

S1 (1A, 1B, 1C)	: 癌原性試験
S2 (2A, 2B)	: 遺伝毒性試験
S3 (3A, 3B)	: トキシコキネティクス
S4 (4, 4A)	: 単回および反復投与毒性試験
S5 (5A, 5B)	: 生殖発生毒性試験
S6	: バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価
S7 (7A)	: 安全性薬理試験
S8	: 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン

C 有効性 (Efficacy)

“有効性”はヒトを対象とした臨床試験に関するものである。13のトピックからなる (<http://www.nihs.go.jp/dig/ich/eindex.html>)。現在の臨床試験はこれらのガイドラインに従って実施されている。

ICH-E1	: 臨床安全性評価に必要な症例数と投与期間
ICH-E2 (2A, 2B, 2C, 2CA, 2D, 2E)	: 臨床安全性情報の取り扱いについて
ICH-E3	: 治験総括報告書の構成と内容
ICH-E4	: 新医薬品の承認に必要な用量-反応関係
ICH-E5	: 外国臨床データを受け入れる際に考慮すべき要因
ICH-E6	: 医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令
ICH-E7	: 高齢者に使用される医薬品の臨床評価法
ICH-E8	: 臨床試験の一般指針
ICH-E9	: 臨床試験のための統計的原則
ICH-E10	: 臨床試験における対照群の選択とそれに関連する諸問題
ICH-E11	: 小児集団における医薬品の臨床試験
ICH-E12 (A)	: 降圧剤の臨床評価に関する原則
ICH-E14	: 非抗不整脈薬における QT/QTc 間隔の延長と催不整脈作用の潜在的可能性に関する臨床評価ガイドライン

D 複合領域 (Multidisciplinary Regulatory Communication)

“複合領域”は上記3分野にあてはまらない分野を統合したものである。下記の5分野からなる (<http://www.nihs.go.jp/dig/ich/ichindex.html>)。

ICH-M1	: ICH 国際医薬用語集日本語版 (MedDRA/J) の使用
ICH-M2	: 個別症例安全性報告を伝送するためのデータ項目およびメッセージ仕様
ICH-M3	: 医薬品の臨床試験実施のための非臨床安全性試験の実施時期
ICH-M4	: 医薬品の製造又は輸入の承認申請に際し承認申請書に添付すべき資料の作成要領 (Common Technical Document: CTD)

ICH-M5：医薬品辞書のためのデータ項目および基準

15-5

ICH がもたらしたもの

ICHの動きを世界的な視野から検討すると、試験（製造・非臨床・臨床）の重複を避けることにより、資源（時間・労力・動物・経済・その他）の活用を効率良く行うことに通じる。このことは、限りある資源の中でより優れた医薬品を世の中に輩出することに貢献することになる。

ICHの目的とそれぞれのトピックの内容を考察してみると、三つの主要な意味が明らかになる。一つは個々の試験（データ）の“品質保証”（quality validation）であり、一つは“データの共有化”，そして“迅速化”である。

“品質保証”のためには、個々のガイドラインを遵守した計画立案、実施、解析、報告が基盤となる。医薬品開発の流れすべてに共通する重要な基本であり、多くのトピックがこれに関係し個々の試験（データ）の質の向上に大きく貢献している。特に、臨床部門では、E6：医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（Guideline for Good Clinical Practice）、E8：臨床試験の一般指針（General Considerations for Clinical Trials）、E9：臨床試験のための統計的原則（Statistical Principles for Clinical Trials）、の果たした役割は大きいと個人的に考えている。“品質保証”が確保されたうえで、次のステップとして重要なことは“データの共有化”である。

“データの共有化”を可能にするトピックは、「E5：外国臨床データを受け入れる際に考慮すべき要因」，「M1：ICH 国際医薬用語集」であろう。現在（2005年12月）の状況を考察すると、各ガイドラインにより個々の試験（データ）の質は目に見えた形で向上してきている。しかしながら、データの共有化に関しては経験を積み重ねている現状であり、各地域で実施された試験データ（特に臨床試験）が他の地域で使用可能になっているかということと必ずしもそうとはいえない。ICHの最終目的はより良い医薬品を各地域の患者に迅速に供給することであるが、“データの共有化”の時点で若干足踏みしている状況があった。このことを考慮して、2002年2月にブリュッセルで開かれた運営委員会では、E5のさらなる活用のためにEWGを組織してE5ガイドラインのQ & A（Questions and Answers）を作成する決定を行った。Q & Aは2003年11月にStep 5に到達した。

“迅速化”に関しては三極で共通の書式を採用し、承認申請に係わる様式の作成時間を短縮する目的のトピック M4：医薬品の製造又は輸入の承認申請に際し承認申請書に添付すべき資料の作成要領（Common Technical Document: CTD）が、日本では2003年7月から適用された。各地域で承認申請に用いた様式がすべてではないがそのまま使用できることになった。また、2004年の5月から電子媒体を用いるeCTD（the electronic CTD）に関する通知が出され、2005年4月には、「「コモン・テクニカル・ドキュメントの電子化仕様について」に関するQ & Aについて」が通知されている。

このように、1990年に発足したICHはわずか15年たらずで大きな進歩を成し遂げたと評価できる。ICHの動きは三極にとどまらず非ICH諸国の医薬品開発・承認のプロセスにも大きな

影響を与えている。ICH 運営委員会はこのことを考慮し、1999年に運営委員会の subcommittee として Global Cooperation Group (GCG) を組織し、非 ICH 諸国に対しても ICH の進捗状況を伝達し、意見交換している。

15-6

ICH の今後

ICH 運営委員会は、遺伝子治療に必要とされる医療品のハーモナイゼーションを目指して、Gene Therapy Discussion Group (GTDG) を組織している。今後の発展を期待したい。

ICH の動きは世界的な様相を呈した。発足当初は3回の本会議を経過した時点で終了する予定であったが、すでに6回の本会議を終了した。第1回から第3回の開催地の頭文字をとると“BOY”となる。BOY (少年) は成人に発育してきたといえる。現在も、年に2回のペースで運営委員会と EWG の会合がもたれている。このことは、全世界的に質の高い医薬品開発と資源活用がいまだに問題となっていることを示している。医薬品のエビデンスをつくる臨床試験の基本となる概念を支持する ICH の活動は、今後とも注目に値する。

15-7

日本の現状と今後

臨床試験においては、倫理性、科学性、信頼性の確保が重要なことであることは認識されていると考える。治験の「質」、「スピード」、「コスト」に関して、諸外国の水準と比較して近年問題になったが徐々に改善されてきている。倫理面では、各施設毎に設置されている IRB (Institutional Review Board) の申請様式の違い、指摘事項の多様さ、開催時期の相違等により、特に多施設共同試験の際に中央 IRB 設立の要望が出されている。

オランダでは EU directive (EU 指令) に対応するために、議会の決定に基づき 1999年に中央倫理委員会を設立している³⁾。オーストラリアでは、National Health and Medical Research Council が National Statement on Ethical Conduct in Research Involving Humans を制定し、Multi Center Research に関する Review System の中で、1か所の IRB での審査を認めている (<http://www.nhmrc.gov.au/publications/humans/contents.htm>)。

オランダの場合、委員は女王陛下から任命され、中央倫理委員会の業務は特殊な領域の臨床研究、各倫理委員会の認定と委員の教育、すべての医学研究データの収集、等であり、日本で意味される中央 IRB とは異なる。オーストラリアの場合、最終的に二重審査となり時間をより費やすことになったために、現在はあまり機能していないようである。

E6に謳われているように、IRB の責務は、被験者の人権・安全・福祉の保護であり、「スピード」の観点から中央 IRB が議論されては本末転倒である。欧米で実施されている、Medical Ethics, Research Ethics の教育が幅広く日本において普及されることが、臨床試験の倫理性の確保のため

めの王道ではないかと思われる。ICH による規制のハーモナイゼーションの根底には、研究倫理の共有理念が存在していることを忘れてはならない。

参考文献（参考 URL は文中に記載）

- 1) 上田慶二, 衣非修, 熊谷曄, 相馬良二, 松倉裕而, 光井英基, 佐直隆一. GCP ガイドラインの国際協調に関する研究. 厚生科学研究 医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究 平成 6 年度研究業績報告書. 1995; 157-70.
- 2) Doi, O. Role and public health responsibilities of the authorities. D'Arcy PF and Harron DWG (eds): Proceedings of The First International Conference on Harmonization Brussels 1991. 18-26. 1992.
- 3) Marcel, JH. Kenter (訳: 内田直樹, 内田英二) オランダ王国における Medical Ethical Review System の発展に関する報告. 臨床評価 2003; 30: 397-405.

「遺伝子例外主義」問題の動向

額賀淑郎* 津谷喜一郎**

●はじめに

日本では、遺伝情報は「究極のプライバシー」とよくいわれている。しかし、果たして本当にそのようにいえるのだろうか。「遺伝情報は他の医療情報と同じなのか、それとも異なるのか」という生命倫理学上の議論がある。そのなかで、「遺伝情報を特別視し、保護すべき」と見なす考え方は「遺伝子例外主義」(genetic exceptionalism)と呼ばれている。近年、遺伝子例外主義に関する賛否両論があり、法的・医療的な立場から遺伝子例外主義を批判する傾向が出てきている。遺伝子例外主義の問題は、法律やガイドラインによる遺伝情報の規制や臨床情報の管理(カルテ管理など)と密接に関係しており、きわめて重要な問題といえる。

本稿では、まず「遺伝子例外主義」問題の根幹にある、遺伝情報の定義の多義性に言及する。次に、倫理的・法的・社会的問題(Ethical, Legal, and Social Issues; ELSI)研究の視点から、遺伝子例外主義の倫理的問題、法的問題、社会的問題、をおのおの概観し、遺伝子例外主義の賛否両論を論じる。そして、日本における「遺伝子例外主義」の現状に触れる。最後に、近年、欧米では遺伝子例外主義に対して批判的な議論が出てきていることを紹介する。

*ぬかが・よしお：東京大学大学院医学系研究科生命・医療倫理人材養成ユニット特任助手。平成13年、マツギル大学大学院社会学部修了。

主研究領域／医療社会学。

**つたに・きいちろう：東京大学大学院薬学系研究科医薬経済学客員教授。

● I. 遺伝情報の定義

遺伝子解析研究において、遺伝情報は塩基配列から構成される遺伝子型(genotype)として理解されるかもしれない。しかし、遺伝情報の定義には多様な見方がある。臨床の現場では、症状により判定される表現型(phenotype)や疾患の家族歴から作成される家系図(pedigree)も含むものとして理解されることが多い。また、遺伝子検査の結果を遺伝情報と定義する場合もある。このように、遺伝情報には多義的な定義があり、どのように定義するかは立場により異なることがある。確かに、遺伝子の定義は生物学的に定義できるが、遺伝情報の定義は多様でありうるといえる。

ジョージタウン大学ケネディ倫理学研究所の生命倫理学者マジソン・パワーズ(Madison Powers)は、遺伝情報の性質について9つの特徴としてまとめている¹⁾。それを要約すると、「予示性」「共有性(遺伝性)」「有害性」という3つの性質として分類することができる²⁾。「予示性」(predictability)とは将来に起こりうる情報をさす。「共有性」(heredity)とは個人的な情報であると同時に家族の情報であることを意味する。「有害性」(harm)とは、遺伝情報は個人に思いがけない危害を与える可能性があることをさす。この3つの特徴は、遺伝子例外主義の議論で重要な争点となることが多い。遺伝情報の定義によって「遺伝子例外主義」の内容に差異が生じる点は注意を要する。

● II. 遺伝子例外主義の倫理的問題

遺伝子例外主義の倫理的議論は、1993年に生命倫理学者のジョージ・アナス (George Annas) が「遺伝情報は特別な情報であり、特別な保護・規制が必要である」という考え方を唱えたことから始まる³⁾。つまり、DNAバンクにおける遺伝情報は、将来の健康を予測することができる「未来の日記」(future diaries) であると見なした。そのため、1995年にボストン大学のパトリア・ロシェ (Patricia Roche) と共に、遺伝情報の特別な保護を訴える「遺伝子プライバシー法」を提案したのである⁴⁾。

一方、ELSIの研究者であるトーマス・マレイ (Thomas Murray) は、アナスの立場を「遺伝子例外主義」と見なした。マレイは、NIH (National Institutes of Health; 国立衛生研究所) のELSI研究プログラム「遺伝情報と保険」に関するワーキング・グループの代表を務めた。そのELSI研究を通じて、「遺伝情報は他の医学情報の性質と差異はない」と結論付けたのである⁵⁾。

1. 遺伝子例外主義の倫理的賛成論

アナスらの遺伝子例外主義には、大きく分けて4つの主張がある⁶⁾。

(1) 遺伝情報は未来の健康を予想することができる(予示性)。予示性に関して、単一遺伝性疾患の遺伝子検査の場合、一般検査よりも将来の発症リスクを正確に予知することができる。

(2) 遺伝情報は家族の医療情報を含む(共有性)。乳癌や大腸癌における易罹患性検査の場合、検査結果は他の家族に影響を与えたり、遺伝性を示唆する場合がある。

(3) 優生学など、遺伝情報は歴史的に悪用されてきた(有害性)。戦後、発展してきた遺伝カウンセリングにおける非指示的なアプローチと異なり、戦前の優生相談では、指示的な中絶や断種などが行われていた。

(4) 遺伝子診断の結果は、社会心理的な危害をもたらす可能性がある(有害性)。たとえば、

ハンチントン病の発症前診断の際、診断結果を知った患者が自殺するケースが北米では約3~5%に達するといわれている。

2. 遺伝子例外主義の倫理的反対論

一方、反遺伝子例外主義の立場は、以下のようないくつかの点に集約することができる。

(1) 遺伝情報は医療センシティブ情報の1つといえる^{5,7)}。医療センシティブ情報とは本人の利益を侵害する可能性のある個人医療情報である。たとえば、HIV陽性情報やコレステロール情報などの臨床情報は、予示性・共有性・有害性を含むといえる。もともと、「例外主義」(exceptionalism) という用語は、1991年に「HIV例外主義」としてロナルド・ベイヤー (Ronald Bayer) により初めて使用されたといわれている⁷⁾。HIV例外主義とは、HIV検査は他の性感染症の臨床検査とは異なることを強調している。このように、医療センシティブ情報にかかわる臨床検査は、遺伝子検査だけではないことを示唆している。注意すべきは、HIV例外主義はHIVが一般化するとともに薄らいでいる点である⁸⁾。遺伝子例外主義も近年多くの批判を受けつつある。

(2) 遺伝情報と他の医療情報を実質的に区別することはできない⁶⁾。遺伝情報は、遺伝子検査の結果として理解されがちだが、多くの遺伝性疾患は、臨床情報や家系情報から診断されている。医療の臨床現場において、遺伝情報とそれ以外の情報を明確に区分することは必ずしも容易ではない^{7,8)}。また、遺伝情報は個人を特定できる特別な情報と見なす場合があるが、他の身体的情報や臨床検査も個人を特定することはできる。

(3) 遺伝子検査と他の臨床検査の結果には道徳的に重要な差異はない⁹⁾。たとえば、主に遺伝要因で発症する乳癌と主に環境要因で発症する肺癌を比べた場合、遺伝要因があるからといって乳癌の遺伝情報を特別視し、特別な保護を行うのは、癌という病気を診療するうえで正

しいといえるのだろうか。今後、「ありふれた病気」(common diseases)や生活習慣病を含む多因子疾患が、遺伝子解析の対象となることが期待されている。その際、遺伝情報は標準的な診療情報の一部になる可能性が高い。その場合、遺伝情報のみを例外視し、特別な管理をすることは、医療資源の配分の問題から正当化できるのかという問題がある。

● Ⅲ. 遺伝子例外主義の法的問題

1. 遺伝子プライバシー法と HIPAA

遺伝子例外主義に立つアナスらは、遺伝子プライバシー法を提案したことにより、さまざまな法的議論を巻き起こした。多くの批判を起こす一方で、遺伝子例外主義に基づく遺伝子プライバシー法が、1995年以降、米国の29州で成立した。だが、それらの州法では「遺伝情報の定義」が統一されていない。いくつかの州では、DNAサンプルと遺伝情報を区別しているが、遺伝情報は「遺伝子検査に基づく情報」として狭く定義されることが多い。ただし、米国4州では遺伝情報は個人の所有物 (personal property) として規定されている。また、多くの州では、家系図や遺伝カウンセリングの情報などは保護されていない。米国では一般人にとっては、遺伝子プライバシー法はさほど生活に影響はないといわれている⁹⁾。

しかし、遺伝情報を医療情報の一部として扱う動きも存在する。米国のHIPAA (Health Insurance Portability and Accountability Act; 医療保険の相互運用性確保及び説明責任に関する法律) は2003年に施行された医療情報に関する初の連邦法である。この法律では、遺伝情報は他の診療情報と同様に「保護される健康情報」として分類されている。ただし、HIPAAは保険のために遺伝子検査を利用することを規制していない。現段階では、連邦政府レベルにおいて遺伝子差別禁止法案がでていますが、遺伝子差別に対する保護は、1990年の米国障害者法 (the

Americans with Disability Act) に基づくと見なされている。

2. 「弱い」遺伝子例外主義の法的賛成論

法的な議論として、遺伝子例外主義に関して、条件付きの賛成論がある。つまり、「強い」(strong) 遺伝子例外主義と「弱い」(weak) 遺伝子例外主義に分類し、後者を支持する立場である¹⁰⁾。「強い」遺伝子例外主義とはアナスの立場である。「弱い」遺伝子例外主義は、原則として遺伝情報を例外としないが、保険や雇用における遺伝情報の利用は、遺伝子差別につながるおそれがあるため、特別であると見なす考え方である¹⁰⁾。この立場に立つと、遺伝子検査による遺伝情報は、保険や雇用の問題と切り離す必要があるといえる。実際、米国では、いくつかの州において保険の加入希望者に対して遺伝子検査を行うことを禁止している。

3. 遺伝子例外主義の法的反対論

ローレンス・ゴスティンとジェイムス・ホッジ (Lawrence Gostin and James Hodge) によれば、遺伝情報の厳しい規制や保護は、公共財 (public goods) の観点から問題があるという¹¹⁾。遺伝情報や遺伝子プライバシーを例外にした場合、社会的費用がかかるうえに、その恩恵を明確にすることはできない。そのため、法律上、遺伝情報を特別扱いすることがそれほど重要な価値があるのかどうか疑問が存在する。

また、遺伝情報と他の診療情報の区別が、法規制上明確ではない。先に指摘したように、広義の遺伝情報には診療情報や家族歴も含まれている。もし遺伝情報に特定したプライバシー法を制定した場合、医療情報の開示を規制している法律との非整合性を生じさせる可能性がある。遺伝情報が他の医療センシティブ情報よりも、なぜ特別な存在となるのかが明確ではないからである。そのため、プライバシーと安全性の基準が遺伝情報に適用されるという条文を明記した、医療情報のプライバシーに関する包括的な法律がより良い選択となる。実際、各国で

は、個人情報保護に関する包括的な法律やガイドラインが制定されており、それに基づく医療センシティブ情報の議論が始まっている。

● IV. 遺伝子例外主義の社会的問題

遺伝情報や薬理遺伝学に関する各国の報告書において、遺伝子例外主義に触れている。米国の国家生命倫理諮問委員会 (National Bioethics Advisory Commission) の報告書では、遺伝子例外主義の賛否両論を整理した¹²⁾。英国の Nuffield Council on Bioethics の報告書では、政策やメディアにおいて、遺伝子例外主義が増えていると指摘した¹³⁾。これに対して、2005年の CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences; 国際医科学協議会) の薬理遺伝学 (pharmacogenetics) に関する報告は遺伝子例外主義を批判している¹⁴⁾。この報告書は、遺伝子例外主義を明確に問題視している点で、おそらく最初のものであろう。遺伝子検査かそうでないかではなく、その情報コンテンツ (information content) に応ずるべきであるとし、他の医学情報と同じ高い情報保護水準の扱いを受けべきであるという考えを示している。

遺伝子例外主義の社会的問題に関して、以下のような賛否両論がある。

1. 遺伝子例外主義の社会的賛成論

遺伝子例外主義の賛成論において、遺伝子検査による遺伝情報の利用は、保険や雇用の遺伝子差別につながる可能性があるため社会的に問題があると見なす。保険や雇用における遺伝子差別は、市場型医療制度をとる米国において最も懸念されている。特に、マスメディアは多くの事例を報告している¹⁵⁾。

2. 遺伝子例外主義の社会的反対論

一方、反対論として4点をあげることができる。

(1) 遺伝子差別は、マスコミで騒がれているほどあまり起きておらず、一般市民の不安を煽っている可能性がある。米国の実態調査によ

れば、遺伝子検査や遺伝情報に基づく遺伝子差別の件数は、まれであることが指摘されている¹⁶⁾。ある研究によると、約290万人の患者のなかで生命保険や雇用について拒否されるケースが693例あったが、そのなかには必ずしも遺伝子差別とはいえない場合もある。

(2) 遺伝情報を特別視する要因として、遺伝子が人間の本質を司るという遺伝子本質主義 (genetic essentialism) が大きな影響を与えている。遺伝子本質主義には、DNAを魂 (soul) と見なす見方がある。このようなとらえ方が増長されると、遺伝子例外主義の考えを支持する結果につながる。

(3) 遺伝子を特別視することは個人の自律という信念を弱める結果となるかもしれない¹⁶⁾。個人の自己同一性は遺伝情報から構成されているのではなく、個人の自律的な選択に基づいていると見なすことができる。そのため、遺伝情報を特別視することは、自己決定尊重の点で適切とはいえない。たとえば、米国では、肥満の人たちが自らの健康問題を「肥満遺伝子」だけのせいにしてしまう事例が現れている。

(4) 遺伝子例外主義をとることによって、遺伝子がすべてを決定するという「遺伝子決定論」を強める結果になる可能性がある⁹⁾。最近のゲノム研究の結果では、ゲノムはヒトの性格・性癖などを含めた「氏育ち」をすべて規定する「設計図」というより、その場の状況・環境によって発現の仕方が変化するという事実が明らかになってきている¹⁷⁾。たとえば、一卵性双生児の研究によれば、癌の発症において遺伝要因よりも環境要因のほうが、影響が大きいことが判明している¹⁸⁾。近年のゲノム・遺伝子解析研究の成果と遺伝子例外主義は明らかに乖離している。これまでの研究では致し方なかったかもしれないが、研究の進展に伴い、見直しの時期に入っているといえるかもしれない。

● V. 日本における遺伝子例外主義の現状

行政ガイドライン「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(2004年改正)によれば、遺伝情報とは「試料等を用いて実施されるヒトゲノム・遺伝子解析研究の過程を通じて得られ、又は既に試料等に付随している子孫に受け継がれ得る情報で、個人の遺伝的特徴及び体質を示すものをいう」と規定している¹⁹⁾。さらに、「基本方針」の「注」には、予示性・共有性・有害性の要素を示唆する次のような文言がある。

研究の過程で得られる遺伝情報が提供者及び血縁者の遺伝的素因を明らかにするおそれがあること、さらに研究内容によっては提供者個人の問題にとどまらず提供者が属する集団の性質等を特徴づける可能性があること等により、様々な問題を提起する可能性があるというヒトゲノム・遺伝子解析研究の特色を踏まえ、… (以下略)

このように、日本の行政ガイドラインは遺伝子例外主義の影響を強く受けているといえるかもしれない。実際、検討委員会の議論においては、遺伝情報は特別であるという発言があった。ヒトゲノム・遺伝子解析関連のガイドライン策定において、遺伝情報に比較的なじみが薄い委員がヒトゲノムを特別視し、遺伝子例外主義の立場をとる規制が導入されたといえるかもしれない。少なくとも、「ゲノム研究に関する基本原則」²⁰⁾などが示すように、遺伝情報を含む研究が特別な枠組で規制されており、医療センシティブ情報の範疇としてあまり考慮されていないといえる。

それでは、一般の遺伝医療においてはどのような状況になっているのだろうか。まず、遺伝情報を特別のものと見なすならば、遺伝情報は独立の病歴として管理することになり、他の診療情報と同じとするならば、中央病歴室で一般カルテとして一元管理するといえるかもしれない。

日本では、遺伝情報を他の医療情報と隔離し

て独立管理している場合が多い。たとえば、信州大学医学部附属病院遺伝子診療部、国立成育医療センター遺伝診療科、京都大学医学部附属病院遺伝子診療部、長崎大学医学部・歯学部附属病院遺伝カウンセリング室、北里大学病院遺伝診療部などではカルテを独立病歴として扱っている²¹⁾。一方、東京女子医科大学附属遺伝子医療センターでは、独立病歴と中央管理を行っている。これらの事実から、日本における代表的な遺伝医療の現場では、遺伝子例外主義の考え方に近いといえるだろう。おそらく、この要因として、遺伝情報の安全管理を強調した、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の影響があると考察することができる。

また、このような歴史的背景として、医科大学の遺伝学教育が近年発展してきたことも指摘できるかもしれない。1990年代初めに、国内の医科大学のうち遺伝学講座をもっていた大学は必ずしも多くなかった。しかし、現在では多くの医科大学で遺伝学講座や教育制度が整備されている。このように、遺伝学教育が長らく行われてこなかったことが、遺伝子例外主義を助長する遠因となっているかもしれない。

もう1つ重要な点は、日本は遺伝病の研究で成功を収めてきたが、少数の「単一遺伝性疾患」の遺伝情報を典型的なモデルとして理解する傾向があった点である。ガイドラインの策定において、「単一遺伝性疾患」のモデルに基づいた結果、遺伝子例外主義が比較的強まったといえるかもしれない。その一方、近年指摘されているような「多因子遺伝性疾患」の遺伝情報に関するELSIの議論は十分に進んでいるとはいえない。

● VI. 結論

本稿では、倫理的・法的・社会的問題研究の立場から、遺伝子例外主義を巡る賛否両論を概観した。遺伝子例外主義問題は、遺伝情報をどのようにとらえるかによって立場が異なってくる。欧米では、個人情報保護の整備に伴い、遺

伝情報を HIV 情報のような医療センシティブ情報の1つとして理解する傾向が高まり、医療従事者・法律家において、遺伝子例外主義に対する批判的な議論が起きている。一方、日本では、臨床・研究・メディアにおいて遺伝子例外主義に関する議論はあまり行われていない。

薬理遺伝学に基づく「個別化医療」(individualized medicine)など、先端医療研究の成果を取り入れた診断・治療・介護を進めるためには、日本においても、遺伝子例外主義の是非に関する議論を行う必要がある。確かに、日本でも遺伝子差別を巡り、ごく少数だが民間の生命保険などの加入や支払いで問題が起きている²²⁾。しかし、研究の進展に応じて、遺伝情報が標準的な医療センシティブ情報として普及していく可能性は高く、臨床現場において遺伝情報を過度に特別視することは妥当とはいえないかもしれない。そのため、今後、遺伝子例外主義の是非を巡る議論を積み重ねていく必要がある。その際、研究者や医療従事者のみならず、メディアを含めた非専門家・一般人の議論や普及啓発が欠かせないだろう。

謝辞：本研究は、平成17年度厚生労働科学研究・医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「ファーマコゲノミクスの合理的使用のための医薬品開発と医薬品行政のあり方に関する研究」(主任研究者：津谷喜一郎)の一環として行われた。本稿作成において、アドバイスと協力をいただいた、東京大学大学院医学系研究科 健康科学・看護学専攻医療倫理学分野教授 赤林 朗、日本臨床薬理学会ゲノム委員会委員長 東純一、独立行政法人医薬基盤研究所 増井 徹、(財)ヒューマンサイエンス振興財団 加藤 顕の各氏に謝意を呈する。

..... 文 献

- 1) Powers M : Privacy and the control of genetic information. eds Frankel MS, Teich AH, In *The Genetic Frontier : Ethics, Law and Policy*, American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, 1994.
- 2) 足立智孝：遺伝子情報の性質に関する一考察—アナスとマレイの議論を中心にして。生命倫理 2002 ; 12 : 39—45.
- 3) Annas GJ : Privacy rules for DNA databanks. Protecting

- coded 'future diaries'. *JAMA* 1993 ; 270 : 2346—2350.
- 4) Annas GJ, Glantz LH, Roche PA : Drafting the genetic privacy act : science, policy, and practical considerations. *J Law Med Ethics* 1995 ; 23 : 360—366.
- 5) Murray TH : Genetic exceptionalism and 'future diaries' : is genetic information different from other medical information? ed Rothstein MA, In *Genetic Secrets : Protecting Privacy and Confidentiality in the Genetic Era*, Yale University Press, New Haven, 1997.
- 6) Green MJ, Botkin JR : "Genetic exceptionalism" in medicine : clarifying the differences between genetic and non-genetic tests. *Ann Intern Med* 2003 ; 138 : 571—575.
- 7) Ross LF : Genetic exceptionalism vs. paradigm shift : lessons from HIV. *J Law Med Ethics* 2001 ; 29 : 141—148.
- 8) Lazzarini Z : What lessons can we learn from the exceptionalism debate (finally)? *J Law Med Ethics* 2001 ; 29 : 149—151.
- 9) Everett M : Can you keep a (genetic) secret? The genetic privacy movement. *J Genet Couns* 2004 ; 13 : 273—291.
- 10) Launis V : Solidarity, genetic discrimination, and insurance : a defense of weak genetic exceptionalism. *Soc Theory Pract* 2003 ; 29 : 87—111.
- 11) Gostin LO, Hodge JG : Genetic privacy and the law : an end to genetic exceptionalism. *Jurimetrics* 1999 ; Fall : 21—58.
- 12) *Research Involving Human Biological Materials : Ethical Issues and Policy Guidance*. National Bioethics Advisory Commission, Rockville, 1999.
- 13) *Pharmacogenetics : Ethical Issues*. Nuffield Council on Bioethics, London, 2003.
- 14) *Pharmacogenetics — Towards Improving Treatment with Medicines*. CIOMS, Geneva, 2005. (津谷喜一郎監訳：ファーマコジェネティクス—薬物治療の改善を目指して。テクノミック, 東京, 2005.)
- 15) Wertz DC : Genetic discrimination—an overblown fear? *Nat Rev Genet* 2002 ; 3 : 496.
- 16) Miller H : DNA blueprints, personhood, and genetic privacy. *Health Matrix* 1998 ; 8 : 179—221.
- 17) Ridley M : *Nature Via Nurture : Genes, Experience and What Makes Us Human*. Harper Collins, New York, 2003. (中村桂子・斉藤隆央訳：やわらかな遺伝子。紀伊國屋書店, 東京, 2004.)
- 18) Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al : Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000 ; 343 : 78—85.
- 19) 文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省：ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 2001年3月29日 (2004年12月28日改正, 2005年6月29日一部改正). 2. (http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/genome/04122801.htm)
- 20) 科学技術会議生命倫理委員会：ヒトゲノム研究に関する基本原則について 2000年6月14日. (http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/shisaku/gensoku.htm)
- 21) 額賀淑郎：新遺伝学。赤林 朗編, 入門・医療倫理 I, 勁草書房, 東京, 2005 ; 220.
- 22) 「重度障害の保険金支払い請求, 遺伝子診断の結果で拒否, 加入者が提訴」朝日新聞(朝刊), 2000年7月30日.

Regular Article

*Novel Structure of the CYP2D6 Gene that Confuses Genotyping for the CYP2D6*5 Allele*Tsuyoshi FUKUDA, Hiromi MAUNE, Yuka IKENAGA, Masakazu NAOHARA,
Kazuhiro FUKUDA and Junichi AZUMA**Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University*Full text of this paper is available at <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/dmpk>

Summary: We encountered DNA samples which showed a positive product using a long PCR-based method for the detection of *CYP2D6**5, indicating deletion of the entire *CYP2D6* gene, but the samples did not show a band related to *CYP2D6**5 in either *Xba*I- or *Eco*RI-RFLP analysis. To achieve genotyping with accuracy, we performed a further genetic analysis to clarify the discrepancy. An unknown 1.6-kb insert was identified in a region downstream from the *CYP2D6* stop codon where a specific primer was designed for long-PCR analysis for *CYP2D6**5 genotyping. This finding suggested that the *CYP2D6* gene might not be deleted in the samples even if a positive product was detected by the long-PCR method. Furthermore, the allelic frequency of this type was found to be approximately 0.3% (4 heterozygous/771 samples) in a Japanese population. In conclusion, we found a novel structure of the *CYP2D6* gene, which might lead to incorrect genotyping for *CYP2D6**5. Although the long PCR-based strategy for the detection of *CYP2D6**5 has been widely used due to its usefulness and convenience, we recommend caution when adopting this method and propose re-evaluating the method for detecting *CYP2D6**5.

Key words: *CYP2D6*; genetic polymorphism; *CYP2D6**5; genotyping

Introduction

CYP2D6 metabolizes many clinically important drugs, including antidepressants, neuroleptics, β -blockers and antiarrhythmics.¹⁾ Individuals with an impaired ability to metabolize various probe drugs for *CYP2D6*, such as debrisoquine and sparteine, are classified as poor metabolizers (PM). There are important interethnic differences in the frequency of PMs. In Caucasian populations, the frequency of PMs is 5–10%, quite high in comparison with the frequencies (0–4%) observed in Chinese and Japanese.²⁾ The homozygous presence of defective *CYP2D6* alleles, such as *CYP2D6**4 and *CYP2D6**5, results in a lack of *CYP2D6* enzymatic activity. *CYP2D6**5 is the most frequent of the PM-related alleles in the Japanese population. Therefore, it is necessary to detect the allele in the genotyping of *CYP2D6*. Southern blot analysis with a *CYP2D6cDNA* probe has been performed to detect the *CYP2D6**5 allele because the *CYP2D6* gene

does not exist on the allele. However, this method is time-consuming and requires relatively large amounts of genomic DNA from each subject. Therefore, a long-PCR based assay with specific primers was needed and has been used in pharmacogenetic studies on *CYP2D6* substrates. Several sets of primers have been reported.^{3–5)}

In our laboratory, a long-PCR based assay was adopted with two different sets of primers, primers D1 and D2 (primers D1/D2)⁴⁾ and primers 13 and 24 (primers 13/24)³⁾ for strict analysis (Fig. 1A). Two fragments, 6.0 kb and 3.5 kb, indicative of the presence of the *CYP2D6**5 allele, are amplified by long-PCR, both with primers D1/D2 and with primers 13/24, respectively. Recently, we encountered DNA samples that showed different results using the two sets of primers in the above-mentioned method for *CYP2D6**5 screening. That is, a positive product was obtained by long-PCR analysis with primers 13/24, but not with primers D1/D2. We have identified four samples out of

Received; March 25, 2005, Accepted; July 25, 2005

*To whom correspondence should be addressed: Dr. Junichi AZUMA, Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamada-oka 1-6, Suita, Osaka, 565-0871, Japan. Tel: +81-6-6879-8258, Fax: +81-6-6879-8259, E-mail: azuma@phs.osaka-u.ac.jp

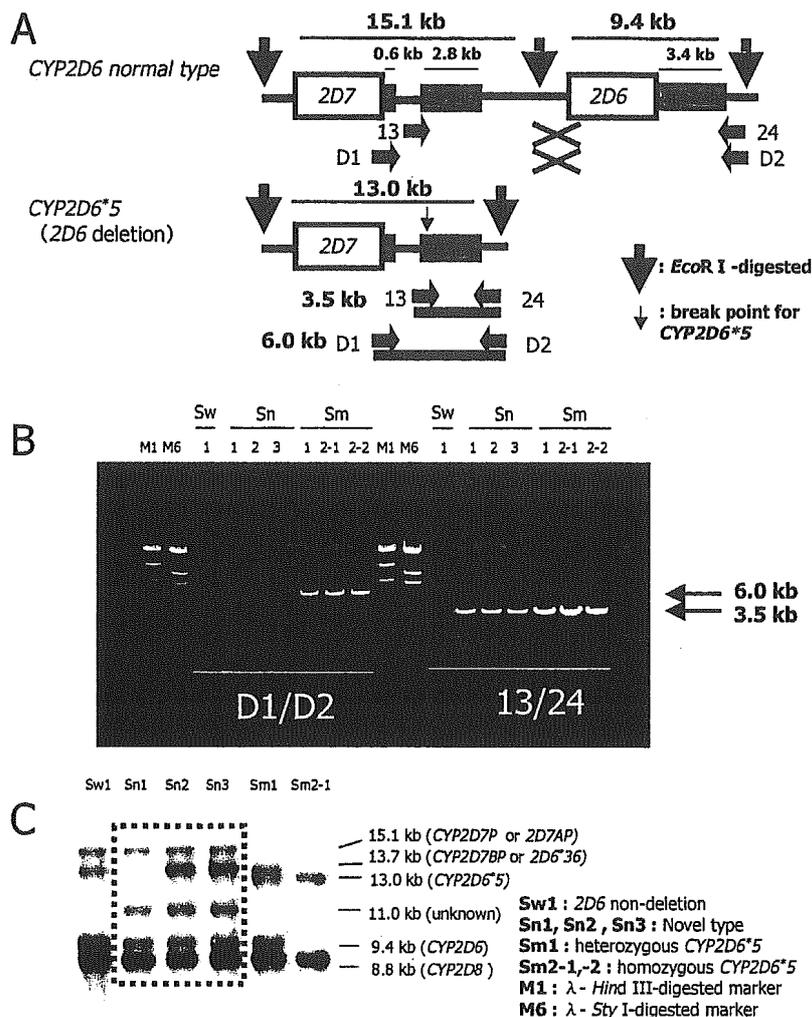


Fig. 1. Methods for detecting *CYP2D6*5* and identifying unknown fragments

A) Two methods of detecting *CYP2D6*5* using long-PCR: Two sets of primers are usually used for *CYP2D6*5* in our laboratory. Arrows show specific primers (primers 13/24 and primers D1/D2). The *CYP2D6*5* allele could be screened rapidly. A gray box indicates the 3.4-kb region which is almost completely identical downstream of both *CYP2D7* and *CYP2D6*. The 3.4-kb homologous region downstream of *CYP2D7* is divided into 0.6-kb and 2.8-kb regions by an insertion of about 1.6 kb. **B)** Different results using two sets of primers: We identified a sample whose results from the two sets of primers were not consistent. The 3.5-kb product was detected despite a negative finding for the 6.0-kb product. We have observed this in four out of 771 samples so far. **C)** Southern blot analysis of genomic DNA with *EcoR*I using the *CYP2D6cDNA* probe: The 13.0-kb fragment, indicating deletion of the *CYP2D6* gene, was not detected from the three samples positive for the 3.5-kb PCR product. However, an unknown 11-kb band in addition to 15.1-kb, 9.4-kb, and 8.8-kb bands. The other two samples, Sn2 and Sn3, showed a 13.7-kb band suggestive of *CYP2D6*36*(*10C) or *CYP2D7BP* located between *CYP2D7* and *CYP2D6*.

over 700 samples. To achieve accurate genotyping, we attempted to resolve the discrepancy by using a step by step genetic analysis.

Methods

Samples: All subjects in the study were healthy males who had enrolled for some clinical trials. The protocol for studies of metabolizing enzymes was approved by the local ethics committee, and the study was performed according to public ethics guidelines for human genome/gene analysis research in Japan. Written informed consent for genetic analysis was

obtained from each subject. Genomic DNA was isolated from the peripheral lymphocytes of subjects using the QIAGEN Blood kit (QIAGEN, Tokyo, Japan).

Detection of *CYP2D6*5*: Two different sets of primers, primers D1/D2⁴⁾ and primers 13/24³⁾ were adopted for the detection of *CYP2D6*5* (Table 1) (Fig. 1A). The reaction mixture contained 1.1 mM Mg (OAc)₂, 1*XL buffer II (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), 0.2 mM of each dNTP, 3 pmol of each primer, 75 ng of genomic DNA and 1 U of rTth DNA polymerase (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), with a total volume of 25 μ L. The reaction profile was 35 cycles

Table 1. Primers used in the current investigation

Primer name	Sequence
For the detection of <i>CYP2D6</i> *5	
2D6 D1	5'-GCCACTCTCGTGTGTCAGCTTT-3'
2D6 D2	5'-GCCATGAGCTAAGGCACC-3'
2D6 13	5'-ACCGGGCACCTGTACTCCTCA-3'
2D6 24	5'-GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC-3'
For new structure	
2D6 15	5'-CGTCTAGTGGGGAGACAAAC-3'
2D6 24	5'-GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC-3'
For sequencing	
Forward primer	
13f	pCR2.1-TOPO vector primer
2D6 15-2	5'-CTCATCACCAACCTGTCATC-3'
2D6 15-3	5'-TCTAATGTACAATAAAGCAA-3'
2D6 15-4	5'-TGTCAGTCAGCCCTGGATGT-3'
2D6 13	5'-ACCGGGCACCTGTACTCCTCA-3'
2D6 13-2	5'-AGGTGCTAAGCCCTCACTG-3'
2D6 13-3	5'-CCCCTGACCAGTGACGAGTT-3'
2D6 13-4	5'-TCCTTGCTCTGCCATTACCC-3'
Reverse primer	
13r	pCR2.1-TOPO vector primer
2D6 24-2	5'-TTAGGTTTAGGTGTTGACAG-3'
2D6 24-3	5'-GCCAGTCTGCCCTTATT-3'
2D6 24-4	5'-AAGTTGCTGCGTATCCATCT-3'
2D6 24-5	5'-GCTGCCTGTTTCTACTTTGC-3'
2D6 b-657	5'-GAGCCAAACAAGTGCCT-3'
2D6 13RA	5'-TGAGGAGTACAGGTGCCCGGT-3'
2D6 13RA-2	5'-AAATACACCAATCAGCACTC-3'
2D6 13RA-3	5'-AATCAGCAGGATGTGGGTGG-3'

of 30 sec at 94°C, 30 sec at 66°C and 5 min at 68°C. PCR products were separated by electrophoresis in 1.0% agarose.

Southern blot analysis: *EcoR* I-RFLP and *Xba* I-RFLP analysis was carried out with *CYP2D6cDNA* as a probe using the DIG system (Roche, Tokyo, Japan).⁶ In addition, *BamH* I was also used for Southern blot analysis to obtain additional information on the *CYP2D6* gene structure.

Approach using long-PCR for a novel gene structure: Primers 15 and 24 were used to amplify a region downstream of *CYP2D6* containing a putative inserted sequence (Table 1). The reaction mixture contained 1.1 mM Mg (OAc)₂, 1*XL buffer II (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), 0.2 mM of each dNTP, 7.5 pmol of each primer, 75 ng of genomic DNA and 1 U of rTth DNA polymerase (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), with a total volume of 25 µL. The reaction profile was 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 5 min at 68°C. PCR products were separated by electrophoresis in 1% agarose.

Sequencing analysis: The PCR product obtained using the primers 15/24, which contains the unknown sequence, was purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) and was cloned using a TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Tokyo, Japan).

Sequencing was performed for the plasmid using a BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), with the primers listed in Table 1. An ABI PRISM310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) was used for sequencing.

Results and Discussion

Southern blot analysis of genomic DNA was performed with *Xba* I or *EcoR* I using the *CYP2D6cDNA* probe to confirm the *CYP2D6* gene structure. The two *Xba* I fragments we have detected most frequently are 29 kb and 44 kb. The *Xba* I 29-kb fragment contains the two pseudogenes *CYP2D8* and *CYP2D7* in addition to the *CYP2D6* gene. DNA samples carrying the *Xba* I 29-kb band show three bands of 15.1 kb, 9.4 kb, and 8.8 kb, indicating *CYP2D7P/AP*, *CYP2D6*, and *CYP2D8*, respectively, when digested by *EcoR* I.⁷ In the present study, we encountered an unknown 11.0-kb band in addition to the 15.1-kb, 9.4-kb, and 8.8-kb bands obtained by *EcoR* I-RFLP analysis, although a 13-kb band, suggestive of *CYP2D6**5, was not detected.

Firstly, we analyzed three DNA samples from which we had obtained positive products by long-PCR with primers 13/14, but not with primers D1/D2. The three samples were named 'Sn1', 'Sn2' and 'Sn3', respectively in this paper (Figs. 1B and C). From the three samples, we found unknown 11.0-kb band in addition to 15.1-kb, 9.4-kb, and 8.8-kb bands by *EcoR* I-RFLP analysis, without the 13-kb band suggestive of *CYP2D6**5. In addition, two samples, Sn2 and Sn3, showed a 13.7-kb band suggestive of *CYP2D6**36(*10C) or *CYP2D7BP* located between *CYP2D7* and *CYP2D6*. Consistent with the *EcoR* I 13.7-kb band, the *Xba* I 44-kb band was detected in the samples.^{8,9}

Furthermore, *BamH* I was used for Southern blot analysis to elucidate the cause of the 11.0-kb band. As a result of *BamH* I-RFLP, one sample, Sn1, showed 4.9-kb, 1.7-kb, 2.2-kb and 1.9-kb bands in addition to 6.6-kb and 4.1-kb bands. Panserat *et al.* reported that 6.6-kb and 4.1-kb bands, suggestive of *CYP2D7* and *CYP2D6*, respectively, were usually detected by *BamH* I-RFLP.¹⁰ When a nucleotide substitution exists at the *BamH* I recognition site in the *CYP2D7* or *CYP2D6* gene, either 4.9-kb and 1.7-kb bands or 2.2-kb and 1.9-kb bands are detected instead of the 6.6-kb or 4.1-kb band, respectively. This result suggests that at least two *CYP2D7* genes and two *CYP2D6* genes exist. Sn1 appeared to have only the 29-kb band as detected by *Xba* I-RFLP probably due to the limited sensitivity although a 30.6-kb band was expected to be detected for the novel allele. *BamH* I-RFLP and *Xba* I-RFLP analysis suggested that the gene structure of the sample had two *CYP2D7*-*CYP2D6* alleles. In other words, the sample did not have the *CYP2D6**5 allele, although a

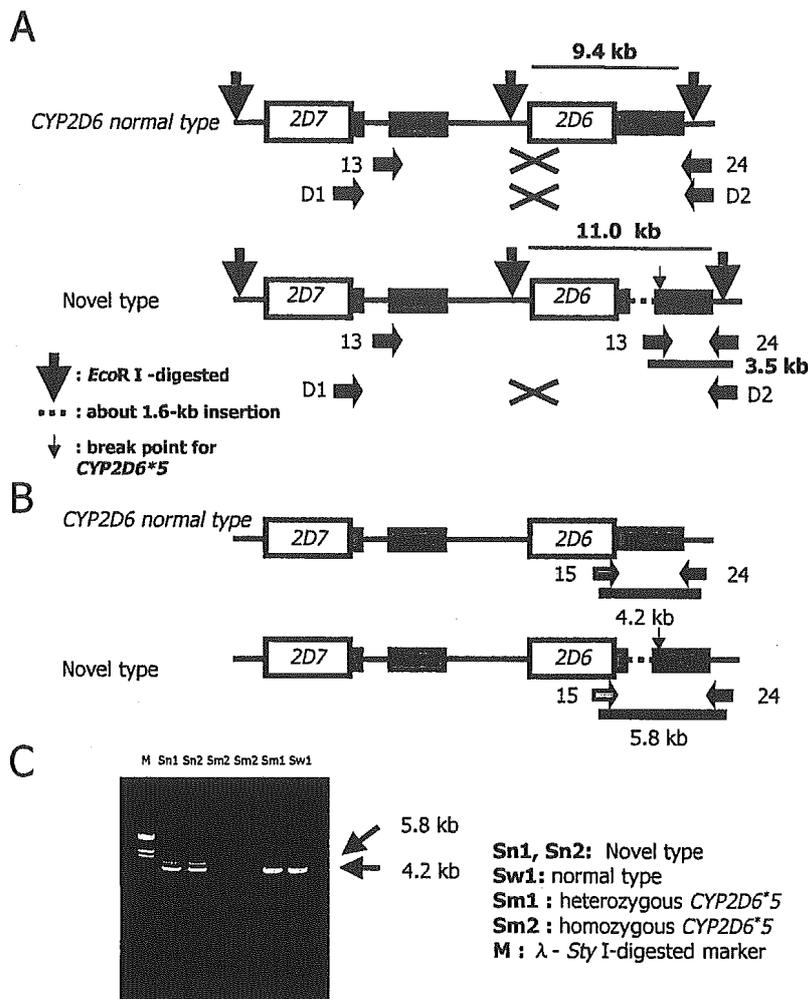


Fig. 2. Analysis for a novel gene structure

A) Hypothesis of a novel gene structure: From the novel type of allele, an 11-kb fragment was detected by *EcoRI* analysis and a positive product was amplified by long-PCR with primers 13/24 but not primers D1/D2. **B)** Detection of the insertion in the novel allele: Primer 15 is a specific primer located in intron 8 of *CYP2D6*. If an inserted sequence exists, a 5.8-kb PCR product will appear. **C)** Confirmation of the PCR product related to the novel allele by electrophoresis: Both the 4.2-kb and 5.8-kb products were amplified from the samples. Neither products were amplified from the homozygote for *CYP2D6**5. In addition, only a 4.2-kb product was amplified from the heterozygote for *CYP2D6**5. The 5.8-kb product was directly sequenced by use of the primers listed in Table 1.

positive product was detected by the long-PCR with primers 13/24.

Based on these results, we hypothesized that an approximately 1.6-kb fragment was inserted into a region downstream of the *CYP2D6* gene and it created a novel *EcoR* I 11-kb fragment (Fig 2A). To confirm this hypothesis, we designed a new specific primer set (primer 15/24) with which the PCR product containing the inserted sequence would be amplified by long-PCR (Fig. 2B). As expected, two bands, 4.2 kb and 5.8 kb, were amplified using primers 15 and 24, and the results were confirmed by sequencing analysis (Fig. 2B and 2C) (Table 1). Finally, we identified the chimeric sequence consisting of exon 9 of *CYP2D6*, the region downstream from *CYP2D7* and the region downstream from

CYP2D6 in that order. We confirmed the sequence where primer 13 could anneal in the region downstream from *CYP2D7* in the chimeric sequence. This was why the positive product was obtained by long-PCR with primers 13/24. On the other hand, primers D1/D2 worked properly in the detection of *CYP2D6**5 because primer D1 was designed based on exon 9 of *CYP2D7*. We also confirmed that false-positive PCR products were detected by long-PCR with primers reported by Hersberger *et al.*⁵⁾ because the primer was designed based on the same region as primer 13.

The breakpoint related to *CYP2D6**5 was seen in the 5.8-kb fragment from the chimeric allele. The 3.5-kb PCR product from this chimeric allele was similar to that from *CYP2D6**5. Therefore, we estimated that a

novel breakpoint is present upstream from the sequence where primer 13 anneals. It was also suspected that this chimeric allele was made from a gene conversion between the *CYP2D6**5 allele and wild-type allele at a region immediately downstream from the *CYP2D6* stop codon. We, however, could not specify the novel breakpoint because of the high homology between *CYP2D6* and *CYP2D7*.

A total of 771 samples have been assessed by long-PCR with the two sets of primers, 13/24 and D1/D2, so far. One sample was detected in addition to the three samples demonstrated above. Therefore, the frequency of the novel allele was estimated to be approximately 0.3% in the Japanese population. After we had demonstrated the estimated structure of this novel allele,¹¹⁾ Ishiguro *et al.* independently reported the presence of the *EcoR* I-11kb fragment in one Japanese subject.¹²⁾ Their observation (n = 1) is probably consistent with our findings. The frequencies in other ethnic groups should be examined as well.

With respect to the activity of *CYP2D6*, the effect of the novel allele could not be evaluated clearly because all four subjects were heterozygous for the allele and no phenotyping test could be conducted. Furthermore, all of them were determined as *CYP2D6**10/*10 by the general genotyping procedure reported previously.⁹⁾ It, however, seems to us that this is not the null-allele of *CYP2D6*, such as *CYP2D6**5, because the coding region of *CYP2D6* exists although this remains to be proven. Thus, it is necessary to characterize the allele with further phenotyping.

Overall, long-PCR analysis is a useful and convenient method to detect *CYP2D6**5. In fact, this strategy for the detection of *CYP2D6**5 has been widely used as a standard since Steen *et al.* first reported the method.³⁾ At the moment, the primers provided by Johansson *et al.*⁴⁾ can be used to avoid a miscall for *CYP2D6**5 due to its novel structure, although the set of primers is less sensitive than the set provided by Steen *et al.*, and the product related to *CYP2D6**36 could be simultaneously detected by the set of primers as a different product from *CYP2D6**5.¹³⁾ As a new typing strategy, a TaqMan-based assay was used to detect *CYP2D6**5¹⁴⁾ although the system has not yet been used in a Japanese population.

In conclusion, we strongly recommend that at least two sets of primers, designed at different positions, be used for the detection of *CYP2D6**5. However, another typing strategy for *CYP2D6**5, superior to the long-PCR method, will be needed to make accurate decisions.

Acknowledgements: We thank Dr Yamamoto and Mr. Otani for their help. This study was supported by a grant-in-aid from the Ministry of Education, Culture,

Sports, Science and Technology of Japan. It was also supported in part by grants from the Organization for Pharmaceutical Safety and Research (No. 99-2), Labour and Health Science, Japan Health Sciences Foundation, The Nakatomi Foundation, and Japanese Research Foundation for Clinical Pharmacology.

References

- 1) Cholerton, S., Daly, A. K. and Idle, J. R.: The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**(12): 434-439 (1992).
- 2) Dahl, M. L., Yue, Q. Y., Roh, H. K., Johansson, I., Sawe, J., Sjoqvist, F. and *et al.*: Genetic analysis of the CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics*, **5**(3): 159-164 (1995).
- 3) Steen, V. M., Andreassen, O. A., Daly, A. K., Tefre, T., Borresen, A. L., Idle, J. R. and *et al.*: Detection of poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*, **5**(4): 215-223 (1995).
- 4) Johansson, I., Lundqvist, E., Dahl, M. L. and Ingelman, S. M.: PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. *Pharmacogenetics*, **6**(4): 351-355 (1996).
- 5) Hersberger, M., Marti-Jaun, J., Rentsch, K. and Hanseler, E.: Rapid detection of the *CYP2D6**3, *CYP2D6**4, and *CYP2D6**6 alleles by tetra-primer PCR and of the *CYP2D6**5 allele by multiplex long PCR. *Clin. Chem.*, **46**(8 Pt 1): 1072-1077 (2000).
- 6) Nishida, Y., Fukuda, T., Yamamoto, I. and Azuma, J.: CYP2D6 genotypes in a Japanese population: low frequencies of CYP2D6 gene duplication but high frequency of CYP2D6*10. *Pharmacogenetics*, **10**(6): 567-570 (2000).
- 7) Skoda, R. C., Gonzalez, F. J., Demierre, A. and Meyer, U. A.: Two mutant alleles of the human cytochrome P-450db1 gene (P450C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **85**(14): 5240-5243 (1988).
- 8) Johansson, I., Oscarson, M., Yue, Q. Y., Bertilsson, L., Sjoqvist, F. and Ingelman, S. M.: Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol. Pharmacol.*, **46**(3): 452-459 (1994).
- 9) Heim, M. H. and Meyer, U. A.: Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics*, **14**(1): 49-58 (1992).
- 10) Panserat, S., Mura, C., Gerard, N., Vincent-Viry, M., Galteau, M. M., Jacoz-Aigrain, E. and *et al.*: An unequal cross-over event within the CYP2D gene cluster generates a chimeric CYP2D7/CYP2D6 gene which is associated with the poor metabolizer phenotype. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **40**(4): 361-367 (1995).
- 11) Maune, H., Fukuda, T., Naohara, M., Ikenaga, Y., Otani, M., Yamamoto, I. and Azuma, J.: *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **33**(2) 379S-380S (2002). (in Japanese).

- 12) Ishiguro, A., Kubota, T., Sasaki, H. and Iga, T.: A long PCR assay to distinguish CYP2D6*5 and a novel CYP2D6 mutant allele associated with an 11-kb EcoRI haplotype. *Clin. Chim. Acta.*; **347**(1-2): 217-221 (2004).
- 13) Chida, M., Ariyoshi, N., Yokoi, T., Nemoto, N., Inaba, M., Kinoshita, M. and Kamataki, T.: New allelic arrangement CYP2D6*36×2 found in a Japanese poor metabolizer of debrisoquine. *Pharmacogenetics*, **12**(8): 659-662 (2002).
- 14) Schaeffeler, E., Schwab, M., Eichelbaum, M. and Zanger, U. M.: CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. *Hum. Mutat.*, **22**(6): 476-485 (2003).



CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation

T Kubota^{1,4}, C Nakajima-Taniguchi^{2,4}, T Fukuda¹, M Funamoto³, M Maeda¹, E Tange¹, R Ueki¹, K Kawashima¹, H Hara², Y Fujio¹ and J Azuma¹

¹Department of Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamadaoka, Suita City, Osaka, Japan; ²Osaka Regional Taxation Bureau's Clinic, Otemae, Chuo-ku, Osaka 540-0008, Japan and ³Funamoto Clinic, Urakaze-cho, Koshien, Nishinomiya City, Hyogo 663-8165, Japan

Correspondence:

Professor J Azuma, Department of Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City, Osaka 565-0871, Japan.
E-mail: azuma@phs.osaka-u.ac.jp

⁴These authors contributed equally to this work.

Received 14 June 2005; revised 15 September 2005; accepted 20 September 2005; published online 10 January 2006

CYP2A6 is the main enzyme that catalyzes nicotine into cotinine. Interindividual differences in nicotine metabolism result at least partially from polymorphic variation of CYP2A6 gene. In this study, we evaluated the influence of CYP2A6 polymorphisms on clinical phenotypes of smoking, such as smoking habit and withdrawal symptoms. Japanese smokers ($n=107$) were genotyped for CYP2A6*1, *4 and *9. Consistent with the previous reports, CYP2A6 genotypes have a tendency to correlate with the number of cigarettes per day and with daily intake of nicotine. Interestingly, CYP2A6 high-activity group (CYP2A6*1/*1, *1/*9, *1/*4, *9/*9) smoked the first cigarette of the day earlier than low-activity group (CYP2A6*4/*9, *4/*4), indicating more remarkable nicotine dependence. Furthermore, nicotine withdrawal symptoms were more serious in smoking cessation in CYP2A6 high-activity group. Collectively, CYP2A6 genotypes are related with nicotine dependence, influencing smoking habits and withdrawal symptoms in quitting smoking. It is proposed that individualized smoking cessation program could be designed based on CYP2A6 genotypes.

The Pharmacogenomics Journal (2006) 6, 115–119. doi:10.1038/sj.tpj.6500348; published online 10 January 2006

Keywords: CYP2A6; polymorphism; smoking; nicotine; individualized medicine

Introduction

Smoking is one of the most important risk factors for serious diseases, including cancers, chronic obstructive pulmonary diseases and cardiovascular diseases. It is strongly recommended that smokers should cease smoking for good health. However, there is an interindividual diversity in the difficulties in quitting smoking, mainly due to nicotine dependence. Therefore, to carry out smoking cessation program effectively, individual status of smoking should be estimated and, more importantly, predicted, based on nicotine dependence.

Nicotine is metabolized to cotinine, an inactive metabolite, principally by CYP2A6.¹ Several CYP2A6 gene polymorphisms have been identified so far, and three alleles, *1, *4 and *9, are shown to be the major polymorphisms in Japanese. CYP2A6*1 is a wild-type allele with normal enzyme activity. CYP2A6*4 is a whole deletion type of the CYP2A6 gene.^{2,3} CYP2A6*9 has a single-nucleotide polymorphism in TATA box, T-48G substitution, which impairs the transcriptional activities⁴ and, consequently, its enzymatic activity.^{5,6} It has been clearly demonstrated that the pharmacokinetics of nicotine is influenced by CYP2A6 polymorphisms.

In the present study, as pharmacokinetic changes in plasma nicotine concentration are considered to be related with craving for nicotine,⁷ we hypothesized that *CYP2A6* polymorphisms might affect smoking status. And we evaluated the relation between *CYP2A6* genotypes and smoking habits, including nicotine withdrawal symptoms, from the point of view of nicotine dependence. The data presented here provide insights into individualized smoking cessation program based on *CYP2A6* genotypes.

Results

First, we confirmed the relationship between the *CYP2A6* genotypes and the number of cigarettes in the subjects analyzed in the present study (Figure 1a). *In vivo* enzymatic activity of nicotine metabolism decreases in order, *CYP2A6**1/*1, *1/*9, *1/*4, *9/*9, *4/*9 and *4/*4.⁵ *CYP2A6* genotype, which determines the enzyme activity *in vivo*, had a tendency to be associated with the number of cigarettes smoked per day, as reported previously.^{8–10} Next, the amounts of daily nicotine intake were also examined. As shown in Figure 1b, *CYP2A6* genotype is likely to be linked with daily nicotine intake, proposing the possible association between *CYP2A6* genotypes and nicotine dependence.

Association between *CYP2A6* genotypes and smoking habits, such as the number of the cigarettes per day and

the daily nicotine uptake, was statistically analyzed. The subjects were divided into the high- and low-activity group, based on their *CYP2A6* genotypes, according to the previous study.⁵ The subjects with the *1/*1, *1/*9, *1/*4 and *9/*9 genotypes, whose metabolic activities of nicotine are more than 70% of those of the subjects with *1/*1, were defined as high-activity group, whereas the subjects with the *4/*9 and *4/*4 genotypes with less than 50% of metabolic activities of the subjects with *1/*1 as low-activity group. It was found that the associations of *CYP2A6* genotypes with the number of cigarettes or with the nicotine uptake approached statistical significance ($P=0.09$ or 0.06 , respectively).

To evaluate nicotine dependence more directly, we analyzed the relation between *CYP2A6* genotypes and the time to the first cigarette as described in Materials and methods. As shown in Figure 2, proportion of subjects who smoked the first cigarette within 5 min of waking up was significantly higher in *CYP2A6* high-activity group than in low-activity group (36.8%, $n=95$ and 8.3%, $n=12$, respectively, $P<0.05$), suggesting that the subjects with high *CYP2A6* activity show the severer nicotine dependence than those with low activity.

Fagerstrom Test for Nicotine Dependence (FTND) is commonly performed to estimate nicotine dependence. Thus, the relationship between *CYP2A6* genotypes and nicotine dependence was evaluated according to FTND. Consistent with the results shown in Figure 2, there was significant association between the total score of FTND and *CYP2A6* activity (3.95 ± 1.45 in high-activity group, 3.17 ± 0.94 in low-activity group, $P<0.05$) (Figure 3).

Finally, nicotine dependence was diagnosed according to the severity of withdrawal symptoms observed during smoking cessation. In the population of smokers who tried to quit smoking, withdrawal syndrome was categorized into

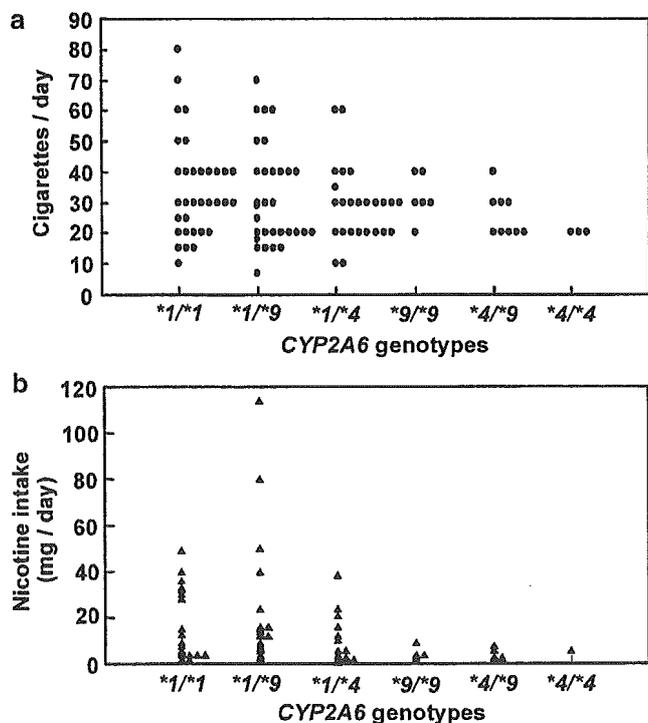


Figure 1 Relationship between the *CYP2A6* genotypes and the number of cigarettes smoked per day (a) or the amount of daily nicotine intake (b). *CYP2A6* genotypes had a tendency to be associated with the number of cigarettes smoked per day ($n=107$, $P=0.09$) and the amount of daily nicotine intake ($n=70$, $P=0.06$).

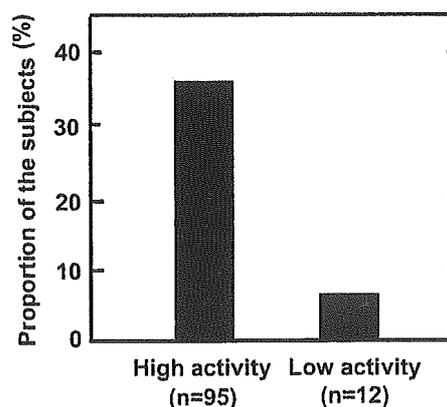


Figure 2 *CYP2A6* genotypes were related to time to the first cigarette of the day. The proportion of subjects who smoked the first cigarette within 5 min of waking up was calculated, as an index for nicotine dependence. The proportion of subjects was significantly higher in *CYP2A6* high-activity group than in low-activity group. *CYP2A6* high-activity group consists of subjects carrying *CYP2A6**1/*1, *1/*9, *1/*4 and *9/*9. Low-activity group consists of subjects carrying *CYP2A6**4/*9 and *4/*4.

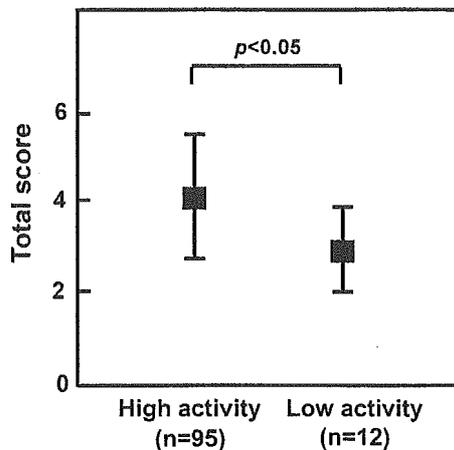


Figure 3 CYP2A6 genotypes are associated with nicotine dependence, analyzed by Fagerstrom Test for Nicotine Dependence. A total score for nicotine dependence was calculated by total scores on self-reported number of cigarettes smoked per day and time to the first cigarette of the day. The score was significantly high in CYP2A6 high-activity group, compared to low-activity group. Data are shown as mean \pm s.d.

three groups: severe, moderate and weak. The proportion of subjects with severe withdrawal symptoms was higher in CYP2A6 high-activity group than in low-activity group (Figure 4a). The proportion of subjects was 50.0, 44.4 and 5.6% for severe, moderate and weak withdrawal symptoms, respectively, in high-activity group ($n=72$), and 22.2, 44.4 and 33.3%, respectively, in low-activity group ($n=9$) (χ^2 test; $P < 0.05$). Furthermore, as nicotine replacement therapy affects the withdrawal symptoms, the degree of withdrawal symptoms was compared in the subpopulation that tried to quit smoking by receiving nicotine replacement therapy. The proportion of subjects was 60.4, 37.5 and 2.1% for severe, moderate and weak symptom, respectively, in high-activity group ($n=48$), and 33.3, 16.7 and 50.0%, respectively, in low-activity group ($n=6$) (χ^2 test; $P < 0.01$; Figure 4b). To clarify the association between the CYP2A6 activities and nicotine dependence, the odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were estimated relatively to the subjects with the weak withdrawal symptoms. In the total subjects, the ORs (95% CIs) were 6.0 (0.97–37.12, $P = 0.128$) for the moderate and 13.5 (1.71–106.56, $P = 0.025$) for the severe, respectively. In the subpopulation, they are 54.0 (2.61–1116.96, $P = 0.0089$) for the moderate and 43.5 (2.99–633.62, $P = 0.00341$) for the severe, respectively. Collectively, the relation between severities of withdrawal symptoms and CYP2A6 genotypes is more clearly demonstrated in this subpopulation.

Discussion

In the present study, we have demonstrated that CYP2A6 mutant allele with impaired or null enzyme activity was a negative risk factor for habit of smoking, especially nicotine dependence.

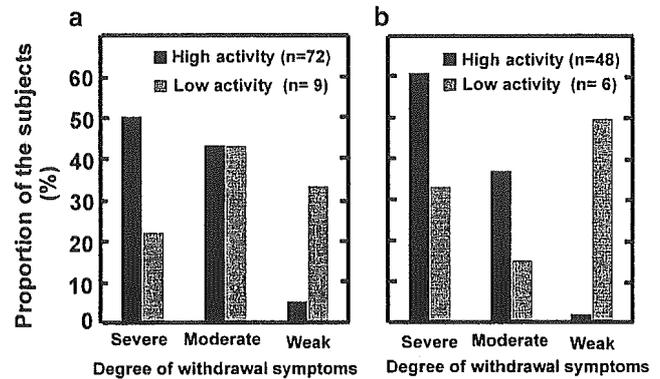


Figure 4 Impacts of CYP2A6 genotypes on withdrawal symptoms in the subpopulation that tried to quit smoking. Degree of withdrawal symptoms was evaluated using a questionnaire. (a) In CYP2A6 high-activity group, the withdrawal symptoms were significantly more serious than the low-activity group. (b) Degree of withdrawal symptoms and CYP2A6 genotypes in the population that tried to quit smoking by receiving nicotine replacement therapy. Among the population that tried to quit smoking by receiving nicotine replacement therapy, severe withdrawal symptoms were more remarkable in CYP2A6 high-activity group than in low activity group.

First, the number of cigarettes per day was likely to be associated with the activity of CYP2A6. Relation between the number of cigarettes and CYP2A6 genotype has been analyzed in several studies, with inconsistent results. Some studies have also shown that subjects who possessed CYP2A6 mutant allele smoked fewer cigarettes,^{8–10} as is the case with the present study, whereas others reported that CYP2A6 genotypes are not associated with cigarettes consumption in Japanese,^{11–13} Chinese¹⁴ and Caucasians.¹⁵ As smoking behavior is also influenced by environmental factors, these conflicting results might be due to interindividual differences in the environmental factors including lifestyles. In this study, a majority of the subjects were working as ‘white collar workers’, so difference in environmental influence was expected to be minimized.

To our knowledge, this is the first report that evaluated the relationship between the time to the first cigarette of the day and CYP2A6 genotypes. And it is revealed that the subjects with high-activity alleles of CYP2A6 smoke the first cigarette earlier than those with low activity. Importantly, as the time to the first cigarette of the day is considered to be influenced by nicotine dependence, it is possible that CYP2A6 activity is related with nicotine dependence. To address this possibility, nicotine dependence was quantified by calculating the score on the number of cigarettes per day and the time to the first cigarette of the day, according to FTND score. These two items are most important factors of FTND score,¹⁶ and are generally used in smoking cessation program. As a result, nicotine dependence was more remarkable in the subjects with CYP2A6 high activity than in those with low activity.

Finally, we investigated the relationship between nicotine withdrawal symptoms and CYP2A6 genotypes. It was revealed that the subjects in CYP2A6 high-activity group

exhibited manifest withdrawal symptoms, which are clinical phenotypes derived from nicotine dependence in smoking cessation. Moreover, the correlation between *CYP2A6* genotypes and withdrawal symptoms is more remarkable in subjects who received nicotine replacement therapy. Recent studies have provided molecular and cellular aspects of nicotine abuse. From the neuroscientific point of view, withdrawal symptom is considered to be the process of the nicotinic acetylcholine receptor from desensitization/inactivation states to functional states.¹⁷ Importantly, low concentrations of nicotine cause desensitization of its receptors. Therefore, the smokers with high *CYP2A6* activity might maintain a low level of nicotine that may inactivate a larger number of nicotinic receptors, compared with those with low activity. As a result, after many hours of abstinence, an excessive number of desensitized/inactivated nicotinic receptors may begin to recover to functional states in the smokers with high *CYP2A6* activity, resulting in the severe withdrawal symptoms.

In the process of smoking cessation, a number of smokers receive nicotine replacement therapy. High dose of nicotine is administered, for example, with nicotine patch, at the starting point and the subjects gradually weaned themselves from nicotine by reducing the dosage according to the generalized cessation protocol. Considering that the subjects with high *CYP2A6* activity are prone to nicotine dependence, it might be beneficial to individualize the protocol for nicotine replacement therapy. Theoretically, by reducing the dosage of nicotine more deliberately in the subjects with high activity than in those with low activity, the success rate in quitting smoking would be improved. At the same time, we have also noticed the limitation of the individualized program for smoking cessation based on *CYP2A6* genotypes alone. It is likely that other gene polymorphisms, in addition to *CYP2A6*, might be involved in nicotine dependence, because interindividual differences were not completely canceled by classifying the subjects based on *CYP2A6* genotypes. Further investigation may be required to understand the genetic background of the susceptibility to nicotine dependence.

In conclusion, we found that *CYP2A6* genotypes affect smoking habit, nicotine dependence, and withdrawal symptoms during smoking cessation. It could be proposed that *CYP2A6* genotyping may be a novel pharmacogenomic strategy for smoking cessation program as an individualized health care.

Materials and methods

Subjects

This study is designed as a multicenter trial. The study subjects consisted of 107 Japanese smokers who attended to a clinic for their health care. The patients with life-threatening diseases, including cancer, heart failure and symptomatic chronic obstructive pulmonary diseases, were excluded. All subjects gave their informed consent to participate in this study.

Table 1 Scoring for the degree of nicotine dependence, analyzed by the Fagerstrom Test for Nicotine Dependence (FTND)

Score	0	1	2	3
Number of cigarettes/day	~10	11–20	21–30	31~
First cigarette of the day (min)	61~	31–60	6–30	~5

~ = from XX to XY.

This study was approved by the institutional review committee of Osaka University.

Estimation of smoking status

All subjects were interviewed about their smoking habits such as the number of cigarettes per day, the nicotine content of the cigarettes, which they usually smoke, and time to the first cigarette of the day, which is generally accepted as a clinical index for nicotine dependence. Daily nicotine intake was calculated by multiplying the number of cigarettes per day by nicotine content of cigarette.

The total score for nicotine dependence was calculated by summing scores on two items that were extracted from FTND: 'the number of cigarettes smoked per day' and 'time to the first cigarette of the day' (Table 1).

In the subpopulation that tried to quit smoking ($n=81$), the degree of withdrawal symptoms was evaluated using a questionnaire. The degree of withdrawal symptoms was categorized into three groups: severe, moderate and weak.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from blood using the QIAamp Blood Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen). The genotyping of *CYP2A6**4 was carried out by the PCR-RFLP method, according to the previous report.¹⁸ The primers used for the PCR were as follows: forward – CAC CGA AGT GTT CCC TAT GCT G; reverse – TGT AAA ATG GGC ATG AAC GCC C. Genomic DNA samples (45 ng) were added to the 25- μ l PCR mixtures that consisted of 0.2 μ M each primer, PCR Gold Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs and 1.25 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). PCR was performed with an initial step at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 5 min, at 56°C for 1 min and at 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 7 min. The PCR product was digested with *Eco*81I. The digestion patterns were analyzed by electrophoresis with 2% agarose gel. Mutation allele was identified from the fragment with 728 bp, whereas the wild-type allele was from that with 789 bp.

*CYP2A6**9 alleles were genotyped by the allele-specific PCR method reported previously,⁵ with minor modification. The primers used for the PCR were as follows: forward – GAT TCC TCT CCC CTG GAA C, reverse-wild type: GGC TGG GGT GGT TTG CCT TTA; reverse-mutant type – GGC TGG GGT GGT TTG CCT TTC. The PCR reaction was performed in 25 μ l PCR reaction mixtures containing 45 ng genomic DNA, 0.4 μ M each primer, PCR Gold Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP and 1.25 U AmpliTaq Gold DNA