

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発」
に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 源間 信弘

平成 19 (2007) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発」
に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 源間 信弘

平成 19 (2007) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

「テーラーメイド医療用全自動DNAチップ診断機器の開発」に関する研究
----- 1

源間 信弘

II. 分担研究報告

1. 「テーラーメイド医療用DNAチップおよび全自動診断機器の開発」に
関する研究 ----- 4

源間 信弘

2. 「薬物動態予測用DNAチップの開発」に関する研究
----- 9

東 純一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

I V. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

総括研究報告書

「テーラーメイド医療用全自動 DNA チップ診断機器の開発」に関する研究

主任研究者 源間 信弘 （株）東芝 研究開発センター 事業開発室 技監

研究要旨：我々は、テーラーメイド医療の実践を加速するために、電気化学的な DNA 検出技術に基づく、迅速、安価、高信頼性の DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器を目指している。本研究では、全自動 DNA チップ診断機器で用いる使い捨てカセットおよび検査装置を開発し、ヒト血液からの全自動での DNA 検出を検証した。また、代表的な薬物代謝酵素「CYP2D6」の遺伝子多型を解析するための DNA チップを新たに開発し、臨床検体を使って実用性を評価した。

分担研究者：

東 純一

大阪大学大学院薬学研究科 教授

A. 研究目的

医薬品の有効性や副作用発現の個体差を予測するために、薬物代謝酵素や薬物標的分子の遺伝子多型の判定および特定の遺伝子発現量の変動解析に関するデータが蓄積されつつある。今後これら遺伝子情報を基にしたテーラーメイド医療が普及していくと考えられているが、既存の遺伝子解析機器は非常に高価で且つ操作に高い専門性が必要なため、一般の医療現場で使うにはまだまだハードルが高い。

本研究は、テーラーメイド医療の実践を加速するために、迅速、安価、高信頼性の DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器を開発することを目的とする。

B. 研究方法

（1）全自動 DNA チップ診断機器の開発

昨年度行なったプロトタイプ 1 号機での検証実験を受けて、本年度はユーザビリティも考慮した 2 号機を開発し、ヒト血液からの全自動での DNA 検出を検証した。

（2）薬物動態予測用 DNA チップの開発

昨年全自動 DNA チップ診断機器で使用する核酸増幅法に LAMP 法の採用を決めたことを受けて、これまで PCR 法で開発してきた CYP2D6 チップについて LAMP 法への対応を図った。また、昨年度までに開発済みの CYP2C9、CYP2C19、NAT2 チップについても継続して実検体での検討を進め、実用性の評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究への参加ボランティアに対しては、インフォームド・コンセントを文書で行う。また、

遺伝子解析を含む臨床研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）」に従い、実施施設内または然るべき機関に所属する倫理委員会において研究計画の承認を受けるものとする。

C. 研究成果

（1）全自動 DNA チップ診断機器の開発

昨年度行なったプロトタイプ1号機での検証実験を受けて、本年度はユーザビリティも考慮した2号機を試作した。2号機は全自動検査用カセットを2個セットできる構成となっており、同時に2検体のDNA検査が可能である。また、専用のグラフィカルユーザーインターフェースを開発し操作性の向上を図った。使い捨ての全自動検査用カセットに約0.5μLの血液を注入し装置にセットすると、後は抽出、増幅、検出などの全ての反応が自動で進行し、最後に検査結果が出力される。昨年に引き続き、マウス血液を用いたモデル系で基本特性を確認後、本装置を共同研究機関である大阪大学薬学部設置し、ヒト血液からの検出を検討した。今回は、N-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）2遺伝子にある2箇所の一塩基多型（SNP：590G/A、857G/A）を検出した結果、従来法（PCR-RFLP）による解析結果と一致しており、ヒト血液から全自動でのDNA検出を検証できた。なお、検査に要した時間は約2.5時間であった。

（2）薬物動態予測用 DNA チップの開発および基本特性の検証

昨年全自動DNAチップ診断機器で使用する核酸増幅法にLAMP法の採用を決めたことを受けて、これまでPCR法で開発してきたCYP2C9、CYP2C19、NAT2チップについては

LAMP法へ移行済みであったが、残るCYP2D6チップについても今年度LAMP法への対応を図った。CYP2D6には80種類以上の遺伝子多型が報告されているが、その中でも遺伝子が欠損するCYP2D6*5は日本人で比較的多く見られる（アレル頻度で5%程度）と共に、酵素活性を失活することから、CYP2D6の多型の中でも最も重要とされている。そこで、今年度はCYP2D6*5への対応を重点的に検討した。これまでCYP2D6*5の検出はサザンハイブリダイゼーションやLong-PCRで行われていたが、操作が非常に煩雑で熟練した技術が必要とされていたり、遺伝子数を特定できないなどの課題があった。今回新たに、DNAチップを用いてCYP2D6遺伝子数を計測する方法を開発し、実検体を用いて評価を行った結果、CYP2D6の欠損（*5のホモ接合体、ヘテロ接合体、遺伝子コピー数が0あるいは1）だけでなく、重複（遺伝子コピー数3）まで検出できることが確認できた。また、他の3種類の薬物動態予測用DNAチップについても、継続して臨床検体での評価を進めた結果、遺伝子型を精度良く解析できることが検証できた。

D. 考察

全自動DNAチップ診断機器の開発では、ユーザビリティを向上させた2号機を完成させ、ヒト血液を用いて全自動でのDNA検出を検証した。また、薬物動態予測用DNAチップの開発では、LAMP法に対応したCYP2D6解析用チップを開発し、臨床検体を使った評価で実用性を検証することができた。DNAチップを用いた小型の全自動DNA検査システムは世界的にも殆ど例がなく、今後テーラーメイド医療への貢献が大いに期待されると考えている。

E. 結論

平成 18 年度は本研究事業の最終年度であったが、ほぼ計画通りに目標を達成することができた。今後、臨床診断機器としての信頼性向上に向けて、継続して臨床検体を使った評価を行い、早期実用化に繋げたい。

F. 健康危険情報---特になし

G. 研究発表

1. 論文発表--- (省略)
2. 学会発表--- (省略)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許 (出願) --- (省略)
2. 実用新案---なし
3. その他---なし

分担研究報告書

「テーラーメイド医療用 DNA チップおよび全自動診断機器の開発」に関する研究

主任研究者 源間 信弘 東芝 研究開発センター 事業開発室 技監

研究要旨：本研究では、ユーザビリティを向上させた全自動 DNA チップ診断機器の 2 号機を開発し、*N*-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）2 遺伝子の一塩基多型（SNPs）検出をモデルとして、ヒト血液からの全自動での DNA 検出を検証した。また、代表的な薬物代謝酵素「CYP2D6」の遺伝子欠損／重複を検出するための DNA チップを新たに開発し、臨床検体を用いて実用性を評価した。

A. 研究目的

本研究では、テーラーメイド医療の実践を加速するために、簡便、迅速、安価、高信頼性の医療用 DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器の開発を目的としており、本年度は本事業の最終年度として、ヒト血液からの全自動での DNA 検出を検証した。

核酸増幅法に LAMP 法の採用を決めたことを受けて、これまで PCR 法で開発してきた CYP2D6 チップについても LAMP 法への対応を図った。CYP2D6 には 80 種類以上の遺伝子多型が報告されているが、日本人で頻度が高く（アレル頻度で 5%程度）かつ酵素活性を失う CYP2D6*5 への対応を重点的に検討した。基本的な特性評価は Coriell Cell Repository から購入した市販ゲノムで行い、最終的に大阪大学が保有するゲノムを用いて実用性を評価した。

B. 研究方法

（1）全自動 DNA チップ診断機器の開発

昨年度決定した仕様を基に、今年度はユーザビリティを向上させた 2 号機を新たに開発し、ヒト血液からの全自動での DNA 検出を検証した。今回の試験では *N*-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）2 遺伝子にある 2 箇所の一塩基多型（SNPs：590G/A、857G/A）の検出をモデルに用いた。また最終的には、共同研究機関である大阪大学で試験を行い、開発した機器の実用性を評価した。

（倫理面への配慮）

本研究への参加ボランティアに対しては、インフォームド・コンセントを書面で行う。臨床材料を使った研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、実施施設内または然るべき機関に所属する倫理委員会（含、東芝・研究開発センター倫理審査委員会）において研究計画の承認を受けるものとする。また、臨床材料提供者の個人情報が出漏りしないよう、全て匿名化を行う。

（2）薬物動態予測用 DNA チップの開発

昨年全自動 DNA チップ診断機器で使用する

C. 研究成果

(1) 全自動 DNA チップ診断機器の開発

(1)-1 全自動診断機器の開発：

昨年度行なったプロトタイプ 1 号機での検証実験を受けて、本年度はユーザビリティも考慮した 2 号機を試作した。今回開発した 2 号機は全自動検査用カセットを 2 個セットできる構成となっており、同時に 2 検体の DNA 検査が可能である。また、専用のグラフィカルユーザーインターフェース (GUI) を開発し操作性の向上を図った結果、全自動カセットへ血液を注入し、カセットを装置へセットすれば、後は GUI 上のスタートボタンを押すだけで検査が可能である。更に、一般ユーザーの使用も想定し、操作時の安全面にも配慮した構造となっている。全自動カセットをセットする装置本体 (W430xH290xD250mm) は、温度制御部、送液制御部、電流検出部などから構成されており、電源や制御基板などから成るコントローラー (W430xH180xD250mm) を通じて PC から制御する (図 1)。

(1)-2 全自動カセットの開発：

昨年度、全自動検査用カセットを試作し機能検証を行なったが、今年度はより多くの実験に対応するため、樹脂製の使い捨てカセットを射出成型で作製した。射出成型カセットのサイズは前回試作したものと同様約 5×7×2cm で、サンプル注入部、試薬保管部、増幅反応部、DNA チップ、送液流路などから構成されており、サンプル注入以降は完全密閉されコンタミネーションの発生を抑制する構造になっている。

(1)-3 ヒト血液からの全自動での DNA 検出の検討：

昨年同様、マウス血液を用いたモデル系で基本特性を確認後、ヒト血液からの検出を検討し

た。今回は、N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) 2 遺伝子にある 2 箇所の一塩基多型 (SNP : 590G/A、857G/A) をモデルに検討を行った結果、従来法 (PCR-RFLP) による解析結果と一致しており、ヒト血液から全自動での DNA 検出を検証できた。なお、検査に要した時間は約 2.5 時間であった。

最終的には、本装置を共同研究機関である大阪大学薬学部を設置し実用性の検証を行なった。

(2) 薬物動態予測用 DNA チップの開発および基本特性の検証

(2)-1 CYP2D6 遺伝子欠損/重複解析チップの開発：

CYP2D6 遺伝子多型のうち、CYP2D6 遺伝子自体を欠失している型 (CYP2D6*5) や重複している型 (CYP2D6*2×N) の検出には、従来サザンブロット法や Long-PCR 法が使われてきたが、操作が非常に煩雑で、熟練した技術が必要とされるだけでなく、遺伝子数を正確に特定できないなどの問題があり、新しい簡便な方法が求められていた。そこで我々は、DNA チップを使って CYP2D6 の遺伝子数を計測する新しい技術を開発した。基本的な特性については、市販のゲノムを用いて検証を行なった結果、CYP2D6*5 のヘテロ接合体と*5 以外との間で明確な信号の差が見られ、*5 の特異的な検出が可能であることが示された。市販ゲノムでは、*5 のホモ接合体や CYP2D6 遺伝子の重複についての検討ができなかったため、これらについては共同研究機関である大阪大学保有のサンプルで評価を行った。その結果、CYP2D6 遺伝子数が 0~3 までを精度良く検出できることが明らかになった。

D. 考察

全自動 DNA チップ診断機器の開発では改良型の 2 号機を開発し、ヒト血液からの全自動での DNA 検査を検証できた。操作に特殊な専門性は不要であることから、DNA 検査の普及に貢献できるものと考えている。

また、薬物動態予測用 DNA チップの開発では、CYP2D6 遺伝子の欠損や重複を解析するためのチップを開発し、実用性を検証できた。従来技術に比べ、短時間で精度良く検出できることから、今後テーラーメイド医療での利用が期待される。

現在、厚生労働省と経済産業省が連携して、医療用 DNA チップの実用化に向けたガイドライン作成に取り組んでおり、医療現場で DNA チップが使われる日も近いと思われる。今後はその動向にも注目しながら、既に開発済みの CYP2C9、CYP2C19、NAT2 チップとあわせ早期実用化を目指したい。

E. 結論

1 滴の血液から簡単に DNA を解析できる、小型の全自動 DNA チップ診断機器を開発し、ヒト血液からの SNPs 検出を検証した。本年度は本事業の最終年度であったが、目標をほぼ計画通り達成することができた。

本事業の成果が、テーラーメイド医療の実践に貢献できる様、DNA チップ、診断機器共に信頼性の向上に努め、今後は製品化に向けて開発を加速していきたい。

F. 研究発表

1. 論文、著書など

Nakamura N, Ito K, Hongo S, Hashimoto K, Furutsuka M, Kubota R, Fukuda T, Ohno M, Azuma J and Gemma N. Determination

of single nucleotide polymorphisms in N-acetyltransferase2 gene using an electrochemical DNA chip and an automated DNA detection system. 臨床病理 55(3) 216-23 2007

Hashimoto K, Takahashi M, Nakamura N, Ito K, Hashimoto M, Okada J, Hongo S and Gemma N. Electrochemical DNA Chip for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis. Wong S H Y, Linder M W and Valdes R Jr (eds). Pharmacogenomics and Proteomics AACCC Press 357-62 (2006)

2. 学会発表など

第 67 回分析討論会 2006 年 5 月 13 日 (秋田) 電気化学 DNA チップとその応用 橋本幸二

オルガテクノ 2006 2006 年 7 月 26 日 (横浜) 電気化学的手法を用いた DNA チップとその応用 橋本幸二

総合科学技術会議成果報告会 2006 年 12 月 21 日 (東京) テーラーメイド医療用 DNA チップ診断機器の開発 伊藤桂子

2007 年電子情報通信学会総合大会 2007 年 3 月 22 日 (名古屋) 電流検出型 DNA チップ 本郷禎人

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許（出願）

・特願 2007-31318 「遺伝子変異の検出方法」中村奈緒子

・特願 2007-77876 「核酸検出用デバイス」岡田純，本郷禎人，伊藤桂子，大木健司，源間信弘

・「ヒトチトクローム P450(CYP) 2D6 遺伝子欠損および遺伝子重複の検出方法およびアッセイキット」中村奈緒子，源間信弘，福田剛史，東純一

・その他外国出願 5 件（予定）

2. 実用新案---なし

3. その他---なし

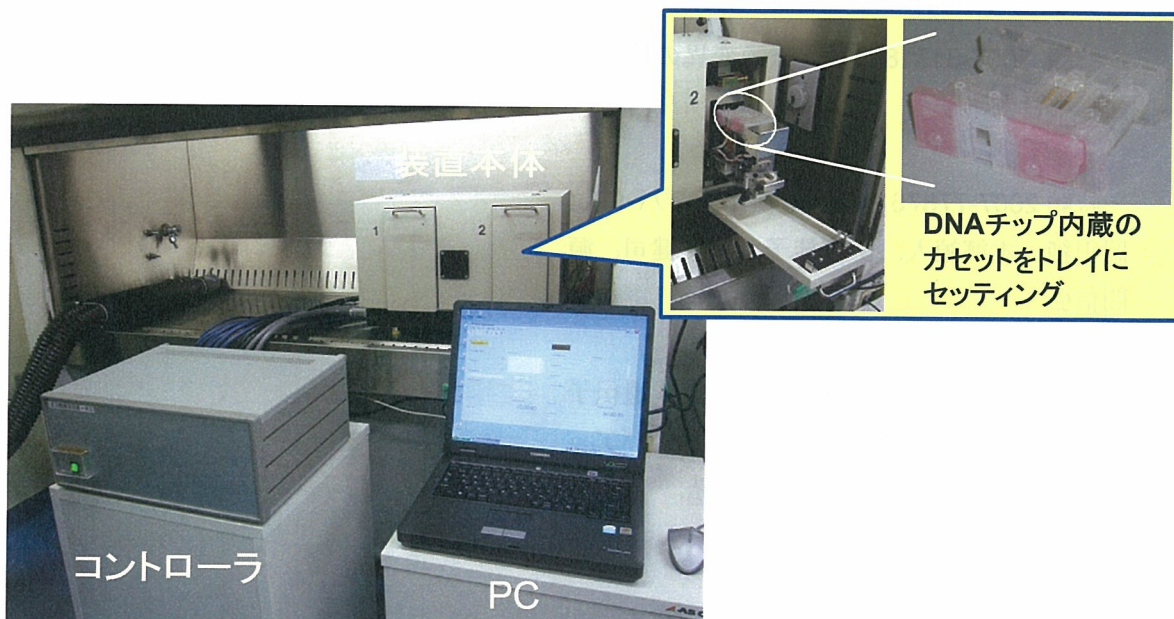


図1 試作した全自動 DNA チップ診断機器

分担研究報告書

「薬物動態予測用 DNA チップの開発」に関する研究

分担研究者 東 純一 大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学 教授

研究要旨： 本研究では、個別化適正医療の実践への過程を加速させるため、簡便、迅速、安価、高信頼性の遺伝子多型判定用 DNA チップの開発を行う。今年度は、①CYP2D6 遺伝子数判定用 DNA チップの開発、②主任研究者らが開発した DNA 検査装置「Genelyzer™」に対応した NAT2 及び CYP2C9/CYP2C19 遺伝子多型判定用 DNA チップの精度評価、③全自動診断機器用 DNA チップの精度検討、④DNA チップ開発の基盤となる臨床的検討の4項目について実施した。

A. 研究目的

医薬品の有効性や有害作用発現の個人差を予測するには、薬物代謝酵素や薬物標的分子の遺伝子多型の判定が有用であることを示唆するデータが蓄積されてきた。しかし現状では、薬効に関するゲノム情報が実地臨床の場で有効に利用されていない。一方、データの蓄積のみならず、蓄積されたデータの適正応用、すなわち遺伝子多型情報に基づいた個別化適正医療を実践する時が来ていることに疑いの余地はない。本研究では、遺伝子多型情報に基づいた個別化適正医療の実践を加速させるため、簡便、迅速、安価、高信頼性の DNA チップおよび全自動 DNA チップ診断機器の開発を目的とする。

B. 研究方法

(1) 薬物動態予測用 DNA チップの仕様の検討および DNA チップ開発の基盤となる

臨床的検討

遺伝子多型の影響が明確にされており、且つ、臨床的に有用な分子として、薬物代謝酵素 NAT2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 が挙げられる。我々は、これまでに上記分子に関し、臨床効果予測に重要な遺伝子多型 (SNPs) を提案し、主任研究者が開発した DNA チップの評価を行ってきた。

今年度も上記チップの改良および精度評価を行うと共に、新たに薬物代謝酵素 CYP2D6 の遺伝子数判定用 DNA チップの検討を行った。また、DNA チップ開発の基盤となる臨床的検討を行った。

- ・ CYP2D6 (CYP2D6 遺伝子数判定用 DNA チップの開発)

CYP2D6 は多くの医薬品の代謝に関与する臨床的に重要な酵素である。しかし、多

数の遺伝子型が存在し、遺伝子型に起因する活性の個体差が著しい。これまでに、CYP2D6 遺伝子上に存在する一塩基置換を伴う多型 (SNPs) の検出に関する検討を提案し、主任研究者らはそれを実施してきた。今年度は、CYP2D6 遺伝子の重複や欠損を伴う多型の解析原理を提案し、主任研究者の保有する技術を活用した DNA チップの作製を試みた。

・ CYP2C9 (ワルファリン臨床試験)

CYP2C9 は、抗凝固薬ワルファリンや糖尿病薬トルブタミドなどを代謝する薬物代謝酵素である。これらの薬物の常用量の投与により、出血や低血糖など重大な副作用を起こす患者が存在するため、CYP2C9 遺伝子多型判定による薬物動態予測は、安全な薬物治療を実践するために重要である。

今年度はこの実例として、ワルファリンを取り上げて、ワルファリン服用症例の解析を行った。

・ CYP2A6 (禁煙指導に関わる臨床研究)

CYP2A6 は、NAT2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 に加え、現在その遺伝子型判定の臨床的有用性が検討されている薬物代謝酵素の一分子種である。我々は、CYP2A6 がニコチンを代謝することに着目し、CYP2A6 多型と喫煙行動との関連性を検討してきた。すなわち、喫煙者の喫煙本数や起床後からの喫煙までの時間と CYP2A6 遺伝子型との関係を調査した。

(2) Genelyzer™ 用薬物動態予測 DNA チップの評価

我々は、血液から DNA 増幅、多型検出までを自動化した「全自動 DNA チップ診断機器」の開発を目指している。その前段階として、主任研究者らはハイブリダイゼーション反応以降を自動化した DNA 検査装置「Genelyzer™」を既に開発している。我々は、Genelyzer™ で利用可能な DNA チップ開発のため、今年度は以下の検討を行った。

・ CYP2C9 / CYP2C19 遺伝子型の同時判定 DNA チップの開発

昨年度に引き続き、LAMP 法(遺伝子の等温増幅法)による増幅産物用 DNA チップの精度評価を行い、データを蓄積した。この精度評価には、TaqMan 法、RFLP 法、シーケンス法などにより遺伝子型を事前に明らかにしている検体を用いた。

・ NAT2 遺伝子型判定用 DNA チップの開発

今年度は NAT2 遺伝子多型判定用 DNA チップの仕様の変更を提案し、さらに前述の CYP2C9 / CYP2C19 判定用チップの場合と同様に DNA チップの精度評価を行った。

(3) 全自動診断機器 (試作機) における NAT2 遺伝子型判定用 DNA チップの検討

血液からの遺伝子型判定までの工程を自動化した解析システムを用いて、NAT2 遺伝子型判定を行った。すなわち、主任研究者より全自動機および全自動機用 NAT2 判定 DNA チップの提供を受け、全自動機判定システムの動作確認を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子多型解析を行うために、大阪大学ヒトゲノム倫理委員会及び

DNA 検体提供医療機関の倫理委員会の承認を得た。DNA 試料採取のための採血を行う前に、被験者には当該試験の内容を十分に説明した後、文書による同意を得た。被験者から採取した血液試料は、採取医療機関にて匿名化された後、大阪大学に届けられ、DNA が精製された。DNA 試料は大阪大学にて厳重に管理されている。

C. 研究成果

(1) 薬物動態予測用 DNA チップの仕様の検討および新規候補遺伝子の探索

・ CYP2D6 遺伝子数判定用 DNA チップの開発

CYP2D6 遺伝子多型には全遺伝子欠損を伴う遺伝子型 (CYP2D6^{*}5) と重複を伴う遺伝子型(CYP2D6^{*}2×2)が存在する。これらを判定するために、遺伝子数を定量的に検出するシステムを提案した。CYP2D6 遺伝子の近傍には同遺伝子と極めて相同性の高い CYP2D7、CYP2D8 が存在する。これらの遺伝子配列を考慮することにより、検出の特異性を確保した。検出原理の確認のために、Genomic Southern Blotting 法により遺伝子構造を解析した検体を利用した。両対立遺伝子が共に欠損している検体を 0 コピー、片方の対立遺伝子を欠損している検体を 1 コピー、もっとも多い通常の検体を 2 コピー、一つの対立遺伝子が重複型の 3 コピーとして、検出方法の理論を構築した。実際に、0 コピーを 1 検体、1 コピーを 5 検体、3 コピー1 検体を含め、合計 17 検体を新たに開発したシステムで解析し、すべて理論どおりの結果を得ることのできる条

件を見出した。

・ワルファリン臨床研究

ワルファリン維持量が平均的維持量 2.0mg/day に比較して、0.5mg/day と低用量の患者に遭遇した。シーケンス法による遺伝子解析の結果、当該患者が CYP2C9^{*}3/3 を有していることが判明した。CYP2C9^{*}3/3 を保有するヒトは、CYP2C9^{*}1/1 に比較して CYP2C9 の活性が著しく低下しているとされており、これを示唆する成績であった。CYP2C9^{*}3/3 を保有するヒトは理論上では 1000 人に 1 人以下とされており、CYP2C9^{*}3/3 保有者のワルファリン服用症例の成績は貴重な知見であった。

・禁煙指導に関わる臨床研究

CYP2A6 の遺伝子型 (CYP2A6^{*}4、CYP2A6^{*}9) を解析し、これらを両対立遺伝子に有する被験者を“CYP2A6 低活性群”、それ以外の被験者を“CYP2A6 高活性群”と定義した。低活性群では、高活性群に比してニコチンの依存度の高い喫煙者の割合が低かった。

(2) Genelyzer™ 用 薬物動態予測 DNA チップの評価

・ CYP2C9 / CYP2C19 遺伝子型の同時判定 DNA チップの開発

主任研究者らから DNA チップの提供をうけ、Genelyzer™ を用いて CYP2C9^{*}3 および CYP2C19^{*}2、3 を解析した。遺伝子型に偏りをなくするため、事前に別法にて遺伝子型を判定した 18 検体を用いた。

CYP2C9*3, CYP2C19*3 については、機器による自動判定と従来法での判定との結果が全例で一致した。CYP2C19*2 については判定自体に問題はないものの、自動判定基準の見直しなどが必要であることが分かった。

・ NAT2 多型判定用 DNA チップの仕様の変更

昨年度までに、C481T, G590A, G857A を判定可能な DNA チップの開発を進めてきた。今年度は、NAT2 活性の推定精度を高めるため、C190T, G191A の 2 箇所を判定箇所に加えること、C481T の判定から T341C の判定に変更することを主任研究者らに提案した。当初、C481T は T341C と連鎖不平衡にあることが知られており、C481T で判定が可能であるため、PCR 法の利便性から C481T を判定箇所としていた。しかし、NAT2 活性に影響を与える部分が T341C であることから、T341C を直接検出することが望ましい。この変更により、極めてまれに検出される C481T と T341C が連鎖不平衡でない検体も正確に評価できる。最終的に C190T, G191A, T341C, G590A, G857A の 5 箇所を同時判定可能な DNA チップの開発を提案した。

・ NAT2 遺伝子型判定用 DNA チップの精度評価

18 検体を用いて精度評価を行った。このうち、LAMP 増幅後の反応溶液を DNA チップにセットする際のトラブルで判定不能となった 2 検体を除いた結果は全て従来法と一致していたが、一部の多型については、自動判定基準の見直しなどが必要であるこ

とが分かった。

(3) 全自動診断機器（試作機）における NAT2 遺伝子型判定用 DNA チップの検討

主任研究者より導入された全自動診断機器を用いて、自動判定の動作確認ならびに精度評価を行った。分担研究者のサイトにおいても、血液を投入し、結果を得るまでの全工程が実行可能であった。

また、数検体の血液を用いて判定精度に影響を及ぼす要因の抽出を行い、主任研究者の開発にフィードバックした。

D. 考察

CYP2D6 の全欠損型 (CYP2D6*5) は活性を消失させる遺伝子型であり、日本人のアレル頻度で 5%程度存在することから、CYP2D6 の多型判定ではもっとも重要である。今回、LAMP 法をベースとした遺伝子増幅法を用い、また、主任研究者が有する技術を活用することにより、DNA チップによる判定が可能となった。本方法は短時間で精度良い検出が期待できることから、開発の意義は大きいと考えられる。

臨床的な検討から、CYP2C9*3/*3 を有する被験者の特定が治療上有用であることが示唆された。また、喫煙習慣の調査検討から、CYP2A6 の遺伝子多型がニコチン依存状態を予測するのに有用である可能性が示唆された。予防医学の観点から、禁煙指導は有効であるとされており、効率的な禁煙指導をサポートする体制を構築するため、CYP2A6 の多型判定チップの開発も今後検

討すべきである。

NAT2, CYP2C9/19 については、Genelyzer™ に対応した遺伝子多型判定用 DNA チップでの精度評価を行い、一定の成果を得たと考えている。また、全自動 DNA 診断機器の試作機を用いた □ サイトテストを実施できた。今後、本成果を基に、全自動 DNA 診断機器のための DNA チップ開発が推進されると考えられる。

E. 結論

臨床検体を用いた □ サイトテストにより、薬物動態を予測するための DNA チップとして、NAT2、CYP2C9/CYP2C19 遺伝子多型判定用の DNA チップの基礎整備は成し遂げられたものと考えられる。製品化に向けては、規制当局の指針を視野に入れ、精度評価を商品レベルにまで高めることが今後必要である。また、今回の成果を基に、全自動 DNA 診断機器の開発が進展していくものと期待される。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

Fukuda T, Yamamoto I, Tanabe T, Ohno M, Tougou K, Takeda H, Fujio Y, Azuma J. Warfarin dose requirement for patients with both VKORC1 3673A/A and CYP2C9*3/*3 genotypes. Clin Pharmacol Ther 2006 80(5):553-554.

Kubota T, Nakajima-Taniguchi C, Fukuda T, Funamoto M, Maeda M, Tange E, Ueki R, Kawashima K, Hara H, Fujio Y and Azuma J. CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation. Pharmacogenomics J 2006 6(2):115-9

田邊智子, 大野雅子, 福田剛史, 景山茂, 東純一. 遺伝子多型情報に基づく投与指針作成に向けて-CYP2C19-. 臨床薬理 37 (6) 2006: 359-66.

田邊智子, 福田剛史, 大野雅子, 景山茂, 東純一. 遺伝子多型情報に基づく投与指針作成に向けて -CYP2C9-. 臨床薬理 36(5) 2005: 255-60.

2.学会発表

第 27 回日本臨床薬理学会年会, 2006 年 11 月 29 日~12 月 1 日 (東京). Warfarin 維持投与量に対する CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型の影響 ~ CYP2C9*3/*3 保有者の維持投与量に対する考察~. 福田剛史, 山本勇, 田邊智子, 大野雅子, 東郷克彦, 竹田晃, 藤尾慈, 東純一

第 27 回日本臨床薬理学会年会, 2006 年 11 月 29 日~12 月 1 日 (東京). Rapid Acetylator におけるイソニアジド増量時の体内動態. 窪田竜二, 大野雅子, 中山哲, 徳田愛理, 加茂里美, 高橋美佳, 蓮沼智子, 飯島肇, 有沢紀子, 山本明子, 武部雅人,

東純一

医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム,2006 年 7 月 15 日～16 日 (大阪). CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型と warfarin の投与量の関係. 福田剛史, 山本勇, 田邊智子, 大野雅子, 東郷克彦, 竹田晃, 藤尾慈, 東純一

医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム,2006 年 7 月 15 日～16 日 (大阪). 心不全治療における beta 遮断薬反応性の個人差: beta1 アドレナリン受容体、及び CYP2D6 遺伝子多型からの検討. 南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈, 竹本恭彦, 葭山稔, 濱口智幸, 松井裕, 早田望, 福田剛史, 吉川純一, 北畠顕, 東純二

The 13th Annual Meeting of Pacific Rim

Association for Clinical Pharmacogenetics 2006 (PRACP2006), June 28-30, 2006 (Changsha, China) Launched "Randomized Controlled Trial of Isoniazid for Pharmacogenomics-based Tuberculosis Therapy" Ohno M, Yokota S, Kubota R, Nakayama S, Tokuda A and Azuma J.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得---特になし
2. 実用新案登録---特になし
3. その他---特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤尾慈, 南畝晋平, 前田真貴子, 東純一, 橋本幸二, 源間信弘	薬物代謝酵素遺伝子変異解析	山本重夫	バイオ解析・診断技術のテーマメイド医療への応用	シーエムシー	日本	2006	211-8
Hashimoto K, Takahashi M, Nakamura N, Ito K, Hashimoto M, Okada J, Hongo S and Gemma N	Electrochemical DNA Chip for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis	Wong S H Y, Linder M W and Valdes R Jr	Pharmacogenomics and Proteomics	AACC Press	米国	2006	357-62

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
田邊智子, 福田剛史, 大野雅子, 景山茂, 東純一	遺伝子多型情報に基づく投与指針作成に向けて -CYP2C9-	臨床薬理	36(5)	255-60	2005
Kubota T, Nakajima-Taniguchi C, Fukuda T, Funamoto M, Maeda M, Tange E, Ueki R, Kawashima K, Hara H, Fujio Y and Azuma J.	CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation.	Pharmacogenomics J	6(2)	115-9	2006

Fukuda T, Yamamoto I, Tanabe T, Ohno M, Tougou K, Takeda H, Fujio Y and <u>Azuma J</u>	Warfarin dose requirement for patients with both VKORC1 3673A/A and CYP2C9*3/*3 genotypes.	Clin Pharmacol Ther	80(5)	553-4	2006
田邊智子, 大野雅子, 福田剛史, 景山茂, <u>東純一</u>	遺伝子多型情報に基づく投与指針作成に向けて —CYP2C19—	臨床薬理	37 (6)	359-66	2006
Nakamura N, Ito K, Hongo S, Hashimoto K, Furutsuka M, Kubota R, Fukuda T, Ohno M, <u>Azuma J</u> and <u>Gemma N</u>	Determination of single nucleotide polymorphisms in N-acetyltransferase2 gene using an electrochemical DNA chip and an automated DNA detection system	臨床病理	55(3)	216-23	2007

第1章 薬物代謝酵素遺伝子変異解析

藤尾 慈^{*1}, 南畝晋平^{*2}, 前田真貴子^{*3},
東 純一^{*4}, 橋本幸二^{*5}, 源間信弘^{*6}

- *1 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 助教授
- *2 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 研究員
- *3 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 研究員
- *4 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 教授
- *5 ㈱東芝 研究開発センター 事業開発室 グループ長
- *6 ㈱東芝 研究開発センター 事業開発室 技監

『バイオ解析・診断技術のテーラーメイド医療への応用』

2006年10月 シーエムシー出版刊 抜刷