

2004-00581B

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

ミトコンドリア DNA 遺伝子変異による
高頻度薬剤性難聴発症の回避に関する研究

平成15年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 水柿 道直

平成17（2005）年4月

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

ミトコンドリア DNA 遺伝子変異による
高頻度薬剤性難聴発症の回避に関する研究

平成15年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 水柿 道直

平成17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告		
ミトコンドリアDNA遺伝子変異による高頻度薬剤性難聴発症 の回避に関する研究	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	9
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	10

ミトコンドリアDNA遺伝子変異による高頻度薬剤性難聴発症の回避に関する研究

主任研究者 水柿 道直 東北薬科大学教授

研究要旨

アミノグリコシド系抗生物質の標準用量投与にもかかわらず不可逆的感音性難聴を誘発する患者群がある。本研究は、その原因遺伝子の一つであるミトコンドリア DNA(mtDNA)の A1555G 変異を簡易迅速に遺伝子診断する系及び既存のアミノグリコシド系抗生物質の毒性をスクリーニングする細胞評価系を確立し、感覚器障害研究の成果を効果的かつ安全な薬物療法に応用することを目的として立案した。

感音性難聴患者及びボランティア患者検体 750 名分より mtDNA A1555G 変異を有する検体をスクリーニングし、変異を有する 5 名の患者を見いだした。次に、その患者検体を用い、診療現場やベッドサイドで簡易、迅速、精確、低コストで mtDNA A1555G 変異の同定が可能な遺伝子診断法を構築した。検出に用いるプライマー配列や反応条件の検討により、PCR 終了後、約 5 分で mtDNA A1555G 変異の検出が可能なイムノクロマトグラフィー遺伝子診断法の確立に成功した。また、同法は煩雑な抽出操作を必要とする末梢血から抽出した DNA だけでなく、乾燥ろ紙(Isocode カード)や血液直接 PCR 試薬(Ampdirect)を利用することで、DNA 精製の操作なしで診断可能であった。さらに、短時間型高速サーマルサイクラー(RapidCycler2 及び iNDY)を利用することで DNA 増幅時間を約 40 分に短縮することに成功し、遺伝子診断に要する時間をトータルで 1 時間程度に短縮することができた。同法の再現性も確認され、特殊な技術や知識を要することなく簡易迅速に mtDNA A1555G 変異を同定する遺伝子診断法が確立できた。

次に、mtDNA 1555A 型(野生型)を有する人からリンパ球を分画し、EB ウィルスを感染させることにより安定したリンパ芽球細胞株の樹立に成功した。また最近、mtDNA 1555G 型(変異型)を有する患者からもリンパ球が提供され、安定樹立株を作製中である。当初はアミノグリコシド系抗生物質に対する細胞障害性の有無による毒性スクリーニング系を予定していたが、mtDNA 1555A 型(野生型)リンパ芽球を用いた検討により、ストレプトマイシンによる細胞死による毒性評価は困難であることが判明した。よって、現在は細胞内 ATP 産生量を指標とした毒性評価を試みている。

今後、mtDNA A1555G 遺伝子診断を臨床現場で積極的に応用することで、アミノグリコシド系抗生物質投与による聴覚障害の発生や QOL の低下を回避することが期待できる。

分担研究者： 平塚 真弘

所属機関・職名：東北薬科大学・講師

A. 研究目的

mtDNA の1555番目のA→G変異を有する人は、ストレプトマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質による不可逆的な感音性難聴の副作用を高頻度で発現することが報告されている。したがって、薬物療法を行う前にmtDNAの遺伝子情報を迅速に得ることにより、このような不幸な副作用を回避することが可能になると考えられる。しかし現在、臨床現場において、患者個々における副作用発現を予測するために遺伝子診断を行い、適正な個別薬物療法を実施している施設はほとんどない。この原因としては、臨床レベルで対応できるだけの簡易、迅速、低コスト、精確な遺伝子診断法が開発されていないことがその一因と言える。そこで本研究では、mtDNA のA1555G変異を、ベッドサイドや診療現場で簡易に検出できる系を開発し、外来患者の遺伝子診断に対応できるシステムを構築することを目的とする(平成15年度実施)。また、mtDNA A1555G変異を有する患者における感音性難聴発症の原因薬物としてはストレプトマイシン、ゲンタマイシン、イセパマイシンが同定されているが、アミカシンをはじめとする他のアミノグリコシド系抗生物質の関与は報告がない。mtDNA A1555G変異を有する患者のリンパ芽球を樹立することで、様々な薬物の副作用発現の可能性を予測できるスクリーニング系の構築が期待できる(平成16年度実施)。これらの検討を行うことにより、感覚器

障害研究の成果を効果的かつより安全な薬物療法に応用することを目的とした。

B. 研究方法

1) イムノクロマトグラフィーを利用したベッドサイド遺伝子診断法の開発

感音性難聴患者及びボランティア患者(疾患名は連結不可能匿名化のため不明)検体計750検体より、mtDNA A1555G変異を有する検体を、以前報告者らが開発したAllele-Specific Real-Time PCR法を用いて、ハイスループットスクリーニングした。次に、ここで得られたmtDNA A1555G変異を有する検体を陽性対象として、PCR法とイムノクロマトグラフィー法を組み合わせた遺伝子診断法を構築した。つまり、図1に示すように、変異部位が3'端になるような野生型対立遺伝子増幅プライマーあるいは変異型対立遺伝子増幅プライマー及び両方の遺伝子を増幅する共通プライマーをそれぞれ設計した。その際に対立遺伝子特異的プライマーの3'端から-2位に位置に人為的なミスマッチを導入し、プライマーの特異性を向上させた。次に2本のPCRチューブ中で、それぞれのプライマーを用いた対立遺伝子特異的遺伝子増幅を行った。その際に共通プライマーの5'端をビオチン(B)でラベルし、反応系にはジゴキシゲニン(DIG)-dUTPを取り込ませた。鋳型DNAとプライマー配列が一致すればPCR産物が増幅され、その産物はBとDIGのダブルラベル化体となる(図2)。反応系は図3に示した。次に得られた反応物をDNA検出テストストリップ(ロシュダイアグノス

ティクス、#1-965-484) (図4)に5 μ Lスポットし、キット付属の Buffer で展開した。ストリップ上には、金コロイドラベルされた抗 DIG 抗体が塗布されたパッドとストレプトアビジンが塗布されたラインが存在し、PCR 産物が増幅されていれば紫色の金コロイド凝集バンドが形成され、遺伝子型を視覚的に判別することができる(図5)。また、総合的な検出時間の短縮を図るため、血液を特殊な乾燥ろ紙血 (Isocode カード) に滴下し乾燥後、その小片 (穴空けパンチを使用) をマイクロチューブに移し、ミリ Q 水を加え、100 $^{\circ}$ Cで 5 分間煮沸し、その上清を用いることで直接 DNA 増幅を検討した。

H ₂ O	14.5 (μ L)
10x Ex Taq Buffer (TaKaRa)	2.0
PCR DIG Labeling Mix (Roche)	2.0
10 μ M Allele-specific primer (wt or mt)	0.2
10 μ M Common primer (Biotin-labeled)	0.2
Ex Taq (TaKaRa)	0.1
DNA (10-30 ng/ μ L)	1.0
<hr/>	
	20.0

↓

95 $^{\circ}$ C	5 min	
95 $^{\circ}$ C	30 sec	25 cycles
55 $^{\circ}$ C	10 sec	
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	7 min	

図3. 反応条件

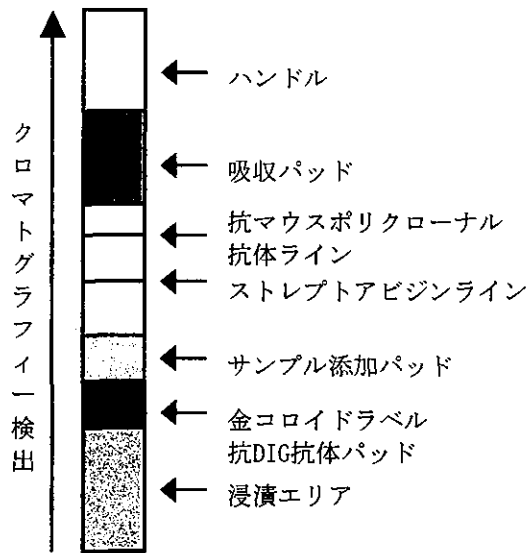


図4. DNA検出ストリップの構造

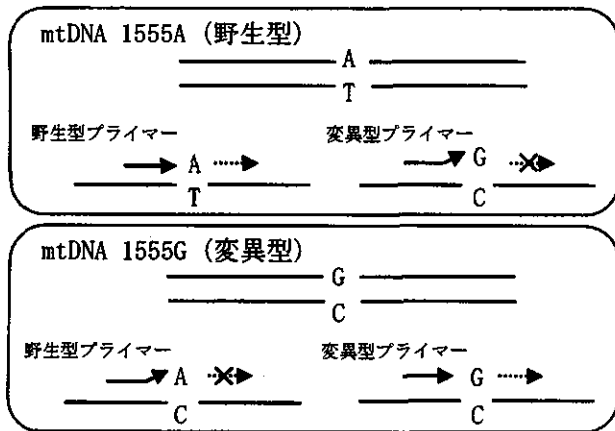


図1. 対立遺伝子特異的PCR

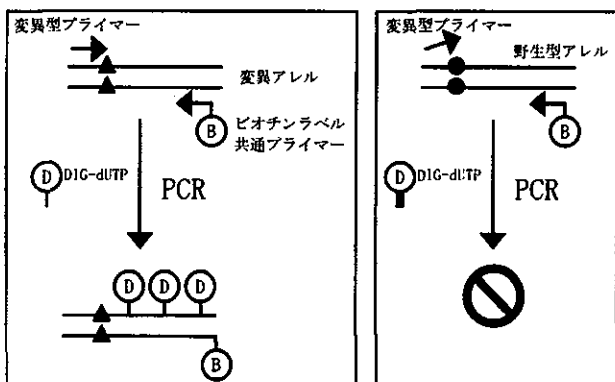


図2. ダブルラベル化PCR

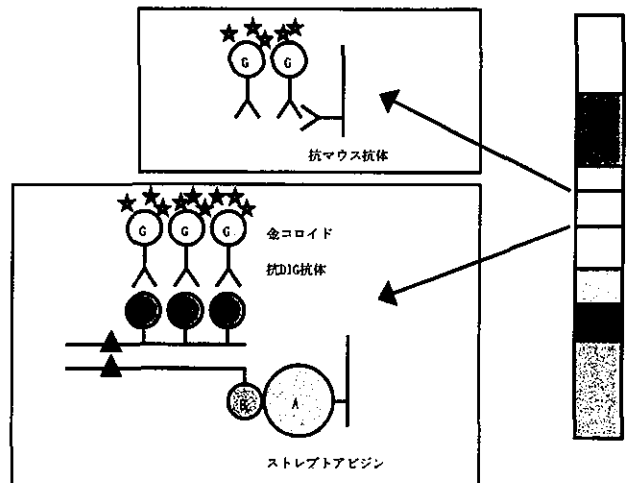


図5. DNA検出ストリップ上でのバンドの形成

2) mtDNA A1555G 変異検出のためのベッドサイド遺伝子診断法の開発: 診断時間の短縮化検討

DNA 精製に費やす時間(約 1 時間)を短縮するため、島津製作所製 Ampdirect を用い、血液からの直接 PCR を行った。Ampdirect は 5x 濃度の試薬を PCR Buffer の代わりに添加した。次に、これまでブロックタイプのサーマルサイクラーを用いて PCR 増幅を行ってきたが、最近市販された高速サーマルサイクラー Rapidcycler2 及び iNDY(アイダホテクノロジー社)を用いて、PCR 増幅時間の短縮を図った。PCR 反応液は前年次に確立したプロトコール通りとし、アニーリング温度や時間を調節することにより、最適な PCR 反応時間を決定した。

3) mtDNA A1555G リンパ芽球の樹立とアミノグリコシド系抗生物質の毒性スクリーニング系の構築

まず始めに、この評価系で用いる mtDNA 1555A(野生型)及び 1555G(変異型)由来のリンパ芽球の樹立を試みた。方法としては、5mL のヘパリン血を血液細胞分画用リンフォプレップに重層した。遠心分離後、リンパ球層を回収し RPMI 培地を加え、再び遠心し上清を除去した。続いて、EB ウィルスを感染させ、インキュベート後、20%FBS-RPMI 培地で培養した。細胞の増殖具合を確認しながら、培地添加、培地交換を繰り返した。毒性評価は、樹立された細胞株を 24 穴プレートに 1×10^5 個/well で蒔き、ストレプトマイシンを 5~300 μ g/mL の濃度で添加し、トリパンブルー染色による生細

胞数のカウント及び MTT 法による細胞毒性を 48 時間まで観察した。

4) mtDNA A1555G 遺伝子診断の臨床応用

東北大学附属病院遺伝科において、遺伝外来(遺伝カウンセリング)を受診した患者とその子供の mtDNA A1555G 遺伝子診断を行った。

(倫理面への配慮)

今回の研究プロトコールは本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、東北薬科大学・大学院倫理委員会および東北大学医学部倫理委員会に申請・承認された同名課題「薬剤反応性遺伝子の多型性が薬効及び薬物動態に与える影響に関する研究」に従って実施された(承認済)。

(サンプルの入手と取り扱い)

今回使用したサンプルは、東北大学医学部附属病院受診の患者あるいは健常人ボランティアに対し、研究内容の十分な説明と書面による同意(インフォームドコンセント)が得られたものを用いた。説明と同意は東北大学医学部附属病院における研究協力者の医師又は薬剤師によって行われた。これらのサンプル採取に際しては、強制的な圧力がかからぬように十分留意し、完全な自由意志のもとで行われた。また、研究対象者に対する人権擁護上の配慮をするにあたり、すべてのサンプルは連結可能匿名化あるいは連結不可能匿名化を行った後、取り扱うこととし、一切の個人情報漏洩されないようにした。よって、研究対象者に

に対する不利益は生じにくいと考えられた。ただし、細心の注意を払い、研究対象者の不利益につながる行為等を回避することを前提とした。

(危険性の排除や説明と理解に関わる状況)

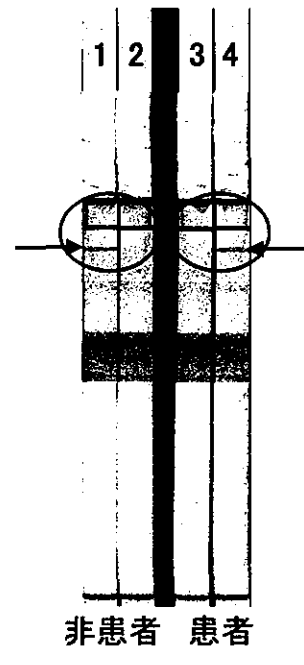
サンプル採取に際して、その対象が末梢血である場合は採血操作の熟練した医師、看護師あるいは臨床検査技師に依頼し、それに関わる事故発生の可能性を最小限にした。研究計画の説明は医師、薬剤師あるいは研究協力者が行い、患者がその主旨を完全に理解し同意した後にはじめて実施されることを確認した。

C. 研究結果

1) イムノクロマトグラフィーを利用したベッドサイド遺伝子診断法の開発

感音性難聴患者検体及びボランティア患者(疾患名は連結不可能匿名化のため不明)検体よりmtDNA A1555G変異を有する検体をスクリーニングした。その結果、mtDNA A1555G変異を有する5名の患者を見いだした。次に、その患者検体を用いPCRとイムノクロマトグラフィーを組み合わせた遺伝子診断法を構築した。上記の方法に基づき、プライマーの配列及び反応条件を検討することによって、DNA検出ストリップ上でmtDNA A1555G変異の有無を検出できる系が確立できた。つまり、ストリップを2本用意し、一方には野生型プライマーを用いた時のPCR反応液を、もう一方には変異型プライマーを用いた時のPCR反応液をアプライすることによって、個人の遺伝子型を視覚的に判別することができた(図6)。PCR後の操作か

ら、わずか5分で結果の判別が可能であった。また、通常末梢血から抽出したDNAだけでなく、乾燥ろ紙(Isocodeカード)上の血液を直接DNA増幅しても、遺伝子診断が可能であることを確認できた。



- 1, 3: 野生型プライマー
- 2, 4: 変異型プライマー

図6. DNA検出ストリップを用いた遺伝子診断結果

2) mtDNA A1555G変異検出のためのベッドサイド遺伝子診断法の開発: 診断時間の短縮化検討

スタンダードプロトコールにおいては、mtDNA A1555G変異検出までに約2~3時間を要するのに対し、血液直接PCR試薬 Ampdirectを利用した遺伝子増幅系の構築と短時間型高速サーマルサイクラーの利用により、検体採取から遺伝子型決定までを約1時間に短縮することができた。イムノクロマトグラフィ

ーによる遺伝子型の検出も精製DNAを用いた方法と同程度のバンド強度が得られた(図7)。一方、当初計画していた等温遺伝子増幅法LAMP法の利用については、遺伝子増幅は成功したが変異検出プローブのハイブリダイズの条件決定が困難であり開発を断念した。

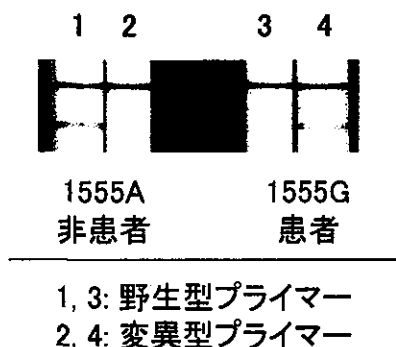


図7 血液直接PCRによるmtDNA A1555G遺伝子診断

3) mtDNA A1555Gリンパ芽球の樹立とアミノグリコシド系抗生物質の毒性スクリーニング系の構築

毒性スクリーニング系で用いるためのmtDNA 1555A(野生型)リンパ芽球株の樹立に成功した(図8)。1555G(変異型)リンパ芽球については、患者検体の入手が遅れたために(平成17年3月)、現在安定株を樹立中である。1555G(変異型)由来検体の入手が遅れた理由としては、mtDNA 1555G変異を有する患者が予想以上に少なかったことと、検体の提供を依頼していた患者の外来通院回数が極端に減少したためにインフォームドコンセントの取得が困難になったことがあげられる。

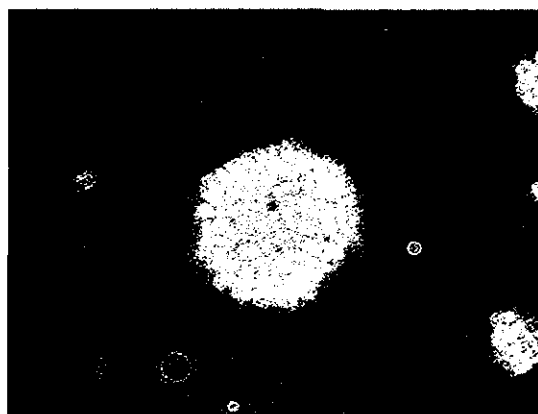


図8 mtDNA 1555A(野生型)リンパ芽球株

樹立できた mtDNA 1555A(野生型)リンパ芽球株を用いて、ストレプトマイシンに対する細胞障害性を検討したところ、5~300 μ g/mLの濃度で48時間観察したが、顕著な細胞死やMTT法による細胞障害性を確認することはできなかった。よって、今後は1555G(変異型)リンパ芽球が樹立できた時点で、毒性スクリーニングの指標を細胞内のATP産生量測定に変更する予定である。

4) mtDNA A1555G 遺伝子診断の臨床応用

実際の臨床現場でmtDNA A1555G変異を診断し、患者のmtDNA A1555G変異を特定した臨床応用を1例行った。今回は、親族に難聴患者が多いことで不安になり、相談に来た母親とその子供(二人とも難聴症状無し)のmtDNA A1555G遺伝子診断を行った。その結果、親子ともmtDNA 1555G変異型であることが判明し、副作用回避薬物カード(図9)を携帯させることにより、将来的な薬剤性難聴発症の予防に貢献できた。

副作用回避薬物カード

**診察を受ける前にこの券を医師
に見せてください**

氏名：○○ ○○殿
M.T.S.H. _____ 生

**上記の方はアミノ配糖体抗生物
質により難聴をきたす可能性が
高いと思われます。**

図9 副作用回避薬物カード

D. 考察

今回開発したDNA検出ストリップを利用した遺伝子診断法は簡便迅速であり、ゲル電気泳動等の煩雑な操作を必要としない。同法は工程的に①DNA抽出、②PCR、③ストリップ上での変異検出が必要になる。しかし、臨床の現場では、さらに短時間、精確、低コストでSNP検出できることが求められている。今回DNA抽出に関しては血液を乾燥ろ紙に滴下乾燥し、その小片を少量の水で煮沸することによりDNA源として利用することが可能であり、診断時間の大幅な短縮に成功した。今回、開発した遺伝子診断法を採用することにより、医師、看護師、薬剤師等がベッドサイドや診療現場で簡便にmtDNA A1555G変異を検出することができ、多くの施設での運用が可能であれば、薬剤性難聴によるQOLの低下を未然に防ぐことが期待できる。

また残念ながら、mtDNA A1555G変異を有

する患者からリンパ芽球を樹立し、それらの培養細胞を用いてアミノグリコシド系抗生物質毒性スクリーニング系の有用性を年度内に評価するまでは至らなかった。しかし、患者由来細胞はほぼ樹立目前であり、数ヶ月後には有用性の有無を報告できると考えている。

今後の研究課題としては、アミノグリコシド系抗生物質がどのようなメカニズムでmtDNA A1555G変異を有する人の蝸牛有毛細胞に障害を与えるのを明らかにし、難聴発症の予防や治療に応用していく必要がある。また、最近ではアミノグリコシド系抗生物質の投与歴がない人でも難聴発症が確認されており、他のリスクファクターの同定が必要と考える。

E. 結論

アミノグリコシド系抗生物質の標準的投与にもかかわらず不可逆的感音性難聴を誘発する原因遺伝子の一つであるmtDNAのA1555G変異を、ベッドサイドや診療現場で簡易迅速に検出することができる遺伝子診断法を確立した。同法はPCR法とイムノクロマトグラフィー法を組み合わせたこれまでにない方法であり、mtDNA A1555G変異の存在を簡易に視覚化することで判別を容易にした優れた方法である。操作はイメージ的に妊娠検査薬に近い。

mtDNAは母系遺伝で子孫に伝搬するため、患者一人を遺伝子診断することで多くの近親者(兄弟姉妹、子供、母親等)のmtDNA遺伝子型が予測でき、効率的に医薬品による副作用を未然に回避できると考えられる。感音性難聴の障害を有する患者の約6%が

mtDNA A1555Gを有することが報告されていることから、この遺伝子情報を早急に臨床現場で利用することが必要である。今後さらなる検討を加えることにより、mtDNA A1555G変異を有する人におけるアミノグリコシド系抗生物質投与による高頻度な不可逆的感音性難聴発現に関する有益な知見が得られ、薬害による聴覚障害の発生及びQOLの低下を回避することに大きく貢献できると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) influencing drug response by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip. Masahiro Hiratsuka, Aiko Ebisawa, Yoichi Matsubara, Shigeo Kure, Yumiko Konno, Takamitsu Sasaki, Michinao Mizugaki. Drug Metabol. Pharmacokin., 19 (4), 303-307 (2004)

2. 学会発表

1) 平塚真弘、池田勝久、佐藤利徳、小林俊光、呉繁夫、松原洋一、金野由美子、斉藤友美、水柿道直、ミトコンドリアDNA遺伝子診断によるアミノグリコシド系抗生物質由来の感音性難聴発現回避、医療薬学フォーラム2003/

第11回クリニカルファーマシーシンポジウム、広島県広島市、平成15年7月

2) 平塚真弘、海老澤愛子、松原洋一、呉繁夫、金野由美子、斉藤友美、水柿道直、血液直接PCR試薬及びSNP検出ストリップを用いた薬剤反応性遺伝子のジェノタイプング、第18回日本薬物動態学会、北海道札幌市、平成15年10月

3) 平塚真弘、オーダーメイド医療における薬剤師の役割ー遺伝子診断による副作用の回避ー、東北薬科大学同窓会札幌支部総会卒業後教育講演、北海道札幌市、平成16年9月

4) 平塚真弘、薬剤反応性予測のための遺伝子診断と個別化薬物療法への応用、遺伝子検査技術セミナー、神奈川県横浜市、平成16年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masahiro Hiratsuka, Aiko Ebisawa, Yoichi Matsubara, Shigeo Kure, Yumiko Konno, Michinao Mizugaki	Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) influencing drug response by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip	Drug Metabol. Pharmacokin.	19 (4)	303-307	(2004)

Short Communication

Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Influencing Drug Response by Competitive Allele-specific Short Oligonucleotide Hybridization (CASSOH) with Immunochromatographic Strip

Masahiro HIRATSUKA^{*,1}, Aiko EBISAWA¹, Yoichi MATSUBARA², Shigeo KURE²,
Yumiko KONNO¹, Takamitsu SASAKI¹ and Michinao MIZUGAKI¹

¹Department of Clinical Pharmaceutics, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan

²Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

Full text of this paper is available at <http://www.jssx.org>

Summary: Using competitive allele-specific oligonucleotide hybridization with immunochromatographic strip (CASSOH), we have developed a simplified method for the detection of eight polymorphisms that are especially important in the identification of drug responders or non-responders and patients at increased risk of drug toxicity. The genotyping method is unambiguously determined by the presence or the absence of visible purple lines on the immunochromatographic strip, and results are obtained within 5 min after PCR. This method is rapid, highly sensitive, simplified, and should be suitable for point-of-care genotyping in clinical settings.

Key words: genotyping; single nucleotide; polymorphism; pharmacogenetics

Introduction

Clinical application of pharmacogenetic information is important in customizing the species, optimal dosage, and schedule of drug for individual patients. Pharmacogenetics involves determining the genetic polymorphisms influencing drug exposure levels. Specifically, increased toxicity or altered efficacy can result from variations in a gene coding for an important drug metabolizing enzyme or phase I or II enzyme. Known alterations in genes influencing the drug response include single nucleotide polymorphisms (SNPs) at loci for *CYP2C19*,^{1,2} N-acetyltransferase 2 (*NAT2*),³⁻⁵ thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*),⁶⁻⁹ uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*),^{10,11} and mitochondrial DNA (mtDNA).¹²

Prior to drug treatment, it is very desirable to use bedside genotyping methods to identify drug responders or non-responders as well as patients at increased risk of toxicity. Numerous SNP detection methods have been developed, including PCR-RFLP, allele-specific PCR,¹³ PCR-SSCP,¹⁴ oligonucleotide ligation assay,¹⁵ TaqMan PCR,¹⁶⁻¹⁸ invader assay,^{19,20} pyrosequencing,²¹ microarray,²² and matrix-assisted laser

desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry.²³ However these require expensive instrumentation and substantial technical expertise.

Matsubara and Kure²⁴ have recently developed the competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip for the detection of some prevalent disease-causing mutations and clinically important polymorphisms. This is a rapid and simplified method for SNP detection that demands neither technical expertise nor expensive instruments. In this report, we use this assay and either purified DNA or unprocessed whole blood as templates to successfully detect SNPs *CYP2C19* (*CYP2C19**3 [636G>A]), *NAT2* (*NAT2**5 [341T>C], *NAT2**6 [590G>A], and *NAT2**7 [857G>A]), *TPMT* (*TPMT**3C [719A>G]), *UGT1A1* (*UGT1A1**6 [211G>A] and *UGT1A1**27 [686C>A]), and mitochondrial DNA (1555A>G).

Materials and Methods

Isolation of DNA from human blood: The local ethics committee of Tohoku Pharmaceutical University and Tohoku University Hospital approved the study, and all blood donors provided written, informed

Received; April 28, 2004, Accepted; June 25, 2004

*To whom correspondence should be addressed: Masahiro HIRATSUKA, Ph.D., Department of Clinical Pharmaceutics, Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1, Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan. Tel. +81-22-234-4181, Fax. +81-22-275-2013, E-mail: mhira@tohoku-pharm.ac.jp

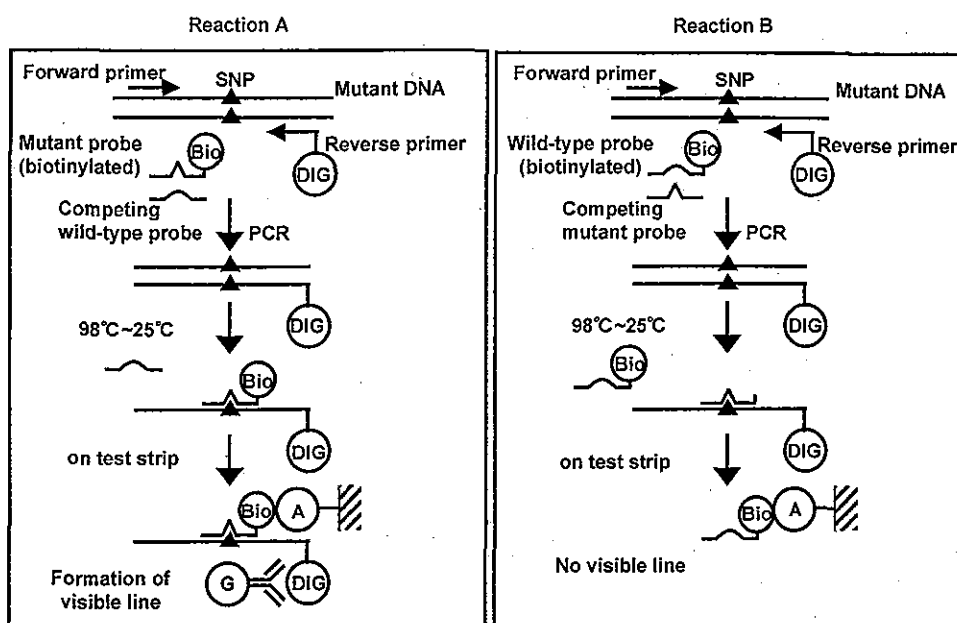


Fig. 1. CASSOH assay with immunochromatographic strip.

Analysis of mutant DNA using reaction A (left) for the detection of a mutant sequence or reaction B (right) for the detection of a wild-type sequence. Closed triangles indicate a SNP site. DIG, digoxigenin labeling; Bio, biotin labeling; A, streptavidin; G, gold particle conjugated to anti-digoxigenin antibody.

consent. DNA was isolated from K₂EDTA-treated anti-coagulated peripheral blood using a DNA Extractor WB-Rapid kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) or a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

CASSOH assay: The CASSOH assay for the detection of polymorphisms of *CYP2C19* (*CYP2C19**3 [636G>A]), *NAT2* (*NAT2**5 [341T>C], *NAT2**6 [590G>A], and *NAT2**7 [857G>A]), *TPMT* (*TPMT**3C [719A>G]), *UGT1A1* (*UGT1A1**6 [211G>A] and *UGT1A1**27 [686C>A]), and mitochondrial DNA (1555A>G) was carried out according to the method described by Matsubara and Kure²⁰ with minor modifications. The principle of the method is illustrated in Fig. 1. A target sequence containing a SNP site is amplified by PCR with a pair of PCR primers, one of which is labeled with digoxigenin (DIG) at its 5'-end. The PCR reaction mixture also contains two sets of hybridization probes. One set is used for the detection of the wild-type nucleotide sequence and consists of an oligonucleotide containing the wild-type sequence labeled with biotin (Bio) at its 3'-end and an unlabeled oligonucleotide containing the mutant sequence (reaction A). The second set consists of an oligonucleotide containing the mutant sequence labeled with Bio at its 3'-end and an unlabeled oligonucleotide containing the wild-type sequence (reaction B). All hybridization probes are designed on the strand opposite to a DIG-labeled PCR primer. A summary of the primers and probes used is presented in

Table 1.

The standard PCR was carried out in a reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 μM each dNTP, 1 μM PCR forward primer, 1 μM PCR reverse primer, 600 nM biotinylated probe, 3 mM unlabeled competing probe, 1.25 U of Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa, Otsu, Japan), and 0.04 to 100 ng of genomic DNA in a total volume of 20 μL. The PCR reactions were performed in a BIO-RAD iCycler (Hercules, CA, USA) with the following cycling conditions: denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 98°C for 10 sec, annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 30 sec, and, finally, successive incubations of 72°C for 3 min, 98°C for 3 min, 65°C for 1 min, 55°C for 1 min, 45°C for 1 min, 35°C for 1 min, and 25°C for 1 min.

The direct PCR using whole blood as template was carried out in a PCR reaction mixture containing 4 μL of 5X Ampdirect-A (Shimadzu, Kyoto Japan), 4 μL of 5X Amp Addition-1 (Shimadzu, Kyoto Japan), 250 μM each dNTP, 1 μM PCR forward primer, 1 μM PCR reverse primer, 600 nM biotinylated probe, 3 mM unlabeled competing probe, 1.25 U of Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa, Otsu, Japan), and 0.2 to 1 μL of blood in a total volume of 20 μL. Whole blood was obtained by scratching of the fingertip with a needle. The PCR reactions were performed in the BIO-RAD iCycler with the following cycling conditions: denaturation at 94°C for 4.5 min, followed by 45 cycles of

Table 1. Sequences of PCR primers and hybridization probes

Gene (allele)	Forward primer	Reverse primer		
PCR primers				
<i>CYP2C19</i> (*3)	5'-tgatctgctccattattttccaga-3'	5'-DIG-cttggccaatataagaatttggatttcc-3'		
<i>NAT2</i> (*5)	5'-ttggaacattaactgacattcttgag-3'	5'-DIG-catctggaggagcttccag-3'		
<i>NAT2</i> (*6)	5'-ttggaacattaactgacattcttgag-3'	5'-DIG-tgtggtataaatgaagatgttgagac-3'		
<i>NAT2</i> (*7)	5'-agggtattttacatccctccagt-3'	5'-DIG-ggtagagaggatctgatgacataagt-3'		
<i>TPMT</i> (*3C)	5'-cagtggtgtattttttactcttgga-3'	5'-DIG-atttcaattcctcaaaaacatgacag-3'		
<i>UGT1A1</i> (*6)	5'-gaaagggtccgctcagcatga-3'	5'-DIG-agcagaggggacatgaaatag-3'		
<i>UGT1A1</i> (*27)	5'-acctgacgctctgttacatc-3'	5'-DIG-tcacaagtcacttctaaacagccag-3'		
<i>mtDNA</i>	5'-cccaactgggattagatacco-3'	5'-DIG-ttagctcagagcggtaagtaag-3'		
	Detection of normal sequence	Detection of mutant sequence		
Gene (allele) Substitution	Biotinylated wild probe	Competing mutant probe	Biotinylated mutant probe	Competing wild probe
Hybridization probes				
<i>CYP2C19</i> (*3) 636G>A	5'-ccctgGatcca-Bio-3'	5'-ccctgAatccag-3'	5'-ccctgAatccag-Bio-3'	5'-ccctgGatcca-3'
<i>NAT2</i> (*5) 341T>C	5'-tgaccaTtgacg-Bio-3'	5'-tgaccaCtgacg-3'	5'-tgaccaCtgacg-Bio-3'	5'-tgaccaTtgacg-3'
<i>NAT2</i> (*6) 590G>A	5'-aacctcGaacaa-Bio-3'	5'-gaacctcAaacaa-3'	5'-gaacctcAaacaa-Bio-3'	5'-aacctcGaacaa-3'
<i>NAT2</i> (*7) 857G>A	5'-tgatgGatccct-Bio-3'	5'-gtgatgAatccct-3'	5'-gtgatgAatccct-Bio-3'	5'-tgatgGatccct-3'
<i>TPMT</i> (*3C) 719A>G	5'-aaagtatAtctacttac-Bio-3'	5'-aaagtatGtctactta-P-3' #	5'-aaagtatGtctactta-Bio-3'	5'-aaagtatAtctacttac-P-3' #
<i>UGT1A1</i> (*6) 211G>A	5'-atgctcCgtctct-Bio-3'	5'-atgctcTgtctctg-3'	5'-atgctcTgtctctg-Bio-3'	5'-atgctcCgtctct-3'
<i>UGT1A1</i> (*27) 686C>A	5'-ttcccCgtatgc-Bio-3'	5'-ttcccAgtatgc-3'	5'-ttcccAgtatgc-Bio-3'	5'-ttcccCgtatgc-3'
<i>mtDNA</i> 1555A>G	5'-aggagAcaagtcg-Bio-3'	5'-aggagGcaagtc-3'	5'-aggagGcaagtc-Bio-3'	5'-aggagAcaagtcg-3'

Underlined nucleotides indicate targeted substitutions.

DIG, digoxigenin; Bio, biotin; P, phosphorylation.

Competing probes for *TPMT* (*3C) detection were labeled with phosphoric acid on their 3'-end to prevent reaction as a primer during PCR amplification.

denaturation at 98°C for 20 sec, annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 60 sec, and, finally, successive incubations of 72°C for 3 min, 98°C for 3 min, 65°C for 1 min, 55°C for 1 min, 45°C for 1 min, 35°C for 1 min, and 25°C for 1 min.

A 5 µL portion of the PCR reaction mixture is pipetted onto the sample application pad of a DNA detection test strip (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The DNA test strip uses a nitrocellulose membrane with a line of immobilized streptavidin together with a conjugate pad impregnated with gold particle-conjugated anti-DIG mouse monoclonal antibody. The bottom end of the strip is immersed in chromatographic buffer at room temperature for approximately 5 sec to initiate chromatography. As the buffer and gold-labeled anti-DIG antibody contained in the test strip pad migrate through the sample, the conjugated antibody binds to the DNA-oligonucleotide hybrid. This complex is further trapped by immobilized streptavidin on the test strip, forming a visible purple line after 5 min. The genotype of the specimen is determined by the presence or absence of purple lines in reactions A and B.

Results and Discussion

Figure 2 shows representative results for *mtDNA* (1555A>G) (Fig. 2a) and *NAT2**6 (590G>A) (Fig. 2b) when purified DNA was used as a template for the

CASSOH assay. False positive or false negative signals were not observed. There was a 100% match in the genotyping results of the 1555A-homoplasm and 1555G-homoplasm of *mtDNA* and the 590G-homozygotes, heterozygotes, and 590A-homozygotes of *NAT2*. Figure 2c shows that, using the primers and probes listed in Table 1, similar results were obtained for the six other polymorphisms: *CYP2C19* (*CYP2C19**3, [636G>A]), *NAT2* (*NAT2**5 [341T>C] and *NAT2**7 [857G>A]), *TPMT* (*TPMT**3C [719A>G]), and *UGT1A1* (*UGT1A1**6 [211G>A] and *UGT1A1**27 [686C>A]). Although signal intensities between wild-type probes and mutant probes in each heterozygous samples of *CYP2C19**3, *NAT2**5, *NAT2**7, *TPMT**3C and *UGT1A1**27 were slightly different, no false-negative signals were observed under the conditions. To estimate the precision and reproducibility of the assay, selected samples (n=3 each) with a known genotype were analyzed in duplicate. All samples were tested for genotypes by sequencing and by CASSOH assay, and identical results were obtained by the two methods (data not shown). The detection limit of this assay was approximately 0.04 ng of template DNA. Test results on the dried DNA detection test strips were stable for at least 3 years at room temperature (data not shown).

SNP genotyping can generally be divided into two steps: purification of DNA from blood and allele

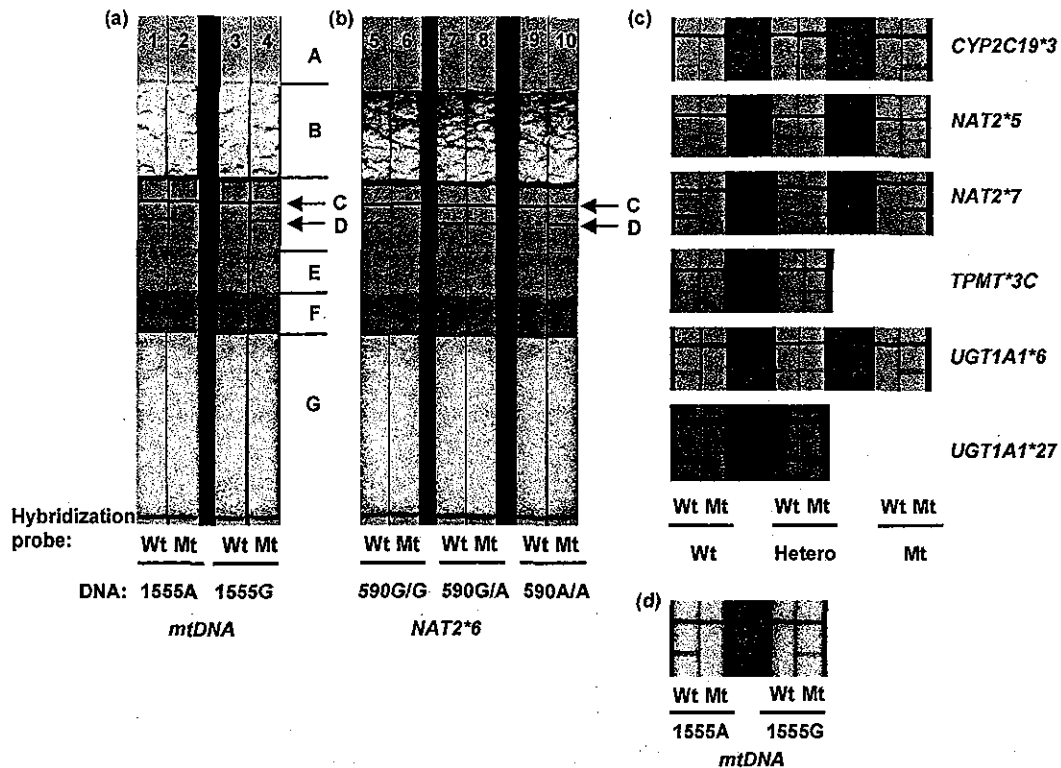


Fig. 2. Genotyping by CASSOH assay with immunochromatographic strip.

(a) Detection of the mtDNA 1555A>G polymorphisms. DNA samples included wild-type (lanes 1 and 2) and mutant homoplasmy (lanes 3 and 4). (b) Detection of the *NAT2* 590G>A polymorphisms. DNA samples included wild-type homozygous (lanes 5 and 6), heterozygous (lanes 7 and 8), and mutant homozygous (lanes 9 and 10). Immunochromatographic strips were as follows: A, handle; B, absorbent pad; C, control line (anti-mouse polyclonal antibody line; not visible before use); D, streptavidin line (diagnostic line, which binds the hybridized PCR product including the anti-DIG gold conjugate; not visible before use); E, sample application pad; F, gold conjugate pad; and G, immersion area. (c) Detection of the *CYP2C19**3 (636G>A), *NAT2**5 (341T>C), *NAT2**7 (857G>A), *TPMT**3C (719A>G), *UGT1A1**6 (211G>A), and *UGT1A1**27 (686C>A) polymorphisms. (d) Detection of the mtDNA 1555A>G polymorphisms in whole blood using Ampdirect.

detection. The DNA purification step is required because DNA polymerases are susceptible to inhibition by endogenous substances, including haemoglobin and bile acids. Purification of DNA is often labor-intensive, time-consuming, and costly, and it enhances the risk of back- or cross-contamination of samples. In the present study, we tested whether Ampdirect-A and Amp Addition-1, a reagent cocktail that suppresses the inhibitors in blood, is useful on CASSOH assay. Figure 2d shows representative results for mtDNA (1555A>G) when whole blood was used as a template for the CASSOH assay. We found that all SNPs tested in this study could be detected by the CASSOH assay in the presence of this cocktail without prior extraction of the DNA (data not shown). In contrast, an amplified band was not produced by PCR when a blood sample was used in the absence of this reagent cocktail. Typically, a 1 μ L sample of whole blood yielded 15 to 60 ng of DNA, and the detection limit for this assay in the presence of Ampdirect was approximately 0.2 μ L whole blood (3 to 12 ng of DNA). The entire assay can be completed in less than 3 h, and costs approximately

\$7 per sample. Thus, the CASSOH assay for SNP determination avoids the need for sample purification, leading to a considerable savings in time, cost, and effort.

In summary, we have developed a CASSOH-based genotyping method using whole blood as a template for eight polymorphisms that are especially important in the Japanese population for identification of drug responders or non-responders and patients at increased risk of drug toxicity. This method is rapid, highly sensitive, simple, and should be suitable for routine clinical genotyping.

Acknowledgements: This work was supported in parts by a Grant-in-Aid for Research on Sensory and Communicative Disorders from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; a Grant-in Aid for Young Scientists (B) from the Japan Society for the Promotion of Science; the Takeda Science Foundation; the Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research; and the Research Foundation for Pharmaceutical Sciences.

References

- 1) de Morais, S. M., Wilkinson, G. R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U. A. and Goldstein, J. A.: The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J. Biol. Chem.*, **269**: 15419-15422 (1994).
- 2) de Morais, S. M., Wilkinson, G. R., Blaisdell, J., Meyer, U. A., Nakamura, K. and Goldstein, J. A.: Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol. Pharmacol.*, **46**: 594-598 (1994).
- 3) Evans, D. A.: N-acetyltransferase. *Pharmacol. Ther.*, **42**: 157-234 (1989).
- 4) Okumura, K., Kita, T., Chikazawa, S., Komada, F., Iwakawa, S. and Tanigawara, Y.: Genotyping of N-acetylation polymorphism and correlation with procainamide metabolism. *Clin. Pharm. Ther.*, **61**: 509-517 (1997).
- 5) Hiratsuka, M., Kishikawa, Y., Takekuma, Y., Matsuura, M., Narahara, K., Inoue, T., Hamdy, S. I., Endo, N., Goto, J. and Mizugaki, M.: Genotyping of the N-acetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. *Drug Metab. Pharmacokin.*, **17**: 357-362 (2002).
- 6) McLeod, H. L., Lin, J. S., Scott, E. P., Pui, C. H. and Evans, W. E.: Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **55**: 15-20 (1994).
- 7) McLeod, H. L., Pritchard, S. C., Githang'a, J., Indalo, A., Ameyaw, M. M., Powrie, R. H., Booth, L. and Collie-Duguid, E. S. R.: Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals. *Pharmacogenetics*, **9**: 773-776 (1999).
- 8) Hiratsuka, M., Inoue, T., Omori, F., Agatsuma, Y. and Mizugaki, M.: Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population. *Mutat. Res.*, **448**: 91-95 (2000).
- 9) Hiratsuka, M., Inoue, T., Omori, F., Agatsuma, Y., Kishikawa, Y. and Mizugaki, M.: Detection assay of rare variants of the thiopurine methyltransferase gene by PCR-RFLP using a mismatch primer in a Japanese population. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**: 1090-1093 (2000).
- 10) Aono, S., Yamada, Y., Keino, H., Hanada, N., Nakagawa, T., Sasaoka, Y., Yazawa, T., Sato, H. and Koiwai, O.: Identification of defect in the genes for bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**: 1239-1244 (1993).
- 11) Aono, S., Adachi, Y., Uyama, E., Yamada, Y., Keino, H., Nanno, T., Koiwai, O., Sato, H., Hanada, N., Nakagawa, T., Sasaoka, Y. and Yazawa, T.: Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *Lancet*, **345**: 958-959 (1995).
- 12) Prezant, T. R., Agopian, J. V., Bohlman, M. C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W. Q., Arnos, K. S., Cortopassi, G. A., Jaber, L., Rotter, J. I., Shohat, M. and Fischel-Ghodsian, N.: Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet.*, **4**: 289-294 (1993).
- 13) Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C. and Markham, A. F.: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, **17**: 2503-2516 (1989).
- 14) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**: 874-879 (1989).
- 15) Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. and Hood, L.: A ligase-mediated gene detection technique. *Science*, **241**: 1077-1080 (1988).
- 16) Livak, K. J., Marmaro, J. and Todd, J. A.: Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat. Genet.*, **9**: 341-342 (1995).
- 17) Fujii, K., Matsubara, Y., Akanuma, J., Takahashi, K., Kure, S., Suzuki, Y., Imaizumi, M., Iinuma, K., Sakatsume, O., Rinaldo, P. and Narisawa, K.: Mutation detection by TaqMan-allele specific amplification: application to molecular diagnosis of glycogen storage disease type Ia and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum. Mutat.*, **15**: 189-196 (2000).
- 18) Hiratsuka, M., Agatsuma, Y., Omori, F., Narahara, K., Inoue, T., Kishikawa, Y. and Mizugaki, M.: High throughput detection of drug-metabolizing enzyme polymorphisms by allele-specific fluorogenic 5' nuclease chain reaction assay. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**: 1131-1135 (2000).
- 19) Kwiatkowski, R. W., Lyamichev, V., de Arruda, M. and Neri, B.: Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay. *Mol. Diagn.*, **4**: 353-364 (1999).
- 20) Lyamichev, V., Mast, A. L., Hall, J. G., Prudent, J. R., Kaiser, M. W., Takova, T., Kwiatkowski, R. W., Sander, T. J., de Arruda, M., Arco, D. A., Neri, B. P. and Brow, M.: A. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat. Biotechnol.*, **17**: 292-296 (1999).
- 21) Fakhrai-Rad, H., Pourmand, N. and Ronaghi, M.: Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.*, **19**: 479-485 (2002).
- 22) Pastinen, T., Raitio, M., Lindroos, K., Tainola, P., Peltonen, L. and Syvanen, A. C.: A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Res.*, **10**: 1031-1042 (2000).
- 23) Pusch, W., Wurmbach, J. H., Thiele, H. and Kostrzewa, M.: MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmacogenomics*, **3**: 537-548 (2002).
- 24) Matsubara, Y. and Kure, S.: Detection of single nucleotide substitution by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip. *Hum. Mutat.*, **22**: 166-172 (2003).