのに極めて有用である。CYP2C9 遺伝子多型情報はアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬による高血圧治療における有害反応と密接に関与することが明らかになった。さらに、高齢者は併用薬数が多いため、CYP 遺伝子多型情報は薬物相互作用、薬物有害反応を防止するために有用であり、今後遺伝子多型情報を活用するシステム構築が求められる。

分担研究者

渡辺裕司 浜松医科大学医学部助教授

山田 浩 浜松医科大学治験管理センター
助教授

橋本久邦 浜松医科大学教授、薬剤部長

平松光夫 浜松ホトニクス（株）中央研究所
室長代理

用となる。薬物治療が主たる治療手段となる高齢者においては薬物代謝酵素遺伝子多型情報は薬物有害反応、薬物相互作用を回避する上で必要である。さらに、この遺伝子多型情報を利用することにより、薬物治療の個別化が図られ、不必要な投与量、投与計画が減少し、医療経済的にも有用となるであろう。

まず本研究では、高齢者における遺伝子多型情報が *H.pylori* 除菌療法、並びにアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬による高血圧治療に有用性についての検討を目的とした。

胃潰瘍や十二指腸潰瘍の治療における *H.pylori* の除菌療法は現在、プロトンポンプ阻害剤 (PPI) と amoxicillin(AMPC)、及び clarithromycin(CAM)の三剤が用いられている。この治療法における PPI の役割は、胃内での

A. 研究目的

近年、薬物代謝の個人差が遺伝的に決定され、遺伝的薬物代謝酵素多型が薬効や薬物有害反応の発現における個人差の主要因と考えられている。速やかにかつ確実な遺伝子多型情報が臨床現場で得られるならば、適切な薬物投与計画をたてることが可能になり、不必要な薬の投与を避け、薬物治療の適正化に有

抗菌剤の安定化、胃液中濃度の上昇と胃からの排出遅延、*H.pylori* の抗生剤感受性の増加、PPI 自体の抗菌作用等が挙げられる。従って PPI の効果が十分発揮されるか否かは *H.pylori* の除菌の成否に影響する因子である。この PPI は CYP2C19 で主に代謝されるが、我々はこの CYP2C19 の遺伝子多型が PPI の酸分泌抑制効果に加えて PPI と抗生剤による *H.pylori* の除菌療法の成否に関わる因子であることをこれまで報告してきた(1-6)。一方、高齢者では一般に生理機能の低下に伴い、薬物の代謝、排泄能も低下しており、薬物の効果が若年者よりも増強しやすい可能性が考えられる。そこで、高齢者における *H.pylori* 除菌療法を CYP2C19 の遺伝子多型とともに比較検討した。

アンギオテンシン II 受容体拮抗薬である candesartan は現在、高齢者における高血圧治療薬として用いられている。Candesartan は CYP2C9 で主に代謝されることより、CYP2C9 の遺伝子変異を有する高齢者に投与された際に、予期せぬ有害反応が生じる可能性がある。CYP2C9 遺伝子多型と candesartan の薬物動態と薬効について検討した。

本研究を推進するためには簡便で迅速で安価な遺伝子変異の測定法を確立する必要がある。蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 法は従来の PCR による方法に比し手間が少なく、迅速に測定が可能になり、臨床現場での利用が期待される(7)。本研究では FRET 法を薬物代謝酵素遺伝子多型測定に応用し、PCR を行う手間をはぶき、検体から抽出した DNA より直接測定が可能であるかを検討する。また、医療現場においては遺伝子多型情報を臨床活用するシステム化が、今後益々望まれてくるところであるが、個人情報取り扱い等のシス

テムの構築が急がれている。そこで本研究においては、薬物代謝酵素遺伝子多型情報の臨床における取り扱いの現状をアンケート調査し、今後の方向性を提言する。

本研究は以上の研究を通して高齢者の薬物治療における遺伝子多型情報の有用性を検討し、オーダーメイド医療を実践するシステムを提言することを目的として実施している。

B. 研究方法

(1) 内視鏡的に消化性潰瘍もしくは胃炎を認め、迅速ウレアーゼテスト、組織検査、培養法のいずれかにて *H.pylori* 陽性と診断された患者で *H.pylori* 除菌療法を完遂した患者を対象とした。*H.pylori* の除菌方法として、プロトンポンプ阻害剤である rabeprazole 10 mg、もしくは lansoprazole 30 mg 朝夕の二回内服と、さらに抗生物質である CAM 200 mg および、AMPC 500mg を一日三回内服を一週間行い、さらに消化性潰瘍患者は PPI の 6~8 週間投与を行った。投与終了一ヶ月以降に内視鏡検査をおこない、除菌判定をおこなった。CYP2C19 の遺伝子多型は患者血液もしくは胃粘膜生検組織より抽出された DNA より、PCR-RFLP 法にて行った。患者は除菌治療開始時の年齢によって 60 歳以上を高齢者、59 歳以下を若年者として比較検討した。*H.pylori* の CAM 耐性は培養もしくは *H.pylori* の 23S rRNA の 2143 位および 2144 位の A-G への変異の有無で検索した。頻度や除菌率の比較は Fisher's exact test にて行い、体重等の比較は one-way ANOVA にて行った。

(2) 症例は 89 歳の男性で、高血圧および心不全(NYHA 心機能分類 II 度)のため benidipine, doxazosin, spironolactone および furosemide の投

与を受けていた。Candesartan 初回投与時には自覚症状には変化がなかった。しかし、candesartan 投与後 2 日目より、服用して約 1 時間にふらつき感とめまいが出現し、さらにその翌日にも同様のふらつき感とめまいを強く自覚した。本患者より文書同意取得後、CYP2C9 の遺伝子型および candesartan の薬物動態を解析した。PCR-RFLP 法による CYP2C9 の遺伝子型判定にてヘテロ型の遺伝子変異 (*1/*3) が認められた。血漿中 candesartan 濃度は HPLC 法により測定した。

(3) 1997 年 12 月から 2 年間に CYP2C19 および CYP2D6 の遺伝子多型検査を行なった外来通院中の高齢者 33 名 (年齢: 66±16 歳 (平均±S.D.) 男性 12 名、女性 21 名) を対象とした。追跡期間は遺伝子多型検査実施日より 2 年間とし、追跡期間中に受診した全ての科における服用薬剤および薬物有害反応についてカルテ調査を行なった。また、転院、転居などの諸事情により追跡不能であったものに関しては、転院先の主治医への質問用紙の郵送あるいは患者への電話により有害反応発現の有無を確認した。

(4) 蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 法による SNP 判定の対象試料として代表的な薬物代謝酵素である CYP2C19 を選択した。その SNP の部位を含む配列 *1,*2,*3 の領域をそれぞれ 2 つに分割し、それぞれに相補的な塩基配列を持つ蛍光標識オリゴヌクレオチドを作成した。これら 2 種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドと標的 DNA を溶液中で混合したときの蛍光スペクトル変化を測定した。3 者によるハイブリッドが形成されると蛍光色素間で FRET が起こり、蛍光スペクトルが変化する。SNP により、標的 DNA の塩基配列とプローブ

の塩基配列にミスマッチがある場合は、これらで形成されるハイブリッドの融解温度 (T_m 値) は低下する。

(5) 日本内科学会認定教育施設 (431 施設) の病院薬剤部 (科) を対象に「薬物の体内動態及び反応性に関連する遺伝子検査の実施に関するアンケート」を送付し、我が国の遺伝子多型情報の現状について調査を行っている。

(倫理面への配慮)

本研究は浜松医科大学倫理委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいた遺伝子倫理委員会の承認を得た後に実施した。

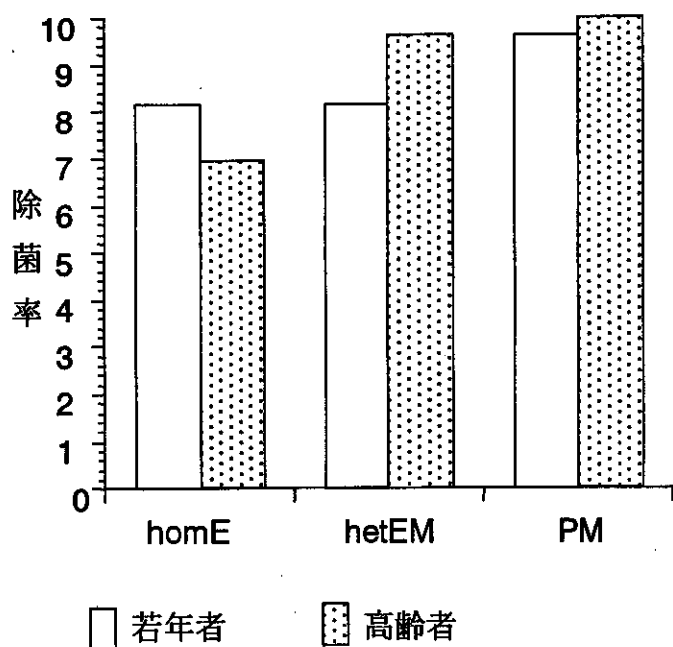
C. 研究結果

(1) 全ての対象患者の *H.pylori* 除菌率は、84.5% (180/213) であった。若年者、高齢者における除菌率は、83.5% (142/170), 88.4% (38/43) であり、除菌率に統計学的な差は認めなかった ($P = 0.4197$)。CYP2C19 の遺伝子多型のとの関連では、homEM 79.3% (65/82), hetEM 85.0% (85/100), PM 96.8% (30/31) であり、CYP2C19 の遺伝子多型によって除菌率は異なり、homEM, hetEM, PM の順に除菌率は高くなり、PM 群は homEM 群より有意に除菌率が高かった ($P = 0.0224$)。CYP2C19 の各群で若年者と高齢者の除菌率を比較すると、homEM では若年者は 81.2% (56/69) で高齢者は 69.2% (9/13) であり、hetEM では若年者は 81.3% (61/75) で高齢者は 96.0% (24/25) であり、PM 群で若年者は 96.1% (25/26) で高齢者は 100.0% (5/5) であり、いずれも統計学的な有意差は認めなかった。

CAM 耐性菌は全体の 15.0% (32/213) に認められた。CAM 感受性菌に対する除菌率は 90.1% (163/181) であるのに対して耐性菌に対する除

菌率は 53.1% (17/32)であり、CAM 耐性菌に対する除菌率は有意に低かった($P < 0.0001$)。この耐性菌の頻度を年齢群別に検討すると、若年者では 11.8% (20/170)であるのに対し、高齢者では 27.9% (12/43)に認め、高齢者での耐性菌の頻度は有意に高かった ($P = 0.0149$)。

さらに CYP2C19 の遺伝子多型とともに除菌率を検討した結果を図に示す。CAM 感受性菌の場合では CYP2C19 のいずれの多型の群でも高齢者と若年者で差は認めなかった。一方、耐性菌では CYP2C19 が homEM の場合は除菌率は若年者、高齢者ともに除菌率は低かったが、hetEM では若年者での除菌率は 25.0% (2/8)と低いが高齢者での除菌率は 100.0% (6/6)と良好であり、若年者と比較して有意に高かった($P = 0.0050$)。PM 群では高齢者、若年者共に良好な除菌率が得られた。



図：CYP2C19 遺伝子多型における高齢者と若年者の除菌率

(2) 本症例は CYP2C9*1/*3 を認めており、血漿中 candesartan 濃度は、高齢高血圧患者群 ($n=6$ 、年齢：67.2±1.7 (65-70) 歳) に比べ

投与後 6 時間以降高値を示した。Candesartan の血漿中濃度推移から算出した薬物動態学的パラメータのうち、CLoral は本症例において高齢高血圧患者群に比べ 1/2 倍低値を示した。一方 AUC および MRT はいずれも 2.5 倍高値であった。また消失半減期は本症例では 14.3 時間と高齢高血圧患者群 (5.46 時間) に比べて 2.6 倍の延長を示した。非活性代謝物である M-2 の血漿中濃度は、本症例と高齢高血圧患者群との間で有意な差異は認められなかった。CYP2C9*3 の allele を有する患者においては candesartan の薬物動態とともに降圧効果も変化することが認められた。

(3) CYP2C19 genotyping の内訳は homEM7 名、hetEM16 名、PM6 名であった。CYP2D6 genotyping の内訳は EM16 名、IM3 名であった。2 年間の追跡期間において調査を行なった患者における服用薬剤数は 12±9 剤であった。有害反応発生の内訳は CYP2C19 では homEM7 名中 3 名、hetEM16 名中 6 名、PM6 名中 3 名、CYP2D6 では EM16 名中 8 名、IM3 名中 1 名に認められた。薬物代謝酵素と関連した有害反応は CYP2C19 では diazepam による日中の眠気・幻暈、CYP2D6 では risperidon による薬剤性 Parkinsonism、haloperidol による歩行障害であった。各群間の有害反応の発生に有意差は認められなかった。

(4) ドナープローブの塩基数を一定 (20mer) とし、アクセプタープローブの長さ (塩基数) を変えた。一方 (ドナープローブ) の長さを 20 mer 以上に保つことで、配列に対する特異性を維持した。相補的な配列と SNP が存在する場合で、アクセプタープローブの長さが 20, 15, 12 mer のとき、 T_m の差はそれぞれ 7, 10, 12 °C であった。また、SNP のある 12 mer の T_m は 35°C

であった。

今回の検討では、最適なプローブの長さは、12 から 15mer 程度であった。

プローブの長さ（塩基数）が短くなるほど、ハイブリダイズ部位の塩基組成が、野生型と変異型の T_m 値の差に影響を与える可能性が大きくなる。

（5）下記のアンケートを配布し、調査を行っている。

問 1. 貴施設において薬物の体内動態や反応性に関連する酵素・受容体・輸送担体などの遺伝子変異についての解析を行ったことがありますか。

問 2. 貴施設において倫理委員会はありますか。

問 3. 解析を行った主体（個人・部署）はどこですか。

問 4. 解析を行った遺伝子はなんですか。

問 5. 今後、薬物の体内動態や反応性に関連する酵素・受容体・輸送担体などの遺伝子変異についての解析（外部依頼を含む）を行いたいと思いますか。

問 6. 貴施設において現在までに解析を行わなかった理由はなんですか。

D. 考察

本研究は薬物治療が主たる治療手段となる高齢者において、薬物代謝酵素遺伝子多型情報が薬効を予測する有用であり、薬物有害反応、薬物相互作用を回避する上で必要であることが示された。さらに、この遺伝子多型情報を利用することにより、薬物治療の個別化が図られ、不必要な投与量、投与計画が減少し、医療経済的にも有用となるであろう。

PPI を用いた *H. pylori* の除菌療法は CYP2C19 の遺伝子多型の影響を受け、さらに

CAM 耐性の有無の影響を受けたが、さらに CAM 耐性菌においては加齢の影響を受けることが示唆された。特にこれまでの報告では耐性菌の場合では *hetEM* では除菌率は低かったが、高齢者に限れば高い除菌率が期待できることが示唆された。今回の検討では CYP2C19 の *hetEM* では高齢者では CAM の耐性に関わらず除菌に成功しており、高齢者では *hetEM* でも PPI が十分に効果が発揮される血中濃度に達している可能性がある。その理由としては、PPI は CYP2C19 で代謝されるとともに CYP3A4 でも一部代謝されるが、この CYP3A4 の活性は加齢とともに低下することが知られている。また、PPI と CAM には相互作用が働くことは以前に報告したが、CAM は CYP3A4 の加齢による活性の低下に伴い、ますますその代謝に CYP2C19 に依存するようになり、それは PPI の代謝をより阻害する事になると推察される。

現在、実際の医療現場で、高齢者における CYP 遺伝子多型と薬物有害反応との関連を長期にわたって科学的に追跡調査した報告はほとんどない。今回の 2 年間の追跡調査においては、追跡期間における服用薬剤数は平均 12 剤と非常に多く、CYP の基質となる薬物とその阻害剤との併用によって有害反応が発生した例も認められた。また、有害反応出現者の多くは複数の薬剤で有害反応を経験していた。多くの患者が有害反応を経験しているものの、今回の結果では遺伝子多型と有害反応との明確な関連は見出せなかった。その原因として、追跡調査を行なった PM に対して必ずしもその基質として知られている薬物が投与されていないことが、追跡調査を行なった PM の症例数が少なかったことなどが考えられた。

服用薬剤数の多い高齢者に対しては薬物相互作用に十分注意を払い、可能であれば CYP 遺伝子多型検査を行なうシステムを構築し、薬物有害反応の発生に注意する必要がある。

E. 結論

本研究により、高齢者における遺伝子多型情報が *H.pylori* 除菌療法、並びにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬による高血圧治療に有用性であることが明らかになった。さらに、投与薬剤数の多い高齢者に対して、CYP 遺伝子多型情報は薬物相互作用、薬物有害反応を防止するために有用であり、今後遺伝子多型情報を活用するシステム構築が求められる。

参考文献

1. Furuta T, Ohashi K, Kamata T, Takashima M, Kosuge K, Kawasaki T, Hanai H, Kubota T, Ishizaki T, Kaneko E. Effect of genetic differences in omeprazole metabolism on cure rates for *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer. *Ann Intern Med* 1998; 129: 1027-30.
2. Furuta T, Ohashi K, Kosuge K, Zhao XJ, Takashima M, Kimura M, Nishimoto M, Hanai H, Kaneko E, Ishizaki T. CYP2C19 genotype status and effect of omeprazole on intragastric pH in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 552-61.
3. Furuta T, Takashima M, Shirai N, Xiao F, Hanai H, Ohashi H, Ishizaki T. Cure of refractory duodenal ulcer and infection caused by *Helicobacter pylori* by high doses of omeprazole and amoxicillin in a homozygous CYP2C19 extensive metabolizer patient. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67:683-8.
4. Furuta T, Shirai N, Takashima M, Xiao F, Hanai H, Nakagawa K, Sugimura H, Ohashi K, Ishizaki T. Effects of genotypic differences in CYP2C19 status on cure rates for *Helicobacter pylori* infection by dual therapy with rabeprazole plus amoxicillin. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 341-8.
5. Furuta T, Shirai N, Xiao F, Ohashi K, Ishizaki T. Effect of high-dose lansoprazole on intragastric pH in subjects who are homozygous extensive metabolizers of cytochrome P450 2C19. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70: 484-92.
6. Shirai N, Furuta T, Moriyama Y, Okochi H, Kobayashi K, Takashima M, Xiao F, Kosuge K, Nakagawa K, Hanai H, Chiba K, Ohashi K, Ishizaki T. Effects of CYP2C19 genotypic differences in the metabolism of omeprazole and rabeprazole on intragastric pH. *Aliment Pharmacol Ther* 2001, 15: 1929-1937.
7. Tsuji A, Koshimoto H, Sato Y, Hirano M, Seilida Y, Kondo S, et al. Direct observation of specific messenger RNA in a single living cell under a fluorescence microscope. *Biophysical Journal* 2000;78:3260-74.

研究協力者

古田 隆久 浜松医科大学医学部助手
白井 直人 浜松医科大学医学部大学院
小菅 和仁 浜松医科大学医学部助手
西尾信一郎 浜松医科大学医学部大学院
内田 真也 浜松医科大学薬剤部
辻 明彦 浜松ホトニクス (株)
渥美 哲至 聖隷浜松病院副院長

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Ohashi K, Shirai N, Furuta T, Ishizaki T. Effect of lansoprazole and famotidine on daytime and nocturnal gastric pH in CYP2C19 genotype. 103rd meeting of American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Atlanta, March 27, 2002
- 2) 内田真也、渡辺裕司、山崎慶介、林秀晴、大橋京一、橋本久邦：カンデサルタン投与により低血圧を示した CYP2C9 遺伝子変異 (*1/*3) 患者における薬物動態、第 22 回日本臨床薬理学会、横浜、2001 年 12 月 15 日
- 3) 辻大樹、渥美位知子、夏目有希子、鈴木千恵子、大貫よし子、堀雅博、生田孝、大橋寿彦、清水貴子、渥美哲至、山田浩、大橋京一：薬剤部における薬物有害反応や薬効低下への対応：チトクローム P450 遺伝多型性検査の導入について。第 22 回日本臨床薬理学会年会、横浜、2001 年 12 月 14-15 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

遺伝子多型情報の臨床的有用性の検討
分担研究者 渡辺裕司、浜松医科大学医学部助教授

研究要旨：薬物代謝酵素をはじめ薬物輸送担体や薬物受容体の遺伝子に多型性が存在し、薬物体内動態や薬物作用の個体間変動の大きな要因となることが明らかとなっている。本研究では薬物有害反応の情報より、高齢高血圧患者の薬物代謝酵素の遺伝子解析とともに、薬物動態を解析した。高齢者において適正な薬物治療を実践するうえで遺伝子多型情報の臨床的有用性は高く、薬物有害反応の原因解明にも大きく寄与することが示唆された。

A. 研究目的

Candesartan はアンジオテンシンⅡのタイプ 1 受容体に選択的な拮抗薬であり臨床において高齢者高血圧症治療薬として広く用いられる。Candesartan はそのプロドラッグである candesartan cilexetil として投与され、小腸のカルボキシエステラーゼによって candesartan に代謝され作用を発揮する。さらに candesartan は肝臓のチトクローム P450 (CYP) 2C9 で代謝される¹⁾。CYP2C9 には遺伝的多型が存在する²⁾ことから、CYP2C9 の遺伝子変異を有する患者に candesartan を投与した場合、本剤の消失が遅延し予期せぬ有害作用が発現する可能性がある。本研究では、candesartan 投与後に過度の降圧を示した患者において、CYP2C9 遺伝子多型および candesartan の薬物動態を検討した。

B. 研究方法

症例は 89 歳の男性で、高血圧および心不全 (NYHA 心機能分類Ⅱ度) のため benidipine, doxazosin, spironolacton および furosemide の投与を受けていた。身長は 153 cm、体重は 57.1 kg、脈拍は 68 /min、血圧は 190/82 mmHg であった。また GOT と GPT はそれぞれ 17 と 13 IU/L、クレアチニンクリアランスは 79.7 ml/min と肝および腎機能は正常であ

った。

高血圧症に対し benidipine および doxazosin を投与していたが血圧コントロール不良 (BP 190/82 mmHg) のため、さらに candesartan (4 mg) を追加投与した。Candesartan 初回投与 1 および 2 時間後に、血圧はそれぞれ 146/70 mmHg および 142/70 mmHg といずれも投与前に比べ低下した。しかし、めまいやふらつき感等の自覚症状は認めなかったため candesartan の投与 (1 日 1 回朝食後) を継続した。Candesartan 投与後 2 日目より、服用して約 1 時間にふらつき感とめまいが出現し、さらにその翌日にも candesartan 服用後約 1 時間で前日と同様のふらつき感とめまいを強く自覚した。Candesartan の投与 4 日目において、candesartan を服用せず来院 (15 時頃) し、その際の血圧は 124/64 mmHg であった。本症例において出現したふらつき感とめまいは candesartan 投与によるものと考え、本剤の投与を中止した。投与中止以降ふらつき感等の自覚症状は出現しなかった。

本患者より文書同意取得後、CYP2C9 の遺伝子型および candesartan の薬物動態を解析した。PCR-RFLP 法による CYP2C9 の遺伝子型判定にてヘテロ型の遺伝子変異 (*1/*3) が認められた。

薬物動態については、candesartan (4 mg) 試験投与後 2, 4, 6, 8, 10, 12 および 24 時間において採血を行った。血漿中 candesartan 濃度は HPLC 法により測定した。薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) と平均滞留時間 (MRT) は非コンパートメント解析法により算出し、経口クリアランス (CLoral) は投与量/AUC により求めた。薬物動態については、candesartan (4 mg) 試験投与後 2, 4, 6, 8, 10, 12 および 24 時間において採血を行った。血漿中 candesartan 濃度は HPLC 法により測定した。薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) と平均滞留時間 (MRT) は非コンパートメント解析法により算出し、経口クリアランス (CLoral) は

高血圧患者群 (5.46 時間) に比べて 2.6 倍の延長を示した。非活性代謝物である M-2 の血漿中濃度は、本症例と高齢高血圧患者群との間で有意な差異は認められなかった。

D. 考察

本症例は CYP2C9*1/*3 を有しており candesartan の投与により、投与 2 日目よりめまい等の症状が出現した。4 日目の受診時における血圧 (124/64 mmHg) は、candesartan の最終服用後約 30 時間経過していたにもかかわらず、投与前の血圧 (190/82 mmHg) に比べかなり低下していた。さらに本症例における candesartan の血漿中濃度は高齢高血圧患

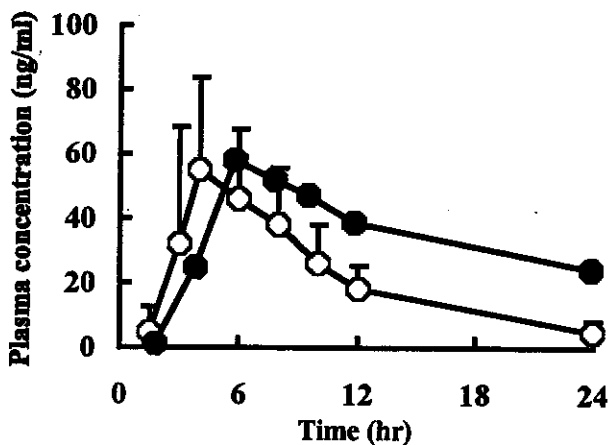


Fig. 本症例および高齢高血圧患者における candesartan (4 mg) 服用後の血漿中濃度推移。●は本症例、○は高齢高血圧患者群 (n=6、年齢: 67.2 (65-70) 歳)。

Table 本症例および高齢高血圧患者における candesartan の薬物動態学的パラメータ

Pharmacokinetic parameters	本症例	高齢高血圧患者
CLoral (mL/kg/hr)	52.6	109
MRT (hr)	27.8	11.2
AUC (hr · ng/ml)	1382	549

CLoral: oral clearance, AUC: area under concentration vs time curve, MRT: mean residence time

投与量/AUC により求めた。

C. 研究結果

本症例における血漿中 candesartan 濃度は、高齢高血圧患者群 (n=6、年齢: 67.2±1.7 (65-70) 歳) に比べ投与後 6 時間以降高値を示した (Fig.)。Candesartan の血漿中濃度推移から算出した薬物動態学的パラメータのうち、CLoral は本症例において高齢高血圧患者群に比べ 1/2 倍低値を示した。一方 AUC および MRT はいずれも 2.5 倍高値であった (Table)。また消失半減期は本症例では 14.3 時間と高齢

者群に比べ著しく高値を示した。本症例の肝および腎機能は正常であった。また慢性心不全患者においても candesartan の薬物動態は変化しないことが報告されている³⁾。以上のことから本症例において、candesartan 投与 2 日目より認められためまいやふらつき感といった症状は、CYP2C9 遺伝子変異 (*1/*3) により candesartan の血漿中濃度が上昇し過度の降圧が生じたことに起因するものと推測された。薬物有害作用の原因究明時にも遺伝子多型情報は、きわめて重要であり、高齢者において適正な薬物治療を实践するうえで臨床的有用

性は高い事が示唆された。

文献

- 1) McClellan, K.J., Goa, K.L.: Candesartan cilexetil. A review of its use in essential hypertension. *Drugs*. 56:847-69 (1998)
- 2) Nasu K, Kubota, T, Ishizaki, T.: Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics*. 7:405-9 (1997)
- 3) 安保泰宏、森 紳、横井博厚ほか：慢性腎不全患者における Candesartan Cilexetil(TCV-116)の薬物動態の検討。新薬と臨床, 45:1662-8 (1996)

研究協力者

内田 真也 浜松医科大学薬剤部

E. 学会発表

内田真也、渡辺裕司、山崎慶介、林秀晴、大橋京一、橋本久邦：カンデサルタン投与により低血圧を示した CYP2C9 遺伝子変異 (*1/*3) 患者における薬物動態、第 22 回日本臨床薬理学会、横浜、2001 年 12 月 14 日

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢者の薬物治療における薬物代謝酵素遺伝多型情報のシステム化に関する研究

分担研究者 山田 浩 浜松医科大学附属病院治験管理センター

研究要旨：高齢者における cytochrome P450 (CYP) 遺伝子多型と薬物有害反応との関連を調べるため、CYP2C19 および CYP2D6 の genotyping を施行した高齢者 33 名を対象とし、服用薬剤および薬物有害反応について 2 年間追跡調査を行なった。追跡期間における服用薬剤数は平均 12 剤と非常に多く、CYP の基質となる薬物とその阻害剤との併用による有害反応発生例も認められた。また、有害反応出現者の多くは複数の薬剤で有害反応を経験していた。服用薬剤数の多い高齢者に対しては薬物相互作用に十分注意を払い、可能であれば CYP genotyping を行なうシステムを構築し、薬物有害反応の発生に注意しながら経過観察していく必要がある。

A. 研究目的

薬物代謝に関与する cytochrome P450 (CYP) 酵素系には遺伝子多型が存在し、薬物投与後の体内薬物動態への影響や薬効、薬物有害反応の発現に個人差が生じることが知られている。特に高齢者では、肝腎機能の低下や多くの疾患の合併による複数薬剤の服用により、薬物有害反応が出現しやすく、CYP 遺伝子多型の影響が問題となる可能性が推測される。今回我々は、高齢者における CYP 遺伝子多型と薬物有害反応との関連を調べるため、CYP 遺伝子多型検査 (genotyping) を実施した高齢者を対象に追跡調査を行なった。

B. 研究方法

1997 年 12 月から 1999 年 1 月までの期間に CYP2C19 および CYP2D6 の genotyping を行な

った当院通院中の高齢者 33 名（年齢：66±16 歳（平均±S.D.）男性 12 名、女性 21 名）を対象とした。CYP2C19 の genotyping は PCR 法および PCR-RFLP 法にて行ない Homo-EM (*1/*1)、Hetero-EM (*1/*2、*1/*3)、PM (*2/*2、*3/*3) に分類した。一方、CYP2D6 の genotyping は PCR 法にて行ない同様に EM (*1/*1、*1/*10、*2/*10)、IM (*10/*10、*5/*10) に分類した。追跡期間は genotyping 実施日より 2 年間とし、追跡期間中に受診した全ての科における服用薬剤および薬物有害反応についてカルテ調査を行なった。また、転院、転居などの諸事情により当院にて追跡不能であったものに関しては、転院先の主治医への質問用紙の郵送あるいは患者への電話により有害反応発現の有無を確認した。

(倫理面への配慮)

CYP genotyping の実施においては院内倫理委員会の承認を受けており、事前に患者からは文書による同意を得た。また被験者のプライバシーは十分に配慮し、情報の匿名化を行ない、個人情報外部に漏洩しない様、セキュリティを高め施行した。

C. 研究成果

CYP2C19 genotyping の内訳は Homo-EM7 名、Hetero-EM16 名、PM6 名であった。CYP2D6 genotyping の内訳は EM16 名、IM3 名であった。2 年間の追跡期間において調査を行なった患者における服用薬剤数は 12±9 剤であった。有害反応発生の内訳は CYP2C19 では Homo-EM7 名中 3 名、Hetero-EM16 名中 6 名、PM6 名中 3 名、CYP2D6 では EM16 名中 8 名、IM3 名中 1 名に認められた。薬物代謝酵素と関連した有害反応は CYP2C19 では diazepam による日中の眠気・幻暈、CYP2D6 では risperidon による薬剤性 Parkinsonism、haloperidol による歩行障害であった。各群間の有害反応の発生に有意差は認められなかった。

D. 考察

現在、実際の医療現場で、高齢者における CYP 遺伝子多型と薬物有害反応との関連を長期にわたって科学的に追跡調査した報告はほとんどない。今回の 2 年間の追跡調査においては、追跡期間における服用薬剤数は平均 12 剤と非常に多く、CYP の基質となる薬物とその阻害剤との併用によって有害反応が発生した例も認められた。また、有害反応出現者の多くは複数の薬剤で有害反応を経験していた。

多くの患者が有害反応を経験しているもの

の、今回の結果では遺伝子多型と有害反応との明確な関連は見出せなかった。その原因として、追跡調査を行なった Poor Metabolizer に対して必ずしもその基質として知られている薬物が投与されていなかったこと、追跡調査を行なった Poor Metabolizer の症例数が少なかったことなどが考えられた。

E. 結論

服用薬剤数の多い高齢者に対しては薬物相互作用に十分注意を払い、可能であれば CYP genotyping を行なうシステムを構築し、薬物有害反応の発生に注意しながら経過観察していく必要がある。

F. 健康危険情報

今回の追跡調査自体における健康危険情報として問題となる事象は、全く現れていない。

G. 研究発表

学会発表

- 辻大樹、渥美位知子、夏目有希子、鈴木千恵子、大貫よし子、堀雅博、生田孝、大橋寿彦、清水貴子、渥美哲至、山田浩、大橋京一：薬剤部における薬物有害反応や薬効低下への対応：チトクローム P450 遺伝多型性検査の導入について。第 22 回日本臨床薬理学会年会、横浜、2001 年 12 月 14-15 日

研究協力者

渥美哲至 聖隷浜松病院副院長

西尾信一郎 浜松医科大学大学院

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

FRET を利用した微量 DNA 検体での SNP 測定

分担研究者 平松 光夫 浜松ホトニクス（株）中央研究所室長代理

研究要旨：蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法は従来の PCR による方法に比し手間が少なく、迅速に SNP 測定が可能になり、臨床現場での利用が期待される。我々は既に、2種類の蛍光色素標識オリゴヌクレオチドを標的 mRNA にハイブリダイズさせたときに生じる FRET を測定することにより生細胞 mRNA の検出に成功しているが、この方法を応用し、微量の採取した血液を検体として迅速に SNP の判定を行なうことが可能か否かの検討を行った。

A. 研究目的

薬物の代謝に関わる酵素群には、遺伝子多型が知られ、その変異パターンは薬物の血中濃度に影響を与える。特に老年者は若年者と異なり、分布容積、体内水分量、腎機能、肝機能などが変化していることから、遺伝子多型による影響がより強く現れる懸念がある。

臨床現場に遺伝子多型の原因の一つである SNP の迅速測定法を提供することは、薬物治療のために重要な情報を提供できることになると考えられる。

B. 研究方法

対象試料として代表的な薬物代謝酵素である CYP2C19 を選択した。その SNP の部位を含む配列 *1,*2,*3 の領域をそれぞれ2つに分割し、それぞれに相補的な塩基配列を持つ蛍光標識オリゴヌクレオチドを作成した。これら2種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドと標的 DNA を溶液中で混合したときの蛍光ス

ペクトル変化を測定した。3者によるハイブリッドが形成されると蛍光色素間で FRET が起こり、蛍光スペクトルが変化する。SNP により、標的 DNA の塩基配列とプローブの塩基配列にミスマッチがある場合は、これらで形成されるハイブリッドの融解温度（ T_m 値）は低下する。これは標的 DNA にオリゴヌクレオチドプローブが結合する比率の低下を招き、結果として蛍光スペクトル変化が小さくなる。

1) T_m 値の検討

標的 DNA が野生型である場合と変異型である場合で、オリゴヌクレオチドプローブの T_m 値が異なることが予想される。この T_m 値の差を、検査室で日常に用いられている温度である 37 度付近に設定することが望ましい。プローブの長さ（塩基数）と野生型、変異型それぞれに対する T_m 値との相関を検討するため、260 nm の吸収値および蛍光スペクトル測定により融解曲線の測定を行ない、それ

それより T_m 値を求めた。

2) 検出感度の向上

微量の試料で蛍光スペクトル変化を精度よく検出するため、現在専用機器の作成に取り組んでいる。

C. 研究結果

ドナープローブの塩基数を一定 (20mer) とし、アクセプタープローブの長さ (塩基数) を変えた。一方 (ドナープローブ) の長さを 20mer 以上に保つことで、配列に対する特異性を維持した。相補的な配列と SNP が存在する場合で、アクセプタープローブの長さが 20, 15, 12mer のとき、 T_m の差はそれぞれ 7, 10, 12 °C であった。また、SNP のある 12mer の T_m は 35°C であった。

D. 考察

15mer 前後のプローブによる検出は、 T_m 値の低下と SNP の影響を適度に大きくすることが可能になり、相補的な配列が完全に一致した場合と一つの SNP が存在する場合での T_m の差が広がることが確認された。プローブの塩基数を減少させることにより T_m への SNP の影響が大きくなることは、SNP の検出に有利に働くと考えられる。

E. 結論

今回の検討では、最適なプローブの長さは、12 から 15mer 程度であった。

プローブの長さ (塩基数) が短くなるほど、ハイブリダイズ部位の塩基組成が、野生型と変異型の T_m 値の差に影響を与える可能性が大きくなる。今後、これらの検討を行い、最終的に最適な塩基数を決定する。その後、複

数の種類の蛍光色素を同時に使用し、複数の SNP 部位の同時測定の実験に入る。

参考文献

- 1) Tsuji A, Koshimoto H, Sato Y, Hirano M, Sei-Iida Y, Kondo S, et al. Direct observation of specific messenger RNA in a single living cell under a fluorescence microscope. *Biophysical Journal* 2000;78:3260-74.

研究協力者

小菅 和仁 浜松医科大学助手
辻 明彦 浜松ホトニクス (株)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

遺伝子多型情報のシステム化

分担研究者 橋本 久邦 浜松医科大学医学部教授

研究要旨：近年、薬物の代謝酵素、輸送担体や受容体などに遺伝子多型が存在し薬物動態及び反応性に影響を及ぼし、薬物治療における個体間変動の一因となることが明らかとなってきた。本研究では、臨床現場において薬物の体内動態や反応性に関連する遺伝子の情報を効果的に利用するシステムを構築することを目的に、これらの遺伝子検査の実施状況に関して調査を実施した。本アンケートおよび今後の調査の結果により、薬物の体内動態や反応性に関連する遺伝子情報の有用性および問題点について明らかにし、これらの遺伝子情報を効果的に利用できるシステムを提示する。

A.研究目的

近年、薬物の代謝酵素、輸送担体、受容体などに遺伝子多型が存在し薬物動態及び反応性に影響を及ぼすことが明らかとなってきた。さらにこれらの遺伝子の多型性が薬物治療における個体間変動の一因となることが知られている。これらの遺伝子の情報は患者個々の薬物治療を決定する過程において大変重要なものと予想されるが、現時点ではこれらの遺伝子情報はほとんど利用されていない。本研究では、臨床現場において薬物の体内動態や反応性に関連する遺伝子情報の利用についての現状の把握を行い、さらに利用する際の有用性と問題点を明らかにすることにより、これらの遺伝子情報を効果的に利用するシステムを構築することを目的とする。

B.研究方法

日本内科学会認定教育施設（431施設）の薬剤部（科）を対象に以下のアンケートを送

付した。

「薬物の体内動態及び反応性に関連する遺伝子検査の実施に関するアンケート」

問1. 貴施設において薬物の体内動態や反応性に関連する酵素・受容体・輸送担体などの遺伝子変異についての解析を行ったことがありますか。（①ある、②ない、③検体採取のみ行い検査は外部に依頼した）

問2. 貴施設において倫理委員会はありますか。（①ある、②ない）

問1で「①ある」あるいは「③検体採取のみ行い検査は外部に依頼した」とお答えになった御施設にお聞きします。

問3. 解析を行った主体（個人・部署）はどこですか。（①薬剤科・部、②医師・医局、③検査科・部、④その他）

問4. 解析を行った遺伝子はなんですか（複数回答可）（①代謝酵素（CYP）、②代謝酵素（CYP以外）、③薬物輸送担体（P糖蛋白質）、④薬物輸送担体（P糖蛋白質以外）、⑤

薬物受容体、⑥その他、⑦不明)

問1で「①ない」とお答えになった御施設にお聞きします。

問5. 今後、薬物の体内動態や反応性に関連する酵素・受容体・輸送担体などの遺伝子変異についての解析（外部依頼を含む）を行いたいと思いますか。（①行う予定である、②予定はないが行いたい、③行いたいと思わない）

問6. 貴施設において現在までに解析を行わなかった理由はなんですか。（複数回答可）

（①必要でない、②臨床的な意義が現時点でははっきりしていない、③解析方法の問題（解析の手技がない、解析に手間がかかる、など）、④費用がかかる、⑤同意取得の問題、⑥遺伝情報の管理の問題、⑦遺伝子変異について知らない、⑧その他）

C. 予想される結果および今後の方針

アンケートにより薬物の体内動態及び反応性に関連する遺伝子検査の実施状況を明らかにする。本アンケートで遺伝子解析を行っているとの回答を得た施設を対象に、これらの遺伝子情報を利用する際の有用性と問題点に関してさらに詳細な調査を行う。それらの結果より、薬物の体内動態や反応性に関連する遺伝子情報の有用性および問題点について明らかにし、これらの遺伝子情報を効果的に利用できるシステムを提示する。

研究協力者

内田 真也 浜松医科大学薬剤部

