

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 はじめに

ゲノム科学の進展は、「体質」として片付けられてきた薬効の個体差に科学的根拠を提供しつつある。遺伝子情報を広く薬物治療に応用する学問領域は、ファーマコゲノミクス (Pharmacogenomics, PGx:ゲノム薬理学) と呼ばれ、その医療への還元として、遺伝子情報を用いて個々の患者に最適化された医療を行う個別化適正医療 (テーラーメイド医療) の実現が、多くの期待を集めている。個々の薬物治療に関し PGx に基づく個別化適正医療の実現を考える場合、薬物動態学的 (Pharmacokinetic, PK) アプローチと薬力学的 (Pharmacodynamic, PD) アプローチとに分けて戦略を練る必要がある。薬物動態学的アプローチとは、薬物動態関連遺伝子 (薬物代謝酵素, 薬物トランスポーター遺伝子) に関する遺伝子情報を用いて医療の個別適正化を行うことを目指すものであり、薬力学的アプローチとは、薬物標的遺伝子の遺伝子情報を医療に用いることを意味する。薬効の個体差を考慮する場合には、PK, PD の両面からのアプローチが必要であることに疑いの余地はなく、著者らはこれらの情報をまとめて「薬効ゲノム情報」と呼んでいる。現状では、PK 関連遺伝子の解析技術の開発が格段に進んでいる。その理由としては、

- ① PGx の分野では特に薬物代謝酵素の遺伝子多型とその活性への影響に関する研究がすすんでおり、遺伝子解析の対象とする遺伝子多型がすでに絞られていること
- ② さまざまな薬物についての薬物動態の個体差が、比較的限られた薬物代謝酵素やトランスポーターの遺伝子変異で説明づけられる可能性が高く、解析結果の汎用性が期待されること

*1 Yasushi Fujio 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 Shinpei Nonen 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 Makiko Maeda 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 Junichi Azuma 大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 教授

*5 Koji Hashimoto (株)東芝 研究開発センター 事業開発室 グループ長

*6 Nobuhiro Gemma (株)東芝 研究開発センター 事業開発室 技監

- ③ 逆に、PDの個体差を説明すると期待される薬物標的遺伝子の遺伝子多型と薬効との相関を検証するには、個々の薬剤について臨床試験を通じて検証する必要があり、未だに解析対象が十分に挙げられていないこと
- ④ 薬物標的遺伝子の遺伝子情報を用いた個別化医療の中でも期待が大きい抗癌剤の選択に関しては、癌組織での標的遺伝子の発現量の検証、(遺伝子多型以外の) 遺伝子変異の同定が要求される場合があり、ゲノムDNAを用いたチップ技術だけでは対応できないことなどが挙げられる。

さらに重要なことは、遺伝子情報を用いた個別化適正医療は、すべての疾患に対して適応されるものではなく、遺伝子解析、遺伝子情報管理に必要な費用と解析によって得られるメリットとのバランスによって、対象疾患・治療法が抽出されうると考えられる点である。従って、

- ① 遺伝子型を考慮すべき遺伝子多型の頻度がある程度高いこと
 - ② 遺伝子多型を判定せずに投薬した場合に、副作用の発現率が無視できないほどに高く、且つ発生する副作用が重篤であること
 - ③ あるいは、遺伝子多型を判定することにより、疾患の中の難治例が克服できること
- という条件を満たしていることが、具体的な医療応用への条件となろう。

これらのことを考慮し、薬物代謝酵素遺伝子多型を用いた個別化適正医療が実現され始めてい

表1 薬物代謝酵素遺伝子多型に基づく個別化適正医療

解析対象遺伝子	対象薬剤	対象疾患・使用目的	期待される効果
CYP			
CYP 2C9	ワーファリン	血栓性疾患	出血の回避
	トルブタミド	糖尿病	低血糖発作の回避
CYP 2C19	PPI	消化性潰瘍	難治例の克服
CYP 2D6	β遮断薬	高血圧, 心不全	徐脈・低血圧・心不全等の回避
	SSRI	うつ病	副作用(嘔気等)の回避と投与量設定
抱合酵素			
NAT 2	イソニアジド	結核	肝障害の回避, 難治例の克服
UGT 1A1	イリノテカン	悪性腫瘍	骨髄抑制, 下痢の回避
その他			
MTHFR	メトトレキサート	リウマチ, 自己免疫性疾患	骨髄抑制

第1章 薬物代謝酵素遺伝子変異解析

る分野、あるいは今後、進展しうる分野の例を表1に示す。ここで注意すべき点のひとつは、遺伝子多型の頻度、副作用発現率が白人、黒人、黄色人種間で異なることである。すなわち、人種により、遺伝子情報に基づいた個別化適正医療のもたらす恩恵が異なり、従って、実現化の社会的有効性は、個々の集団において検証されねばならないことにある。事実、最近、黒人のみを治療対象とする心不全治療薬が、FDAにより承認されている。

このように、遺伝子情報に基づいた個別化適正医療が実現するには、越えなければならないハードルはまだ多いが、現実には一部の治療薬に関して薬物代謝酵素遺伝子のゲノム情報に基づいた投与設計が行われている。例えば、2005年6月にグルクロン酸抱合酵素(UGT)の対立遺伝子型の違いによる塩酸イリノテカンの投与量の変更を求めた添付文書をFDAが承認した。このような中、遺伝子情報を迅速、安価かつ簡便に収集する技術の進歩は、PGxに基づいた個別化医療の実現がさらに大きな広がりを見せるためのdriving forceとなるであろう。

本章では、医薬工連携のもと、開発が進んでいる臨床現場での使用を目指した薬物代謝酵素の遺伝子多型判定機器に関し概説する。

2 DNAチップを使った遺伝子多型解析技術

DNAチップ(マイクロアレイ)は複数の塩基配列を同時に検出できるデバイスとして、遺伝子発現や遺伝子多系解析などの研究分野で広く用いられている。例えば、Affymetrix社製のGeneChipを用いると、数万種類の遺伝子を同時に検出することが可能であり、最近ではその長を活かして診断分野にも応用され始めている¹⁾。しかしながら、現在用いられているDNAチップのほとんどが蛍光標識を利用しているため、操作が煩雑で、蛍光ムラが生じやすいなどの問題点が指摘されている。さらに標識する蛍光色素が高価であるうえに、検出に高感度の光学系を必要とするのでシステムも大型で高額になる。そのため、これらの課題を克服する新しい技術が求められている。

2.1 電気化学的遺伝子検出法の原理

著者らは、核酸挿入剤(インターカーレーター)の電気化学反応を利用した遺伝子検出方法を開発した(図1)²⁻⁴⁾。この方式は、①DNAプローブが結合した金電極上で検体DNAとハイブリダイゼーション反応を行い、②形成したハイブリッド(二本鎖)部位に特異的に結合するインターカーレーターを添加し、③電圧印加による挿入剤の酸化還元電流を検出する、という原理である。金電極上へプローブを固定化するために、合成DNAの末端にチオール基を導入した。チオール基と金は非常に親和性が高いため、電極表面にプローブ溶液を滴下するだけで簡単かつ強固に固

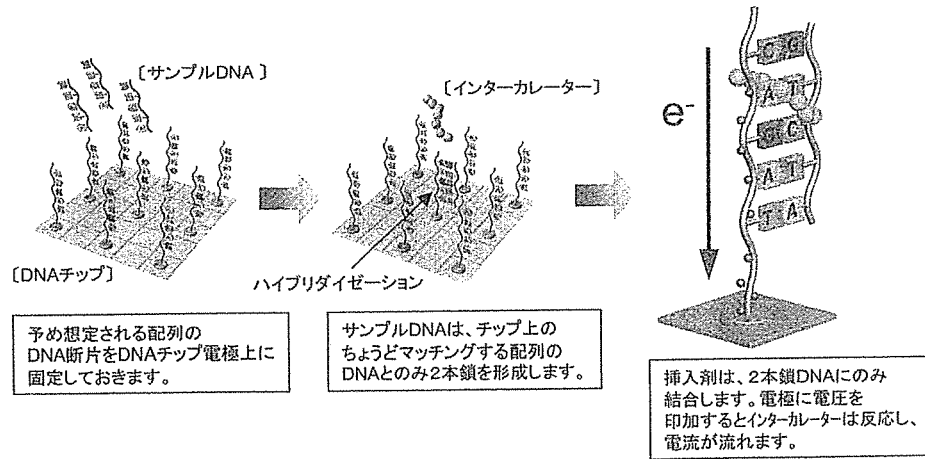


図1 インターカレーターの電気化学反応を利用した遺伝子検出法の原理

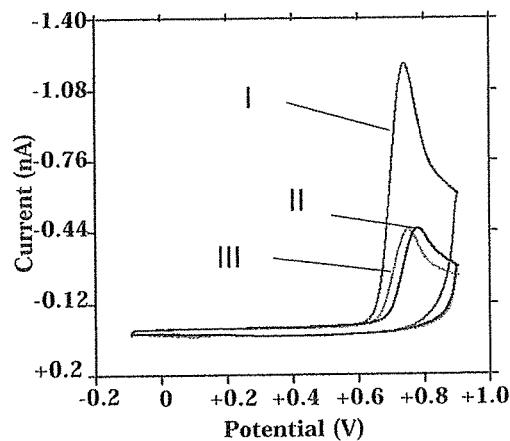


図2 ヘキスト 33258 を用いた電流検出型 DNA チップの検出例

- I : フルマッチ用プローブからの信号
 - II : ミスマッチ用プローブからの信号
 - III : ネガティブコントロール
- ターゲットとプローブが一致した場合だけ、有意な電流が観察される。

定化が可能である。インターカレーターの役割は、遺伝子ハイブリッドの量を電気化学信号に変換する点にある。インターカレーターは、古くから遺伝子や細胞の核を染める物質として使われているもので、市販品としても数十種類入手可能である。これら市販品の中から、DNA に対する特異性、電気的な特性に着目しスクリーニングを実施した結果、マイナーグループバインダーとして知られているヘキスト 33258 を用いた場合に最も良い特性が得られている (図 2)。

本方式は、煩雑な標識が不要なため検査時間が短くて済む。更に、検出系がコンパクトなので、

システムの小型化が容易である。以上のように、蛍光方式での問題点を克服することで、研究用途のみならず、今後臨床検査など幅広い分野での利用が期待されている。

2.2 電流検出型 DNA チップ

著者らは、上述した電気化学的な原理に基づく DNA チップを開発した⁵⁻⁷⁾。電流検出型 DNA チップは、数 cm 角のガラス基板の上に金電極をパターンニングしたもので、それぞれの電極上には異なる配列のプローブを固定化することができる。そのため、1 チップで複数の DNA を同時に検出することができる (図 3)。今回作製したものは、基板上に作用電極 (直径 200 μm) と、参照電極、対極が形成されており、作用電極上に DNA プローブを固定化して実験に用いた。

また、チップに合わせて専用の検査装置も開発した。従来の DNA チップを使った遺伝子検査は、高価で大型のハイブリダイゼーション装置と DNA の検出/解析装置が必要で、取り扱いにも高い専門性が要求される。著者らは、一般病院にも導入できる様に、ハイブリダイゼーション反応からデータ解析までを自動で行えるシステムを目指している^{8,9)}。写真の装置は 2 カセットを並列処理できる仕様になっており、このシステムを使うと、カセットに PCR 産物などのサンプルを注入し、あとは装置にセットするだけで自動的に検査結果が出力される。電流検出方式の簡便性、短時間検出といった長所を生かすことで、検査項目によっては 10 分程度での測定が可能になり、DNA 抽出、PCR 増幅などの前処理を含めても、数時間以内で検査が完了する。また、装置内部には、測定系、送液系、制御系が組み込まれているにもかかわらず、小型化を実現した。また、反応ユニットを増設することができるので、多検体の同時処理も可能である。

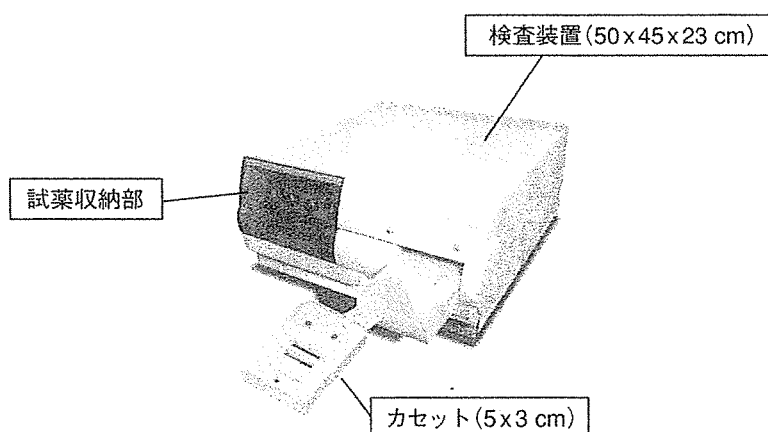


図3 電流検出型 DNA チップカセットと検査装置

3 応用

前述した新しい解析機器を用いて、薬物代謝酵素の遺伝子多型を解析した例を次に紹介する。

3.1 NAT 2 遺伝子解析チップ

N-アセチルトランスフェラーゼ 2 (NAT 2) は、薬物のアセチル化に関与する酵素で、日本人では NAT2 *5, *6, *7 の 3 つの遺伝子変異型を判定できれば、NAT の酵素活性がほぼ予測可能と言われている¹⁰⁾。そこで、これら変異型を判定するために 3 箇所(481 C/T, 590 G/A, 857 G/A) の一塩基多型 (SNPs) を解析する DNA チップを開発した。3 箇所の SNPs は 2 塩基置換タイプであることから、DNA チップ上には SNP 当たりそれぞれの多型に対応する 2 種類、計 6 種類のプローブを固定化した。今回使用したチップでは、データの信頼性を確保するために 1 種類のプローブにつき 4 電極以上を割り当てた。既に約 100 例以上の実検体を使った試験を終了しており、PCR-RFLP の結果と 100% 一致することを確認している (図 4)。

3.2 CYP 2 C 19 遺伝子解析チップ

CYP 2 C 19 には、これまで約 20 の遺伝子型が報告されているが、日本人における CYP 2 C 19 低活性群は CYP2 C19 *2, *3 を検出することでほぼ 100% 特定できるとされている。そこで、この 2 つのアレルを検出するために、636 G/A, 681 G/A の 2 箇所の SNPs を解析対象とする DNA チップを開発した。約 30 例の臨床検体を用いて CYP 2 C 19 チップの評価を行った結果、

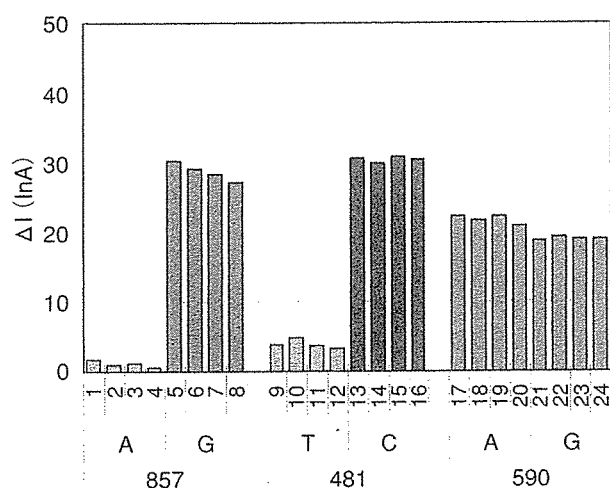


図 4 NAT 2 遺伝子多型検出結果の一例
 サンプル：血液から抽出したゲノム DNA の PCR 産物
 判定結果：481 C/C, 590 G/A, 857 G/G

全検体において従来法と一致する判定結果を得た。

3.3 CYP2C9 遺伝子解析チップ

CYP2C9 活性低下を引き起こす遺伝子型としては、CYP2C9*2、*3 が報告されている。日本人では CYP2C9*3 を判定することで CYP2C9 活性の個人差をほぼ 100% 説明できるとされている。そこで、CYP2C9*3 の判定に必要な 1075 A/C 多型を解析対象とした DNA チップを開発した。検体から抽出したゲノム DNA を増幅し DNA チップで検出した結果、従来法と判定結果が一致し、精度良く多型判定が行えることが示された。

4 次世代技術開発—全自動 DNA 検査装置

DNA チップを用いた遺伝子検査では、DNA の抽出、増幅、反応、検出、解析という複数の工程が必要となる。個々の工程には煩雑な作業を必要とするので、将来的に医療の現場で DNA チップが幅広く使われるようになるためには、全工程の自動化が必要と考えられる。そこで著者らは、電流検出型 DNA チップを骨格とした全自動 DNA チップ検査装置のプロトタイプ機および DNA チップカセットを開発した。開発で最も重要視したのは、コンタミネーション対策で、その実現のために完全密閉型のカセットを基本コンセプトにした。検査に必要な試薬類および DNA チップはカセットに封入されており、検体としての血液を注入した後はカセット内で全ての反応が行われる。カセット内には廃液貯めもあるため、廃棄に際しても増幅産物が外気と接する事がない。開発したプロトタイプ機を使って血液からの全自動解析を行い、特異的な DNA 検出が可能であることを実証した。

5 まとめ

以上のように、ナノテクノロジーの目覚ましい発展に伴い、臨床現場での使用を目的とした遺伝子判定装置の開発は着実に進んでおり、一塩基置換に対する判定はほぼ満足がいくものとなっている。残された技術的な問題点は、長い領域の遺伝子欠損変異、あるいは繰り返し構造からなる遺伝子多型の判定を、一塩基置換の解析と同じシステムの中にどのように組み込むかにある。

また近い将来の問題点として、薬効ゲノム情報に基づいた医療が、従来の「さじ加減」による医療に比べ医療経済学的に優れているかどうかを明らかにするための前向き臨床研究による確証の欠如があげられるであろう。この場合、遺伝子多型頻度が人種間で異なることに加え、保健行政が各国で異なることから、臨床研究は国際的な規模での比較試験としてデザインされるべきで

ある。

最後に、多型判定機器というハード面での開発に加え、遺伝子情報管理というソフト面での技術開発を提言したい。現在の想定では、個人の遺伝子情報の保護と遺伝子多型の判定までの時間の短縮の観点から、臨床現場において遺伝子判定を行うことを前提としている。この前提に従えば、異なる疾患に罹患し、異なる医療機関を受診する場合、その度に遺伝子多型の判定を受けることになる。しかし、最初に述べたように、薬物代謝酵素の遺伝子多型情報は、様々な疾患を対象とした様々な薬物治療にも応用可能な情報であり、さらに自明のことながら患者の一生涯にわたり不変の情報である。従って、各人の遺伝子情報を管理保存することにより、遺伝子判定の不要な繰り返しを避けることができ、時間的・経済的節約が可能になる。各人の遺伝子情報「薬効ゲノム情報」を管理するシステムの開発について、情報保存の可否を含めて、今後、社会的な議論が必要であろう。

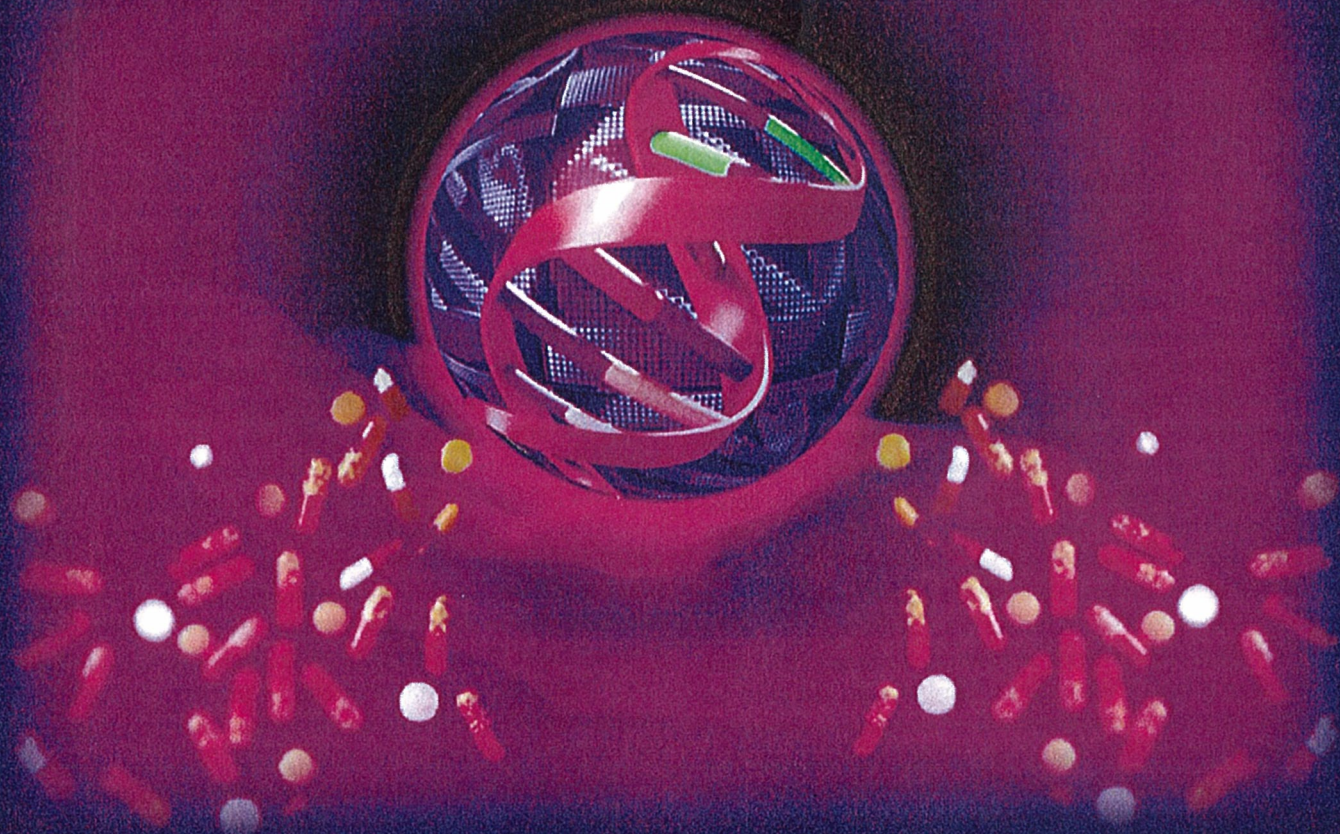
本研究の一部は、平成 14 年度(新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 産学官連携型産業技術実用化開発補助事業および平成 16~17 年度厚生労働科学研究費補助事業 (萌芽的先端医療技術推進研究) として行われた。また、本研究の一部は、ヒューマンサイエンス財団の支援を受けている。南畝晋平, 前田真貴子は、財団法人医療機器センター流動研究員である。

文 献

- 1) W. H. Koch *et al.*, Pharmacogenomics and Proteomics, AACC Press, p. 331 (2006)
- 2) K. Hashimoto *et al.*, *Supramol. Chem.*, 2, 265 (1993)
- 3) K. Hashimoto *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 286, 219 (1994)
- 4) K. Hashimoto *et al.*, *Sensors and Actuators, B* 46, 220 (1998)
- 5) M. Takahashi *et al.*, *Clin. Chem.*, 50, 658 (2004)
- 6) M. Takahashi *et al.*, *Analyst*, 130, 687 (2005)
- 7) T. Nakamura *et al.*, *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, 20, 219 (2005)
- 8) 源間信弘ほか, DNA チップとリアルタイム PCR, 講談社, p. 111 (2006)
- 9) K. Hashimoto *et al.*, Pharmacogenomics and Proteomics, AACC Press, p. 357 (2006)
- 10) 窪田竜二ほか, 臨床検査, 48, 171 (2004)

Pharmacogenomics and Proteomics

ENABLING THE PRACTICE OF PERSONALIZED MEDICINE



EDITED BY
Steven H.Y. Wong
Mark W. Linder
Roland Valdes, Jr.

AACCPress

Electrochemical DNA Chip for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis

Koji Hashimoto, Masayoshi Takahashi, Naoko Nakamura, Keiko Ito, Michie Hashimoto, Jun Okada, Sadato Hongo, and Nobuhiro Gemma

INTRODUCTION

The postgenome market is expected to show exponential growth following the decoding of the human genome. There are great expectations for DNA chip technology, which permits the DNA sequence and gene expression in individuals to be easily evaluated and holds the promise of DNA-based diagnosis for cancer and other common diseases. Both Affymetrix and Stanford-type DNA chips are commonly employed for the analysis of gene expression and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the research setting, but these methods involve complicated fluorochrome labeling, expensive chips, and specialized fluorescence analysis equipment (1,2). On the other hand, new technologies that avoid the above problems have been developed (3–5).

Electrochemical methods for the sequence-specific detection of target DNA have been reported from the early 1990s (6–8). These methods combine nucleic acid (probe) layers with electrochemical transducers. Some of these methods employ an electrochemically active DNA binder (i.e., an intercalator) as the hybridization indicator rather than labeling the target DNA as in conventional methods (9–13). Since they obviate the need for labeling and expensive equipment, electrochemical methods are expected to be useful for point of care (POC) applications. It is anticipated that this technology will provide rapid, accurate, and simple DNA analysis with inexpensive equipment and also promote personalized medicine, which is a key concept in the next generation of medical science.

ELECTROCHEMICAL DNA CHIP

We have been working since 1990 to develop an original electrochemical DNA chip based on the use of an electrochemically active intercalator and a probe-immobilized electrode (10–13). The most outstanding feature of this electrochemical DNA chip, which is expected to promote personalized medicine, is that it successfully combines nanotechnology, semiconductor technology, and biotechnology.

Principle of the Electrochemical DNA Chip

Synthesized oligonucleotide probes are bound to the surfaces of the electrodes of the DNA chip (Fig. 35-1). The oligonucleotide probes are modified with a thiol residue at the 5' or 3' end. It is well known that thiol residues bind strongly to gold. Therefore, the probes are easily bound to the gold electrode surface by chemisorption. Genomic DNA is extracted from a specimen such as a blood sample or a scraping from the oral mucosa using a commercially available DNA extraction kit. Target sequences are amplified by the polymerase chain reaction (PCR) method. When the amplicon is added to the chip, it reacts only with the probes that have complementary sequences, and specific double-stranded hybrids are formed on the electrode surface.

After the hybridization reaction, an intercalator solution is added to the chip. The intercalator binds specifically to the hybrids that have formed on the electrodes. About 50 different commercially available intercalators were evaluated. A minor groove binder, Hoechst 33258 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), was found to be the most suitable for the electrochemical DNA chip due to its electrochemical properties and specificity to double-stranded DNA.

When a voltage is applied to an individual electrode, a redox current flows between the intercalator bound to the hybrid and the electrode. The sequence of the target DNA is determined by measuring this redox current. In the case of Hoechst 33258, the peak anodic current is obtained at 600 mV (Fig. 35-2).

Microfabricated Disposable Chip and Cassette

Figure 35-3 shows the structure of the disposable DNA chip. Both a titanium thin film (500 Å) and a gold thin film (5000 Å) are formed sequentially using a two-dimensional sputtering system on a Pyrex glass plate. Then, the electrode ($\phi = 500 \mu\text{m}$) is photolithographically processed on the plate using a photo-resist. The chip shown in Fig. 35-3 has 40 electrodes for probe

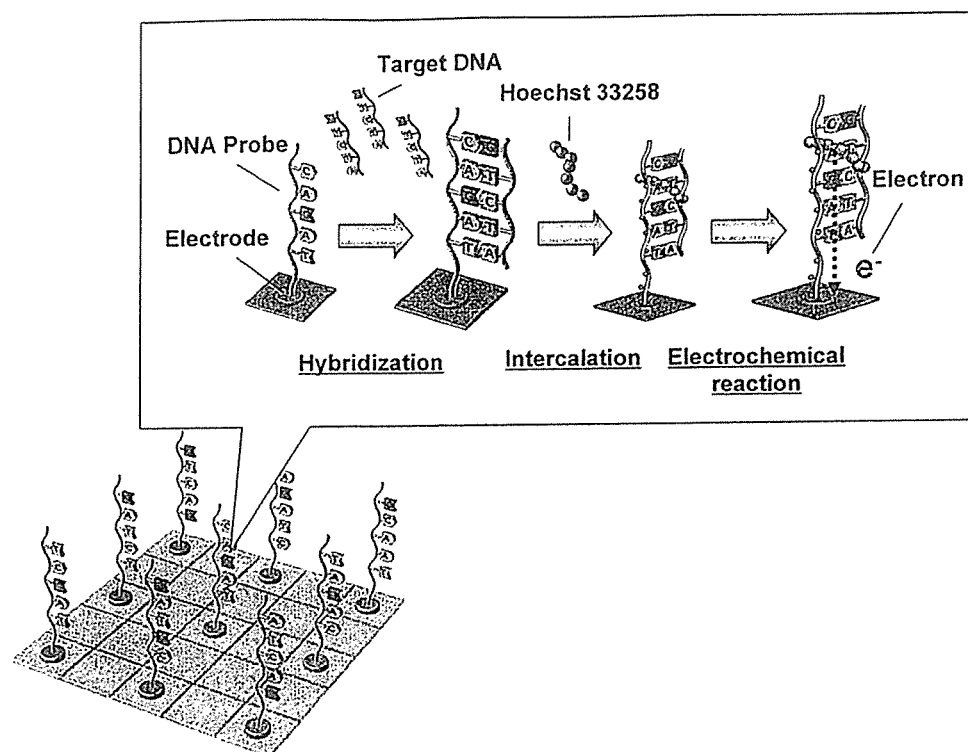


Figure 35-1 Principle of the electrochemical DNA chip based on an electrochemically active intercalator and probe-immobilized electrodes.

binding. A conventional microfluidic spotting device is usually employed for probe binding. The length and sequence of the probes are designed and optimized for each target sequence.

The cassette consists of a glass chip, sample injection port, liquid flow line, electrical pad for signal transfer to the device, and bar code for data control. The chip measures 5×3 cm, and the sample volume is less than $50 \mu\text{L}$ of PCR product.

Automatic SNP Detection Device

A dedicated device for the electrochemical DNA chip has also been developed (Fig. 35-4). This device includes a liquid flow

pump, temperature controller, and electrical circuits for signal detection. The cassette is controlled by a bar code reader and is set by an autoloading mechanism. After the cassette containing the analyte such as the PCR product is set, all processes related to hybridization, washing, signal detection, and identification of the genotype are performed automatically by the dedicated device and software designed for SNPs analysis. Genotyping is performed in about 60 minutes using the standard protocol in which two samples (cassettes) are tested independently. The detection time depends on the target sequence. Only 10 minutes is needed for the detection of sequences that match perfectly.

APPLICATIONS

We are actively investigating the applications of the electrochemical DNA chip in various areas, particularly in the field of medical research, in collaboration with a number of medical institutions.

Interferon (IFN) Responsiveness Genes

Currently, about 2 million people are infected with the hepatitis C virus (carriers) in Japan, and there are thought to be about 170 million such people in the world. Although interferon is considered to be an effective agent for the treatment of hepatitis C, it is actually effective in less than one half of patients in Japan. This is due to the genetic characteristics of individual patients as well as the viral genotype. Our colleagues at Toshiba Hospital have found SNPs in more than a dozen genes, including

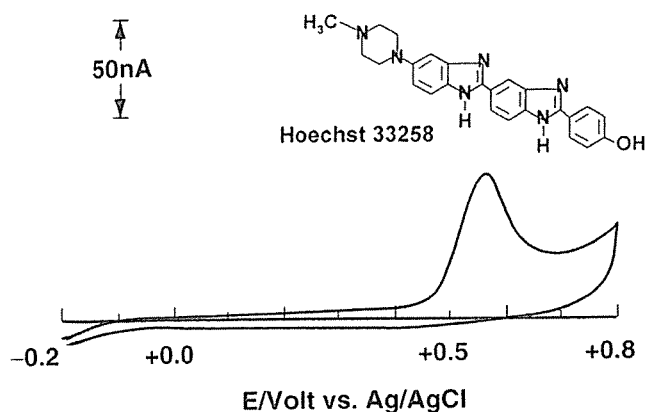


Figure 35-2 Electrochemical signal derived from Hoechst 33258 using gold electrodes.

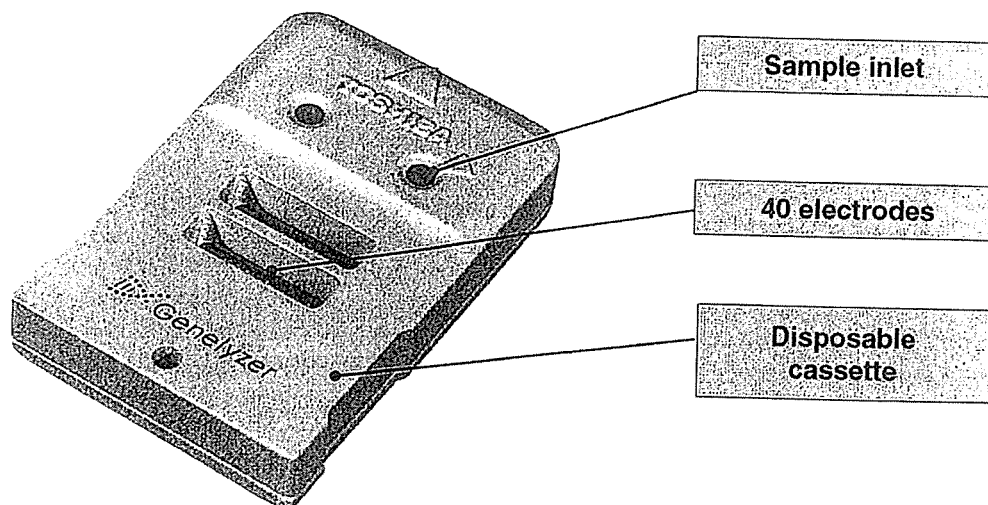


Figure 35-3 Microfabricated disposable DNA chip cassette.

myxovirus resistance-1 (MxA) and mannose binding lectin (MBL) genes, which are useful in predicting whether IFN treatment will be effective in individual patients (14–16).

We applied electrochemical DNA chip technology to analyze these IFN responsiveness genes. The DNA chip is designed to support the simultaneous genotyping of four SNPs (MxA G-88T and A-123C; MBL G-221C and G54A) that have been found to be correlated with the responsiveness of patients with

hepatitis C to IFN therapy. For the simultaneous genotyping of these four SNPs, eight allele-specific DNA probes are employed. Each probe is attached to two electrodes for validation. The target DNA solution containing four targets prepared by PCR is reacted with the probes on the chip. Figure 35-5 shows an example of the results for simultaneous detection using the electrochemical DNA chip. In this figure, the increase in peak current (ΔI) above background is shown. Each genotype can be

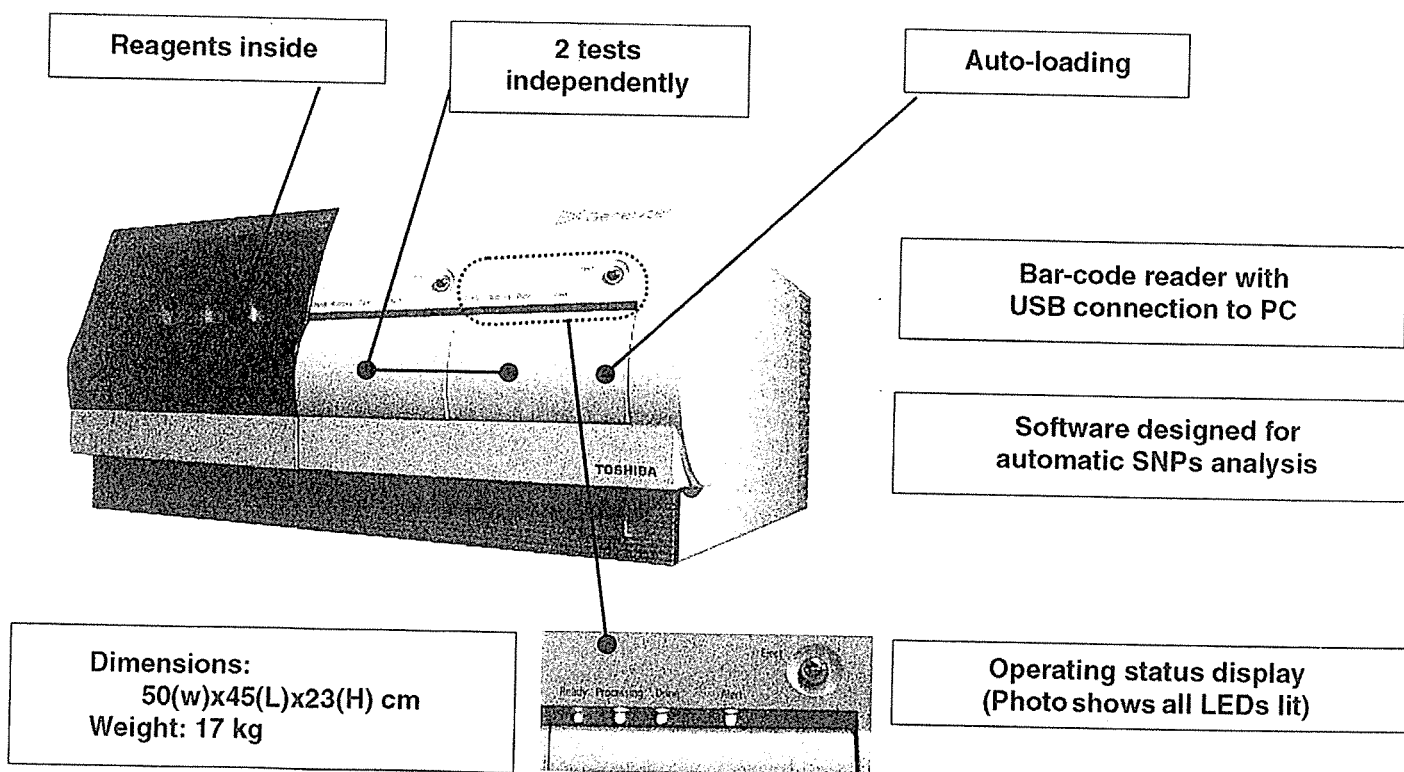


Figure 35-4 Automatic single-nucleotide polymorphism (SNP) detection device.

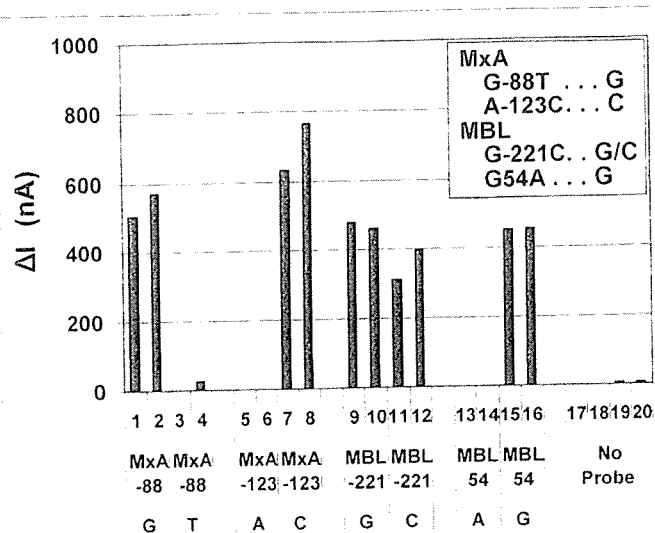


Figure 35-5 Typical data for the simultaneous detection of SNPs in the *MxA* and *MBL* genes using the electrochemical DNA chip. Inset: Genotyping results obtained by direct sequencing.

tuberculosis based on pharmacogenomics in the clinical setting, a DNA chip for NAT2 has been developed to facilitate simple and quick genotyping.

Electrochemical DNA chip technology was applied to the analysis of three polymorphic sites (T481C, A590G, and A857G) of NAT2 that are correlated with responsiveness to isoniazid in the Japanese population. To permit simultaneous genotyping, a specific DNA chip was designed and six allele-specific oligonucleotide probes were employed. The results of preliminary experiments demonstrated that the genotyping results matched perfectly with the results obtained by restriction length fragment polymorphism (data not shown).

After validating this DNA chip using clinical samples, we plan to employ it in clinical trials for personalized medicine involving antituberculosis therapy with isoniazid. This will be the first practical DNA chip in the medical field.

Multidrug Resistance Transporter (MDR1)

It is necessary to evaluate the function of P-glycoproteins such as MDR1 in order to obtain a clear understanding of the pharmacokinetics of drugs because it is involved in the absorption, distribution, and excretion of many drugs in the body. More than 20 polymorphic sites have been identified in the *MDR1* gene, including an amino acid substitution (24). However, little is known concerning the relationships between the function of P-glycoproteins and polymorphisms. It has been reported that a polymorphism at C3435T is related to the concentrations of the cardiac drug digoxin (25) and the antiretroviral drug nelfinavir in the plasma (26).

We applied electrochemical DNA chip technology to the analysis of *MDR1* polymorphism. First, the DNA chip was designed for the simultaneous genotyping of four major SNP sites (C3435T, A2677G or T, C-129T, and C1277T), and nine allele-specific DNA probes were employed. The results of preliminary experiments using PCR products showed that the genotyping results matched perfectly with the results obtained by direct sequencing (data not shown). We have just begun to study the relationships between polymorphisms and responsiveness to several drugs. *MDR1* has been reported to be related to a large number of commercially available drugs such as anticancer agents, HIV protease inhibitors, immunosuppressants, etc. This *MDR1* chip is expected to be a useful tool for the functional analysis of the *MDR1* gene.

FUTURE PROSPECTS

We have developed a novel next-generation DNA chip based on complementary metal oxide semiconductor (CMOS) technology. It has many advantages compared with conventional electrochemical DNA chips. The measurement system has been made even more compact by incorporating a current measurement circuit. High-sensitivity expression analysis has been achieved with excellent noise-resistance by integrating the sensor and the measurement circuit. This CMOS-driven DNA chip is also effective in the management of genetic data due to the incorporation of code circuits and security technology. The cost of

identified clearly and independently even in the presence of other targets. For comparison of genotypes, direct sequencing was also performed. The genotypes identified using the DNA chip matched perfectly with the results obtained by direct sequencing. This result suggests that the electrochemical DNA chip is as accurate as direct sequencing in identifying these genotypes. The relative standard deviations of the anodic current values for a perfect match and for a single mismatch were 2% and 3%, respectively.

Recently, other types of polymorphism of human and viral factors (genotype of HCV, mutation within the IFN sensitivity determining region [ISDR], and viral load) that are correlated with therapeutic responsiveness have been reported (17–21). The use of such genetic information in combination is expected to lead to safer and more effective treatment for hepatitis C based on the patient's individual characteristics.

N-Acetyltransferase-2 (NAT2)

The rates of tuberculosis infection are increasing globally, and it is necessary to improve the recovery rate in the treatment of tuberculosis (22). However, there are marked individual differences in the effectiveness and side effects of chemotherapy for tuberculosis. In particular, antituberculosis drugs such as isoniazid are associated with liver damage, and some patients are either unresponsive or tend to relapse. Methods for predicting these risks in advance and ensuring proper therapy are urgently required.

Genetic polymorphism related to metabolic activity is present in NAT2, which is the main enzyme involved in the metabolism of isoniazid. Based on the metabolic activity of this enzyme, a patient can be classified by genotype into one of three groups: rapid acetylator (RA), intermediate acetylator (IA), or slow acetylator (SA) (23). To permit personalized medicine for

the chip is further reduced by employing semiconductor mass production technology.

We are also currently engaged in the development of a compact automated detection system that is able to perform all test processes, including hybridization, detection, and analysis, as well as preprocessing such as DNA extraction and amplification. This will be expected to be of great value in POC applications.

CONCLUSION

The principles and applications of electrochemical DNA chip technology have been described in this chapter. Electrochemical DNA chip technology provides a number of distinct advantages in SNPs analysis:

1. Ease of processing because labeling is not required
2. High reliability of the data obtained
3. Automatic operation from hybridization to data analysis using a dedicated device
4. Compact size
5. Low production cost for both the chip and the device

The electrochemical DNA chip shows great promise in becoming a platform for genetic testing, especially in POC applications, due to its outstanding features. It is expected to contribute to the realization of personalized medicine in the 21st century and to help promote healthy lifestyles for people everywhere.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by a grant from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) in Japan.

We would like to thank Dr. Shunji Mishiro and Dr. Yasuhiro Furuichi for their work involving IFN responsiveness genes. We also wish to thank Dr. Junnichi Azuma and Dr. Masako Ohno for their work in NAT2 analysis. We are also grateful to Dr. Toshiyuki Sakaeda and Dr. Tsutomu Nakamura for their work in MDR1 analysis, and would like to thank Dr. Yoshio Ishimori, Dr. Hideki Horiuchi, and Dr. Shinnichi Oouchi for their contributions to this project, as well as Mr. Shigeru Wakayama, Mr. Minoru Ishikawa, Mr. Takiji Ishimura, Mr. Kenji Ooki, and Mr. Shinji Yanaga for their efforts in developing the device. Finally, we wish to thank Dr. Kiichi Adachi for his help in coordinating the submission process.

REFERENCES

1. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genet* 1999;21:10–4.
2. Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MM, Yohn CT, Tobin KP, Kashuk C, et al. High-throughput variation detection and genotyping using microarrays. *Genome Res* 2001;11:1913–25.
3. Nelson BP, Grimsrud TE, Liles MR, Goodman RM, Corn RM. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Anal Chem* 2001;73:1–7.
4. Amexis G, Oeth P, Abel K, Ivshina A, Pelloquin F, Cantor CR, et al. Quantitative mutant analysis of viral quasispecies by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12097–102.
5. Shi MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin Chem* 2001;47:164–72.
6. Yang M, McGovern ME, Thompson M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Anal Chim Acta* 1997;346:259–75.
7. Mikkelsen SR. Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. *Electroanalysis* 1996;8:15–9.
8. Drummond TG, Hill MG, Barton JK. Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotech* 2003;21:1192–9.
9. Takenaka S, Yamashita K, Takagi M, Uto Y, Kondo H. DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenylnaphthalene diimide as the electrochemically active ligand. *Anal Chem* 2000;72:1334–41.
10. Hashimoto K, Miwa K, Goto M, Ishimori Y. DNA sensor: a novel electrochemical method using carbon electrode immobilized DNA probes. *Supramol Chem* 1993;2:265–70.
11. Ito K, Hashimoto K, Ishimori Y. Quantitative analysis for solid-phase hybridization reaction and binding reaction of DNA binder to hybrids using a quartz crystal microbalance. *Anal Chim Acta* 1996;327:29–35.
12. Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y. Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA. *Sens Actuators B* 1998;46:220–5.
13. Hashimoto K, Ishimori Y. Preliminary evaluation of electrochemical PNA array for detection of single base mismatch mutations. *Lab Chip* 2001;1:61–3.
14. Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt –88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology* 2000;43:124–7.
15. Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, Furuichi Y, Hashimoto M, Ohta Y. Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (–123 and –88) in vivo and in vitro. *Intervirology* 2001;44:379–82.
16. Matsushita M, Hijikata M, Matsushita M, Ohta Y, Mishiro S. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXP_A and LYP_B with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. *J Hepatol* 1998;29:695–700.
17. Sugimoto Y, Kuzushita N, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Miyagi T, et al. A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepatitis* 2002;9:377–84.
18. Saito H, Tada S, Ebinuma H, Wakabayashi K, Takagi T, Saito Y, et al. Interferon regulatory factor 1 promoter polymorphism and response to type 1 interferon. *J Cell Biochem* 2001;81(Suppl 36):191–200.
19. Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* 2003;4:411–9.
20. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene

- and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77–81.
21. Takahashi K, Iwata K, Matsumoto M, Matsumoto H, Nakao K, Hatahara T, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotype 1b sequences from fifteen patients with hepatocellular carcinoma: the “progression score” revisited. *Hepatol Res* 2001;20:161–71.
 22. Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J* 2003;20(Suppl 36):87s–94s.
 23. Ohno M, Yamaguchi I, Yamamoto I, Fukuda T, Yokota S, Maekura R, et al. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:256–61.
 24. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* 2003;4:397–410.
 25. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johne A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3473–8.
 26. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, et al. Response to antiviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002;359:30–6.

フォーラム

遺伝子多型情報に基づく投与指針作成に向けて—CYP2C9—

田邊 智子*¹ 福田 剛史*¹ 大野 雅子*¹ 景山 茂*²
東 純 一*¹

1. はじめに

薬の応答性には大きな個体差が存在し、同じ薬を同量服用しても、効果や副作用が大きく異なることがある。このような個体差を考慮した個別化医療の実現は、より安全で有効な治療を可能にするうえで重要である。

薬物応答性の個体差の原因の1つに、薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP450) の遺伝子多型がある。CYP 分子種の中で、CYP2C ファミリーは CYP で代謝される医薬品の約 20% の代謝に関わっており、CYP2C9、CYP2C19 遺伝子多型の医薬品に及ぼす影響が数多く報告されている。個別化医療の実現には遺伝子多型の情報の活用が有効であると考えられるが、臨床試験のデザイン、すなわち対象者や治療法などの違いにより、エビデンスが一致しないことも多く、それらの報告を臨床現場へそのままの形で応用することは難しいのが現状である。

本稿では、CYP2C9 遺伝子多型について、得られているエビデンスを系統的に整理し、独自の視点で遺伝子多型情報の臨床応用の可能性を論ずる。

2. CYP2C9 の遺伝子多型と薬物

CYP2C9 には、*2 から *23 までの多型が報告されている (2005 年 6 月 20 日更新)¹⁾。欧米人では *2、*3 の頻度がそれぞれ 10% 前後、3~8% 程度であるのに対し、日本人では、CYP2C9*2 および *4 から *23 は出現頻度が非常に低いか、もしくは詳細に検討されおらず、エビデンスの観点からアレル頻度で約 2% 存在する *3 を考慮することが重要である。

CYP2C9 はワーファリン (warfarin) やフェニトイン (phenytoin) といった治療域が狭い薬物をはじめ、スルホニル尿素 (sulfonylurea, SU)、ロサルタン (losartan)、フルバスタチン (fluvastatin)、ジク

ロフェナク (diclofenac) などの非ステロイド性抗炎症薬 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) の代謝に関わっている。

以下に、これらの薬物について、CYP2C9*3 保有者に対する投与量やその反応性など臨床応用の際に留意すべき点を整理した。

1) ワーファリン (warfarin)

ワーファリンは治療域が狭いうえに、薬に対する感受性の個人差が大きいことが知られている。この個人差の原因の1つとして、ワーファリンの主たる代謝を担う CYP2C9 の遺伝子多型が挙げられる²⁾。

これまでの報告の多くは、ワーファリン血中濃度が定常状態に到達後の維持量について検討したものである。日本人の場合、CYP2C9*1/*3 を有する患者の維持量は *1/*1 の患者の約 50%、CYP2C9*3/*3 を有する患者 (n=1) では *1/*1 の患者の約 13% であると報告されている^{3,4)}。欧米人では CYP2C9*1/*3 の維持量が *1/*1 の約 80% という報告もあり^{4,5)}、人種差の存在が示唆される。

一方、目標 international normalized ratio (INR) を 2~3 に設定した治療におけるワーファリン導入期では、CYP2C9*3 を有する患者の投与量が *1/*1 の患者の投与量に比して 60% 程度に減少している (Fig. 1-A)⁶⁾。

ワーファリン服用による出血の副作用は、維持期よりも導入期 (3 カ月以内) で 1.75 倍起こりやすいと報告されている⁷⁾。その導入期に、CYP2C9 遺伝子多型が副作用のリスクファクターになると報告されている。しかし、維持期における CYP2C9 多型のリスクについては見解が分かれており、多型がリスクファクターになる⁸⁾ という報告と関係ない⁹⁾ という両方の見解が示されている。関係ないとする後者の論文では INR のみによるリスク評価にとどまり、実際の出血

Key words : CYP2C9, warfarin, phenytoin, polymorphism, individualized medicine

*¹ 大阪大学大学院薬学研究所臨床薬効解析学 *² 東京慈恵会医科大学薬物治療学

別刷請求先：東純一 大阪大学大学院薬学研究所臨床薬効解析学 〒565-0871 吹田市山田丘 1-6

(投稿受付 2005 年 5 月 27 日, 第 2 稿受付 2005 年 7 月 8 日, 掲載決定 2005 年 7 月 14 日)

頻度については述べられていない点を考慮しなければならない。また、副作用の出現頻度と多型のリスク評価は、INR等のモニター間隔にも依存すると考えられる。

導入時における多型による副作用のリスクについての論文を引用し列挙する。

例1) 66歳白人男性(73 kg)に2日間、ワーファリン10 mgを投与したところ、INRが9.7まで上昇し、最終的に1.0 mg/2 dayの維持量で落ち着いていた。この患者のCYP2C9遺伝子型は*3/*3であった⁹⁾。

例2) ワーファリン維持量が1.5 mg/day以下で落ち着いた低用量群では、ワーファリン導入時にINR>4となる患者の割合がコントロール群(無作為抽出群)の3.2倍であり、この群ではCYP2C9多型保有者の割合が高かった¹⁰⁾。

例3) 虚血性心疾患のリスクが高い男性233人に対し、目標INRを1.5に設定しワーファリンを初回投与量2.5 mgで予防投与を開始した際、CYP2C9*3/*3の患者の2例中2例ともに、ワーファリン投与開始3カ月以内に出血の副作用が観察された¹¹⁾。

例4) 185人の患者を対象とした治療において、CYP2C9の多型を有する患者では、出血の発現率が*1/*1より高く、とくに治療開始初期(3カ月)でその傾向は顕著であった⁸⁾。

例5) ワーファリン導入時(24日以内)に白人患者125人中、INR>3となる患者の割合はCYP2C9*3を有する患者では67%(14/21)であり、*1/*1の33%(25/75)に比して2倍であった⁶⁾。

出版バイアスの存在を考慮する必要はあるが、上記のように、CYP2C9*3を有する患者にはとくに慎重に投与する必要がある。

さらに、高齢者では維持量が少ないと報告されている。高齢(66歳以上)かつCYP2C9*3を有する患者のワーファリン維持量は、65歳以下で*1/*1の患者の約28%であり¹²⁾、多型とともに年齢を考慮した投与が必要と考えられる。

日本人と欧米人の常用量に乖離があり(CYP2C9*1/*1同士で比較した場合:日本人3.4~4 mg/day^{3,13)}、欧米人5.0~6.5 mg/day^{5,8,12)})、また、治療時の目標INRも欧米人が2~3であるのに対し日本人が1.5~2.5と、日本人のほうが低い^{4,14)}。その原因として、日本人と欧米人の体格差とともに、血液凝固因

子や^{13,15)}やワーファリンの標的分子である vitamin K epoxide reductase 遺伝子(VKORC1)の多型^{16~18)}が報告されている。これらの多型には人種差があり、アジア人ではワーファリンの感受性が高くなるアレルが欧米人と比較して大多数である。上記の例は、ほとんどが白人を対象とした試験であることを考慮する必要があり、ワーファリン量の絶対値を単純に日本人と比較することはできない。しかし、薬物代謝酵素CYP2C9多型の影響により血中濃度の変動することは明白であり、多型の影響がワーファリン量に与える相対的な影響は参考にすべきであると考えられる。

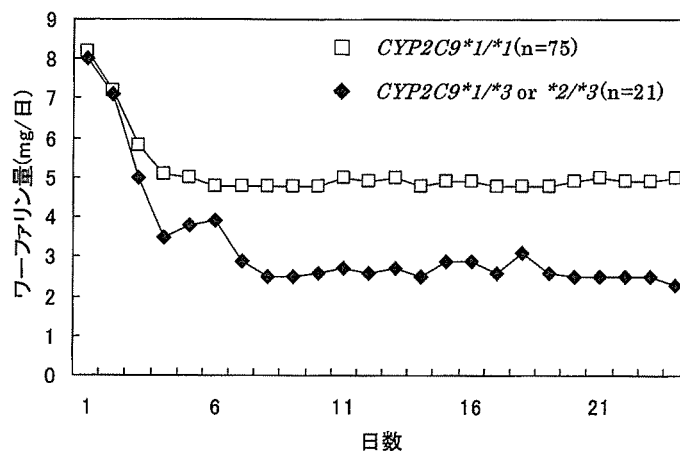
日本人の大多数である*1/*1に比してCYP2C9*3を有する患者にワーファリンを投与する際には注意を要する。とくに導入初期(1~3カ月)の出血傾向には注意したい。

2) フェニトイン (phenytoin)

フェニトインは、治療域の範囲内で飽和による非線形的な体内動態を示すため、少量の投与量の増加が容易に中毒濃度に達する危険がある。この現象はCYP2C9多型により影響を受けることから、さらに注意を要する。

欧米人健康成人に対してフェニトイン100 mgを単回経口投与したところ、CYP2C9*3/*3を有する者(n=1)では血中濃度下面積が4.3倍に上昇し、半減期が3.3倍に延長、クリアランスは20%程度にまで低下している(Fig. 1-B)¹⁹⁾。てんかん患者においてもCYP2C9遺伝子多型の影響は認められ、Table 1にはCYP2C9の遺伝子多型とフェニトインの投与量および血中濃度の報告をまとめて示した。日本人のてんかん患者におけるフェニトイン維持量は、*1/*3では*1/*1の60%程度である²⁰⁾。欧米人においてもCYP2C9*3を有する患者のフェニトイン維持量は60~70%程度になっていた²¹⁾。フェニトインの至適濃度は5~20 µg/mLであるが²²⁾、中毒濃度(30 µg/mL)を超えた患者の投与量を比較すると、CYP2C9*1/*3の患者では*1/*1の患者の53~76%程度であった²³⁾。別のグループの報告でも、CYP2C9*1/*3の患者にフェニトイン4.2 mg/kg/day投与時の血中濃度は32.6 µg/mLに達していた²⁴⁾。標準投与量は5~8 mg/kg/dayとされている²²⁾ものの、フェニトインの投与量には乖離があり(Table 1)、施設における治療法や併用薬などの違いが影響している可能性がある。しかし、遺伝子多型間の相対的な違いは明らかであり、欧米人でも同様のデータが得られていることから、その妥当性が示唆

A : ワーファリン導入段階における遺伝子型別の投与量 (イタリア人における検討)
(文献6) より改変して引用



B : フェニトイン 100 mg 単回経口投与時の血中濃度 (文献19) より改変して引用

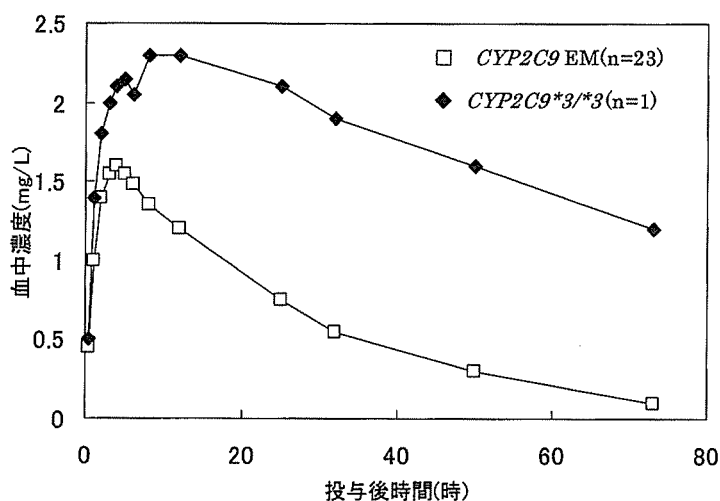


Fig. 1 CYP2C9 遺伝子多型による薬物への影響

Table 1 フェニトインの投与量-血中濃度関係に及ぼす CYP2C9 遺伝子多型の影響

対象	年齢 (歳)	CYP2C9	CYP2C19 ^c	n	平均投与量 (mg/kg/day)	血中濃度 (μg/mL)	文献	
標準					5.0~8.0	5~20	22	
					Mean±SD	定常濃度		
日本人	てんかん患者 ^a	18~76	*1/*1	Wild	52	3.58±1.48	6.6±4.8	20
			*1/*3	—	3	2.09±0.17	4.7±2.0	
	てんかん患者 (ケースレポート)	40	*1/*3	Hetero	1	4.17	32.6	24
			全被験者		44	5.18		
	てんかん患者	1~33	*1/*1	Wild	1	8.6	>30 (中毒濃度)	23
		*1/*1	Wild	1	7.1			
		*1/*1	Homo	1	6.0			
		*1/*3	Hetero	1	4.6			
欧米人	てんかん患者 (オランダ人) ^b	16~74	*1/*1	—	37	(mg/day) [range] 287 [75~425]	定常濃度 [range] 15.8 [2.2~36.4]	21
			*1/*3	—	9	19 [150~275]	13.8 [5.1~18.2]	

a : 1カ月間投与量が安定している患者
 b : 6カ月以上フェニトインを服用し、維持量が安定している患者
 c : (—) : non-determined (検討されていない)

Table 2 CYP2C9 基質薬物への多型の影響

薬物	対象 (人種)	*1/*1 と比較したときの影響		備考	
		薬物動態学的作用	薬力学的作用		
スルホニル尿素	Tolbutamide	健康成人 (韓国人 ²⁷⁾ (欧米人 ²⁸⁻³⁰)	*1/*3 CL 48~75% AUC 約2倍 ²⁷⁻²⁹⁾ *3/*3 CL 16~21% ^{28,30)}	血糖降下作用 ・*1/*3 作用増強 ^{*27)} ・差なし ^{28,29)}	*100 g グルコース 負荷時の血糖上昇 作用 1/2
	Glibenclamide	健康成人 (欧米人)	*3 保有者 AUC 2.8 倍 ³¹⁾ *1/*3 CL 72% ³²⁾ *3/*3 CL 42% ³²⁾	血糖降下作用 差なし ^{31,32)}	
	Glimepiride	健康成人 (欧米人)	*3 保有者 AUC 2.7 倍 ³¹⁾	血糖降下作用 差なし ³¹⁾	
サルタン系降圧薬	Losartan	健康成人 (欧米人 ³³⁾ (日本人 ²⁶⁾)	Losartan → PK パラメータ差なし *1/*3 代謝物 C _{max} 40% 代謝比 1.7 倍 *3/*3 代謝比 30 倍 ³³⁾	降圧作用 ・*1/*3 で効果減弱 ・作用時間の短縮 ²⁶⁾	代謝物が活性体
	Candesartan	高齢患者 (日本人 1 例)	*1/*3 CL 48% (ただし比較した対象は一般の高齢 患者の平均 ³⁴⁾)	過度の降圧作用 ³⁴⁾	1 例のみの症例報 告
NSAIDs	Diclofenac	健康成人 (日本人 ³⁵⁾ (欧米人 ³⁶⁾)	CL, AUC など差なし ³⁵⁾ *1/*3 尿中代謝比 1.3 倍 ³⁶⁾	—	
	Ibuprofen	健康成人 (欧米人)	*1/*3 CL 約 70% AUC 1.8 倍 *3/*3 CL 16~25% AUC 2.7 倍 ³⁷⁾	—	CYP2C8 多型の 影響も示唆される
	Flurbiprofen	健康成人 (欧米人)	*1/*3 CL 56% AUC 1.7 倍 ³⁸⁾	—	
	Tenoxicam	健康成人 (ブラジル人)	*1/*3 CL 34% AUC 1.7 倍 ³⁹⁾	—	
その他	Fluvastatin	健康成人 (欧米人)	*1/*3 AUC 1.3 倍 *3/*3 AUC 3 倍 ⁴⁰⁾	コレステロール低下作用 に差なし ⁴⁰⁾	
	Torsemide	健康成人 (欧米人)	*1/*3 AUC 1.5 倍 *3/*3 AUC 2.8 倍 ⁴¹⁾	尿量に差なし Na ⁺ と Cl ⁻ 排泄がわずかに 増加 ⁴¹⁾	
	Nateglinide	健康成人 (欧米人)	*1/*3 CL 87% AUC 1.7 倍 *3/*3 CL 52% AUC 2.0 倍 ⁴²⁾	血糖降下作用 差なし ⁴²⁾	

—: 記述がない

CL: クリアランス, clearance

AUC: 血中濃度下面積, area under the curve

される。その他、フェニトインの標的分子であるナトリウムイオンチャネルの遺伝子多型がフェニトイン量に関係していたとの報告²⁵⁾もあり、同一の CYP2C9 遺伝子型での個人差の解明が進むと期待される。

3) その他

スルホニル尿素系経口血糖降下薬, サルタン系降圧

薬, NSAIDs などと CYP2C9 遺伝子多型との関係について報告されているものを Table 2 にまとめた。サルタン系降圧薬のうちロサルタンは, CYP2C9 により代謝活性化されるため, CYP2C9 多型保有者で降圧作用が弱くなることに注意が必要である²⁶⁾。これらの薬物では, 対象が健康成人にほぼ限定されている

こと、薬物血中濃度と薬効、すなわち、薬物動態学的作用 (pharmacokinetics, PK) と薬力学的作用 (pharmacodynamics, PD) の相関が得られていないものが多いことを考慮しなければならない。また、これまでに実施された検討も数少なく、*CYP2C9* 多型の影響を結論付けるにはさらなるエビデンスが必要であろう。これらの薬物について、遺伝子多型の情報を臨床現場に活用するにはもう少し時間がかかると思われるが、今後、臨床応用につながる検証的臨床研究の成績が蓄積されることを期待したい。

3. まとめ

ワーファリンとフェニトインについては、人種や試験によって絶対量の差はあるものの、*CYP2C9* 遺伝子多型の相対的な影響は認められている。今後、個人差の原因をより明らかにするために、PD 因子の遺伝子多型を考慮することが必要になってくるであろう。その他の *CYP2C9* 基質薬物については健康成人での評価にとどまっており、遺伝子多型が実際の患者の治療における投与量に及ぼす影響についてはいまだほとんど検討されていない。薬効や副作用など PD の情報も一致した見解が得られておらず、遺伝子多型情報に基づいた個別化治療を実現するには、これらの点を検討することが必須となる。

文 献

- 1) Ingelman-Sundberg M, Daly A, Nebert D. Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature committee (web site). 2005. <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>.
- 2) Echizen H. ワーファリンの抗凝固効果の個人間変動に関係する遺伝子多型. *血栓止血誌* 2001; **12**: 111-8.
- 3) Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H. Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed *CYP2C9*, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding *CYP2C9* genotypes. *Pharmacogenetics* 1998; **8**(5): 365-73.
- 4) Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y, Muszkat M, Kim RB, Kashima T, Kimura S, Echizen H. Population differences in S-warfarin metabolism between *CYP2C9* genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**(3): 253-63.
- 5) Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 *CYP2C9* polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000; **96**(5): 1816-9.
- 6) Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM, Moia M, Mannucci PM. *CYP2C9* genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**(3): 198-203.
- 7) Palareti G, Leali N, Coccheri S, et al. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy. *Lancet* 1996; **348**(9025): 423-8.
- 8) Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Rettie AE. Association between *CYP2C9* genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002; **287**(13): 1690-8.
- 9) Steward DJ, Haining RL, Henne KR, Davis G, Rushmore TH, Trager WF, Rettie AE. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of *CYP2C9*3*. *Pharmacogenetics* 1997; **7**(5): 361-7.
- 10) Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP2C9* with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999; **353**(9154): 717-9.
- 11) Ogg MS, Brennan P, Meade T, Humphries SE. *CYP2C9*3* allelic variant and bleeding complications. *Lancet* 1999; **354**(9184): 1124.
- 12) Loebstein R, Yonath H, Peleg D, Almog S, Rotenberg M, Lubetsky A, Roitelman J, Harats D, Halkin H, Ezra D. Interindividual variability in sensitivity to warfarin—Nature or nurture? *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**(2): 159-64.
- 13) Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, Aono H, Inoue K, Koide T, Ohgi S, Otsubo K. Association of pharmacokinetic (*CYP2C9*) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood* 2004; **103**(7): 2630-5.
- 14) Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of *CYP2C9* and interindividual variability in anticoagulant response to warfarin. *Pharmacogenomics J* 2003; **3**(4): 202-14.
- 15) Takahashi H, Nutescu E, Morita T, Wilkinson GR, Ieiri I, Kashima T, Kimura S, Kijima S, Echizen H. Population differences in anticoagulant response to warfarin among Caucasian, African American and Japanese patients. *2nd World Congress of the Board of Pharmaceutical Sciences of FIP*. 2004: 384 (P1E-X-018).
- 16) D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M. A polymorphism in the *VKORC1* gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; **105**(2): 645-9.
- 17) Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, et al. A novel functional *VKORC1* promoter polymorphism is associated with interindividual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 2005; **14**(13): 1745-51.
- 18) Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE. Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; **352**(22): 2285-93.
- 19) Kidd RS, Straughn AB, Meyer MC, Blaisdell J, Goldstein JA, Dalton JT. Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the *CYP2C9*3* allele. *Pharmacogenetics* 1999; **9**(1): 71-80.
- 20) Mamiya K, Ieiri I, Shimamoto J, Yukawa E, Imai J, Ninomiya H, Yamada H, Otsubo K, Higuchi S, Tashiro N. The effects of genetic polymorphisms of *CYP2C9* and *CYP2C19* on phenytoin metabolism in Japanese adult