

博士学位論文

精神疾患個別化治療開発のための
治療薬体内動態の個人差に関する研究

平成 27 年度

昭和薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻 博士課程

薬物動態学研究室

大久保 真穂

目 次

略語集

| | 頁 |
|---|----|
| 序論 | 1 |
| 第 I 章 日本人に重要な遺伝子多型の選別および判定法の確立 | |
| 第 1 節 緒言 | 6 |
| 第 2 節 実験材料および方法 | |
| I -2-1 実験材料、試薬および使用機器 | 8 |
| I -2-2 <i>CYP3A5*3</i> の判定 | 9 |
| I -2-3 <i>CYP3A4*22</i> の判定 | 10 |
| I -2-4 薬物酸化酵素活性の測定 | 11 |
| I -2-4-a) デキストロメトルファン酸化酵素活性の測定 | 11 |
| I -2-4-b) ミダゾラム酸化酵素活性の測定 | 11 |
| I -2-4-c) テストステロン酸化酵素活性の測定 | 12 |
| I -2-5 ヒト肝ミクロゾーム中の <i>CYP3A</i> 含量の定量 | 12 |
| I -2-6 <i>CYP3A4*22</i> の頻度解析 | 13 |
| I -2-7 <i>CYP2D6*5</i> の判定 | |
| I -2-7-a) 従来法による <i>CYP2D6*5</i> 判定 | 13 |
| I -2-7-b) <i>CYP2D6*5</i> 判定法の確立 | 14 |
| I -2-7-c) <i>CYP2D6*5</i> 判定法の迅速化 | 14 |
| I -2-8 <i>CYP2D6</i> 遺伝子多型の頻度解析 | 15 |
| 第 3 節 結果 | |
| I -3-1 <i>CYP3A4*22</i> および <i>CYP3A5*3</i> の <i>CYP3A</i> タンパク発現量および 酵素活性に対する影響 | 15 |
| I -3-2 <i>CYP3A4*22</i> の頻度解析 | 19 |

| | | |
|------------|--|----|
| I -3-3 | <i>CYP2D6</i> *5 判定法の確立 | 20 |
| I -3-4 | <i>CYP2D6</i> 遺伝子多型の頻度解析 | 23 |
| 第 4 節 | 考察 | 24 |
| | | |
| 第 II 章 | オランザピン体内動態の個人差 | |
| 第 1 節 | 緒言 | 27 |
| 第 2 節 | 実験材料および方法 | |
| II -2-1 | 実験材料、試薬および使用機器 | 29 |
| II -2-2 | 研究対象および検体 | 29 |
| II -2-3 | 薬物酸化酵素活性の測定 | |
| II -2-3-a) | オランザピン酸化酵素活性の測定 | 30 |
| II -2-3-b) | フェナセチン酸化酵素活性の測定 | 30 |
| II -2-3-c) | デキストロメトルファン酸化酵素活性の測定 | 31 |
| II -2-3-d) | ベンジダミン酸化酵素活性の測定 | 31 |
| II -2-4 | 患者血漿中オランザピン濃度の測定 | 32 |
| II -2-5 | <i>CYP1A2</i> 遺伝子多型の判定 | 32 |
| II -2-6 | <i>CYP2D6</i> 遺伝子多型の判定 | 33 |
| II -2-7 | <i>FMO3</i> 遺伝子多型の判定 | 35 |
| II -2-7-a) | Arg205Cys および Val257Met の判定 | 35 |
| II -2-7-b) | Glu158Lys の判定 | 35 |
| II -2-7-c) | Cys197Ter の判定 | 36 |
| II -2-7-d) | Glu308Gly の判定 | 36 |
| II -2-7-e) | Arg500Ter の判定 | 36 |
| 第 3 節 | 結果 | |
| II -3-1 | ヒト肝ミクロゾームによるオランザピン酸化酵素活性および代謝消失に対する阻害剤の影響 | 37 |
| II -3-2 | ヒト肝ミクロゾームによるオランザピン代謝消失および酸化酵素活性と P450 および <i>FMO3</i> 指標酵素活性との間の相関関係 | 40 |

| | | |
|-------------|---|----|
| II -3-3 | 組換え P450 および FMO3 によるオランザピン酸化酵素活性 | 42 |
| II -3-4 | オランザピン酸化酵素活性の速度論的解析 | 43 |
| II -3-5 | ヒト肝ミクロゾームによるオランザピン代謝消失および酸化酵素活性に対する遺伝子多型の影響 | 47 |
| II -3-6 | オランザピン投与患者血漿中薬物濃度に対する内的・外的因子の影響 | 49 |
| 第 4 節 | 考察 | 52 |
| | | |
| 第 III 章 | リスペリドン体内動態の個人差 | |
| 第 1 節 | 緒言 | 56 |
| 第 2 節 | 実験材料および方法 | |
| III -2-1 | 実験材料、試薬および使用機器 | 57 |
| III -2-2 | 研究対象および検体 | 58 |
| III -2-3 | 薬物酸化酵素活性の測定 | |
| III -2-3-a) | リスペリドン酸化酵素活性の測定 | 58 |
| III -2-3-b) | クマリン酸化酵素活性の測定 | 59 |
| III -2-3-c) | デキストロメトルファン酸化酵素活性の測定 | 59 |
| III -2-3-d) | ミダゾラム酸化酵素活性の測定 | 59 |
| III -2-4 | 患者血漿中リスペリドン濃度の測定 | 59 |
| III -2-5 | P450 遺伝子多型の判定 | 60 |
| 第 3 節 | 結果 | |
| III -3-1 | ヒト肝ミクロゾームによるリスペリドン酸化酵素活性に対する阻害剤の影響 | 60 |
| III -3-2 | ヒト肝ミクロゾームによるリスペリドン酸化酵素活性と P450 指標酵素活性との間の相関関係 | 61 |
| III -3-3 | 組換え P450 によるリスペリドン酸化酵素活性 | 63 |
| III -3-4 | リスペリドン酸化酵素活性の速度論的解析 | 64 |
| III -3-5 | ヒト肝ミクロゾームによるリスペリドン酸化酵素活性に対す | |

| | |
|---|----|
| る遺伝子多型の影響 | 67 |
| III-3-6 リスペリドン投与患者血漿中薬物濃度に対する内的・外的因子の影響 | 68 |
| 第4節 考察 | 75 |
| | |
| 第IV章 ミルタザピン体内動態の個人差 | |
| 第1節 緒言 | 78 |
| 第2節 実験材料および方法 | |
| IV-2-1 実験材料試薬および使用機器 | 79 |
| IV-2-2 研究対象および検体 | 80 |
| IV-2-3 ミルタザピン代謝酵素活性の測定 | 80 |
| IV-2-4 患者血漿中ミルタザピン濃度の測定 | 81 |
| IV-2-5 P450 遺伝子多型の判定 | 81 |
| 第3節 結果 | |
| IV-3-1 ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン酸化酵素活性とP450 指標酵素活性との間の相関関係 | 81 |
| IV-3-2 ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン酸化酵素活性および代謝消失に対する P450 分子種阻害剤の影響 | 83 |
| IV-3-3 ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン代謝消失に対する併用薬の影響 | 84 |
| IV-3-4 組換え P450 によるミルタザピン酸化酵素活性 | 86 |
| IV-3-5 ミルタザピン酸化酵素活性の速度論的解析 | 87 |
| IV-3-6 ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン酸化酵素活性および代謝消失に対する遺伝子多型の影響 | 90 |
| IV-3-7 ミルタザピン投与患者血漿中薬物濃度に対する内的・外的因子の影響 | 90 |
| 第4節 考察 | 94 |

| | |
|----------|-----|
| 総括 | 98 |
| 本研究の誌上発表 | 102 |
| 謝辞 | 103 |
| 引用文献 | 104 |

略語表

本論文においては以下の略語を用いた。

| | |
|-------------------|---|
| A | adenine |
| BMI | body mass index |
| bp | base pair (s) |
| C | cytosine |
| C/D ratio | plasma concentration normalized with the dose ratio |
| CYP | individual form of cytochrome P450 |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| dNTPs | deoxyribonucleoside 5'-triphosphates |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid |
| EM | extensive metabolizers |
| EtBr | ethidium bromide |
| FAM | 6-carboxyfluorescein |
| FMO | flavin-containing monooxygenase (EC. 1. 14. 13. 8) |
| G | guanine |
| G-6-P | glucose-6-phosphate |
| G-6-P DHase | glucose-6-phosphate dehydrogenase |
| HPLC | high-performance liquid chromatography |
| HRP | horseradish peroxidase |
| IM | intermediate metabolizers |
| kb | kilobase pair(s) |
| K_m | michaelis constant |
| mRNA | messenger ribo nucleic acid |
| NADP ⁺ | β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form |

| | |
|-----------|--|
| NADPH | β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form |
| NFQ | nonfluorescent quencher |
| P450 | general term for cytochrome P450 (EC. 1. 14. 14. 1) |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PM | poor metabolizers |
| REP | repetitive sequence |
| RFLP | restriction fragment length polymorphism |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis |
| T | thymine |
| TBS | tris buffered saline |
| TE | 10 mM Tris-HCl (pH7.5)/1 mM EDTA |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| UM | ultrarapid metabolizers |
| UV | ultraviolet |
| VIC | 4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein |
| V_{max} | maximum velocity |

序 論

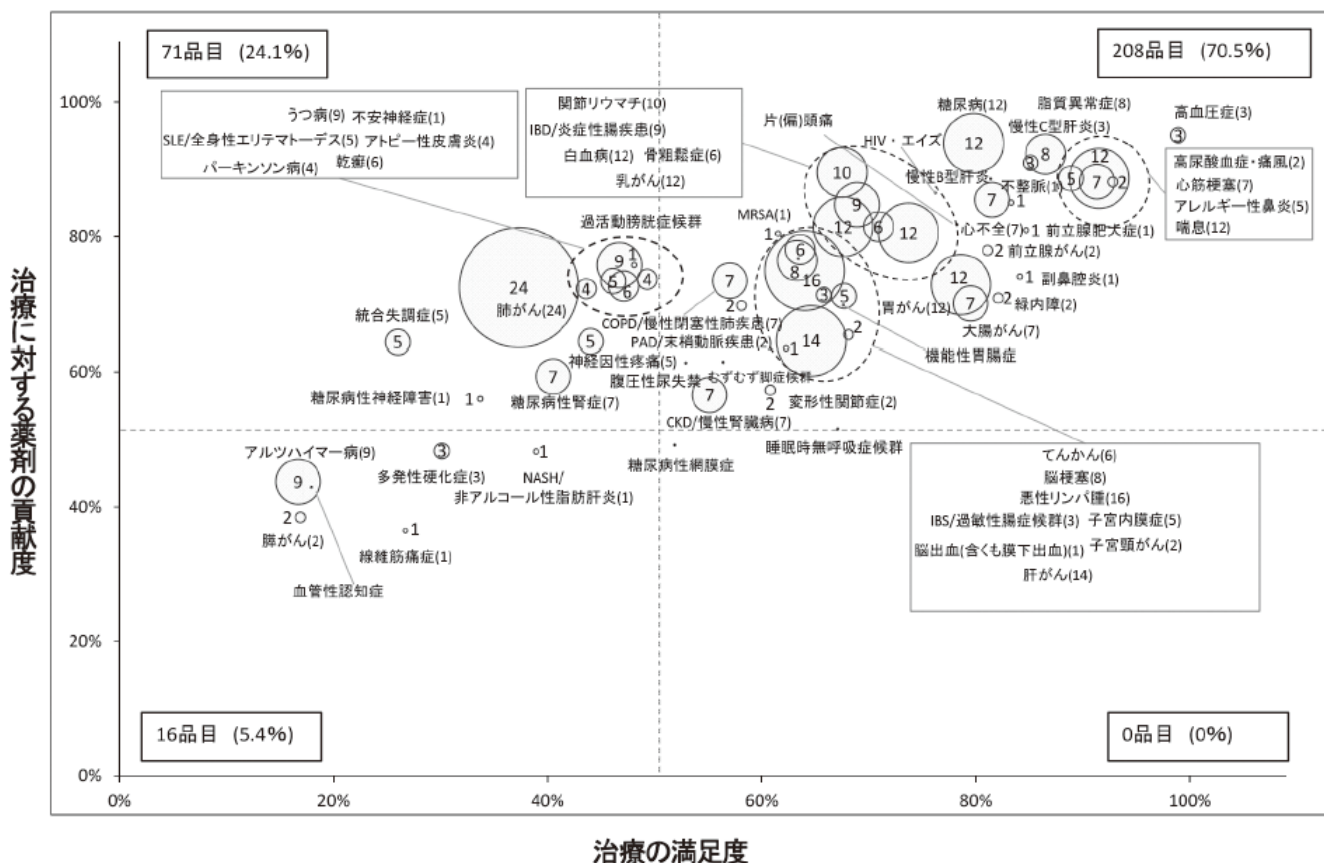
精神疾患患者は、近年増加傾向にあり、本邦での患者数は 300 万人を超えるとされている¹⁾。精神疾患のなかでもうつ病と統合失調症の割合は大きく、全体の約半数を占める¹⁾。これら疾患の治療には抗精神病薬や抗うつ薬が用いられる。近年、非定型抗精神病薬や新規作用機序での抗うつ薬など新薬が次々と上市されている (Table 1)。これら治療薬は複数同時に使用されることが多く、入院患者においては抗精神病薬 3 剤以上投与の割合が全体の 4 割を超えると報告されている²⁾。厚生労働省は向精神薬の減薬を推進し、平成 26 年度診療報酬改定では向精神薬の多剤投与に減算が盛り込まれた。すなわち、1 回の処方において 3 種類以上の抗不安薬、3 種類以上の睡眠薬、4 種類以上の抗うつ薬または 4 種類以上の抗精神病薬を投与した場合、精神科継続外来支援・指導料は算定できず、処方せん料、処方料、薬剤料については減算し、さらに精神科救急入院料、精神科急性期治療病棟入院料、精神科救急・合併症入院料、精神療養病棟において、種類数制限のない非定型抗精神病薬加算 2 を削除した³⁾。しかしながら、本改定では諸外国で一般的となっている単剤投与の推進までは及んでいない。日本精神神経学会は本診療報酬改定に対して反対の声明を發表しているように

(https://www.jspn.or.jp/modules/info/index.php?content_id=36)、減薬そのものに対しても意見が対立しているのが国内の現状であり、精神疾患治療は極めて複雑化していると指摘せざるを得ない。

Table 1. Typical antipsychotics and antidepressants and the years of marketing approval.

| Antipsychotics | Approval (year) | Antidepressants | Approval (year) |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Risperidone | 1996 | Trazodone | 1991 |
| Olanzapine | 2000 | Fluvoxamine | 1999 |
| Quetiapine | 2000 | Paroxetine | 2000 |
| Perospirone | 2000 | Sertraline | 2006 |
| Aripiprazole | 2006 | Milnacipran | 2008 |
| Blonanserin | 2008 | Mirtazapine | 2009 |
| Clozapine | 2009 | Duloxetine | 2010 |
| Paliperidone | 2010 | Escitalopram | 2011 |
| | | Venlafaxine | 2015 |

このように精神疾患治療は複雑な一方で、公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団の医師対象アンケートによると、統合失調症とうつ病に対する治療薬の薬剤貢献度はそれぞれ 64.4 と 75.8% と高い値であった (Fig. 1)⁴⁾。しかしながら、同調査における治療の満足度は 26.0 と 46.7% と低いままであり、調査対象である社会的に重要な 60 疾患のうち、統合失調症はアルツハイマー、膵がん、血管性認知症に次いで 4 番目に低く、うつ病も 19 番目に低い満足度の順位であった (Fig. 1)⁴⁾。このように、精神疾患治療は未だ不十分である一方で、医薬品を活用する潜在的な治療貢献度が高い疾患領域のひとつに挙げることができる。



注：数字（括弧内含む）は該当新薬の開発件数を示す。
 出所：HS財団による調査結果、各社公表情報、製薬協ホームページ、明日の新薬をもとに作成。

Fig. 1. 治療満足度・薬剤貢献度（2014年度）別にみた新薬開発件数（2015年5月時点）

治療満足度が上がらない原因として、薬物体内動態に個人差が生じ、薬効が得られない、あるいは副作用域に達しているなどの困難な状況が考えられる。精神疾患治療薬の代謝に関わる薬物代謝酵素チトクロム P450 (P450 または CYP) やフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 (FMO3) には多くの遺伝子多型が報告されており、体内動態に個人差を生じさせる要因となる可能性が高い。精神疾患治療薬を代謝する代表的な P450 遺伝子多型について Table 2 に示す⁵⁻¹⁷⁾。

Table 2. Representative P450 alleles in Japanese population.

| P450 isoform | 1A2 | 2D6 | 3A4 | 3A5 | | |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|----------|-----------|------------------------------|----------|
| Allele | *1C | *1F | *5 | *10 | *22 | *3 |
| Enzyme activity | Low responsibility (Smoker) | Higher inducibility (Smoker) | None | Decreased | Decreased (<i>in vivo</i>) | None |
| Frequency (Japanese) | 20% | 60% | 5-10% | 40% | Not reported | 75% |
| Genotyping | PCR-RFLP | PCR-RFLP | Long-PCR | PCR-RFLP | TaqMan assay | PCR-RFLP |

これら遺伝子多型のうち、*CYP3A4**22は*CYP3A*基質の高暴露の報告^{12-14, 16)}から*CYP3A*活性の低下が予想されるが、*in vitro*における*CYP3A*タンパク発現量および活性への影響は詳細に検討されていない。日本人での頻度は報告がないため、本邦で重要な変異であるか否かは明らかでない。さらに*CYP2D6**5は*CYP2D6*遺伝子の全欠損変異であり、欧米で提唱されたlong-PCR法が判定に用いられるが、日本人で誤判定が報告されており¹¹⁾、判定法の整備が必要である。

精神疾患治療薬 (Table 1) のなかでも代表的な抗精神病薬オランザピンは*CYP1A2*、*CYP2D6* および *FMO3* によって¹⁸⁾、リスペリドンは、*CYP2D6* および *CYP3A4* によって^{19, 20)}、ならびに抗うつ薬ミルタザピンは *CYP1A2*、*CYP2D6* および *CYP3A4* によって代謝される²¹⁾ことが知られている。これら薬物酸化酵素にはそれぞれ上述の遺伝子多型 (Table 2) が存在するため、酵素活性の個人間変動が治療薬の体内動態に影響する可能性がある。

以上の背景から、本研究では精神疾患個別化治療の開発を目標とし、治療

薬体内動態の個人差に影響を与える因子について主に薬物代謝酵素に着目して解明することを目的とした。第 I 章では日本人において重要な薬物代謝酵素遺伝子多型の選別と判定法の確立を行った。第 II 章から第 IV 章では個別対象薬物の主代謝経路に関わる酵素を明らかとし、遺伝子多型等による各酵素の活性変動が薬物代謝消失に与える影響について、ヒト由来酵素源および臨床患者由来血液試料を用いて検討を行った。選択した研究対象薬物は、第 II 章でリスペリドン、第 III 章でオランザピン、第 IV 章でミルタザピンとし、薬物個々に詳細に解析した。調べた範囲において、リスペリドンおよびオランザピンでは薬物代謝酵素遺伝子多型を含めた単独因子の影響が認められず、複合要因により代謝消失に影響を及ぼすことが推察された。一方、ミルタザピンでは *CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型による影響に加え、併用注意となる 3 種以上の薬物の組み合わせが示唆された。本研究により、治療薬体内動態を規定する薬物代謝酵素の個人差の観点から精神疾患個別化治療の基盤となる重要な知見を得たので、以下に詳述する。

第 I 章 重要な日本人 P450 遺伝子多型の選別と判定法の確立

第 1 節 緒言

CYP3A4 はヒト肝臓中で最も発現量が多く、市場に売られている医薬品の 50% 以上の代謝に関与する重要な薬物代謝酵素である^{22, 23)}。CYP3A4 の代謝能には 10—100 倍の個人差が報告されており、医薬品の応答性や毒性に影響を与えている^{22, 24-26)}。CYP3A4 の遺伝子多型は 20 以上報告されているが、その多くは非常に頻度が低い (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>)。

近年欧米白人において CYP3A4 のイントロン 6 領域の変異である CYP3A4*22 が報告された¹⁵⁾。本変異を有する場合に CYP3A4 基質である高脂血症治療薬シンバスタチンの効果が高いこと¹²⁾および免疫抑制剤の高暴露^{13, 14, 16)}が報告されていることから、CYP3A4 酵素活性低下が指摘されている。CYP3A4*22 はスプライシング異常によりイントロン 6 以降が欠損した不完全な mRNA が合成される結果、酵素機能を持たない CYP3A4 タンパクが合成されるものと考えられており²⁷⁾、CYP3A タンパク発現量および酵素活性に影響を与えている可能性が示唆される。しかしながら *in vitro* で CYP3A4*22 変異のタンパク発現と活性への影響は十分検討されていない。さらに日本人における CYP3A4*22 変異の発現頻度は検討されていないため、本変異が日本人の薬物代謝能を考える上で重要な変異であるかは明らかではない。

CYP3A 酵素活性に影響を与える酵素として CYP3A4 の他に CYP3A5 が挙げられる。CYP3A5 は CYP3A4 とのアミノ酸相同性が 84% と高く、多くの CYP3A4 基質を代謝する²⁸⁾ことから、CYP3A5 遺伝子多型もまた CYP3A 酵素活性に影響を与えると考えられる。CYP3A5*3 はスプライシング異常により CYP3A5 の発現を著しく低下させる変異であり、野生型を超える発現頻度である^{29, 30)}。野生型 CYP3A5 の頻度は欧米白人に比べて日本人で高いため³¹⁾、日本人の薬物代謝能を考慮する上で CYP3A5 の変異は重要である。

一方、CYP2D6は抗うつ薬、オピオイド、β遮断薬など多くの医薬品の代謝を担う薬物代謝酵素である³²⁾。CYP2D6には100を超える遺伝子多型が報告されており(<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>)、生体内において代謝能の個人差や人種差を生じさせる大きな要因となっている。日本人では低酵素活性のintermediate metabolizer (IM)の要因となるCYP2D6*10の発現が野生型に匹敵する頻度で報告されている¹⁰⁾。日本人CYP2D6*10の多くはCYP2D6*10BであるがCYP2D6*10から派生したその他変異も複数存在している³³⁻³⁶⁾。一方で、欧米白人のCYP2D6*10アリル頻度は3%程度と低く³⁷⁾、CYP2D6*10から派生する変異の頻度も非常に低いと考えられる。しかしながら欧米白人においては、酵素活性が全く認められないあるいは著しく低いpoor metabolizer (PM)の頻度が5—10%と高く、その要因となる多型はフレームシフトを起こすCYP2D6*3、スプライシング異常を起こす*4およびCYP2D6遺伝子の全欠損変異*5である³⁸⁾。欧米白人に比べて日本人ではPMの頻度は低く1%未満であり、その多くはCYP2D6*5によるものである¹⁰⁾。

CYP2D6*5の判定はCYP2D6配列によく似た偽遺伝子CYP2D7の存在により困難である。判定法としてサザンブロット法³⁹⁾やTaqManプローブを用いた方法⁴⁰⁾が知られているが、これらは一般に複雑で時間がかかり、判定に高価な機器や試薬を要する。1995年に全欠損変異特有の領域を増幅することにより判定を行うlong-PCR法が開発された⁵⁾。本判定法ではCYP2D6*5特異的な3.5 kbのPCR産物の有無により、簡便に判定を行うことができるため、非常に有用であった (Fig. I-1)。しかしながら近年日本人でCYP2D6*5をもたないにもかかわらず、本判定法でCYP2D6*5と誤判定されてしまうことが問題となっている¹¹⁾。

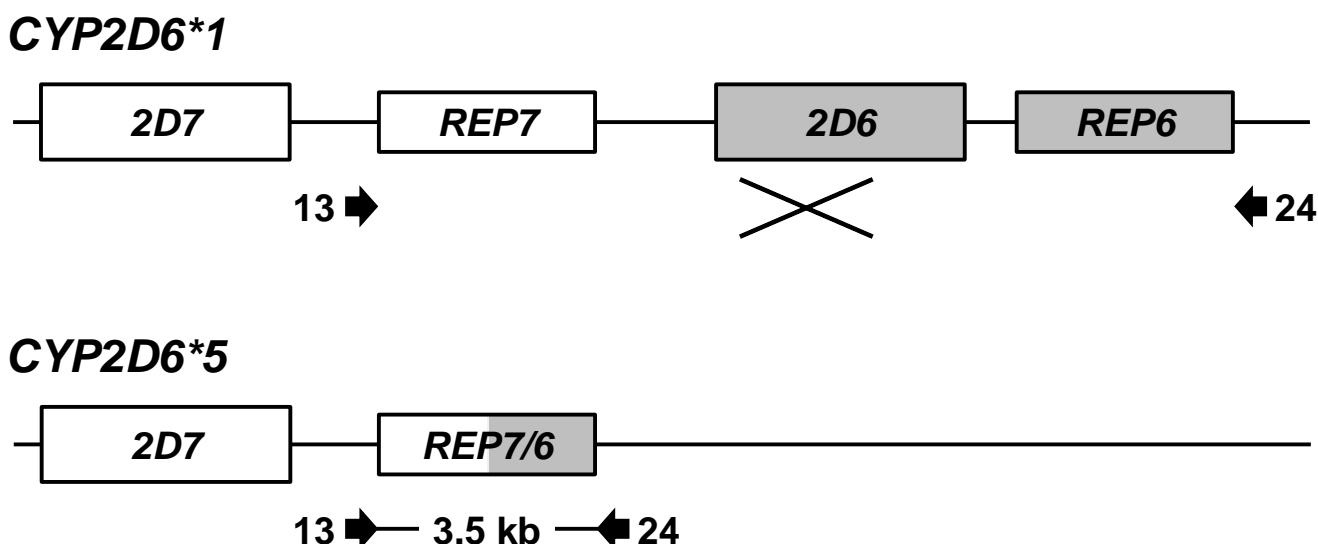


Fig. I-1. Diagrams of *CYP2D6*1*, *CYP2D6*5*, and positions of primers.

The target regions of *CYP2D6* alleles and primers (forward 13 and reverse 24) are illustrated. The size of PCR product with the respective primer pair is indicated. ‘×’ indicates that primers do not hybridize or efficiently amplify the corresponding sequence.

以上を考慮し、第 I 章では *CYP3A4*22* が日本人において判定すべき重要な多型であるかの選別を行うため、*CYP3A4*22* 変異について *CYP3A* タンパク発現量および酵素活性への影響を検討し、日本人でのアリル頻度を調べた。さらに日本人 *CYP2D6*5* の誤判定を回避した判定法の確立を行った。

第 2 節 実験材料および方法

I -2-1 実験材料、試薬および使用機器

第一群の欧米白人ゲノム DNA および対応する肝ミクロゾームは Inoue ら⁴¹⁾および Shimada ら³⁵⁾によって調製された全 23 検体を使用した。第二群のゲノム DNA は第一群の 23 検体に加え、Inoue ら⁴¹⁾および Shimada ら³⁵⁾によって調製されたゲノム DNA および熊本大学中川和子博士および大阪府立大

学島田力博士より御供与頂いた肝試料より調製されたゲノム DNA 全 94 検体を使用した。第三群の全 500 検体は Matsunaga ら³⁴⁾ および Kiyotani ら⁴²⁾ により *CYP2D6* 遺伝子型判定済みの白血球細胞由来日本人ゲノム DNA および第二群の日本人ゲノム DNA を使用した。ゲノム DNA は全てマルコムの e-spect を用いた UV 280 nm より濃度を測定し、必要に応じて TE で希釈した。本研究は昭和薬科大学研究倫理委員会において承認された。

肝ミクロゾームのタンパク量は bovine serum albumin を標準タンパクとして BCA Protein Assay Kit (Pierce) を用いて Model 550 Microplate Reader (Bio-Rad) により測定した。

デキストロメトルファンは Sigma-Aldrich より購入した。ミダゾラムおよびテストステロンは和光純薬より購入した。プライマーとして用いたオリゴヌクレオチドの合成は Sigma Genosys に依頼した。DNA ポリメラーゼは、タカラバイオの TaKaRa LA TaqTM および TOYOBO の KOD-Plus-を使用した。制限酵素 *Ssp I* はタカラバイオより購入し、反応には添付の緩衝液を使用した。バキュロウィルスを昆虫細胞に感染させ発現させた組換え *CYP3A4*、マウス抗ヒト *CYP3A* 抗体および HRP 標識ウサギ抗マウス IgG は、Corning より購入した。リアルタイム PCR の試薬は Applied Biosystems より C_59013445_10 を購入し、遺伝子増幅には Applied Biosystems の 7300 Real-Time PCR System を使用した。その他の試薬類は市販の特級または生化学用のものを使用した。

HPLC システムは、島津製 Prominence の CBM-20A system controller、SIL-20A auto injector、LC-20AD pump、CTO-10A column oven、DGU-20A 5R degasser、SPD-20A detector および RF-20A XS detector を使用した。PCR による遺伝子増幅には Applied Biosystems の 2720 サーマルサイクラーを使用した。アガロースゲル電気泳動は ADVANCE の Mupid-exU を使用した。

I -2-2 *CYP3A5*3* の判定

欧米白人ゲノム DNA を用いて Adler らの方法⁴³⁾を一部改変し、*CYP3A5*3* 判定を行った。反応液は 1×LA PCRTM 緩衝液、0.2 mM dNTPs、2.5 mM 塩化マ

グネシウム、0.4 μM プライマー3A5-F、0.4 μM プライマー3A5-R、1.0 U/ μL *TaKaRa LA Taq*TM およびゲノム DNA 20 ng を含み、滅菌精製水で全量を 25 μL とした。PCR 反応は 94°C で 5 分間熱変性後、94°C で 20 秒間、50°C で 40 秒間、70°C で 40 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクル、さらに 72°C で 7 分間の伸長反応を行った。増幅させた後、PCR 反応液 3.0 μL 、1×*Ssp* I 緩衝液、10 U *Ssp* I を含み、滅菌精製水で全量を 20 μL とし、37°C で 18 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 4.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。168 bp の PCR 産物が野生型アリルでは制限酵素で切断され、148 および 20 bp の断片となるのに対し、変異型アリルでは切断されないことを利用して判定を行った。用いたプライマーの配列を Table I-1 に示す。

Table I-1. Sequences of primers used for detection *CYP3A53.**

| Name | Sequence |
|-------|-------------------------------------|
| 3A5-F | 5'- CAT CAG TTA GTA GAC AGA TGA -3' |
| 3A5-R | 5'- GGT CCA AAC AGG GAA GAA ATA -3' |

I -2-3 *CYP3A4**22 の判定

*CYP3A4**22 の判定は TaqMan プローブを用いた定量 PCR 法で行った。反応液は 1×Taq Man Universal PCR Master Mix No UNG、1×Taq Man Genotyping Assay Mix およびゲノム DNA 10 ng を含み、全量を滅菌精製水で 25 μL とした。60°C で 1 分間反応後、PCR 条件として 95°C で 10 分間の熱変性後、92°C で 15 秒間、60°C で 1 分間を 1 サイクルとして 40 サイクル反応を行った。DNA を含まないコントロールに対する野生型および変異型プローブに標識された各蛍光物質の増幅前後での相対蛍光強度を解析し、遺伝子型の判定を行った。プローブの配列は 5'- GTG CCA GTG ATG CAG CTG GCC CTA C[G/A]C TGG GTG TGA TGG AGA CAC TGA ACT -3' であり、蛍光標識は野生型で VIC、*22

で FAM とし、クエンチャーに NFQ を使用した。

I -2-4 薬物酸化酵素活性の測定

第一群の個別肝ミクロゾームを用いて、CYP2D6 および CYP3A 指標酵素活性を求めた。

a) デキストロメトルファン酸化酵素活性

Uno ら⁴⁴⁾の方法を一部改変し、デキストロメトルファン *O*-脱メチル化および *N*-脱メチル化酵素活性を測定した。反応混液は 0.20 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾーム、NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) ならびに 400 μM デキストロメトルファンを含み、全量を 200 μL とした。37°C の水浴上で 15 分間振とうして反応させ、氷冷した 60% 過塩素酸 10 μL を添加して反応を停止させた。攪拌後、700 × *g* で 5 分間遠心分離し、上清を HPLC に注入した。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm × 150 mm、5.0 μm; 関東化学) を使用し、カラムオーブンは 25°C とした。移動相には 20 mM 過塩素酸ナトリウム (pH2.5):アセトニトリル (67:33,v/v) を使用し、流速は 1.2 mL/min とした。測定は励起波長 270 nm、蛍光波長 312 nm とした。デキストロメトルファン *O*-脱メチル化体および *N*-脱メチル化体の標品で検出された HPLC ピーク面積を基に代謝物の定量を行った。

b) ミダゾラム水酸化酵素活性

Kronbach ら⁴⁵⁾の方法を一部改変し、ミダゾラム 1'-水酸化酵素活性を測定した。反応混液は 0.50 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾーム、NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) ならびに 100 μM ミダゾラムを含み、全量を 250 μL とした。37°C の水浴上で 15 分間振とうして反応させ、氷冷したメタノール 250 μL を添加して反応を停止させた。攪拌後、700 × *g* で 5 分間遠心分離し、上

清を HPLC に注入した。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm × 150 mm、5.0 μm) を使用し、カラムオーブンは 25 °C とした。移動相には 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) :メタノール:アセトニトリル (43:24:33) を使用し、流速は 1.0 mL/min とした。測定波長は UV 220 nm とした。ミダゾラム 1'-水酸化体の標品で検出された HPLC ピーク面積を基に代謝物の定量を行った。

c) テストステロン酸化酵素活性

Yamazaki および Shimada ⁴⁶⁾ の方法を一部改変し、以下の方法によりテストステロン 6β-水酸化酵素活性を測定した。反応混液は 0.25 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾーム、NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) ならびに 50 μM テストステロンを含み、全量を 250 μL とした。37°C の水浴上で 10 分間振とうして反応させ、氷上で酢酸エチル 1.5 mL を加えて反応停止後、3 M 塩化ナトリウム 25 μL を加えた。攪拌後、700 × g で 5 分間遠心分離し、酢酸エチル層 1.0 mL を別の試験管に移し、遠心濃縮器 CC-105 および冷却トラップ TU-055 (トミー工業) を用いて濃縮乾固した。残渣を移動相 200 μL に溶解させ、HPLC に注入した。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm × 150 mm、5.0 μm) を使用し、カラムオーブンは 25 °C とした。移動相には 64 %メタノールを使用し、流速は 1.2 mL/min とした。測定波長は UV 240 nm とした。テストステロン 6β-水酸化体の標品で検出された HPLC ピーク面積を基に代謝物の定量を行った。

II -2-5 ヒト肝ミクロゾーム中の CYP3A 含量の定量

欧米白人個別肝ミクロゾーム中の CYP3A 含量の測定は免疫学的方法により測定した。SDS-PAGE には 1.0 mm の厚さの 7.5% アクリルアミドを用いて、1 ウェルあたり 5 μg タンパクを添加した。SDS-PAGE 後、タンパクをアクリルアミドゲルからニトロセルロース膜へ電気的 (100V、2 時間) に転写した。ニトロセルロース膜を 10% (w/v) スキムミルクに 1 晩浸けた後、TBS で洗浄し、2000 倍に希釈したマウス抗ヒト CYP3A 抗体に浸し、3 時間振とうさせた。

さらに TBS で洗浄後、5000 倍に希釈した HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体に浸して 45 分間振とうさせ、TBS で洗浄を行った。バンドの検出は発光試薬として ECLTM Western Blotting Detection Reagents (Amersham) をニトロセルロース膜に添加し 1 分間室温で反応させ、LAS-1000 UV mini (富士フィルム) を用いて行った。検出されたバンドの発光強度は、Multi Gauge (GE Healthcare) を用いて、組換えヒト CYP3A4 に対する相対強度を解析して求めた。なお用いた一次抗体は添付情報より CYP3A4 と CYP3A5 を同程度の強度で認識するものである。

I -2-6 CYP3A4*22 の頻度解析

第二群の欧米白人および日本人のゲノム DNA を用いて、I -2-3 の項に述べた方法にしたがって判定を行い、CYP3A4*22 の頻度解析を行った。

I -2-7 CYP2D6*5 の判定

a) 従来法による CYP2D6*5 判定

第三群の遺伝子型既知のゲノム DNA を用いて、プライマー 13/24 (Fig. I-1) による CYP2D6*5 判定を行った。反応条件は Steen ら⁵⁾の方法を改変し、以下のとおりとした。

PCR 反応液は 1×KOD-Plus-PCR 緩衝液、1 mM 硫酸マグネシウム、0.2 mM dNTPs、1 μM プライマー 13、1 μM プライマー 24、0.4 U/μL KOD-Plus-およびゲノム DNA 75 ng を含み、滅菌精製水で全量を 20 μL とした。PCR 反応は 94°C で 1 分間の熱変性後、98°C で 20 秒間、68°C で 6 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル、さらに 72°C で 10 分間の伸長反応を行った。PCR 産物は EtBr を含む 0.7% (w/v) アガロースゲルで電気泳動し、判定を行った。用いたプライマーの配列を Table I-2 に示す。

Table I-2. Sequences of primers used for detection *CYP2D6*5*.

| Name | Sequence |
|------|---------------------------------------|
| 13 | 5'- ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA -3' |
| 24 | 5'- GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C -3' |

b) *CYP2D6*5* 判定法の確立

第三群の遺伝子型既知のゲノム DNA を用いて、誤判定を起こす遺伝子型を特定した。反応条件は Soyama ら⁴⁷⁾の方法を改変し以下のとおりとした。

PCR 反応液は 1×LA PCRTM 緩衝液、2.5 mM 塩化マグネシウム、0.3 mM dNTPs、0.1 μM プライマー 2D6-6F、0.1 μM プライマー REP6-R、2.5 U *TaKaRa LA Taq*TM およびゲノム DNA 200 ng を含み、滅菌精製水で全量を 50 μL とした。PCR 反応は 94°C で 1 分間の熱変性後、98°C で 20 秒間、70°C で 6 分間を 1 サイクルとして 25 サイクル、さらに 70°C で 6 分間の伸長反応を行った。PCR 産物は EtBr を含む 0.7% (w/v) アガロースゲルで電気泳動し、判定を行った。用いたプライマーの配列を Table I-3 に示す。

Table I-3. Sequences of primers used for detection *CYP2D6* alleles.

| Name | Sequence |
|--------|---|
| 2D6-6F | 5'- AAG GAG TGT CAG GGC CGG A -3' |
| REP6-R | 5'- CAG GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C -3' |

c) *CYP2D6*5* 判定法の迅速化

第三群の遺伝子型既知のゲノム DNA を用いて、*CYP2D6* 遺伝子、*CYP2D6*5* および *CYP2D6*10D* をそれぞれ特異的に検出するマルチプレックス PCR 法の条件を検討した。

PCR 反応液は 1×LA PCRTM 緩衝液、2.5 mM 塩化マグネシウム、0.3 mM dNTPs、0.1 μM プライマー-13、0.1 μM プライマー-24、1 μM プライマー-2D6-6F、1 U TaKaRa LA TaqTM およびゲノム DNA 80 ng を含み、滅菌精製水で全量 20 μL とした。PCR 反応は 94°C で 1 分間の熱変性後、98°C で 20 秒間、70°C で 6 分間を 1 サイクルとして 25 サイクル、さらに 70°C で 6 分間の伸長反応を行った。PCR 産物は EtBr を含む 0.7% (w/v) アガロースゲルで電気泳動し、判定を行った。

I -2-8 CYP2D6 遺伝子多型の頻度解析

第三群のゲノム DNA を用いて、I -2-7-c)の項に述べた方法にしたがって判定を行い、CYP2D6*5 の頻度解析を行った。

第 3 節 結果

I -3-1 CYP3A4*22 および CYP3A5*3 の CYP3A タンパク発現量および酵素活性に対する影響

第一群のゲノム DNA を用いて、CYP3A4*22 の判定を行った。解析結果の一例を示す(Fig. I-2)。第一群のゲノム DNA 23 検体のうち CYP3A4*1/*1 が 19 検体、CYP3A4*1/*22 が 4 検体であった。同検体で CYP3A5 遺伝子多型判定を行ったところ、CYP3A5*1/*3 が 4 検体、CYP3A5*3/*3 が 19 検体であった。CYP3A4*22 と CYP3A5*1 アリルを双方もつ検体は見出されなかった。

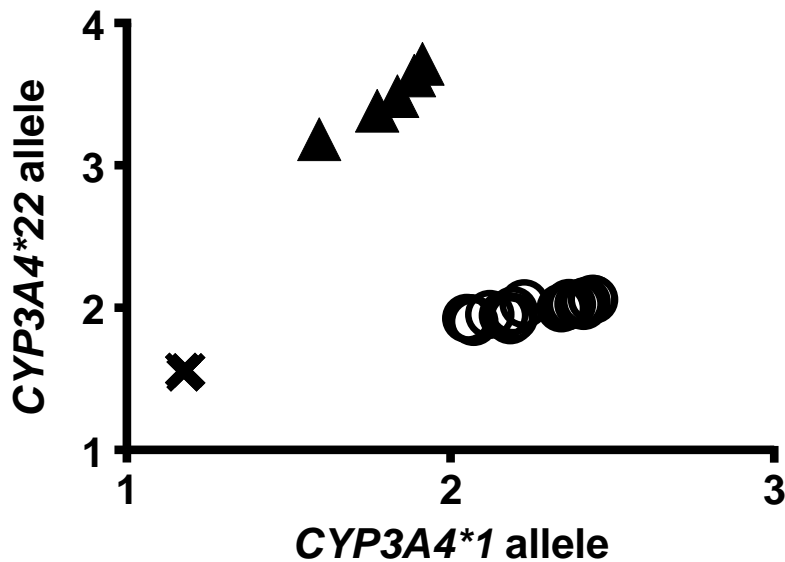


Fig. I-2 Genotyping of *CYP3A4* gene by TaqMan genotyping assay.

Representative results by TaqMan genotyping assay using human DNA samples. ○, *CYP3A4**1/*1; ▲, *CYP3A4**1/*22; and ×, no template control.

CYP3A 指標酵素活性に対し *CYP3A4**22 が影響しうるか否か調べるために、第一群の肝ミクロゾームを用いてデキストロメトルファン、ミダゾラムおよびテストステロン酸化酵素活性を求めた。*CYP2D6* 特異的な反応であるデキストロメトルファン *O*-脱メチル化酵素活性の平均値は *CYP3A4* および *CYP3A5* 遺伝子多型で違いは見出されなかった (Fig. I-3A)。一方、*CYP3A* 特異的な反応であるデキストロメトルファン *N*-脱メチル化酵素活性、ミダゾラム 1'-水酸化酵素活性およびテストステロン 6β-水酸化酵素活性の平均値は *CYP3A4**1/*1 の群に比べて *CYP3A4**1/*22 の群で有意に低値を示した (Figs. I-3B, 3C, 3D)。これら *CYP3A* 基質は *CYP3A5* 遺伝子型間で違いは認められなかった (Fig. I-3)。

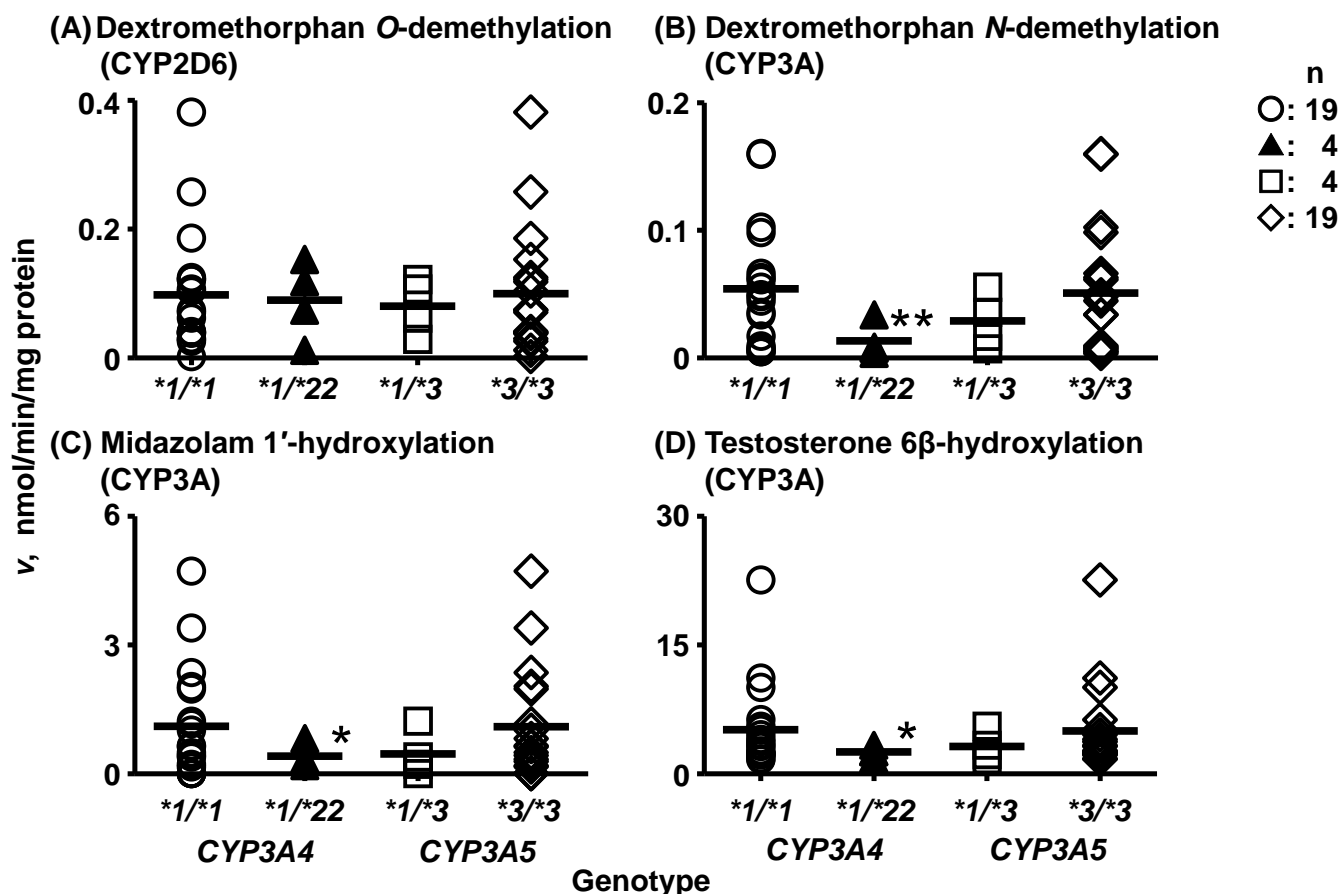


Fig. I-3. Association between *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes and P450-dependent drug oxidation activities in human liver microsomes.

Dextromethorphan *O*- (A) and *N*-demethylation (B), midazolam 1'-hydroxylation (C), and testosterone 6β-hydroxylation (D) activities were analyzed in liver microsomal samples from 23 Caucasians genotyped for *CYP3A4* and *CYP3A5*. The horizontal lines indicate the mean activities, respectively. ○, *CYP3A4**1/*1; ▲, *CYP3A4**1/*22; □, *CYP3A5**1/*3; and ◇, *CYP3A5**3/*3. **p*<0.05; ***p*<0.01, significantly different by unpaired *t*-test with Welch correction.

次に *CYP3A* タンパク発現量に *CYP3A4**22 が影響しうるか否か調べるために、第一群の個別肝ミクロゾームの *CYP3A* 含量を測定した。結果、*CYP3A* 含量の平均値は *CYP3A4**1/*1 の群に比べて *CYP3A4**1/*22 の群で有意に低値を示した (Fig. I-4)。一方、*CYP3A* 含量は *CYP3A5* 遺伝子型間で違いは認められなかった (Fig. I-4)。

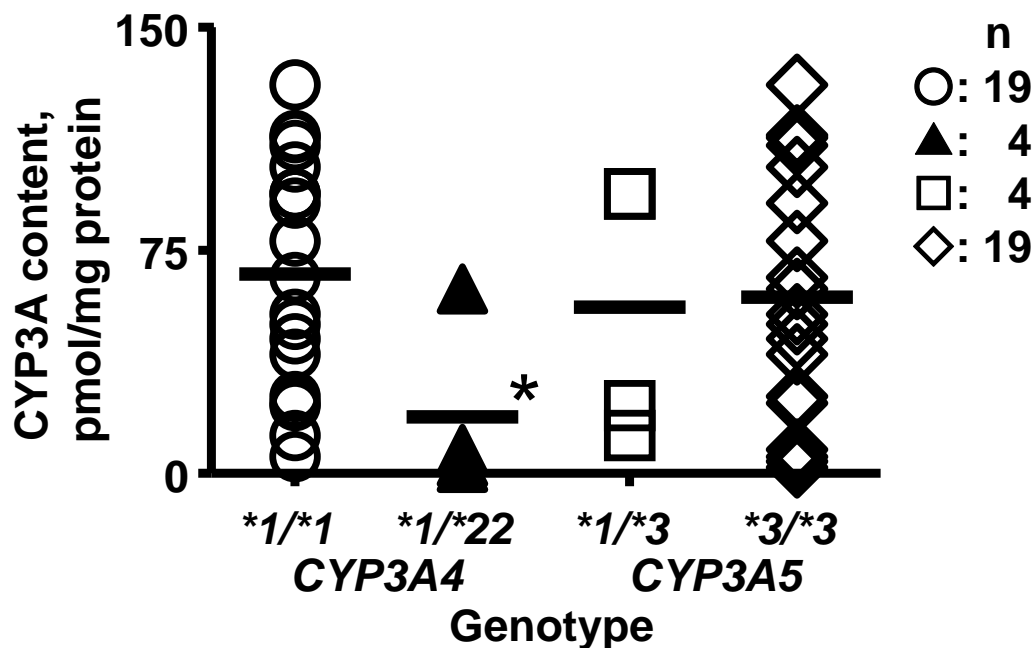


Fig. I-4. Association between *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes and expression levels of CYP3A protein in human liver microsomes.

CYP3A contents were measured in liver microsomal samples from 23 Caucasians genotyped for *CYP3A4* and *CYP3A5* by immunoblotting. ○, *CYP3A4**1/*1; ▲, *CYP3A4**1/*22; □, *CYP3A5**1/*3; and ◇, *CYP3A5**3/*3. * $p < 0.05$, significantly different by unpaired *t*-test with Welch correction.

CYP3A タンパク発現量と各種指標酵素活性との間の相関関係を調べた。CYP3A タンパク発現量はデキストロメトルファン *O*-脱メチル化酵素活性との間には相関関係が認められなかったのに対し (Fig. I-5A)、デキストロメトルファン *N*-脱メチル化酵素活性、ミダゾラム 1'-水酸化酵素活性およびテストステロン 6β-水酸化酵素活性との間には有意な正の相関関係が認められた (Figs. I-5B, 5C, 5D)。

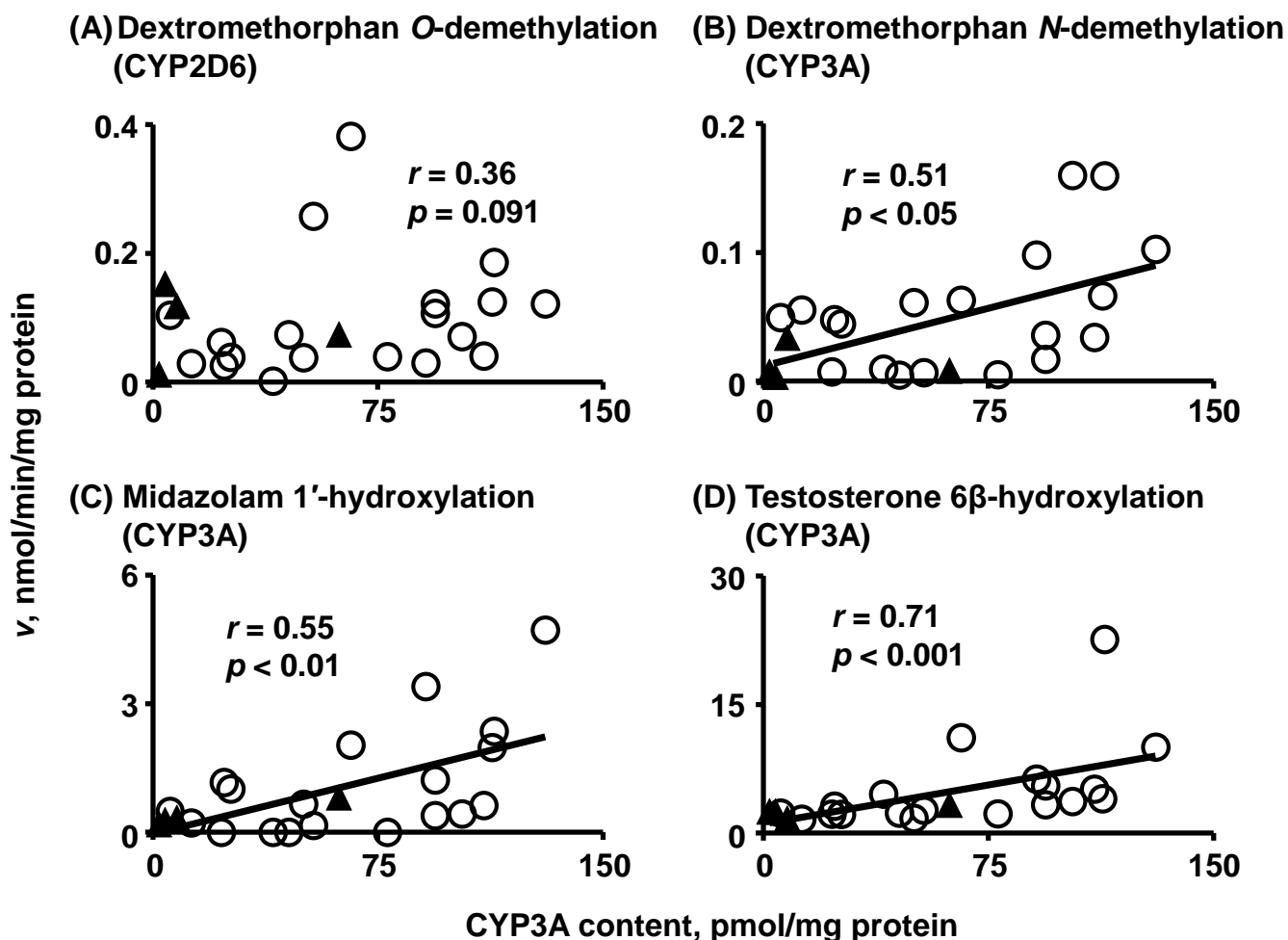


Fig. I-5. Correlation between P450-dependent drug oxidation activities and expression levels of CYP3A protein in human liver microsomes.

Dextromethorphan *O*- (A) and *N*-demethylation (B), midazolam 1'-hydroxylation (C), and testosterone 6 β -hydroxylation (D) activities were analyzed in liver microsomal samples from 23 Caucasians. \circ , *CYP3A4**1/*1; and \blacktriangle , *CYP3A4**1/*22.

I -3-2 *CYP3A4**22 の頻度解析

第二群の欧米白人および日本人ゲノム DNA を用いてそれぞれの人種の *CYP3A4**22 アリル頻度を求めた (Table I-4)。欧米白人 41 検体のうち、36 検体が *CYP3A4**1/*1、5 検体が *CYP3A4**1/*22 であり、*CYP3A4**22 ホモ接合体は見出されなかった。本検体での欧米白人の *CYP3A4**22 アリル頻度は 6.1%であった (Table I-4)。一方、日本人 53 検体を判定した結果、*CYP3A4**22 アリル

は見出されなかった (Table I-4)。

Table I-4. *CYP3A4* allele frequencies in 41 Caucasian and 53 Japanese DNA samples

| <i>3A4</i> allele | Number (%) | |
|-------------------|------------------|------------------|
| | Caucasian (n=82) | Japanese (n=106) |
| *1 | 77 (94) | 106 (100) |
| *22 | 5 (6) | 0 (0) |

I -3-3 *CYP2D6**5 判定法の確立

遺伝子型既知の日本人ゲノム DNA を用いて、プライマー 13 および 24 (Fig. I-1, Table I-2) を用いた従来の *CYP2D6**5 判定を行い、*CYP2D6**5 と誤判定される遺伝子型を特定した。判定結果の代表例を Fig. I-6 に示す。*CYP2D6**1/*5 および *CYP2D6**5/*5 で 3.5 kb の PCR 産物が得られ (Figs. I-6B, 6C)、*CYP2D6**5 を含まない検体では増幅がみられなかった (Fig. I-6A)。しかし、一部 *CYP2D6* を持ち*5を持たない検体で 3.5 kb の PCR 産物が認められた (Fig. I-6D)。

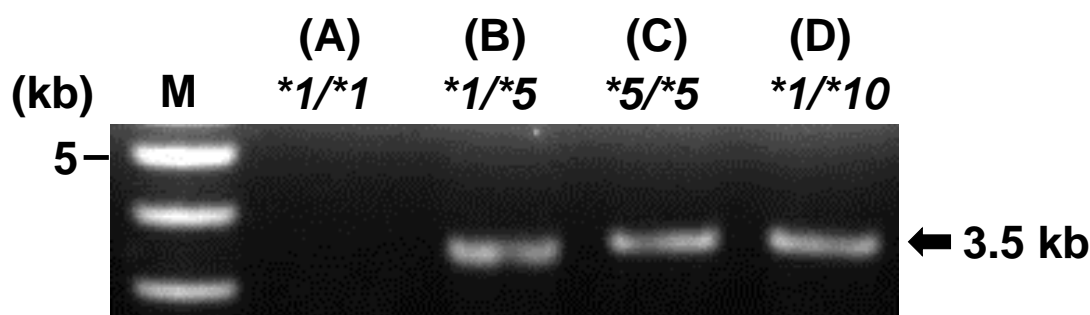


Fig. I-6. Genotyping of *CYP2D6* gene by conventional long-PCR.

Representative electrophoresis images by conventional long-PCR assay using human DNA samples. M, size marker; lane A, *CYP2D6**1/*1; lane B, *CYP2D6**1/*5; lane C, *CYP2D6**5/*5; and lane D, *CYP2D6**1/*10.

種々検討の結果、*CYP2D6*5* と誤判定されたヒト検体は *CYP2D6*10* を保有したことから、*CYP2D6*5* 判定でプライマーが認識する反復性配列をもつ *CYP2D6*10D* であると考え、これらを区別することを目的に、*CYP2D6* 遺伝子多型判定法の条件を検討した。Fig. I-7 に用いたプライマーの認識領域を示す。

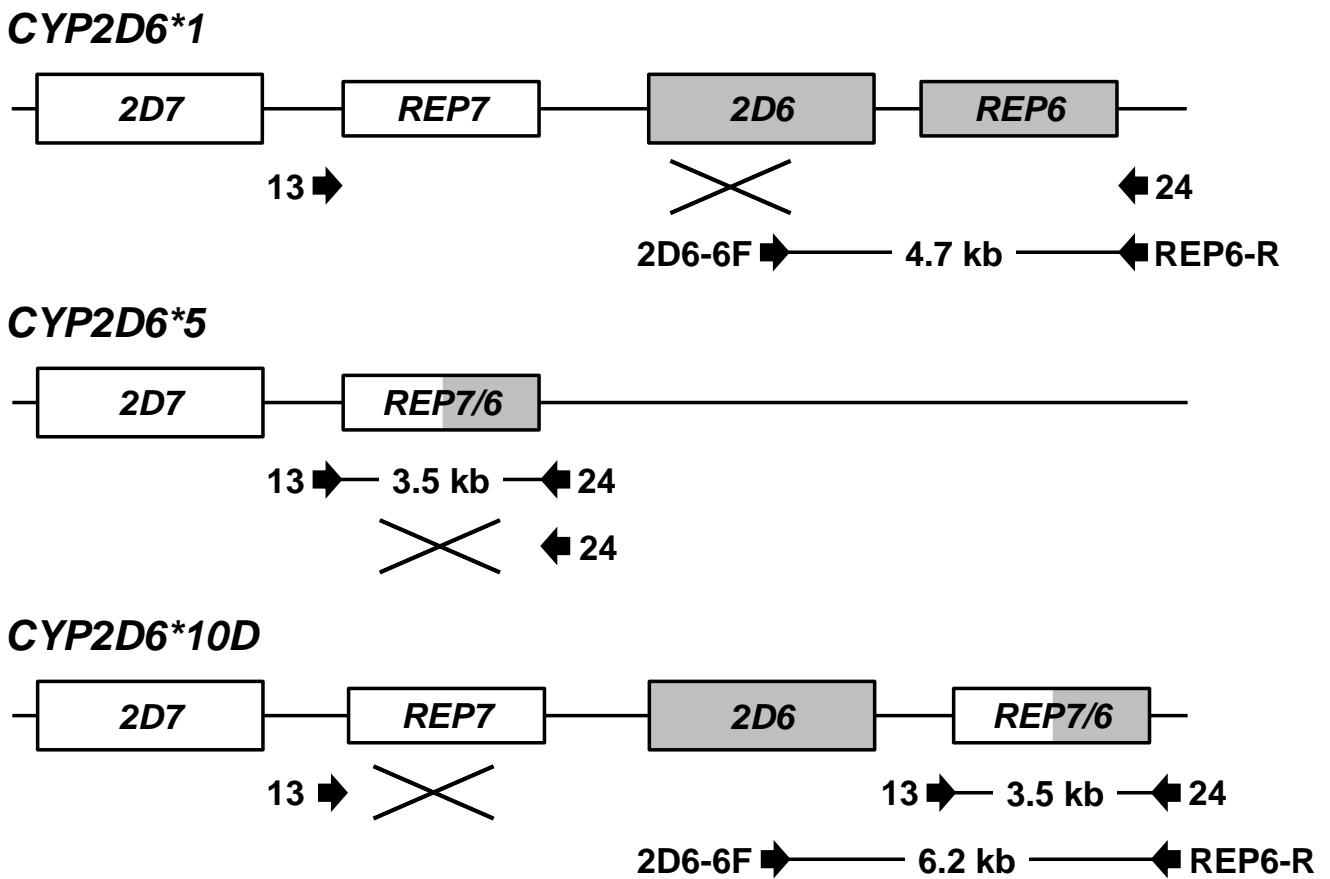


Fig. I-7. Diagrams of *CYP2D6*1*, *CYP2D6*5*, and *CYP2D6*10D* and positions of primers.

The target regions of *CYP2D6* alleles and primers are illustrated. The size of each PCR product with the respective primer pair is indicated. ‘×’ indicates that primers do not hybridize or efficiently amplify the corresponding sequence.

CYP2D6 遺伝子多型判定を検討した結果の代表例を Fig. I-8 に示す。*CYP2D6* 遺伝子特異的な 4.7 kb の PCR 産物 (Figs. I-8A, 8B, 8D) および *CYP2D6*10D*

特異的な 6.2 kb の PCR 産物 (Fig. 8D) が得られた。同条件のとき *CYP2D6**5 ホモ接合体では PCR 産物が得られなかった (Fig. I-8C)。

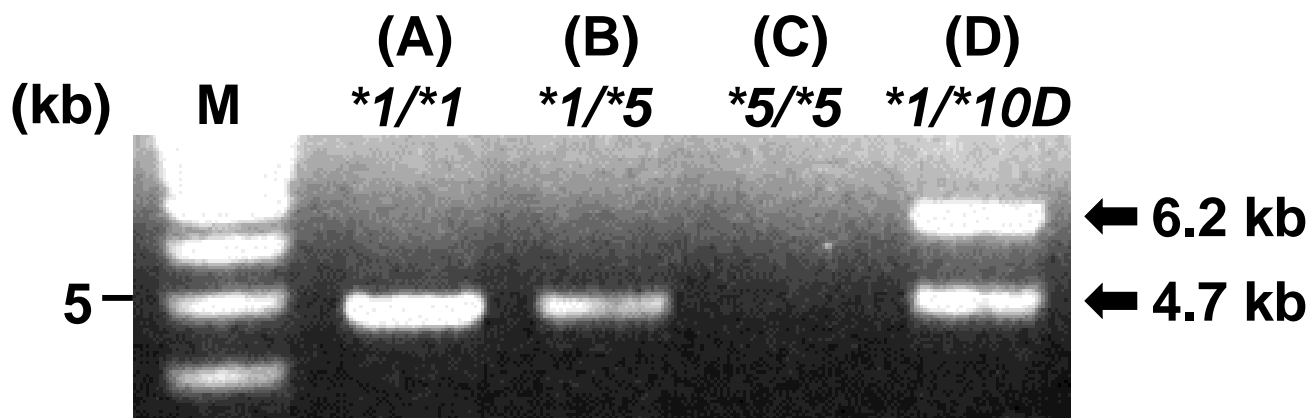


Fig. I-8. Genotyping of *CYP2D6* gene by long-PCR.

Representative electrophoresis images by long-PCR assay using human DNA samples. M, size marker; lane A, *CYP2D6**1/*1; lane B, *CYP2D6**1/*5; lane C, *CYP2D6**5/*5; and lane D, *CYP2D6**1/*10D.

さらに本判定法を簡便に行うため、マルチプレックス PCR 法の検討を行った。結果の代表例を Fig. I-9 に示す。*CYP2D6**5 および *CYP2D6**10D で増幅される 3.5 kb の PCR 産物 (Figs. I-9B, 9C, 9D)、*CYP2D6* 遺伝子で増幅される 4.7 kb の PCR 産物 (Figs. 9A, 9B, 9D)、ならびに *CYP2D6**10D で増幅される 6.2 kb の PCR 産物 (Fig. 9D) がそれぞれ特異的に確認された。

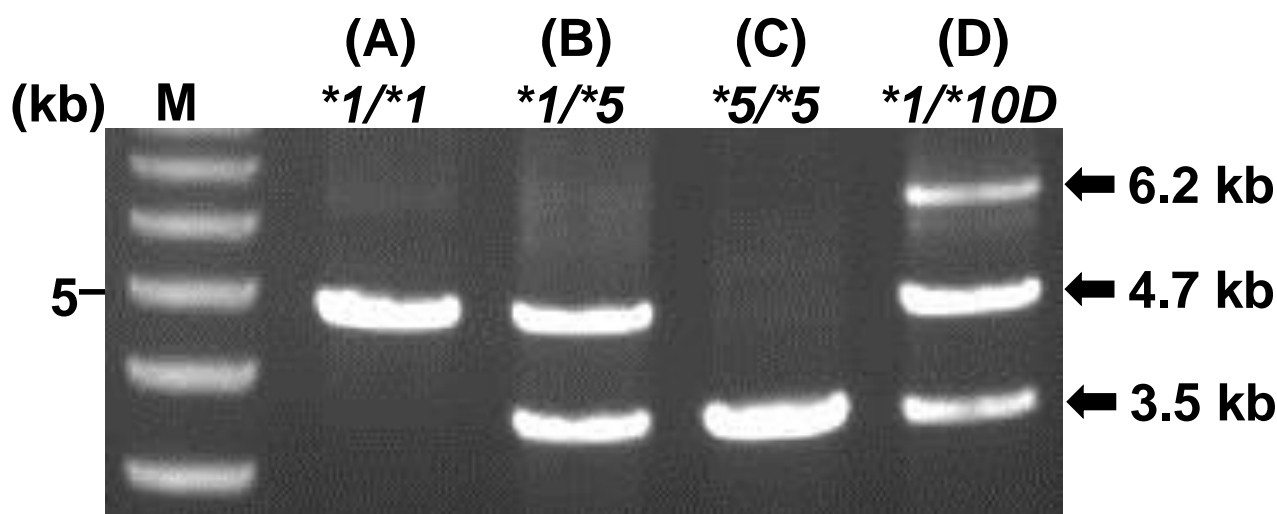


Fig. I-9. Genotyping of *CYP2D6* gene by multiplex PCR.

Representative electrophoresis images by multiplex PCR assay using human DNA samples. M, size marker; lane A, *CYP2D6**1/*1; lane B, *CYP2D6**1/*5; lane C, *CYP2D6**5/*5; and lane D, *CYP2D6**1/*10D.

I -3-4 *CYP2D6* 遺伝子多型の頻度解析

第三群の日本人ゲノム DNA 全 500 検体を用いて、I -3-4 の項で確立した方法で *CYP2D6**5 判定を行った。

判定の結果、アレル頻度は *CYP2D6**5 が 5.0%、*CYP2D6**10D が 0.5%であった (Table I-5)。

Table I-5. *CYP2D6* allele frequencies in 500 Japanese samples.

| <i>2D6</i> allele | Number (%) | |
|--------------------|-------------------|-----------------------|
| | Proposed long-PCR | Conventional long-PCR |
| <i>Normal type</i> | 945 (94.5) | 945 (94.5) |
| *5 | 50 (5.0) | 55 (5.5) |
| *10D | 5 (0.5) | |

第 4 節 考察

本章では精神疾患治療薬の代謝に関わる酵素のうち、日本人において重要と考えられる *P450* 遺伝子多型の選別および簡便な判定法の確立を行った。

はじめに欧米白人で報告された *CYP3A4*22* がタンパクへ影響を与え得るか調べた。個別ヒト肝マイクロゾーム中の *CYP3A* 指標酵素活性は、*CYP3A4*1/1* の検体群に比べて *CYP3A4*1/22* の検体群では有意に低値を示し (Fig. I-3)、同様に *CYP3A* タンパク発現量も低値を示した (Fig. I-4)。本研究で求めた *CYP3A* タンパク発現量は、電気泳動により分子量を指標にふるい分けがなされていると推察されるが、スプライシング異常により全長が合成されず酵素活性を持たない *CYP3A4* タンパクも合わせて検出した可能性は否定できない。しかしながら、*CYP3A* タンパク発現量と 3 つの *CYP3A* 酵素活性との間にはそれぞれ有意な正の相関関係が認められた (Fig. I-5) ことから、酵素活性をもつ *CYP3A* タンパクのみが検出できたものと考えられる。これらのことから、*CYP3A4*22* は *CYP3A* タンパク発現量を低下させることで *CYP3A* 酵素活性を低下させることが示唆された。本マイクロゾームは *CYP2D6* 酵素活性では同様の有意差は認められなかったため (Fig. I-3A)、サンプルの偏りはないものと考えられる。本研究で *CYP3A4*22* ホモ接合体は見出されなかったが、ヘテロ接合体の群で影響が認められており、*CYP3A4*22* ホモ接合体での *CYP3A* 含量および *CYP3A* 酵素活性はヘテロと同等あるいはより低値を示すことが考えられる。*CYP3A5* 遺伝子多型に 3 つの指標酵素活性および発現量は影響を受けなかった (Figs. I-3, 4)。よって *CYP3A4*22* 変異は *CYP3A* 酵素活性を考慮するうえで *CYP3A5* 遺伝子多型よりも影響を与え得る可能性が示唆された。本研究で用いた *CYP3A5* 発現群の *CYP3A5* 発現量は極めて低値であったため^{31, 48)}、*CYP3A* 酵素活性に影響を与えなかったことが考えられる。欧米白人および日本人のゲノム DNA を用いてそれぞれの人種でのアリル頻度を調べた結果、欧米白人で 6.1% であり (Table I-4)、過去の報告値とほぼ一致した¹³⁾。一方、日本人 53 検体を判定した結果、*CYP3A4*22* アリルは見出されなかった

(Table I-4)。これは日本人と同じモンゴル人種である中国人での報告 (0/216) と一致するものである⁴⁹⁾。よって日本人の *CYP3A4*22* アリル頻度は 1% 未満であると推察された。

以上のことから、*CYP3A4*22* 変異は *CYP3A* タンパク発現量を低下させることにより *CYP3A* 酵素活性を低下させるため、*CYP3A* 酵素活性を考慮する際には極めて重要な変異ではあるが、日本人ではその頻度が低いため、日本人に対する実臨床での個別化治療においては、考慮するには及ばないと推察された。

さらに *CYP2D6*5* 判定法の確立を行った。*CYP2D6*5* の判定は *CYP2D6* 配列によく似た偽遺伝子 *CYP2D7* の存在により困難であるが、欧米で開発された long-PCR 法により、比較的簡便に判定が行えるようになった。しかしながら、本判定では欧米白人では報告例の無い誤判定が日本人で起きたことで問題となっている。種々検討の結果、*CYP2D6*5* と同じ反復性の配列をもつ *CYP2D6*10D* が誤判定を起こしていることが考えられたため、これを区別する方法を調べた。結果、*CYP2D6*10D* 特異的な 6.2 kb の PCR 産物を得るプライマーを添加することでこれらを区別するマルチプレックス PCR 法を確立した (Fig. I-9)。本判定法にて頻度解析を行ったところ、アリル頻度は *CYP2D6*5* が 5.0%、*CYP2D6*10D* が 0.5% であったことから (Table I-5)、従来法により *CYP2D6*5* と判定されている検体の約 1 割は誤判定であることが明らかとなった。*CYP2D6*10D* の頻度は非常に低いものの、*CYP2D6*10D* の 2D6 遺伝子の翻訳領域および近位プロモーター領域の配列は *CYP2D6*10B* と同一であり、生成されるタンパクは触媒活性の低い *CYP2D6.10* である。酵素活性の低下をもたらす変異である *CYP2D6*10D* と、全欠損型の *CYP2D6*5* との区別は重要であると考えられる。マルチプレックス法としたことで 1 度の PCR 反応で *CYP2D6*5* と *CYP2D6*10D* を区別できるため、作業時間の短縮および試薬や DNA 検体の使用量も少なく有用である。さらに野生型アリルでも 4.7 kb の PCR 産物が得られるため、*CYP2D6*5* ヘテロ接合体とホモ接合体の区別および DNA 試料添加の内部標準による PCR 反応の確保による誤判定の軽減が可

能となり、さらに有用性が高いと考えられる。

本研究の結果、*CYP3A4**22 変異は *CYP3A* タンパク発現量が低下することにより、*CYP3A* 酵素活性を低下させるが、日本人においてはその頻度が非常に低いと考えられるため、日本人で考慮すべき重要な変異とはならないと推察された。さらに本章では日本人において誤判定を回避したマルチプレックス PCR による正確で簡便な *CYP2D6**5 判定法を確立した。

第 II 章 オランザピン体内動態の個人差

第 1 節 緒言

オランザピンは D_2 受容体、 $5-HT_2$ 受容体、 H_1 受容体などさまざまな受容体に対して遮断作用をもつ多元受容体標的化抗精神病薬であり、統合失調症だけではなく双極性障害にも用いられる^{50, 51)}。オランザピンは肝臓中の CYP1A2 によって *N*-脱メチル化体に、FMO3 によって *N*-酸化体に、CYP2D6 によって 2-水酸化体にそれぞれ代謝されることが知られている (Fig. II-1)¹⁸⁾。これら酵素は内的・外的要因により代謝能に個人差が生じることがある。

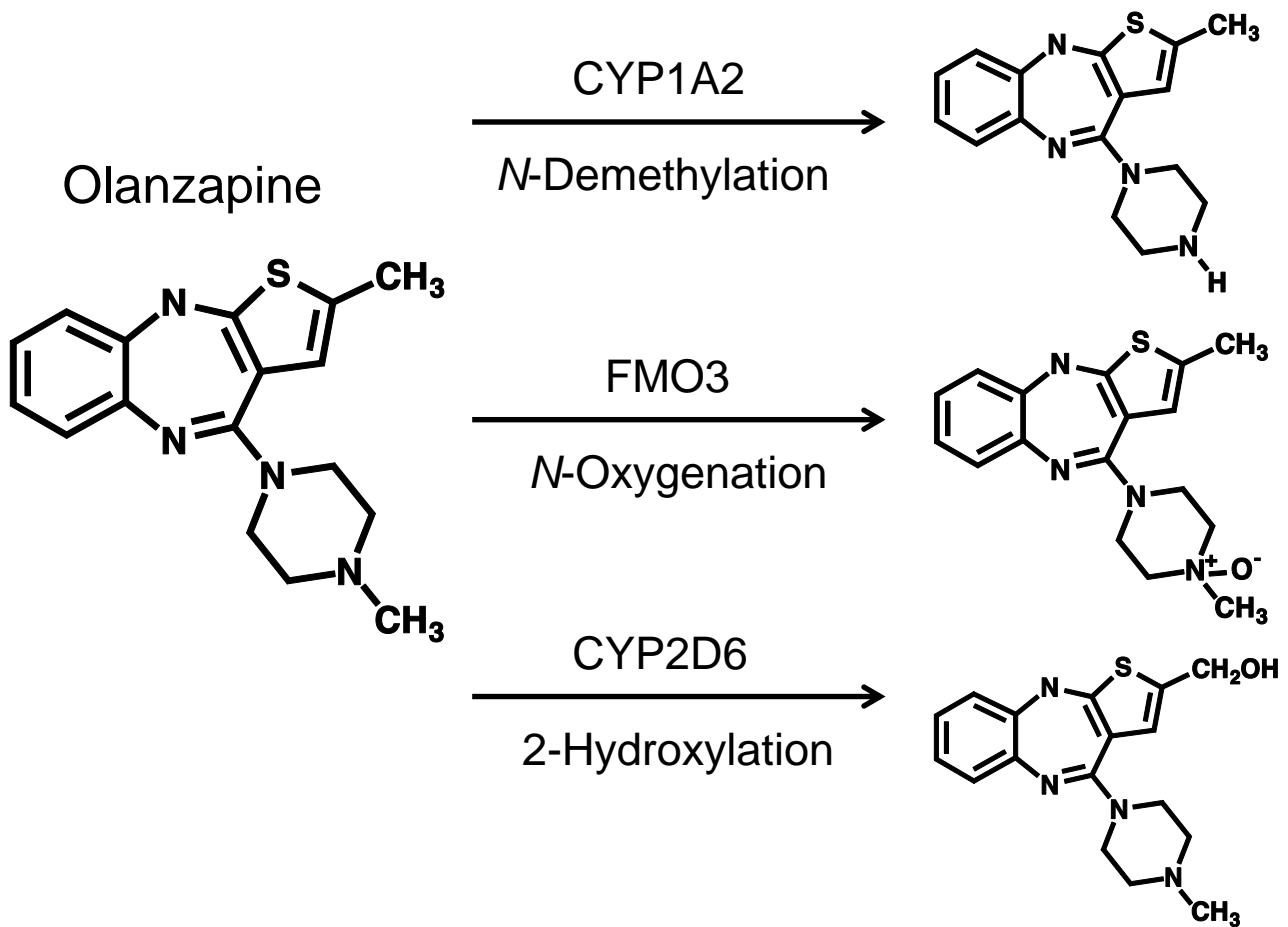


Fig. II-1. Reported metabolic pathways of olanzapine mediated by P450 and FMO3 enzymes.

たばこに含まれる多環芳香族炭化水素によって CYP1A2 発現誘導がおこることが知られている⁵²⁾。この喫煙による誘導に関して、*CYP1A2*1F* 変異を有すると誘導効果が上昇する一方で^{8, 9)}、*CYP1A2*1C* 変異を持つと誘導効果が起きないために触媒活性が上がらず、非喫煙者と同等の酵素活性であると報告されている⁷⁾。*CYP1A2*1C* および **1F* の日本人における頻度は高く、それぞれ 20% および 60% 程度である⁶⁾。喫煙により CYP1A2 酵素活性が上昇することでオランザピン血漿中濃度に影響を与えるという報告がなされているが^{53, 54)}、一方で CYP1A2 酵素活性とオランザピンの消失との間に有意な相関は認められないとする報告も存在する⁵⁵⁾。さらに前述の遺伝子多型までを考慮したオランザピン代謝への喫煙の影響に関する報告はなされていない。

前章で述べたように、*CYP2D6* には遺伝的多型性が報告されているがオランザピン代謝に対する影響はないとされている^{53, 54)}。一方、*CYP2D6* と同様に *FMO3* にも多型が存在することが報告されている^{56, 57)}。特に日本人においては *Glu158Lys*、*Cys197Ter*、*Arg205Cys*、*Val257Met*、*Glu308Gly* および *Arg500Ter* の 6 つの変異の頻度が比較的高い⁵⁶⁾。*FMO3* の *Glu308Gly* 変異をホモ接合体で持つ患者はヘテロ接合体および野生型ホモ接合体の患者に比べて、血漿中オランザピン *N*-酸化体濃度が有意に低くなるという報告がなされている⁵⁸⁾。さらにオランザピンの副作用発現は *FMO3* の *Glu158Lys*、*Val257Met* および *Glu308Gly* の変異と関連性があると報告されている⁵⁹⁾。しかしながら日本人において *FMO3* 遺伝子多型がオランザピンの代謝消失に影響を与え得るかは明らかとされていない。

本章ではヒト肝ミクロゾーム、組み換え酵素および日本人オランザピン投与患者の血漿を用いて、CYP1A2、CYP2D6 および *FMO3* の各酵素のオランザピン代謝消失に対する寄与を求めた。さらにこれら酵素活性の変動がオランザピン代謝消失に影響を与え得るかを検討した。

第 2 節 実験材料および方法

II -2-1 実験材料、試薬および使用機器

第 I 章で用いた実験材料、試薬および機器は記載を省略した。

ヒト肝マイクロゾームは第 I 章で使用した欧米白人肝に加えて、日本人肝より Inoue ら⁴¹⁾および Shimada ら³⁵⁾によって調製された全 29 検体を使用した。

プールドヒト肝マイクロゾーム (150 名分のヒト肝マイクロゾームを混合したもの) およびバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ発現させた組換え P450 (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 および 3A5) ならびに FMO3 は Corning より購入した。

オランザピン、フラフィリンおよびベンジダミンは Sigma-Aldrich より購入した。キニジンおよびフェナセチンは和光純薬より購入した。制限酵素 *Dde* I、*Apa* I、*Hph* I、*Pvu* II および *EcoO109* I はタカラバイオより、*BsrE* II、*BsaA* I、*Hinf* I、*Mwo* I および *BssS* I は New England Biolabs より購入し、反応には添付の緩衝液を使用した。その他の試薬類は市販の特級または生化学用のものを使用した。

HPLC システムは島津製 Prominence の CBM-20A system controller、SIL-20AC HT auto injector、LC-20AD pump、CTO-20AC column oven、DGU-20A 3R degasser、SPD-20A detector および RF-20A XS detector を使用した。

II -2-2 研究対象および検体

対象は 2013 年 10 月から 2015 年 2 月、鶴が丘ガーデンホスピタルを受診した 32—69 歳の男女 21 名の血液をヘパリンおよび EDTA 採血管にそれぞれ約 5 mL ずつ供与頂いた。ヘパリン採血管で採取した血液試料は 1 晩冷蔵保存した後、 $2,500 \times g$ で遠心分離後得られた上層の血漿を取り使用した。ゲノム DNA は EDTA 管で採取した患者血液から I -2-1 の項に準じて調製を行った。本研究は鶴が丘ガーデンホスピタルにおいて承認され、それぞれの被験者またはその家族に本研究の趣旨を十分に説明し、書面にて承諾を得て行われた。併

用薬剤が P450 誘導および阻害作用を有するかどうかは、各薬剤のインタビューフォームおよび Samer らによる報告⁶⁰⁾を参考にした。

II -2-3 薬物酸化酵素活性の測定

a) オランザピン酸化酵素活性の測定

Ring ら¹⁸⁾の方法を一部改変し、組換え P450 および FMO3 ならびにヒト肝ミクロゾームによるオランザピン *N*-脱メチル化、*N*-酸化、2-水酸化酵素活性および基質消失速度を算出した。反応混液は 0.30 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾームあるいは 20 pmol/mL 組換え酵素、NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4 または 8.4) ならびに 5–400 μM オランザピンを含み、全量を 250 μL とした。阻害実験では基質と同濃度の各 P450 阻害剤 (フラフィリン、キニジンおよびケトコナゾール) を添加あるいは FMO3 失活のため NADPH 非存在下で 45°C、5 分間熱処理を行った。37°C の水浴上で 45 分間振とうして反応させ、氷冷したアセトニトリル 250 μL を添加して反応を停止させた。攪拌後 700 × g で遠心分離した後、上清を HPLC に注入した。カラムは Kinetex XB-C18 (4.6 mm × 100 mm、2.6 μm; Phenomenex) を、ガードカラムは SecurityGuard Ultra C18 (4.6 mm; Phenomenex) を使用し、カラムオーブンは 40°C とした。移動相には 75 mM リン酸緩衝液 (pH7.0):メタノール (45:55、v/v) を使用し、流速は 0.8 mL/min とした。測定は UV 238 nm とした。オランザピン *N*-酸化体で検出された HPLC ピーク面積を基に代謝物生成速度を算出した。反応前後のオランザピン量の差を代謝消失量とした。

b) フェナセチン酸化酵素活性の測定

Uehara ら⁶¹⁾の方法を一部改変し、ヒト肝ミクロゾームによるフェナセチン *N*-脱エチル化酵素活性を算出した。反応混液は 0.30 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾーム、NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) ならびに 50 μM フェ

ナセチンを含み、全量を 250 μ L とした。37°C の水浴上で 10 分間振とうして反応させ、氷冷した酢酸エチル 1.5 mL および 3 M 塩化ナトリウム 25 μ L 加えて反応を停止させた。1 分間ボルテックスで攪拌後 700 \times g で遠心分離した後、有機層 1.2 mL を別の試験管に移し、遠心濃縮器および冷却トラップを用いて濃縮乾固した。移動相 200 μ L で再溶解させ、HPLC に注入させた。カラムは CAPCELL PACK C18 (4.6 mm \times 150 mm、5.0 μ m; 資生堂) を使用し、カラムオーブンは 40°C とした。移動相には 32%メタノールを使用し、流速は 1.0 mL/min とした。測定は UV 245 nm とした。フェナセチン *O*-脱エチル化体 (アセトアミノフェン) で検出された HPLC ピーク面積を基に *O*-脱エチル化酵素活性を算出した。

c) デキストロメトルファン酸化酵素活性の測定

ヒト肝ミクロゾームによるデキストロメトルファン *O*-および *N*-脱メチル化酵素活性は HPLC を用いて算出した。反応混液および反応条件は I -1-a) の項に準じて行った。

d) ベンジダミン酸化酵素活性の測定

Taniguchi-Takizawa ら⁶²⁾の方法を一部改変してヒト肝ミクロゾームによるベンジダミン *N*-酸化酵素活性を算出した。反応混液は 0.125 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾーム、NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.4) ならびに 50 μ M ベンジダミンを含み、全量を 200 μ L とした。37°C の水浴上で 10 分間振とうして反応させ、氷冷したアセトニトリル 250 μ L を加えて反応を停止させた。攪拌後 700 \times g で遠心分離した後、上清を HPLC に注入させた。カラムは CAPCELL PACK C18 (4.6 mm \times 150 mm、5.0 μ m) を使用し、カラムオーブンは 40°C とした。移動相には 46%メタノール-37%アセトニトリル-0.1%アンモニア水溶液を使用し、流速は 1.0 mL/min とした。測定は励起波長 307 nm、蛍光波長 377 nm とした。ベンジダミン *N*-酸化体の標品で検出された HPLC ピ

ーク面積を基にベンジダミン *N*-酸化酵素活性を算出した。

II -2-4 患者血漿中オランザピン濃度の測定

患者血漿 500 μ L あたり 1 M HCl 100 μ L、50 % 硫酸アンモニウム 500 μ L を加えてよく混和した後、10,000 \times g で 15 分間遠心分離させた。上清をセントリフリー (Merck Millipore) に入れ、2,500 \times g で遠心分離してろ過させ、HPLC に注入させた。HPLC の条件は II -2-3-a) の項に準じて行った。

II -2-5 *CYP1A2* 遺伝子多型の判定

PCR-RFLP 法を用いて *CYP1A2*1C* および **1F* の判定を行った。

Nakajima ら⁷⁾の方法を一部改変して *CYP1A2*1C* の判定を行った。反応液は 1 \times LA PCRTM 緩衝液、2.0 mM 塩化マグネシウム、0.25 mM dNTPs、0.4 μ M プライマー 5'-flanking R2_F、0.4 μ M プライマー 5'-flanking R3_R、0.5 U TaKaRa LA TaqTM およびゲノム DNA 50 ng を加え、滅菌精製水で全量を 25 μ L とした。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C で 5 分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ C で 1 分 30 秒間、56 $^{\circ}$ C で 2 分間、72 $^{\circ}$ C で 2 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル、さらに 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の伸長反応を行った。増幅させた後、PCR 産物 5.0 μ L に 1 \times Buffer K、10 U *Dde* I を加え、滅菌精製水で全量を 20 μ L とし、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。596 bp の PCR 産物が野生型アリルでは制限酵素で切断されないのに対し、*CYP1A2*1C* では切断されて 132 および 464 bp の断片となることを利用して判定を行った。用いたプライマーの配列を Table II-1 に示す。

Chida ら⁶⁾の方法を一部改変して、*CYP1A2*1F* の判定を行った。反応液は 1 \times LA PCRTM 緩衝液、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.2 mM dNTPs、1.0 μ M プライマー hCYP1A2_1F_F、1.0 μ M プライマー hCYP1A2_1F_R、0.5 U TaKaRa LA TaqTM およびゲノム DNA 50 ng を加え、滅菌精製水で全量を 25 μ L とした。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C で 5 分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、58 $^{\circ}$ C で 20 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクルとして 35 サイクル、さらに 72 $^{\circ}$ C で 7 分間の伸長反応

を行った。増幅させた後、PCR 産物 5.0 μ L に 1 \times Buffer L、15 U *Apa* I を加え、滅菌精製水で全量を 20 μ L とし、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 4.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。242 bp の PCR 産物が野生型アレルでは制限酵素で切断されて 119 および 123 bp の断片となるのに対し、*CYP1A2*1F* では切断されないことを利用して判定を行った。用いたプライマーの配列を Table II-1 に示す。

Table II-1. Sequences of primers used for detection *CYP1A2*.

| Name | Sequence |
|------------------|--------------------------------------|
| 5'-flanking R2_F | 5'-GCT ACA CAT GAT CGA GCT ATA C-3' |
| 5'-flanking R3_R | 5'-CAG GTC TCT TCA CTG TAA AGT TA-3' |
| hCYP1A2_1F_F | 5'-CCC AGA AGT GGA AAC TGA GA-3' |
| hCYP1A2_1F_R | 5'-GGG TTG AGA TGG AGA CAT TC-3' |

*CYP1A2*1C* と **1F* をどちらも持たないアレルは **1A*、双方持つ場合は **1L* とした (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm>)。

II -2-6 *CYP2D6* 遺伝子多型の判定

*CYP2D6*5* の判定は I -2-7-c) の項に準じて行った。*CYP2D6*2* および **10* の判定は Fukuda ら⁶³⁾の方法を一部改変して行い、C100T および G4180C の有無により決定した。

C100T の判定での反応液は 1 \times LA PCRTM 緩衝液、2.5 mM 塩化マグネシウム、0.2 mM dNTPs、0.3 μ M プライマー C100T-F、0.3 μ M プライマー C100T-R、1 U *TaKaRa LA Taq*TM およびゲノム DNA 50 ng を加え、滅菌精製水で全量を 25 μ L とした。PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C で 10 分間の熱変性後、95 $^{\circ}$ C で 45 秒間、61 $^{\circ}$ C で 45 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクルとして 35 サイクル、さらに 72 $^{\circ}$ C で 10 分間の伸長反応を行った。増幅させた後、PCR 産物 5.0 μ L に 1 \times *Hph* I 緩衝液、2.5

U *Hph* I を加え、滅菌精製水で全量を 20 μ L とし、37°C で 30 分間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 4.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。PCR 産物が野生型アレルでは制限酵素処理により 287 bp の断片となるのに対し、C100T アレルではさらに切断されて 187 および 100 bp の断片となることを利用して判定を行った。用いたプライマーの配列を Table II-2 に示す。

G4180C の判定での反応液は 1 \times LA PCRTM 緩衝液、2.5 mM 塩化マグネシウム、0.2 mM dNTPs、0.3 μ M プライマー 2D6-6F、0.3 μ M プライマー G4180C-R、0.5 U *TaKaRa LA Taq*TM およびゲノム DNA 50 ng を加え、滅菌精製水で全量を 25 μ L とした。PCR 反応は 94°C で 5 分間の熱変性後、94°C で 30 秒間、56°C で 35 秒間、72°C で 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクル、さらに 72°C で 10 分間の伸長反応を行った。増幅させた後、PCR 産物 5.0 μ L に 1 \times NE Buffer 3、5 U *BsrE* II、1 \times BSA を加え、滅菌精製水で全量を 20 μ L とし、60°C で 1 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。PCR 産物が野生型アレルでは制限酵素処理により 1118 bp の断片となるのに対して、G4180C アレルではさらに切断されて 861 および 257 bp の断片となることを利用し判定を行った。新たに用いたプライマーの配列を Table II-2 に示す。

Table II-2. Sequences of primers used for detection *CYP2D6*10*.

| Name | Sequence |
|----------|-----------------------------------|
| C100T-F | 5'-TCG GTG TGC TGA GAG TGT CCT-3' |
| C100T-R | 5'-TGG TTT CAC CCA CCA TCC AT-3' |
| G4180C-R | 5'-CAA GGG TAA CTG ACA TCT GC-3' |

G4180C のみ有する場合を *CYP2D6*2*、C100T および G4180C 双方を有する場合を *CYP2D6*10* とした (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>)。

II -2-7 FMO3 遺伝子多型の判定

FMO3 遺伝子多型は Shimizu ら⁶⁴⁾の方法を一部改変し、Glu158Lys、Cys197Ter、Arg205Cys、Val257Met、Glu308Gly および Arg500Ter 変異の判定を後述する PCR-RFLP 法で行った。

a) Arg205Cys および Val257Met の判定

PCR 反応液は 1×LA PCRTM 緩衝液、2.0 mM 塩化マグネシウム、0.2 mM dNTPs、0.2 μM プライマー-hFMO3ex4S、0.2 μM プライマー hFMO3ex5AS、0.2 μM プライマー-hFMO3ex6A、0.2 μM プライマー-hFMO3ex6AS、0.5 U TaKaRa LA TaqTM およびゲノム DNA 25 ng を加え、滅菌精製水で全量を 25 μL とした。PCR 反応は 94°C で 5 分間の熱変性後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 45 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクル、さらに 72°C で 2 分間の伸長反応を行った。増幅させた後、PCR 産物 10 μL に 1×Buffer M、15 U Pvu II および 10 U BsaA I を加え、滅菌精製水で全量を 20 μL とし、37°C で 17 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。Arg205Cys の判定では 699 bp の PCR 産物が野生型アレルでは Pvu II で切断されないのに対し、変異型アレルでは切断されて 99 および 600 bp の断片となることを利用して判定を行った。Val257Met の判定では 378 bp の PCR 産物が野生型アレルでは BsaA I で 135 および 243 bp に切断されるのに対し、変異型アレルでは切断されないことを利用して判定を行った。用いたプライマーの配列は Table II-3 に示す。

b) Glu158Lys の判定

PCR 反応液は 1×LA PCRTM 緩衝液、2.0 mM 塩化マグネシウム、0.2 mM dNTPs、0.2 μM プライマー-hFMO3ex4S、0.2 μM プライマー-hFMO3exC5AS、0.5 U TaKaRa LA TaqTM およびゲノム DNA 25 ng を加え、滅菌精製水で全量を 25 μL とした。PCR 反応は 94°C で 5 分間の熱変性後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 45 秒間を 1 サイクルとして 35 サイクル、さらに 72°C で 2 分間の

伸長反応を行った。増幅させた後、PCR産物 10 μ L に 1 \times NE Buffer 2、10 U *Hinf* I を加え、滅菌精製水で全量を 20 μ L とし、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。699 bp の PCR 産物が野生型アレルでは *Hinf* I で切断されて 66、87、153 および 217 bp の断片となるのに対し、変異型アレルでは 87、153 および 283 bp の断片となることを利用して判定を行った。用いたプライマーの配列は Table II-3 に示す。

c) Cys197Ter の判定

PCR 反応液はプライマーを hFMO3ex4S および hFMO3ex5AS に変更して、II-2-6-b) と同じ条件で行った。増幅させた後、PCR産物 10 μ L に 1 \times NE Buffer 3、5 U *Mwo* I を加え、滅菌精製水で全量を 20 μ L とし、37 $^{\circ}$ C で 17 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。699 bp の PCR 産物が野生型アレルでは *Mwo* I で切断されて 196 および 503 bp の断片となるのに対し、変異型アレルでは 80、116 および 503 bp の断片となることを利用して判定を行った。

d) Glu308Gly の判定

PCR 反応液はプライマーを hFMO3ex7S および hFMO3ex7AS に変更して、II-2-6-b) と同じ条件で行った。増幅させた後、PCR産物 10 μ L に 1 \times Buffer L、15 U *EcoO109* I を加え、滅菌精製水で全量を 20 μ L とし、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。464 bp の PCR 産物が野生型アレルでは *EcoO109* I で切断されず、変異型アレルでは切断されて 146 および 318 bp の断片となることを利用して判定を行った。用いたプライマーの配列を Table II-3 に示す。

e) Arg500Ter の判定

PCR 反応液はプライマーを hFMO3ex9S および hFMO3ex9AS に変更して、

II -2-6-b) と同じ条件で行った。増幅させた後、PCR 産物 10 μ L に 1 \times NE Buffer 3、5 U *BssS* I を加え、滅菌精製水で全量を 20 μ L とし、37 $^{\circ}$ C で 17 時間反応させた。制限酵素処理した反応液は EtBr を含む 2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。443 bp の PCR 産物が野生型アレルでは *BssS* I によって切断されて 154 および 289 bp の断片となるのに対し、変異型アレルでは切断されないことを利用して判定を行った。用いたプライマーの配列を Table II-3 に示す。

Table II-3. Sequences of primers used for detection *FMO3* genotype.

| Name | Sequence |
|-------------|--|
| hFMO3ex4S | 5'-TCA TAC TGT ATC TGC CAA AAC CA-3' |
| hFMO3ex5AS | 5'-CCC CAC ATT TCA TAT CAC ACC T-3' |
| hFMO3exC5AS | 5'-GTT CTT TAT AGT CCC TGC TGT GGA GC-3' |
| hFMO3ex6S | 5'-GCT GGG GTA ATA GAT CCA TTC-3' |
| hFMO3ex6AS | 5'-TGG GCT TAC AGG ACA TTA AGG-3' |
| hFMO3ex7SF | 5'-ACA AGA GGG AAA TAT TAC ACT TCC-3' |
| hFMO3ex7AS | 5'-CAA AGTT ATT GTC ACT GGC ATT C-3' |
| hFMO3ex9S | 5'-CTA CAC AGA GTT TGG GTA TCC-3' |
| hFMO3ex9AS | 5'-CCC TGT CTG GGT ATT GTC AG-3' |

第 3 節 結果

II -3-1 ヒト肝マイクロゾームによるオランザピン酸化酵素活性および代謝消失に対する阻害剤の影響

オランザピン代謝消失および代謝物生成に対する各酵素の寄与を調べるために、プールドヒト肝マイクロゾームを用いて、オランザピン代謝消失速度お

よび代謝物生成速度へ及ぼす各種阻害剤の影響を検討した。終濃度 5 μM の時のオランザピン代謝消失速度は CYP1A2 阻害剤であるフラフィリン、CYP2D6 阻害剤であるキニジンおよび FMO3 を失活させる熱処理によってそれぞれ 28%、33%および 25% 阻害された (Fig. II-2A)。これら 3 つの失活によって 85% の阻害が認められた (Fig. II-2A)。

終濃度 100 μM の時のオランザピン *N*-脱メチル化酵素活性はフラフィリンおよびキニジンでそれぞれ 64% および 50% の阻害効果が認められ、両阻害剤添加では 95% 以上の強い阻害効果が認められた (Fig. II-2B) が、熱処理では 20% 程度の阻害に留まった (Fig. II-2B)。同濃度の時、オランザピン *N*-酸化酵素活性は 3 種全ての処置によって阻害効果が認められたが、フラフィリンでは 20% 程度の阻害に留まった (Fig. II-2C)。さらに複数の阻害剤によって阻害効果は大きく変化しなかった (Fig. II-2C)。

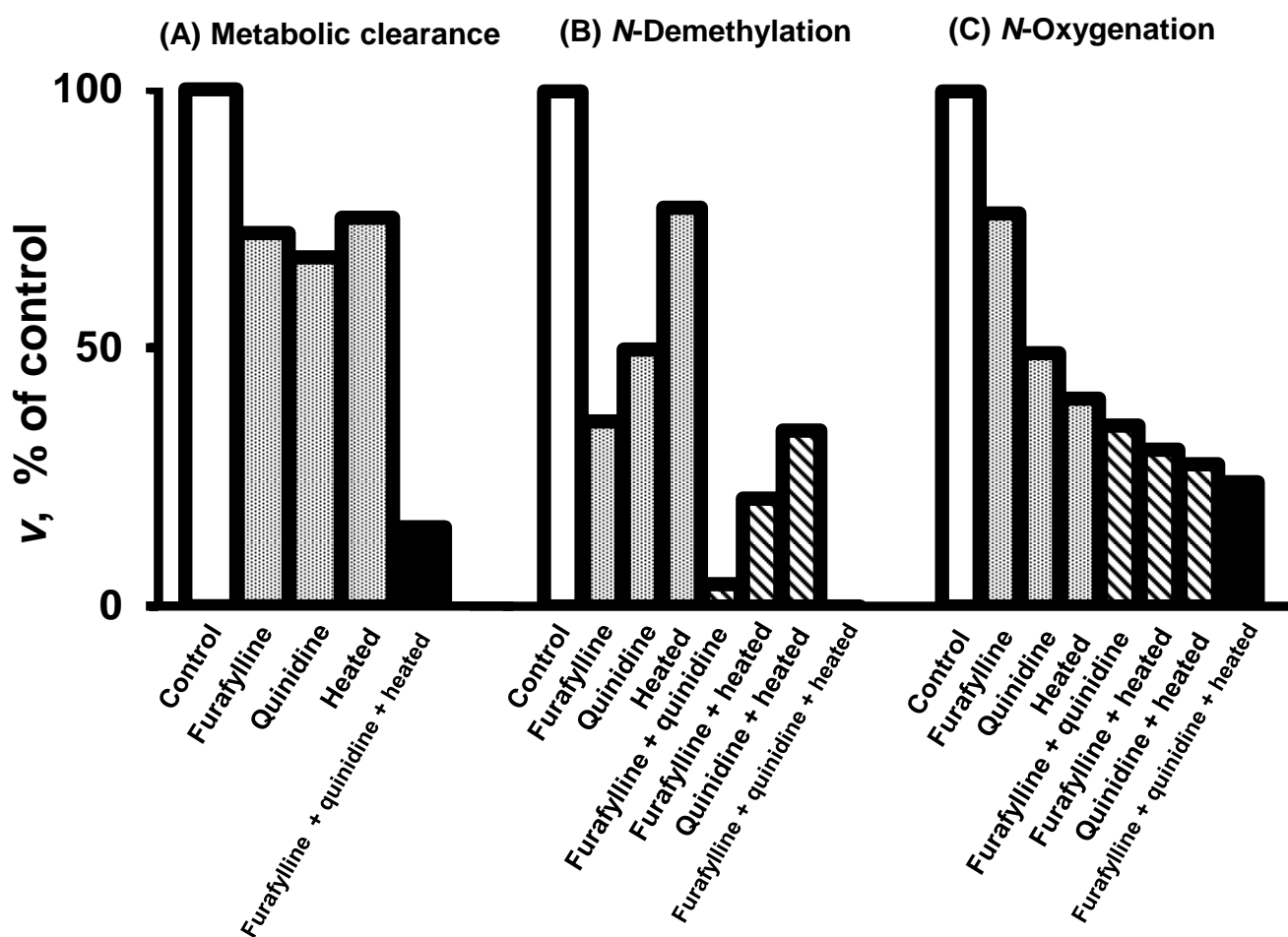


Fig. II-2. Effects of P450 inhibitors and heat treatment on olanzapine metabolic clearance and olanzapine oxidation catalyzed by pooled human liver microsomes.

Metabolic clearance of olanzapine (A), olanzapine *N*-demethylation (B), and olanzapine *N*-oxygenation (C) activities were analyzed in pooled human liver microsomes. The control activities of metabolic clearance, *N*-demethylation, and *N*-oxygenation were 41, 53, and 27 pmol/min/mg protein, respectively.

Furafylline, a CYP1A2 inhibitor; Quinidine, a CYP2D6 inhibitor; Heated, inactivates FMO3.

II-3-2 ヒト肝マイクロゾームによるオランザピン代謝消失および酸化酵素活性と P450 および FMO3 指標酵素活性との間の相関関係

オランザピン代謝に対する各酵素の寄与を確認するために、個別ヒト肝マイクロゾームを用いて、P450 および FMO3 指標酵素活性とオランザピン代謝消失および酸化酵素活性との間の相関関係を調べた。オランザピン終濃度 5 μ M の時の代謝消失速度は CYP1A2、CYP2D6 および FMO3 指標酵素活性との間に有意な相関関係は認められなかった (Table II-4)。

オランザピン終濃度 300 μ M の時のオランザピン *N*-脱メチル化酵素活性と有意な正の相関関係が認められたのは CYP1A2 指標酵素活性であるフェナセチン *O*-脱エチル化酵素活性 ($r=0.87$, $p<0.001$)、CYP2D6 指標酵素活性であるデキストロメトルファン *O*-脱メチル化酵素活性 ($r=0.39$, $p<0.05$) および FMO3 指標酵素活性であるベンジダミン *N*-酸化酵素活性 ($r=0.80$, $p<0.001$) であった (Table II-4)。さらに *N*-酸化酵素活性との間にもフェナセチン *O*-脱エチル化酵素活性 ($r=0.67$, $p<0.001$)、デキストロメトルファン *O*-脱メチル化酵素活性 ($r=0.51$, $p<0.01$) およびベンジダミン *N*-酸化酵素活性 ($r=0.86$, $p<0.001$) は有意な相関関係が認められた (Table II-4)。本条件下でヒト肝マイクロゾームの 2-水酸化酵素活性は検出限界以下であった。

同肝マイクロゾームで、フェナセチン *O*-脱エチル化酵素活性とベンジダミン *N*-酸化酵素活性との間にも有意な正の相関関係が認められた ($r=0.68$, $p<0.0001$) (Fig. II-3A)。デキストロメトルファン *O*-脱メチル化酵素活性とベンジダミン *N*-酸化酵素活性およびフェナセチン *O*-脱エチル化酵素活性との間には有意な相関関係は認められなかった (Figs. II-3B, 3C)。さらに CYP3A 指標酵素活性であるデキストロメトルファン *N*-脱メチル化酵素活性はいずれの酵素活性とも相関関係は認められなかった (data not shown)。

Table II-4. Correlation coefficients (*r*) between metabolic clearance, *N*-demethylation activities, and *N*-oxygenation activities of olanzapine and three probe oxidation activities in liver microsomes from 29 individuals

| | Metabolic clearance of olanzapine | Olanzapine oxidations | |
|--|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | <i>N</i> -demethylation | <i>N</i> -oxygenation |
| Phenacetin <i>O</i> -deethylation (CYP1A2) | 0.23 | 0.87*** | 0.67*** |
| Dextromethorphan <i>O</i> -demethylation (CYP2D6) | 0.20 | 0.39* | 0.51** |
| Benzydamine <i>N</i> -oxygenation (FMO3) | 0.04 | 0.80*** | 0.86*** |

Olanzapine (5 and 300 μ M) was incubated with human liver microsomes to determine metabolic clearance and metabolite formation, respectively. Metabolic clearance was calculated by differences of initial and later measured olanzapine concentrations based on mg microsomal protein per incubation time. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; and * $p < 0.05$, significant correlations by Pearson product-moment correlation.

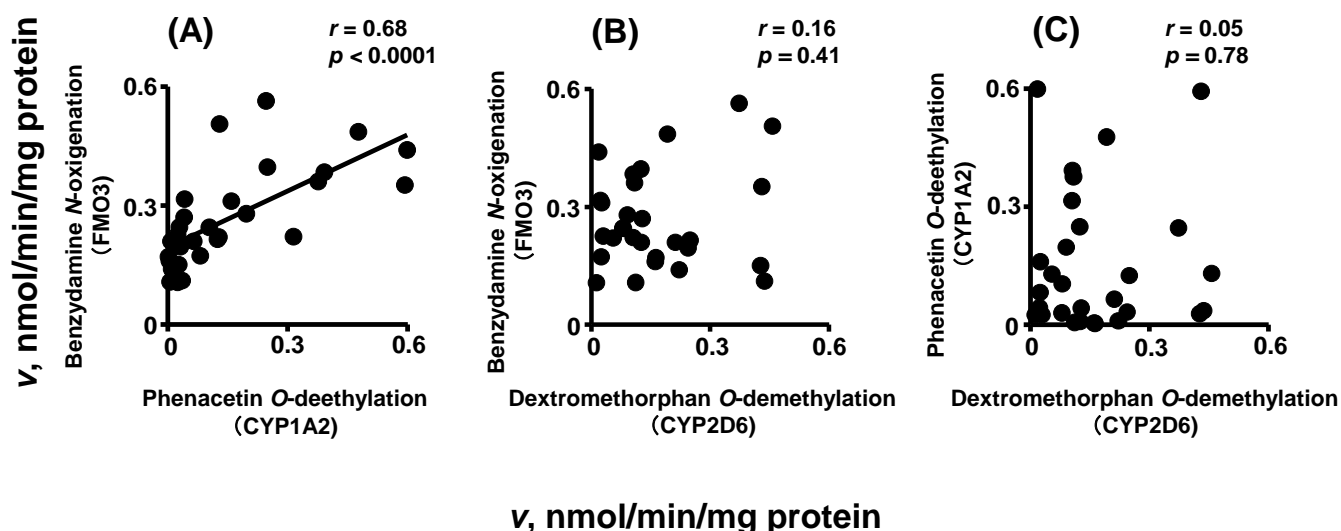


Fig. II-3. Correlations between three probe oxidation activities in liver microsomes from 29 individuals.

Each probe substrate (phenacetin, a CYP1A2 probe; dextromethorphan, a CYP2D6 probe; and benzydamine, a FMO3 probe) was incubated with human liver microsomes.

II-3-3 組換え P450 および FMO3 によるオランザピン酸化酵素活性

10種の組換え P450 分子種 (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6.1, 2E1, 3A4, および 3A5) および FMO3 を用いてオランザピン代謝酵素活性を測定した。オランザピン *N*-脱メチル化酵素活性は基質終濃度 5 μ M のとき、CYP1A2, 2C19, 2D6.1 および 3A4 で認められた (Table II-5)。基質終濃度 300 μ M のときはこれらに加えて、CYP2C8, 2C9 および 3A5 で認められた (Table II-5)。オランザピン *N*-酸化酵素活性は基質終濃度 5 μ M では主に CYP2D6.1 および FMO3 で認められたが、300 μ M では全ての酵素で酵素活性が認められた (Table II-5)。オランザピン 2-水酸化酵素活性は基質終濃度 5 μ M では CYP2D6 のみで認められた (Table II-5)。基質終濃度 300 μ M の条件下では CYP2D6.1 に加えて、CYP1A2, 2C9, 2C19, 3A4 および 3A5 で認められたが、活性値が 0.1 nmol/min/nmol P450 を超えたのは CYP2D6.1 のみであった (Table II-5)。

Table II-5. Olanzapine *N*-demethylation, *N*-oxygenation, and 2-hydroxylation activities at substrate concentrations of 5 μ M and 300 μ M catalyzed by ten recombinant human P450 and recombinant FMO3 enzymes.

| Enzymes | Olanzapine oxidation activities | | | | | |
|----------|---------------------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------|-------------|
| | (nmol/min/nmol P450 or FMO) | | | | | |
| | <i>N</i> -Demethylation | | <i>N</i> -Oxygenation | | 2-Hydroxylation | |
| | 5 μ M | 300 μ M | 5 μ M | 300 μ M | 5 μ M | 300 μ M |
| CYP1A2 | 0.02 | 1.07 | < 0.01 | 0.05 | < 0.01 | 0.07 |
| CYP2A6 | < 0.01 | < 0.01 | < 0.01 | 0.01 | < 0.01 | < 0.01 |
| CYP2B6 | < 0.01 | < 0.01 | < 0.01 | 0.12 | < 0.01 | < 0.01 |
| CYP2C8 | < 0.01 | 0.05 | < 0.01 | 0.07 | < 0.01 | < 0.01 |
| CYP2C9 | < 0.01 | 0.05 | < 0.01 | 0.05 | < 0.01 | 0.04 |
| CYP2C19 | 0.12 | 2.11 | 0.02 | 0.52 | < 0.01 | 0.02 |
| CYP2D6.1 | 0.13 | 2.36 | 0.59 | 6.38 | 0.06 | 4.78 |
| CYP2E1 | < 0.01 | < 0.01 | < 0.01 | 0.11 | < 0.01 | < 0.01 |
| CYP3A4 | 0.02 | 0.61 | 0.05 | 0.78 | < 0.01 | 0.05 |
| CYP3A5 | < 0.01 | 0.88 | 0.01 | 0.84 | < 0.01 | 0.03 |
| FMO3 | < 0.01 | < 0.01 | 0.34 | 9.49 | < 0.01 | < 0.01 |

II -3-4 オランザピン酸化酵素活性の速度論的解析

II-3-1、II-3-2 および II-3-3 の項に述べた結果より、CYP1A2、CYP2D6 および FMO3 がオランザピン代謝に寄与していると考えられたため、これら酵素の組換え体およびプールドヒト肝ミクロゾームを用いて、オランザピン酸化について速度論的解析を行った (Fig. II-4)。算出されたキネティックパラメータを Table II-6 に示す。

CYP1A2 のオランザピン *N*-脱メチル化反応の V_{\max}/K_m 値は高く、*N*-酸化反

応は低かった (Table II-6)。2-水酸化反応は認められたものの、パラメータ算出には至らなかった (Fig. II-4, Table II-6)。CYP2D6 は 3 つの反応全てで最も低い K_m 値および最も高い V_{max} 値を示した (Table II-6)。しかしながら変異体である CYP2D6.10 ではその酵素活性はほとんど認められず、*N*-酸化反応の V_{max}/K_m 値が CYP2D6.1 の 150 分の 1 以下で認められた程度であった (Table II-6)。FMO3 は *N*-酸化反応のみを触媒し、その V_{max}/K_m 値は CYP2D6.1 に次いで高い値であった (Table II-6)。ヒト肝マイクロゾームでは *N*-脱メチル化と *N*-酸化反応はほぼ同程度の触媒活性を示したが、2-水酸化反応はほとんど認められなかった (Table II-6)。

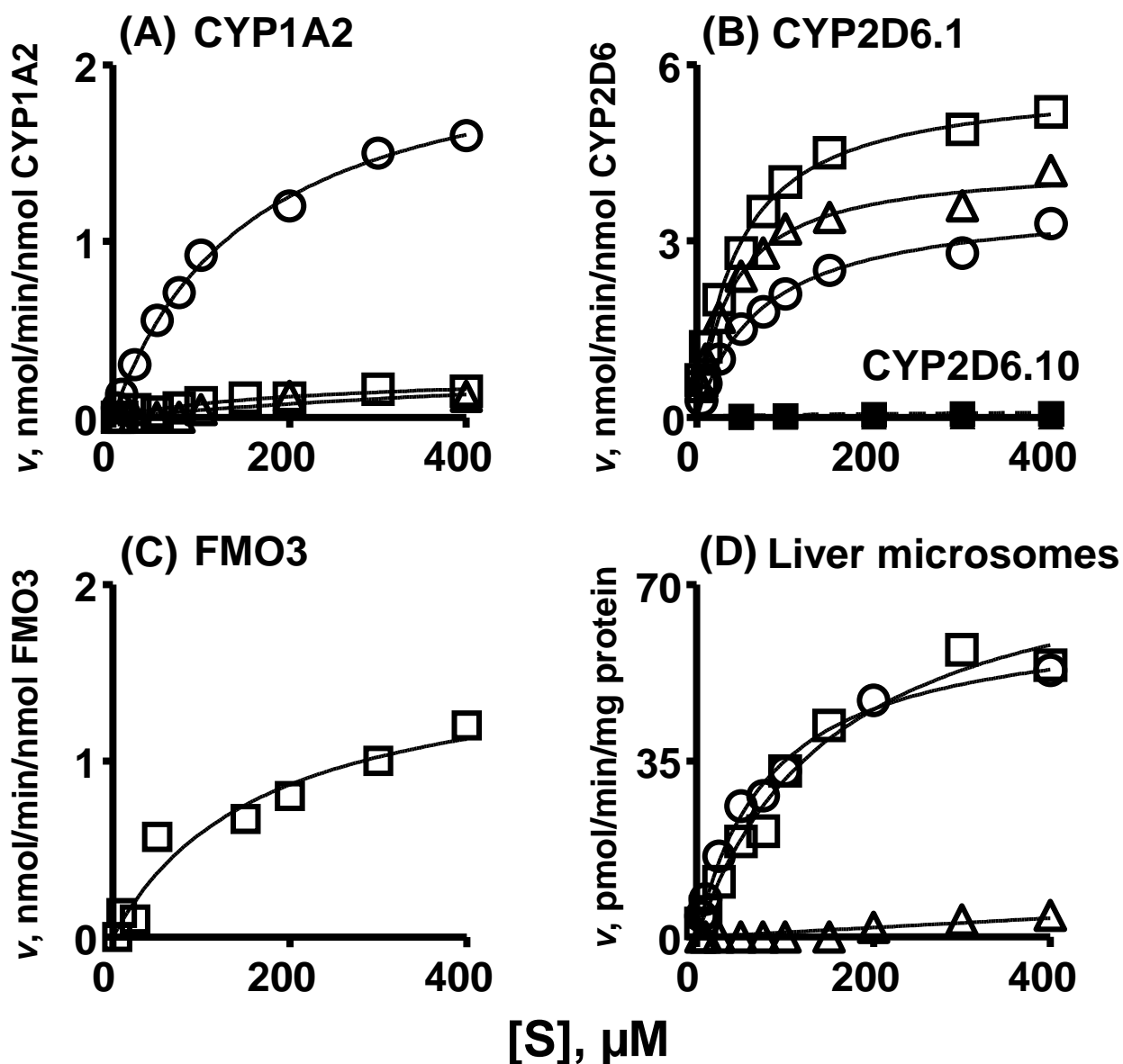


Fig. II-4. Kinetic analyses for olanzapine oxidation by recombinant P450 and FMO3 and pooled human liver microsomes.

N-demethylation (○), *N*-oxygenation (□), and 2-hydroxylation (△) activities catalyzed by recombinant human P450 and FMO3 enzymes and pooled human liver microsomes. (A), CYP1A2; (B), CYP2D6.1 (open plots) and CYP2D6.10 (closed plots); (C), FMO3; and (D), pooled human liver microsomes.

Table II-6. Kinetic parameters for olanzapine *N*-demethylation, *N*-oxygenation, and 2-hydroxylation activities catalyzed by recombinant P450s, recombinant FMO3, and pooled human liver microsomes (HLM).

| Enzyme | <i>N</i> -demethylation | | | <i>N</i> -oxygenation | | | 2-hydroxylation | | |
|--------|-------------------------|----------------------------|------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|-----------------|----------------------|---------------|
| | K_m^a | V_{max}^b | V_{max}/K_m^c | K_m | V_{max} | V_{max}/K_m | K_m | V_{max} | V_{max}/K_m |
| 1A2 | 0.16 ± 0.01 | 2.2 ± 0.1 | 14 | 0.22 ± 0.07 | 0.25 ± 0.04 | 1.1 | - | < 0.05 | - |
| 2D6.1 | 0.073 ± 0.008 | 3.7 ± 0.1 | 51 | 0.046 ± 0.003 | 5.8 ± 0.1 | 130 | 0.039 ± 0.004 | 4.3 ± 0.1 | 110 |
| 2D6.10 | - | < 0.05 | - | 0.25 ± 0.06 | 0.10 ± 0.01 | 0.40 | - | < 0.05 | - |
| FMO3 | - | < 0.05 | - | 0.17 ± 0.08 | 1.6 ± 0.3 | 9.4 | - | < 0.05 | - |
| HLM | 0.083 ± 0.009 | 0.064 ± 0.003 ^d | 0.7 ^e | 0.16 ± 0.03 | 0.081 ± 0.007 ^d | 0.51 ^e | - | < 0.015 ^d | - |

Kinetic parameters were calculated from a fitted curve by non-linear regression (mean ± SE).

^a mM, ^b min⁻¹, ^c (mM min)⁻¹, ^d nmol (min mg protein)⁻¹, and ^e mL (min mg protein)⁻¹.

II-3-5 ヒト肝ミクロゾームによるオランザピン代謝消失および酸化酵素活性に対する遺伝子多型の影響

CYP2D6 および *FMO3* 遺伝子多型のオランザピン酸化酵素活性および代謝消失への影響について調べた。ナンセンス変異 (Cys197Ter および Arg500Ter) のいずれか 1 つを持つあるいはアミノ酸置換を伴う変異を 2 つ持つ場合を IM、ナンセンス変異を 2 つ持つ場合を PM とし、それ以外の場合を EM とした。ただし Glu308Gly 変異は単独よりも Glu158Lys 変異と同一アレル上である頻度が高いため⁵⁶⁾、これら 2 つを持ち他の変異を持たない場合は EM とした。*CYP2D6* 遺伝子多型はオランザピン代謝消失、*N*-脱メチル化酵素活性および *N*-酸化酵素活性に影響を与えなかった (Figs. II-5A, 5C, 5E)。*FMO3* 遺伝子多型も同様にオランザピン代謝消失および *N*-酸化酵素活性に影響を与えなかった (Figs. II-5B, 5D)。

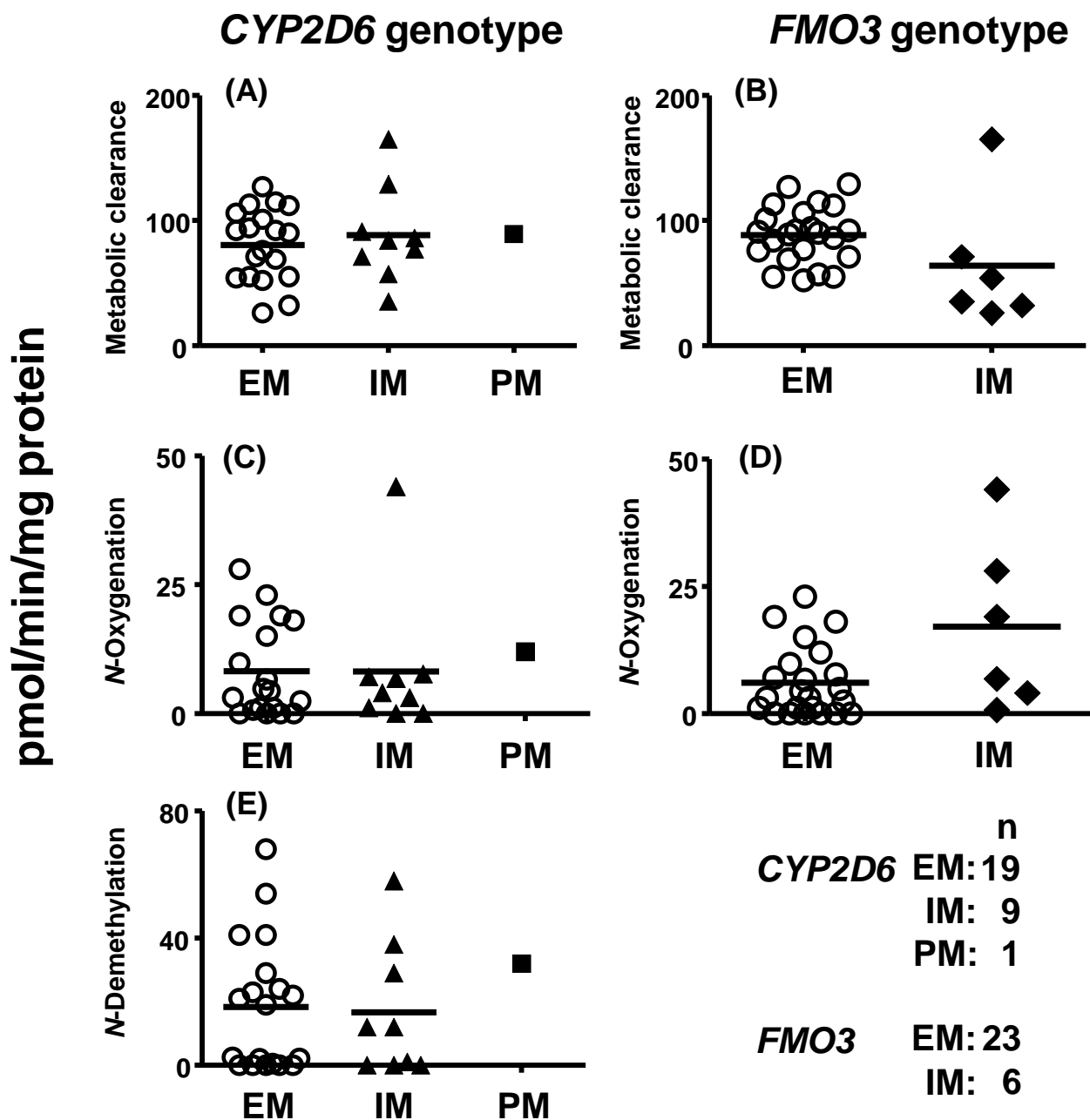


Fig. II-5. Olanzapine metabolic clearance (A, B), *N*-oxygenation (C, D), and *N*-demethylation (E) catalyzed by liver microsomes from 29 individuals genotyped for the *CYP2D6* (A, C, E) and *FMO3* (B, D) genes.

Horizontal lines indicate the mean values.

II-3-6 オランザピン投与患者血漿中薬物濃度に対する内的・外的因子の影響

オランザピン投与患者のトラフ時点での血漿中薬物濃度を測定した。患者ごとの結果を Table II-7 に示す。本集団の中には *CYP2D6* および *FMO3* で PM に分類される遺伝子型の患者は見いだされなかった (Table II-7)。さらに喫煙者の *CYP1A2* 遺伝子型は、喫煙により *CYP1A2* 誘導応答性が十分に備わっていると考えられるものであった (Table II-7)。

血漿中オランザピン濃度に対する内的・外的因子の影響について調べた。本薬物では内的因子として、*CYP2D6* および *FMO3* 遺伝子多型ならびに性別を、外的因子として喫煙の有無、肥満の指標とされる BMI 値および *CYP2D6* 併用薬数を検討した。本集団での年齢層が壮年期後半から中年期に偏っていることから、年齢を区分しての検討は行わなかった。本集団で血漿中薬物濃度を投与量で除した C/D 比に対する喫煙 (Fig. II-6A)、*CYP2D6* (Fig. II-6B) および *FMO3* (Fig. II-6C) 遺伝子多型の影響は認められなかった。さらに *CYP2D6* 阻害薬併用の有無および併用数の増加ならびに肥満 (BMI 値 25 以上) によるオランザピン C/D 比の上昇や性別による C/D 比の違いも認められなかった (data not shown)。

Table II-7. *CYP1A2*, *CYP2D6*, and *FMO3* genotypes and plasma concentrations of olanzapine determined for patients.

| ID | <i>CYP1A2</i> | <i>CYP2D6</i> | <i>FMO3</i> | D (mg) | Olanzapine (ng/mL) | Smoking, S | <i>CYP2D6</i> inhibitor |
|----|-----------------------|-----------------|---|-----------|-----------------------|---------------|---|
| 1 | *1A/*1F | *10/*10 (IM) | p.Arg205Cys/p.Val257Met (IM) | 15 | 4 | - | Levomepromazine |
| 2 | *1A/*1F | *1/*1 (EM) | Wild/Wild (EM) | 10 | 8 | - | Levomepromazine |
| 3 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*2 (EM) | Wild/p.Glu158Lys (EM) | 20 | 4 | S | Chlorpromazine, levomepromazine, promethazine, risperidone |
| 4 | *1A/*1F | *1/*10 (EM) | Wild/Wild (EM) | 20 | 4 | - | Levomepromazine, risperidone |
| 5 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*10 (EM) | Wild/Wild (EM) | 20 | 31 | - | Chlorpromazine, levomepromazine, promethazine |
| 6 | *1F/*1F | *1/*2 (EM) | Wild/Wild (EM) | 5 | 22 | - | - |
| 7 | *1A/*1F | *1/*1 (EM) | Wild/p.Cys197Ter (IM) | 20 | 23 | - | Chlorpromazine, |
| 8 | *1A/*1F | *1/*10 (EM) | Wild/Wild (EM) | 10 | 36 | - | Chlorpromazine, promethazine |
| 9 | *1A/*1A | *1/*1 (EM) | Wild/p.[Glu158Lys;Glu308Gly] (EM) | 10 | 24 | S | Fluvoxamine |
| 10 | *1F/*1F | *2/*10 (EM) | p.Arg205Cys/p.[Glu158Lys;Glu308Gly] (IM) | 5 | 34 | - | - |
| 11 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*5 (IM) | Wild/p.Val257Met (EM) | 20 | 23 | S | - |

Table II-7 (Continued). *CYP1A2*, *CYP2D6*, and *FMO3* genotypes and plasma concentrations of olanzapine determined for patients.

| ID | <i>CYP1A2</i> | <i>CYP2D6</i> | <i>FMO3</i> | D (mg) | Olanzapine (ng/mL) | Smoking, S | <i>CYP2D6</i> inhibitor |
|----|-----------------------|-----------------|---|-----------|-----------------------|---------------|---|
| 12 | *1A/*1F | *1/*10 (EM) | Wild/p.Val257Met (EM) | 20 | 12 | - | Chlorpromazine, levomepromazine, promethazine |
| 13 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*2 (EM) | Wild/p.Val257Met (EM) | 20 | 20 | S | Chlorpromazine, haloperidol |
| 14 | *1A/*1F | *1/*1 (EM) | Wild/p.[Glu158Lys;Glu308Gly] (EM) | 20 | 30 | - | Levomepromazine, promethazine, risperidone |
| 15 | *1F/*1L | *1/*10 (EM) | Wild/p.[Glu158Lys;Glu308Gly] (EM) | 2.5 | 4 | - | Levomepromazine |
| 16 | *1A/*1F | *1/*5 (IM) | Wild/p.[Glu158Lys;Glu308Gly] (EM) | 20 | 51 | - | - |
| 17 | *1A/*1F | *1/*10 (EM) | p.Val257Met/p.[Glu158Lys;Glu308Gly] (IM) | 20 | 76 | S | - |
| 18 | *1A/*1A | *10/*10 (IM) | Wild/Wild (EM) | 20 | 54 | - | - |
| 19 | *1A/*1F | *2/*2 (EM) | Wild/Wild (EM) | 20 | 74 | - | - |
| 20 | *1C/*1F or *1A/*1L | *5/*10 (IM) | Wild/p.Val257Met (EM) | 15 | 19 | S | - |
| 21 | *1F/*1L | *1/*10 (EM) | Wild/p.Val257Met (EM) | 15 | 37 | - | Risperidone |

D, dose; olanzapine, plasma concentrations of olanzapine; *CYP2D6* inhibitor, coadministered *CYP2D6* inhibitor.

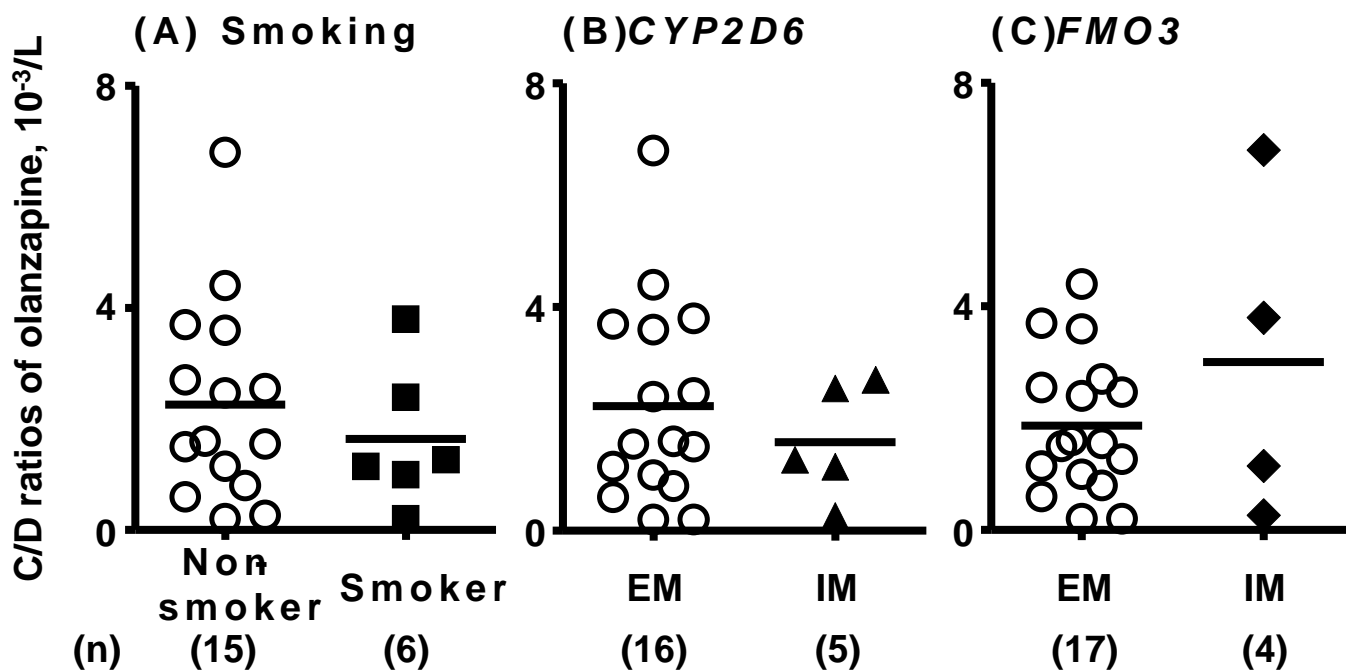


Fig. II-6. Association of smoking (A) and specific *CYP2D6* (B) and *FMO3* (C) genotypes with trough plasma concentration/dose (C/D) ratios of olanzapine in 21 patients.

The horizontal lines indicate the mean values.

第 4 節 考察

抗精神病薬オランザピンは体重増加や傾眠、高血糖といった副作用を引き起こすことが知られている⁶⁵⁾。実際に服用患者の体重増加と血漿中オランザピン濃度との関連性が報告されており⁶⁶⁾、オランザピン消失の個人差は治療効果のみならず、副作用のリスクを考える上でも非常に重要であると考えられる。本章では *in vivo* と *in vitro* の両面からオランザピン代謝消失の個人差について検討を行った。ヒト肝ミクロゾームによるオランザピンの代謝消失速度は *CYP1A2*、*CYP2D6* および *FMO3* 指標酵素活性との間に相関関係は認められなかった (Table II-4)。一方、*CYP1A2* および *CYP2D6* に対する阻害剤の添加ならびに熱処理による *FMO3* の失活でオランザピン代謝消失速度はそれ

ぞれ約 30% ずつ低下した (Fig. II-2A)。これら結果よりオランザピンの代謝消失は単独酵素に依存しておらず、複数酵素が補完し合っていることが示唆された。

10 種の組換え P450 および FMO3 による各代謝経路別酵素活性を測定したところ、主要な CYP1A2、CYP2D6 および FMO3 以外に CYP2C19 および CYP3A も程度に違いはあるが代謝に関与していた (Table II-5)。しかしながら CYP2C19 の肝臓中存在量は低く⁶⁷⁾、CYP3A 指標酵素活性とオランザピン酸化酵素活性との間には相関関係が認められなかったことから、これらはオランザピン代謝の主要酵素ではないと考えられた。

それぞれのオランザピン代謝経路に対する CYP1A2、CYP2D6 および FMO3 の寄与について調べるために、オランザピン *N*-脱メチル化酵素活性、*N*-酸化酵素活性および 2-水酸化酵素活性と各指標酵素活性との相関および組換え体によるこれら代謝経路の速度論的解析を行った。オランザピン *N*-脱メチル化酵素活性に対する CYP1A2 および CYP2D6 の役割は、フェナセチンおよびデキストロメトルファンとの相関関係 (Table. II-4)、フラフィリンとキニジンによる阻害 (Fig. II-2B) ならびに組換え体による速度論的解析 (Fig. II-4A, 4B, Table II-6) の結果から認められた。オランザピン *N*-脱メチル化酵素活性とベンジダミン *N*-酸化酵素活性との間に正の相関関係が認められたが (Table II-4)、組換え FMO3 からはオランザピン代謝で *N*-酸化体のみが生成された (Fig. II-4C, Table II-6)。本研究で用いたヒト肝ミクロゾームの CYP1A2 酵素活性と FMO3 酵素活性との間に相関関係が認められていた (Fig. II-3A) ことから、実際には FMO3 は *N*-脱メチル化には関与しないものと考えられた。一方、オランザピン *N*-酸化酵素活性とデキストロメトルファンおよびベンジダミン酸化酵素活性との間には正の相関関係が認められたこと (Table. II-4)、キニジンおよび熱処理により阻害が認められたこと (Fig. II-2C) ならびに組換え CYP2D6 および FMO3 の高い触媒活性 (Figs. II-4B, 4C, Table II-6) により、*N*-酸化には CYP2D6 および FMO3 が関与していることが示唆された。オランザピン 2-水酸化反応は CYP1A2 および CYP2D6 で認められたが (Table

II-5)、CYP1A2 の活性値は低く、キネティックパラメータ算出には至らなかった。さらにヒト肝ミクロゾーム中でのオランザピン 2-水酸化酵素活性は低値であった (Fig. II-4D, Table II-6)。これら結果よりオランザピン 2-水酸化反応には CYP2D6 のみが関与しており、オランザピン代謝の主たる経路ではないことが示唆された。CYP3A4/5 はいずれの反応に対しても酵素活性が認められたが (Table II-5)、個別肝ミクロゾームによる各経路の酵素活性とデキストロメトルファン *N*-脱メチル化酵素活性との間に相関関係が認められなかったため、その寄与は小さいものと考えられる。以上より、ヒト肝では主たる経路であるオランザピン *N*-脱メチル化反応には CYP1A2 および CYP2D6 ならびに *N*-酸化反応には CYP2D6 および FMO3 がそれぞれ寄与しており、従たる経路である 2-水酸化反応には CYP2D6 が寄与していることが推察された (Fig. II-7)。

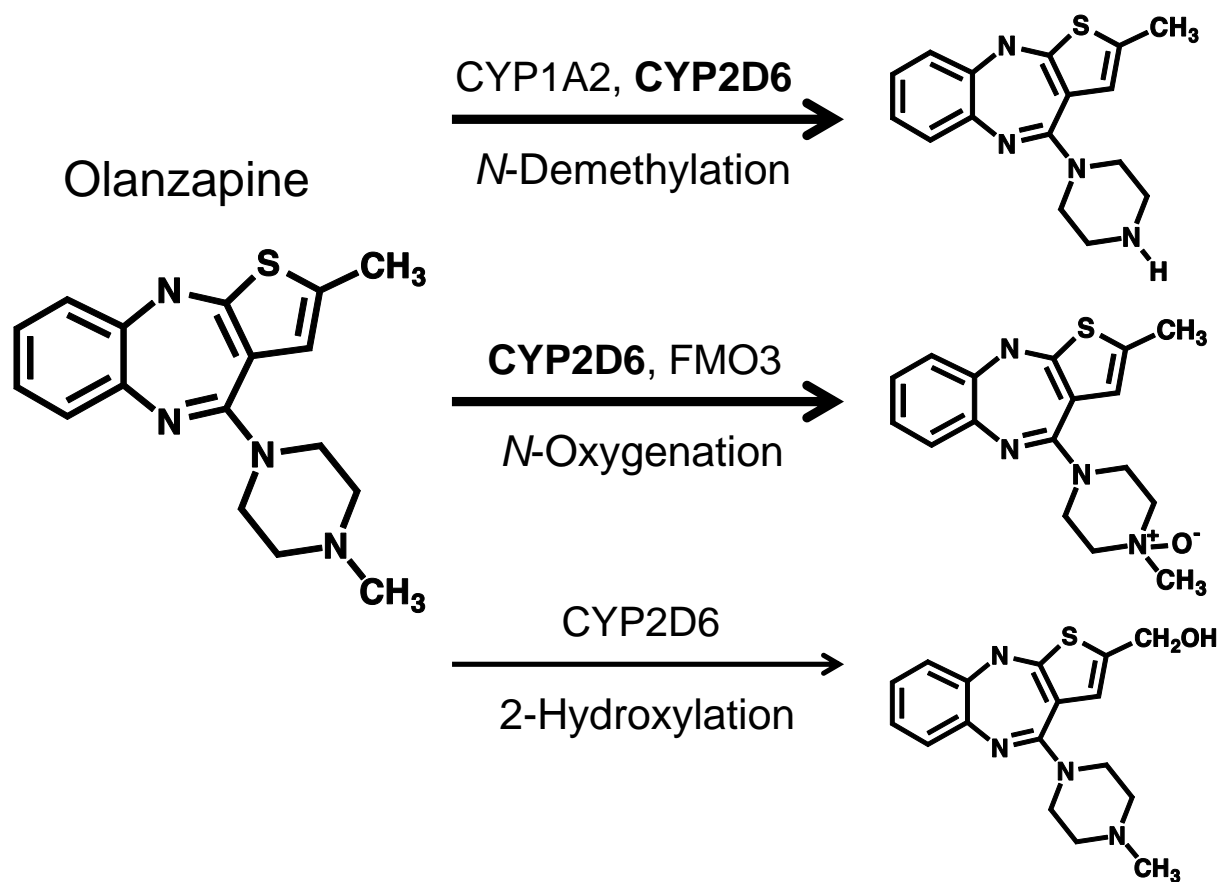


Fig. II-7. Proposed metabolic pathways of olanzapine mediated by P450 and FMO3 enzymes in the present study.

In vivo の検討では、オランザピン C/D 比は *CYP2D6* および *FMO3* 遺伝子多型の影響を受けず (Figs. II-6B, 6C)、*in vitro* の結果と一致した。*CYP2D6*.10 のオランザピン酸化反応は極めて低値を示した (Fig. II-4B, Table II-6) が、個別ヒト肝マイクロゾームでのオランザピン代謝酵素活性は *CYP2D6* 遺伝子多型による影響を受けなかった (Figs. II-5A, 5C, 5E) ことから、低い *CYP2D6* 酵素活性は他の酵素が補完していると考えられる。さらに血漿中オランザピン濃度に喫煙の影響は認められなかった (Fig. II-6A)。個別ヒト肝マイクロゾームで 1 検体のみ *CYP2D6**4/*4 が見出されたが、その他は *CYP2D6* および *FMO3* ともに PM の検体は見いだされなかった。*CYP2D6* および *FMO3* は双方とも日本人における PM の頻度は 1% 未満である^{10, 57)}ため、どちらも PM となる患者は極めてまれであると考えられる。さらに UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A4 もオランザピン代謝に関与することが報告されている⁶⁸⁾。よってこれら結果より、P450、*FMO3* および UGT といった複数の酵素が複数の経路でオランザピンを代謝しており、単独酵素に依存しないことが明らかとなった。これら複数酵素が関与することから、薬物相互作用リスクが低いことが推察された。さらにその他内的・外的因子として性別、併用薬および肥満による影響も考慮するにはおよばないと考えられた。

以上、本章ではオランザピンの代謝に関わる酵素の詳細な同定解析と *CYP2D6* および *FMO3* 遺伝子多型ならびに喫煙の因子がオランザピン代謝消失に影響を与え得るか否か検討を行った。各代謝経路に複数の酵素が乗り入れており各酵素が補完し得るため、それぞれの因子単独ではオランザピンの代謝消失に影響を与えないことが示唆され、日本人患者においてオランザピンは比較的安全に使用できることが考えられた。

第 III 章 リスペリドン体内動態の個人差

第 1 節 緒言

リスペリドンはセロトニン・ドパミン・アンタゴニストに分類される抗精神病薬であり、世界中で広く使用されている⁶⁹⁾。リスペリドンは主に CYP2D6 一部 CYP3A4 によって代謝されて活性代謝物 9-水酸化リスペリドン (パリペリドン) となる (Fig. III-1)^{19, 20)}。

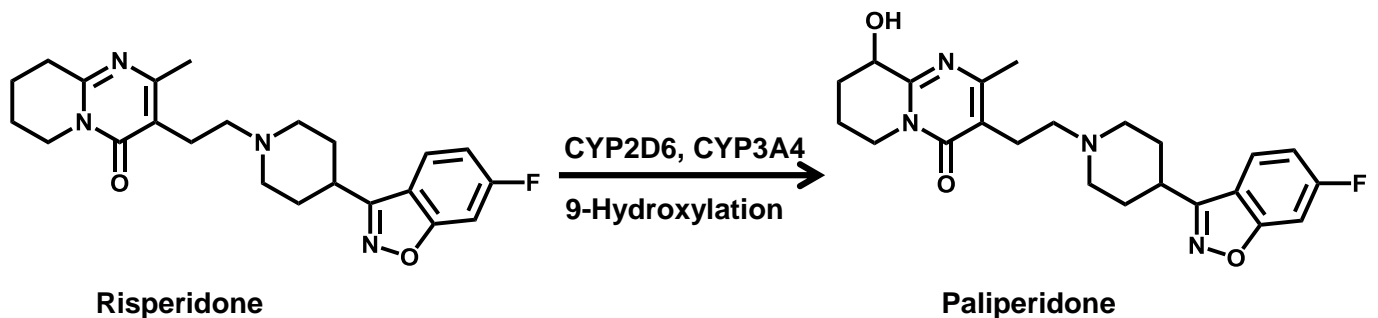


Fig. III-1. Metabolic pathways of risperidone mediated by P450 enzymes.

CYP2D6 遺伝子多型は血漿中リスペリドン、パリペリドンおよびこれらの総和 (すなわち活性体濃度) やリスペリドンとパリペリドンの代謝比に影響を与えていることが報告されている⁷⁰⁻⁷²⁾。しかしながら血漿中パリペリドン濃度およびリスペリドンとパリペリドン濃度の合計は CYP2D6 遺伝子多型に影響を受けないという報告も存在する⁷³⁻⁷⁷⁾。一方、CYP3A4 と同様の基質に対して触媒活性を示す CYP3A5 の遺伝子多型との関連について、韓国人で CYP3A5 発現群に比べて低発現群で血漿中リスペリドンおよびパリペリドン濃度が有意に高かったという報告が存在している⁷⁸⁾。しかしながら CYP3A5*3 多型は CYP2D6 IM の群でのみリスペリドン代謝に影響を与えるとする報告⁷⁹⁾やリスペリドンやパリペリドン濃度には影響を与えないとする報告^{80, 81)}

など相反するものも存在しており、*CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型がリスペリドン代謝に影響を与え得るか明らかとなっていない。さらにリスペリドン代謝への *CYP3A5* の寄与については *in vitro* において詳細に検討はなされていない。

本章ではヒト肝マイクロゾーム、組換え酵素および日本人リスペリドン投与患者の血漿を用いて、*CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型や併用薬がリスペリドン代謝消失に影響を与え得るか検討した。

第 2 節 実験材料および方法

III-2-1 実験材料、試薬および使用機器

第 I 章および第 II 章で用いた実験材料、試薬および機器は記載を省略した。速度論的解析に用いた個別ヒト肝マイクロゾームは Corning より購入した。プールドおよび個別ヒト肝マイクロゾームの添付資料に記載されていた遺伝子型、*CYP2D6* および *CYP3A* 指標酵素活性（ブフラロール 1'-水酸化およびテストステロン 6 β -水酸化酵素活性）ならびに P450 含量の値を Table III-1 に示す。

Table III-1. Genotypes and enzyme activities of the pooled (HLM) and three individual human liver microsomes used in this study.

| | HLM | HH108 | HH61 | HH31 |
|--|------|-------|---------|---------|
| <i>CYP2D6</i> genotype | - | *1/*1 | *4/*4 | *4/*4 |
| Bufuralol 1'-hydroxylation (pmol/min/mg protein) | 71 | 100 | PM (<1) | PM (<1) |
| Testosterone 6 β -hydroxylation (pmol/min/mg protein) | 4600 | 3700 | 2700 | 12000 |
| Total P450 (pmol/mg protein) | 350 | 310 | 180 | 710 |

リスペリドン、ケトコナゾールおよびクマリンは和光純薬より購入した。パリペリドンは東京化成工業より購入した。

III-2-2 研究対象および検体

対象は2013年10月から2015年2月、鶴が丘ガーデンホスピタルを受診した24—75歳の男女27名の血液をヘパリンおよびEDTA採血管にそれぞれ約5 mLずつ供与頂き、II-2-2の項に準じて血漿を取り出した。本研究はそれぞれの被験者またはその家族に本研究の趣旨を十分に説明し、書面にて承諾を得て行われた。

III-2-3 薬物酸化酵素活性の測定

a) リスペリドン酸化酵素活性の測定

ヒト肝ミクロゾームおよび組換え P450 によるリスペリドン 8-水酸化および基質消失速度は HPLC を用いて測定を行い算出した。反応混液は 0.40 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾームあるいは 5 pmol/mL 組み換え P450、NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) ならびに 0.5—300 μM リスペリドンを含み、全量を 250 μL とした。阻害実験では 0.01—10 μM 各 P450 阻害剤 (キニジンおよびケトコナゾール) を添加した。37°C の水浴上で 30 分間振とうして反応させ、氷冷したアセトニトリル 250 μL を添加して反応を停止させた。攪拌後 10,000 × g で遠心分離した後、上清を HPLC に注入した。カラムは Kinetex XB-C18 (4.6 mm × 100 mm、2.6 μm) を、ガードカラムは SecurityGuard Ultra C18 (4.6 mm) を使用し、カラムオーブンは 40°C とした。移動相には 30 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0):アセトニトリル (80:20、v/v) を使用し、流速は 1.0 mL/min とした。測定は UV 238 nm とした。パリペリドンで検出された HPLC ピーク面積を基に 9-水酸化酵素活性を算出した。反応前後のリスペリドン量の差を代謝消失量とした。

b) クマリン酸化酵素活性の測定

ヒト肝ミクロゾームによるクマリン 7-水酸化酵素活性は HPLC を用いて測定を行い算出した。反応混液は 0.40 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾーム、NADPH 生成系(0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) ならびに 100 μM クマリンを含み、全量を 250 μL とした。37°C の水浴上で 10 分間振とうして反応させ、氷冷した 60% 過塩素酸 10 μL で反応を停止させた。攪拌後 700 × g で遠心分離し、上清を HPLC に注入した。カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm × 150 mm、5.0 μm) 使用し、カラムオーブンは 25 °C とした。移動相には 20 mM 過塩素酸ナトリウム (pH 2.5):アセトニトリル (55 : 45) を使用し、流速は 1.2 mL/min とした。測定波長は励起波長 338 nm、蛍光波長 458 nm とした。

c) デキストロメトルファン酸化酵素活性の測定

ヒト肝ミクロゾームによるデキストロメトルファン *O*-脱メチル化酵素活性は HPLC を用いて測定を行い算出した。反応混液および反応条件は I -2-4-a) に準じて行った。

d) ミダゾラム水酸化酵素活性の測定

ヒト肝ミクロゾームによるミダゾラム 1'-水酸化酵素活性は HPLC を用いて測定を行い算出した。反応混液および反応条件は I -2-4-b) の項に準じて行った。

III -2-4 患者血漿中リスペリドン濃度の測定

患者血漿 500 μL あたり 1 M HCl 100 μL、50 % 硫酸アンモニウム 500 μL を加えてよく混和した後、10,000 × g で 15 分間遠心分離させた。上清をセントリフリーで 2,500 × g で遠心分離してろ過させた。試験管 1 本あたりろ液 800 μL、1 M NaOH 800 μL および酢酸エチル 2 mL を加えて 3 分間ボルテックスで混和した。700 × g で 15 分間遠心分離させた後、各上層 1.8 mL を 1 本の試験

管にまとめて、遠心濃縮器および冷却トラップを用いて濃縮乾固した。抽出操作は試験管 1 本あたり 2 度ずつ行った。移動相 200 μ L で再溶解させ、HPLC に注入した。HPLC の条件は-2-3-a)の項に準じて行った。

III -2-5 P450 遺伝子多型の判定

CYP1A2、CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型判定は II -2-5、II -2-6 および I -2-2 の項に準じて行った。

第 3 節 結果

III -3-1 ヒト肝ミクロゾームによるリスペリドン酸化酵素活性に対する阻害剤の影響

CYP2D6 阻害剤であるキニジンおよび CYP3A 阻害剤であるケトコナゾールを用いて、プールドヒト肝ミクロゾームによるリスペリドン 9-水酸化酵素活性への影響を調べた。終濃度 5 μ M のリスペリドンに対してはキニジンおよびケトコナゾールの双方で濃度依存的な阻害が認められた (Fig. III-2A)。一方、50 μ M のリスペリドンではキニジンに比べてケトコナゾールで強い阻害作用が認められた (Fig. III-2B)。

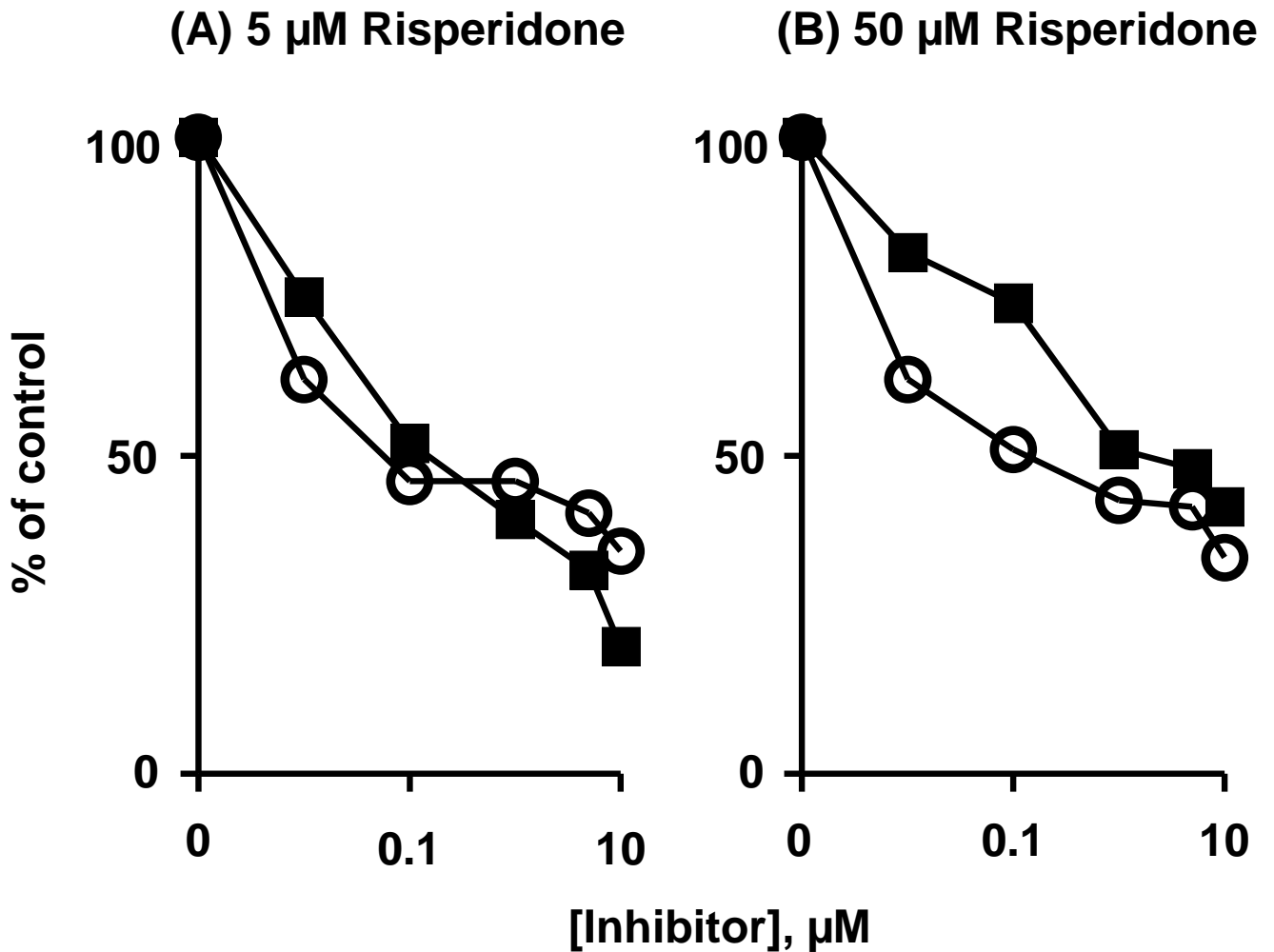


Fig. III-2. Inhibitory effects of quinidine (a CYP2D6 inhibitor, ■) and ketoconazole (a CYP3A inhibitor, ○) on risperidone 9-hydroxylation by pooled human liver microsomes at substrate concentrations of 5 (A) and 50 μ M (B). The control activities were 310 and 1100 pmol/min/mg protein at 5 and 50 μ M risperidone, respectively.

Ⅲ-3-2 ヒト肝ミクロゾームによるリスペリドン酸化酵素活性と P450 指標酵素活性との相関関係

個別ヒト肝ミクロゾームの P450 指標酵素活性およびリスペリドン 9-水酸化酵素活性を測定し、相関関係について調べた。終濃度 5 および 50 μ M でのリスペリドン 9-水酸化酵素活性は CYP2D6 指標酵素活性であるデキストロメ

トルファン *O*-脱メチル化酵素活性との間に正の相関関係が認められた ($r=0.63$, $p<0.001$, Fig. III-3B; and $r=0.72$, $p<0.001$, Fig. III-3E)。さらに同酵素活性は CYP3A 指標酵素活性であるミダゾラム 1'-水酸化酵素活性との間にも正の相関関係が認められた ($r=0.52$, $p<0.001$, Fig. III-3C; and $r=0.67$, $p<0.001$, Fig. III-3F)。一方、同酵素活性は CYP2A6 指標酵素活性であるクマリン 7-水酸化酵素活性との間には関連は認められなかった (Figs. III-3A, 3D)。

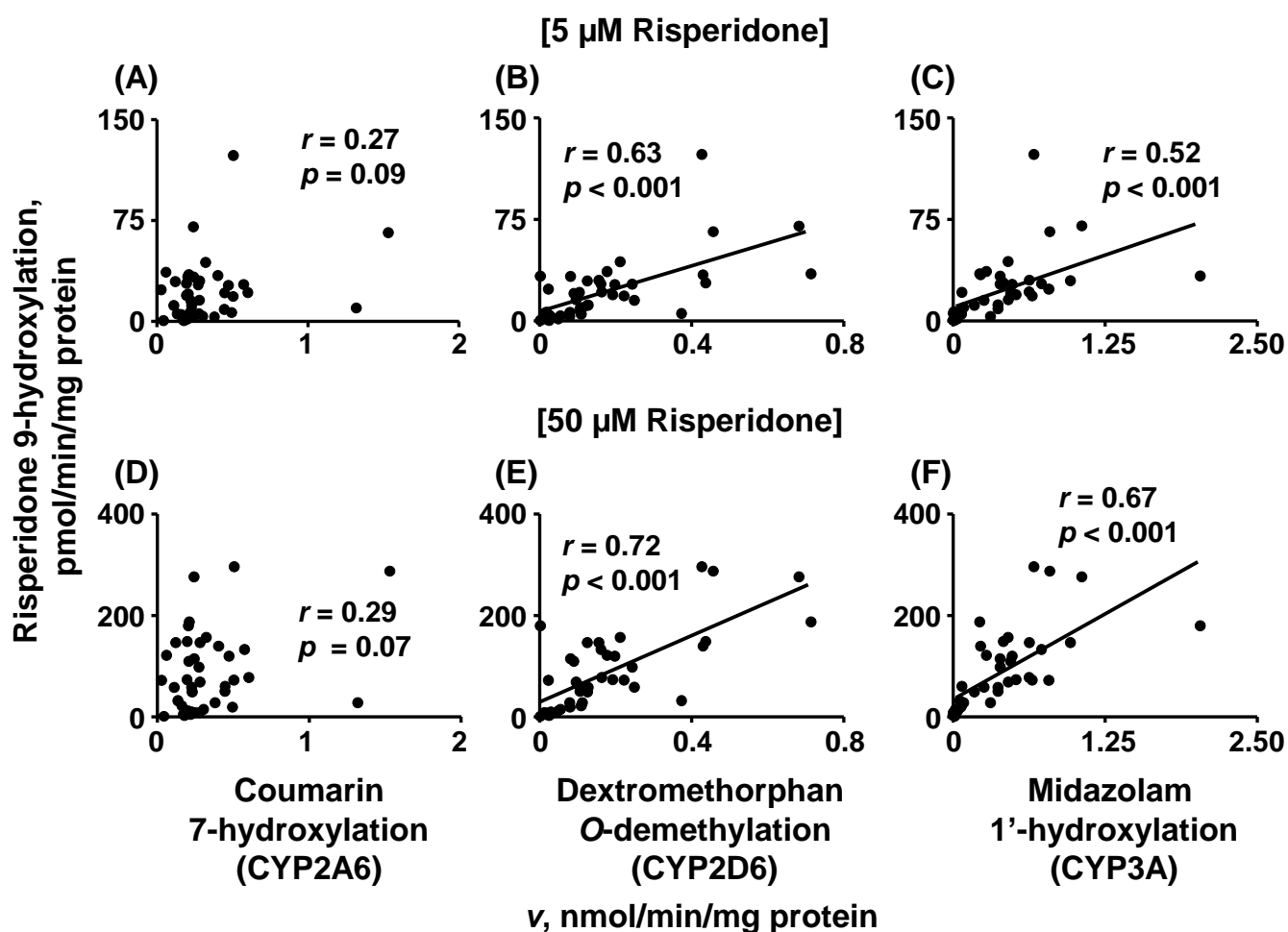


Figure III-3. Correlation between risperidone 9-hydroxylation activities and three probe oxidation activities in human liver microsomes from 40 individuals. Risperidone (5 and 50 μ M) was incubated with human liver microsomes from individual donors.

III-3-3 組換え P450 によるリスペリドン酸化酵素活性

10 種の組換え P450 分子種 (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6.1, 2E1, 3A4, および 3A5) を用いてリスペリドン 9-水酸化酵素活性を測定した。リスペリドン 9-水酸化酵素活性は基質終濃度 5 μM の条件下、CYP2C19、2D6、3A4 および 3A5 で認められた (Fig. III-4A)。基質終濃度を 50 μM の条件下のとき、これらに加えて CYP2C8 の代謝酵素活性も認められたが、相対的に CYP2C によるリスペリドン 9-水酸化酵素活性は低値を示した (Fig. III-4B)。

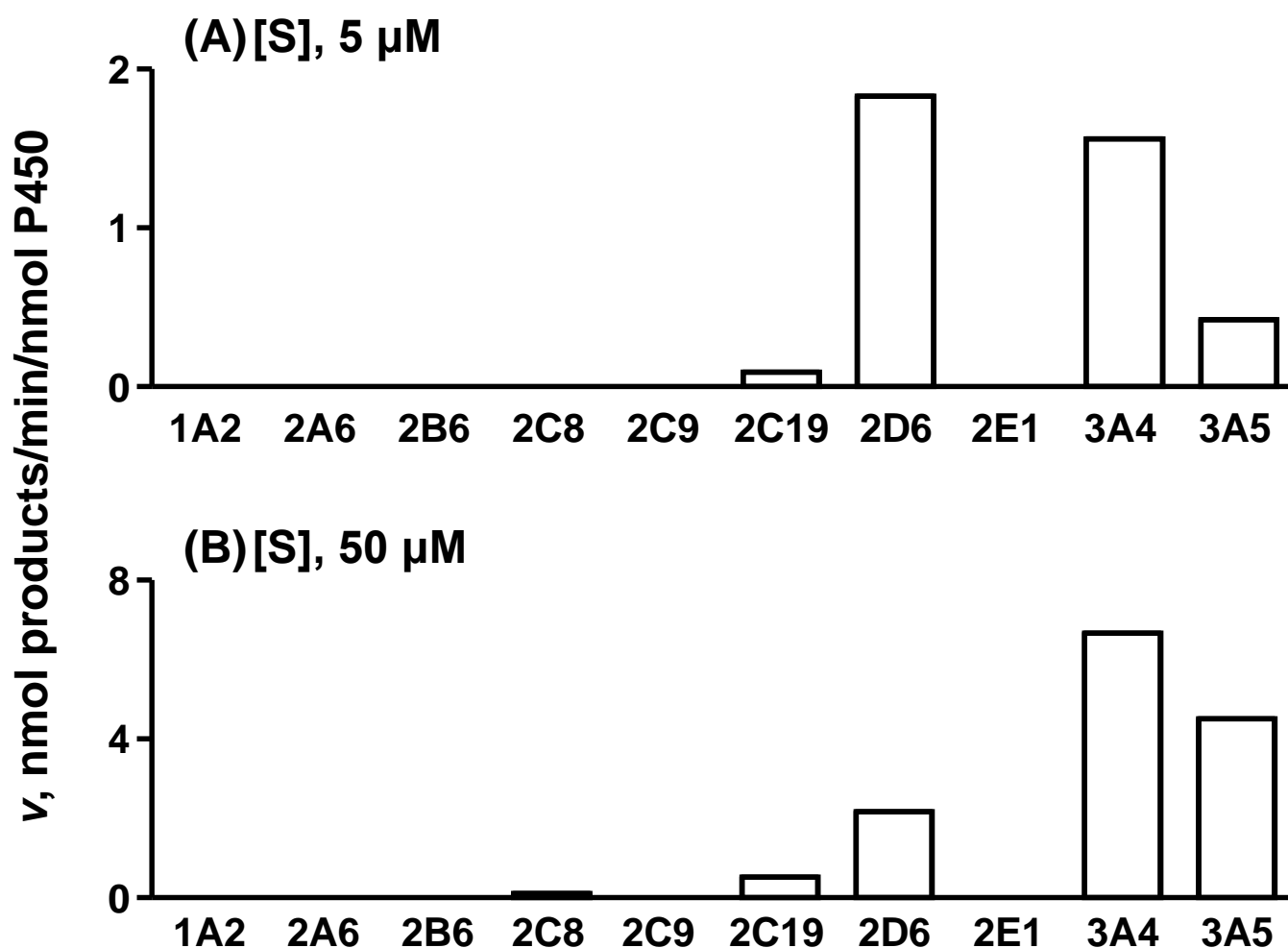


Fig. III-4. Risperidone 9-hydroxylation activities at substrate concentrations of 5 (A) and 50 μM (B) catalyzed ten recombinant P450 enzymes.

III-3-4 リスペリドン酸化酵素活性の速度論的解析

組換え CYP2D6.1、CYP2D6.10 (Fig. III-5A)、CYP3A4 および CYP3A5 (Fig. III-5B) ならびにプールドおよび個別ヒト肝マイクロゾーム (Fig. III-5C) を用いて、リスペリドン 9-水酸化酵素活性を測定し、速度論的解析を行った。キネティックパラメータを Table III-2 に示す。組換え CYP2D6.1 は最も低い K_m 値 $1.1 \mu\text{M}$ および最も高い V_{\max}/K_m 値 $2.1 (\mu\text{M min})^{-1}$ であった (Table III-2)。一方、変異型である CYP2D6.10 の V_{\max}/K_m 値は CYP2D6.1 の 100 分の 1 以下であった (Table III-2)。CYP3A4 の K_m 値はプールドヒト肝マイクロゾームでの K_m 値と近似であった (Table III-2)。CYP3A5 の V_{\max} 値は CYP3A4 と同等であったが、 K_m 値は $200 \mu\text{M}$ と高く、 V_{\max}/K_m 値は CYP3A4 の 30% 程度であった。個別ヒト肝マイクロゾームでのキネティックパラメータは CYP2D6 遺伝子多型の影響を受けなかった (Table III-2)。

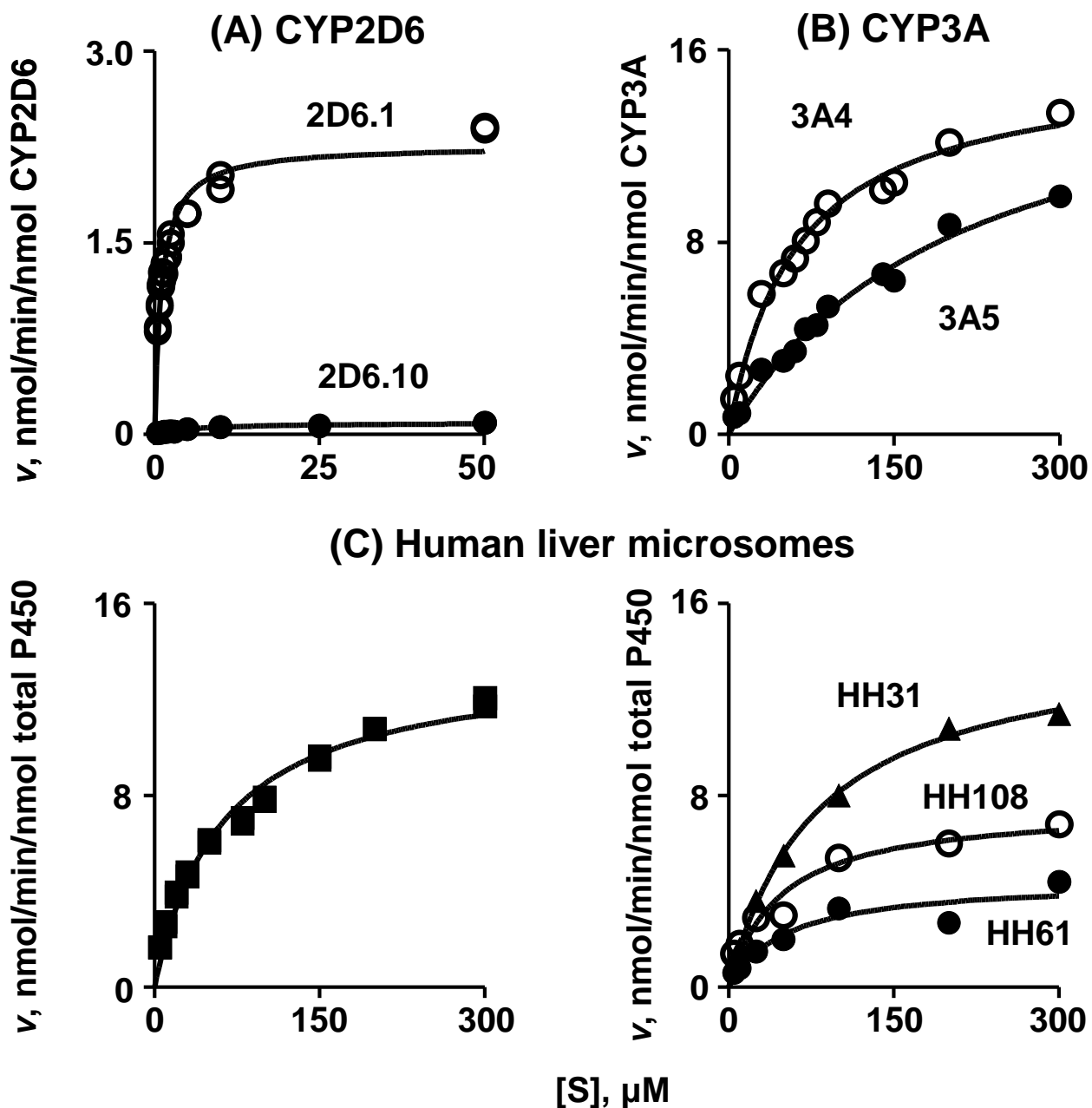


Fig. III-5. Kinetic analyses of risperidone 9-hydroxylation activities of recombinant human P450 enzymes (A, B) and pooled and individual human liver microsomes genotyped for *CYP2D6* (C).

In panel A, CYP2D6.1 (\circ) and CYP2D6.10 (\bullet) were used. In panel B, CYP3A4 (\circ) and CYP3A5 (\bullet) were investigated. In panel C, risperidone was incubated with pooled (\blacksquare) human liver microsomes and the following individual human liver microsomes: HH108 (\circ , *CYP2D6**1/*1), HH61 (\bullet , *CYP2D6**4/*4), and HH31 (\blacktriangle , *CYP2D6**4/*4) with low and high CYP3A-mediated activities.

Table III-2. Kinetic parameters of risperidone 9-hydroxylation catalyzed by recombinant P450s and pooled (HLM) and individual human liver microsomes.

| Enzymes | <i>CYP2D6</i> genotype | Risperidone 9-hydroxylation | | |
|-----------|---------------------------|-----------------------------|---|--|
| | | K_m (μM) | V_{max} (min^{-1}) | V_{max}/K_m ($\mu\text{M min}^{-1}$) ⁻¹ |
| CYP2D6.1 | - | 1.1 ± 0.1 | 2.3 ± 0.1 | 2.1 |
| CYP2D6.10 | - | 6.7 ± 0.8 | 0.10 ± 0.01 | 0.015 |
| CYP3A4 | - | 61 ± 7 | 15 ± 1 | 0.25 |
| CYP3A5 | - | 200 ± 30 | 15 ± 1 | 0.075 |
| HLM | Pooled | 62 ± 7 | 1.4 ± 0.1 | 0.022 |
| HH108 | *1/*1 | 46 ± 14 | 0.75 ± 0.07 | 0.016 |
| HH61 | *4/*4 | 52 ± 14 | 0.48 ± 0.07 | 0.0092 |
| HH31 | *4/*4 | 80 ± 6 | 1.5 ± 0.1 | 0.018 |

Kinetic parameters were calculated from a fitted curve by non-linear regression (mean ± SE).

III-3-5 ヒト肝ミクロゾームによるリスペリドン代謝消失および酸化酵素活性に対する遺伝子多型の影響

個別ヒト肝ミクロゾームを用いてリスペリドン代謝酵素活性測定を行った。基質終濃度 5 μM のとき、CYP2D6 IM (n=12) および PM (n=2) 群は EM (n=26) 群に比べてリスペリドン 9-水酸化酵素活性が有意に低値を示した (Fig. III-6A)。しかしながら基質終濃度を 50 μM としたとき、2 群間の有意差は消失した (Fig. III-6C)。基質終濃度がどちらの場合でも、リスペリドン 9-水酸化酵素活性は CYP3A5 遺伝子多型の影響を受けなかった (Fig. III-6B, 6D)。

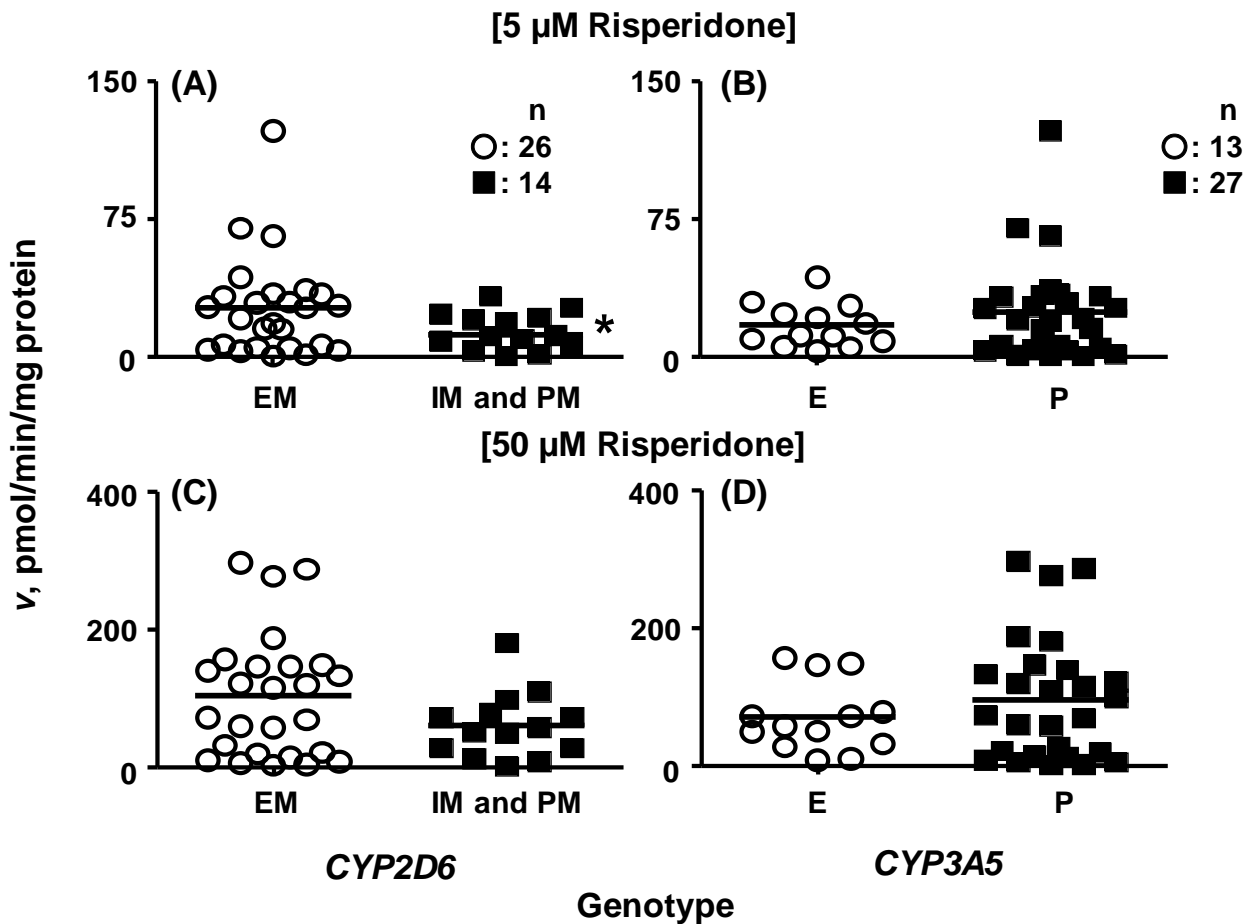


Fig. III-6. Risperidone 9-hydroxylation activities catalyzed by human liver microsomes from 40 individuals genotyped for CYP2D6 and CYP3A5.

The horizontal lines indicate the mean values. E, extensive expressors; P, poor expressors. * $p < 0.05$, significantly different by unpaired t -test with Welch correction.

Ⅲ-3-6 リスペリドン投与患者血漿中薬物濃度に対する内的・外的因子の影響

リスペリドン投与患者の血漿中薬物濃度および *P450* 遺伝子多型判定を行った。個々の患者情報を Table III-3 に示す。リスペリドンおよびパリペリドンの C/D 比-時間プロットを Fig. III-7 に示した。リスペリドンは 1 日 1 回投与患者 12 名中 8 名で、1 日 2 回投与患者 15 名中 10 名で検出され、その他の検体では検出限界以下 (<1 ng/mL) であった (Figs. III-7A, 7B)。パリペリドンは全ての患者で検出が可能であった (Figs. III-7C, 7D)。1 日 1 回および 2 回投与群間でリスペリドンおよびパリペリドンの C/D 比に差は認められなかった (Fig. III-7)。

Table III-3. CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A5 phenotypes and plasma concentrations of risperidone and paliperidone determined for 27 patients.

| ID | CYP1A2 | CYP2D6 | CYP3A5 | BMI | Total dose, (mg)* | D (mg) | Time after administration (hr) | Risperidone (ng/mL) | Paliperidone (ng/mL) | Smoking, S | CYP2D6 inhibitor |
|----|--------------------------|-----------------|--------------|------|-------------------|--------|--------------------------------|---------------------|----------------------|------------|--------------------------------|
| 1 | *1C/*1F or *1A/*1L | *10/*10 (IM) | *3/*3 (P) | 27.7 | 1 | 1 | 17 | <1 | 4 | - | - |
| 2 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*2 (EM) | *3/*3 (P) | 20.6 | 2 | 2 | 11 | 4 | 8 | S | - |
| 3 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*2 (EM) | *1/*3 (E) | 23.2 | 2 | 2 | 2.5 | 3 | 15 | - | - |
| 4 | *1A/*1A | *1/*10 (EM) | *3/*3 (P) | 18.0 | 2 | 2 | 13.5 | <1 | 4 | - | - |
| 5 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*10 (EM) | *1/*3 (E) | 27.4 | 2.5 | 2.5 | 11 | 20 | 17 | - | Levomepromazine, |
| 6 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*10 (EM) | *3/*3 (P) | 29.6 | 3 | 3 | 13 | 2 | 5 | - | - |
| 7 | *1L/*1L | *1/*10 (EM) | *1/*1 (E) | 20.4 | 3 | 3 | 12.5 | 1 | 8 | S | - |
| 8 | *1C/*1F or *1A/*1L | *2/*10 (EM) | *1/*1 (E) | 26.2 | 6 | 6 | 13 | <1 | 6 | - | Chlorpromazine, haloperidol |
| 9 | *1A/*1F | *2/*10 (EM) | *3/*3 (P) | 22.7 | 7 | 7 | 11.5 | 2 | 15 | S | - |
| 10 | *1A/*1A | *2/*10 (EM) | *1/*3 (E) | 29.6 | 8 | 8 | 13 | 6 | 12 | - | - |
| 11 | *1F/*1L | *1/*10 (EM) | *1/*1 (E) | 30.3 | 9 | 9 | 1 | 11 | 14 | - | - |

Table III-3. (Continued). *CYP1A2*, *CYP2D6*, and *CYP3A5* phenotypes and plasma concentrations of risperidone and paliperidone determined for 27 patients.

| ID | <i>CYP1A2</i> | <i>CYP2D6</i> | <i>CYP3A5</i> | BMI | Total dose, (mg)* | D (mg) | Time after administration (hr) | Risperidone (ng/mL) | Paliperidone (ng/mL) | Smoking, S | <i>CYP2D6</i> inhibitor |
|----|-----------------------|---------------|---------------|------|-------------------|--------|--------------------------------|---------------------|----------------------|------------|---|
| 12 | *1A/*1F | *10/*10 (IM) | *3/*3 (P) | 25.9 | 12 | 12 | 16.5 | <1 | 13 | S | Chlorpromazine |
| 13 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*1 (EM) | *3/*3 (P) | 21.3 | 2.5* | 0.5 | 3.5 | <1 | 4 | - | - |
| 14 | *1A/*1F | *1/*2 (EM) | *3/*3 (P) | 16.9 | 2.5* | 0.5 | 3 | 1 | 3 | - | - |
| 15 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*2 (EM) | *1/*3 (E) | 22.8 | 5* | 1 | 3 | <1 | 10 | - | Chlorpromazine, levomepromazine, promethazine |
| 16 | *1F/*1F | *1/*10 (EM) | *3/*3 (P) | 23.9 | 3* | 1 | 2.5 | 2 | 6 | - | Promethazine |
| 17 | *1F/*1F | *1/*1 (EM) | *1/*3 (E) | 18.0 | 2* | 1 | 12.5 | 3 | 3 | - | - |
| 18 | *1A/*1A | *1/*1 (EM) | *1/*3 (E) | 21.4 | 4* | 2 | 1.5 | 4 | 8 | - | - |
| 19 | *1F/*1F | *2/*10 (EM) | *1/*3 (E) | 23.9 | 3* | 2 | 2.5 | 3 | 13 | - | - |
| 20 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*10 (EM) | *1/*3 (E) | 26.5 | 4* | 2 | 4 | 2 | 6 | - | Levomepromazine |
| 21 | *1A/*1F | *1/*5 (IM) | *3/*3 (P) | 24.7 | 4* | 2 | 15.5 | 7 | 23 | S | Chlorpromazine |
| 22 | *1C/*1F or *1A/*1L | *2/*10 (EM) | *1/*3 (E) | 28.4 | 3* | 2 | 16.5 | 4 | 18 | S | Promethazine |
| 23 | *1F/*1F | *10/*10 (IM) | *1/*1 (E) | 21.4 | 7* | 3 | 2 | <1 | 25 | - | - |
| 24 | *1A/*1F | *1/*1 (EM) | *3/*3 (P) | 25.0 | 6* | 3 | 10.5 | <1 | 7 | - | Levomepromazine, metoclopramide, promethazine |

Table III-3. (Continued). *CYP1A2*, *CYP2D6*, and *CYP3A5* phenotypes and plasma concentrations of risperidone and paliperidone determined for 27 patients.

| ID | <i>CYP1A2</i> | <i>CYP2D6</i> | <i>CYP3A5</i> | BMI | Total dose, (mg)* | D (mg) | Time after administration (hr) | Risperidone (ng/mL) | Paliperidone (ng/mL) | Smoking, S | CYP2D6 inhibitor |
|----|-----------------------|---------------|---------------|------|-------------------|--------|--------------------------------|---------------------|----------------------|------------|------------------|
| 25 | *1L/*1L | *1/*2 (EM) | *3/*3 (P) | 24.8 | 4* | 3 | 16 | 1 | 20 | - | Chlorpromazine |
| 26 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*10 (EM) | *3/*3 (P) | 23.6 | 5* | 4 | 14.5 | 3 | 3 | S | Haloperidol |
| 27 | *1C/*1F or *1A/*1L | *1/*1 (EM) | *3/*3 (P) | 32.1 | 9* | 6 | 13.5 | <1 | 4 | - | Levomepromazine |

E, extensive expressor; P, poor expressor; Risperidone, plasma concentration of risperidone; Paliperidone, plasma concentration of paliperidone; CYP2D6 inhibitor, coadministered CYP2D6 inhibitor.

D (mg) values were used for the C/D ratio calculations in cases of twice a day administrations with total doses*.

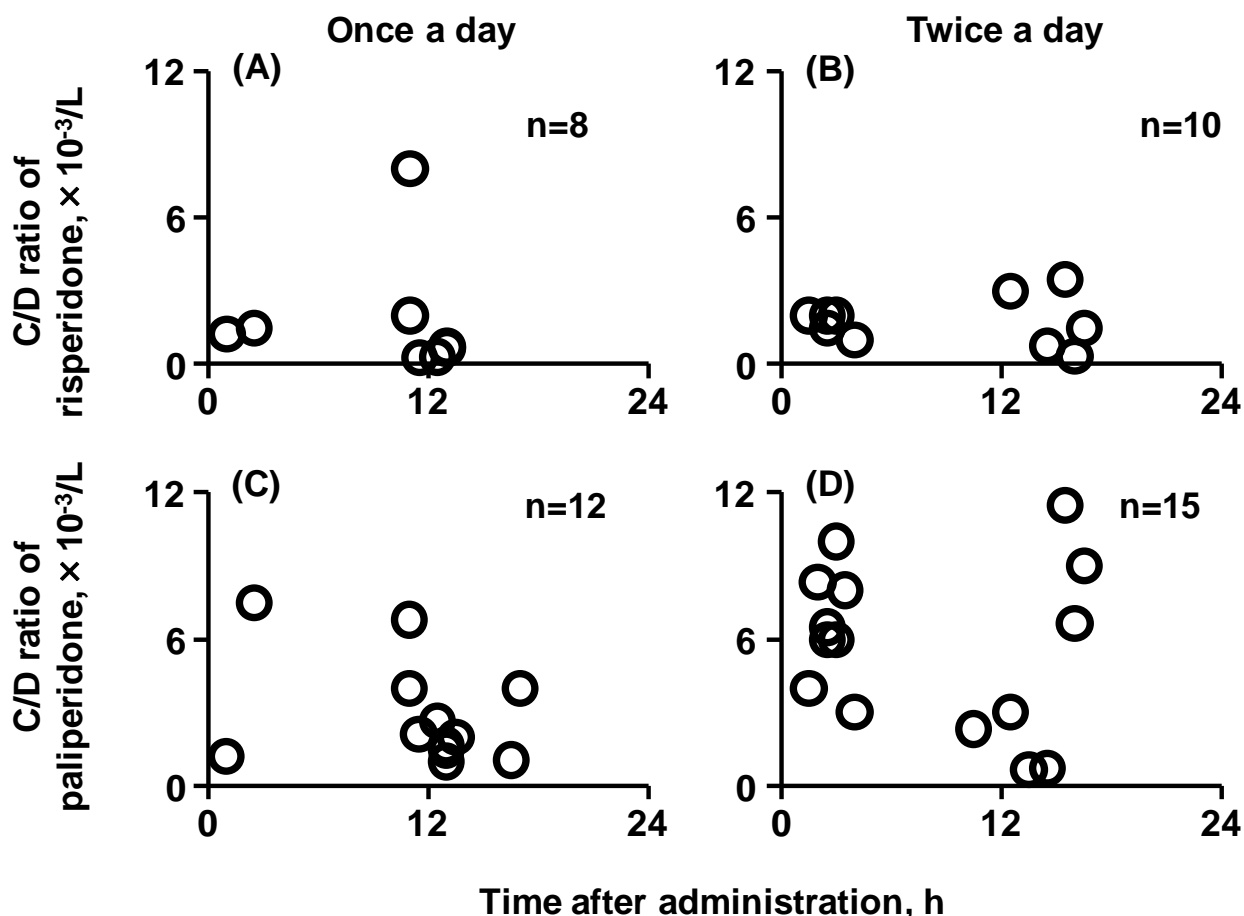


Fig. III-7. Plasma concentration/risperidone dose (C/D) ratios of risperidone and paliperidone in 27 patients.

Patients took risperidone at doses in the range of 1–12 mg/day (mean, 4.6 mg/day) once or twice a day.

リスペリドンの C/D 比を因子ごとに群分けして検討した。本薬物では内的因子として、*CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型ならびに性別を、外的因子として肥満の指標とされる BMI 値、*CYP2D6* 併用薬数および喫煙の有無を検討した。本集団での年齢層が壮年期後半から中年期に偏っていることから、年齢を区分しての検討は行わなかった。結果を Fig. III-8 に示す。本条件下で *CYP2D6* 阻害薬併用数 (Fig. III-8A)、BMI 値 (Fig. III-8B)、*CYP2D6* (Fig. III-8C) および *CYP3A5* (Fig. III-8D) 遺伝子型に対してリスペリドンの C/D 比に影響は認められなかった。

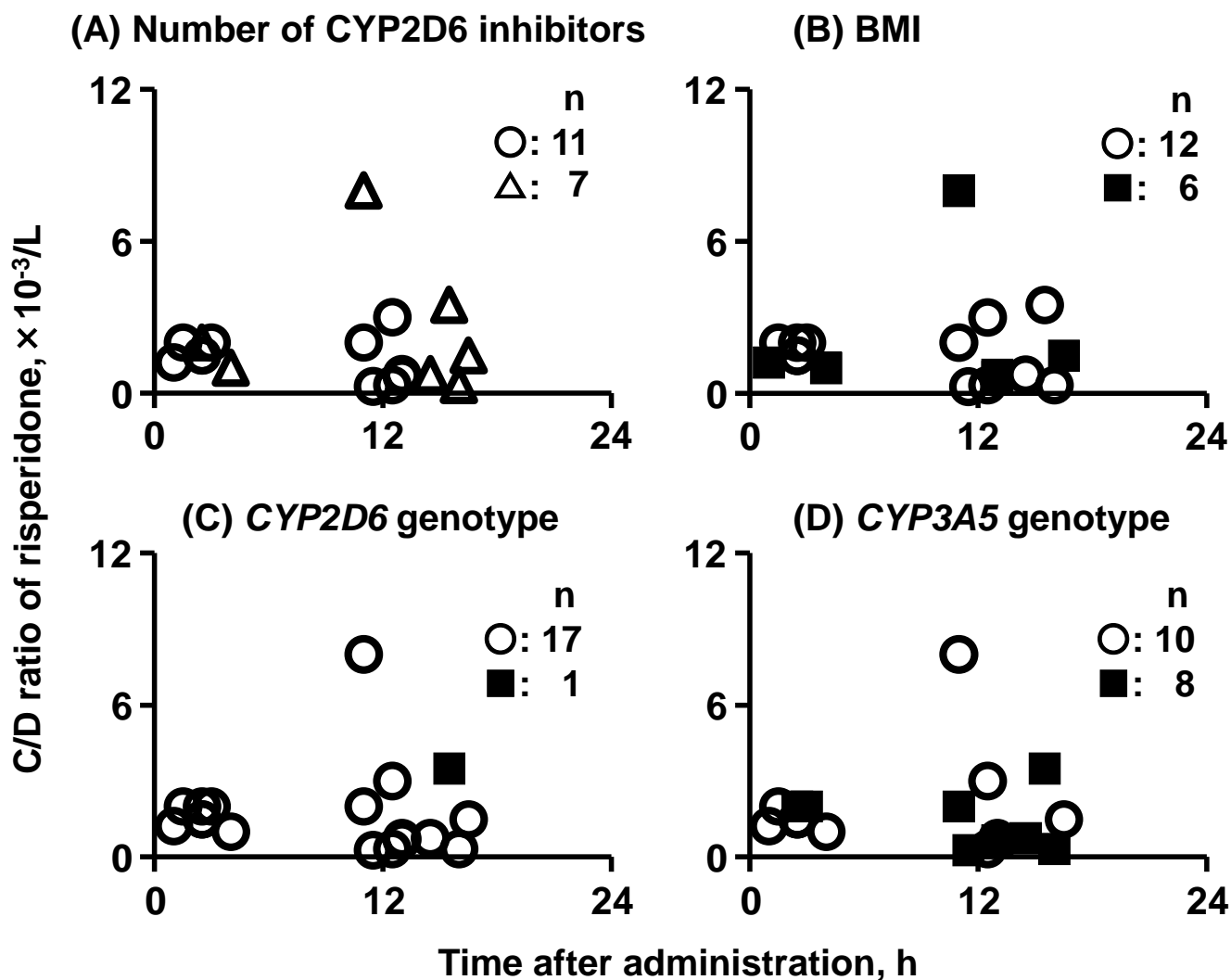


Fig. III-8. Association between internal or external factors and C/D ratios of risperidone in 18 patients.

In panel A, each plot indicates the number of CYP2D6 inhibitors (\circ , 0; and \triangle , 1). In panel B, each plot indicates BMI (\circ , BMI < 25; and \blacksquare , BMI \geq 25). In panel C, each plot indicates the *CYP2D6* genotype (\circ , EM; and \blacksquare , IM). In panel D, each plot indicates the *CYP3A5* genotype (\circ , extensive expressors; and \blacksquare , poor expressors).

パリペリドンの C/D 比を因子ごとに群分けした結果を Fig. III-9 に示す。本条件下で CYP2D6 阻害薬併用数 (Fig. III-8A)、BMI 値 (Fig. III-8B)、*CYP2D6*

(Fig. III-8C) および *CYP3A5* (Fig. III-8D) 遺伝子型によりパリペリドンの C/D 比は影響を受けなかった。

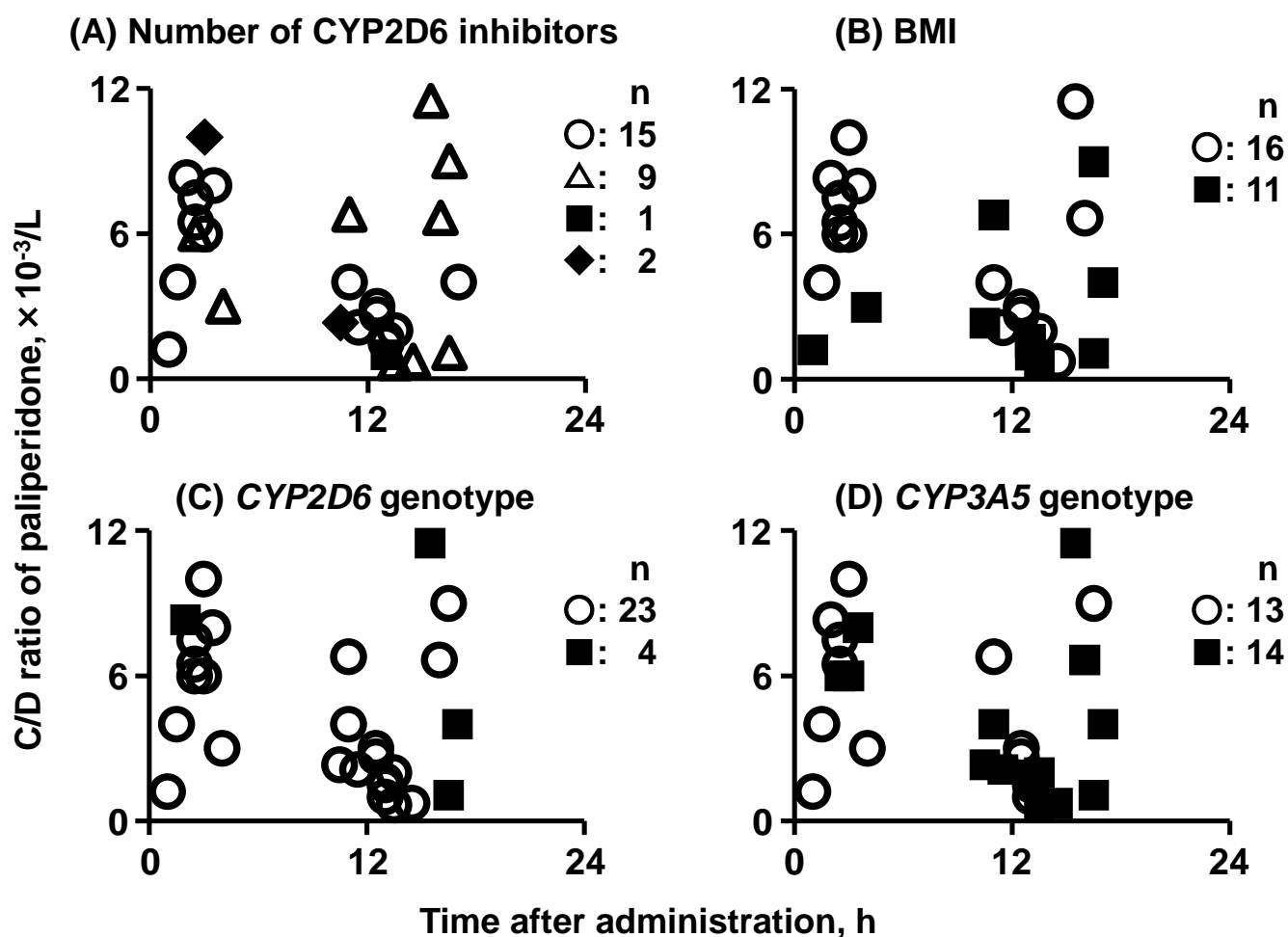


Fig. III-9. Association between internal or external factors and C/D ratios of paliperidone in 27 patients.

In panel A, each plot indicates the number of CYP2D6 inhibitors (\circ , 0; \triangle , 1; \blacksquare , 2; and \blacklozenge , 3). In panel B, each plot indicates BMI (\circ , BMI < 25; and \blacksquare , BMI \geq 25). In panel C, each plot indicates the *CYP2D6* genotype (\circ , EM; and \blacksquare , IM). In panel D, each plot indicates the *CYP3A5* genotype (\circ , extensive expressors; and \blacksquare , poor expressors).

さらに *CYP1A2**1A/*1C および *CYP1A2**1C/*1C である喫煙者は本集団では

見いだされなかったが (Table III-3)、リスペリドンおよびパリペリドンの C/D 比は喫煙の影響を受けなかった (Fig. III-10)。性別によりリスペリドンおよびパリペリドンの C/D 比に違いは認められなかった (data not shown)。

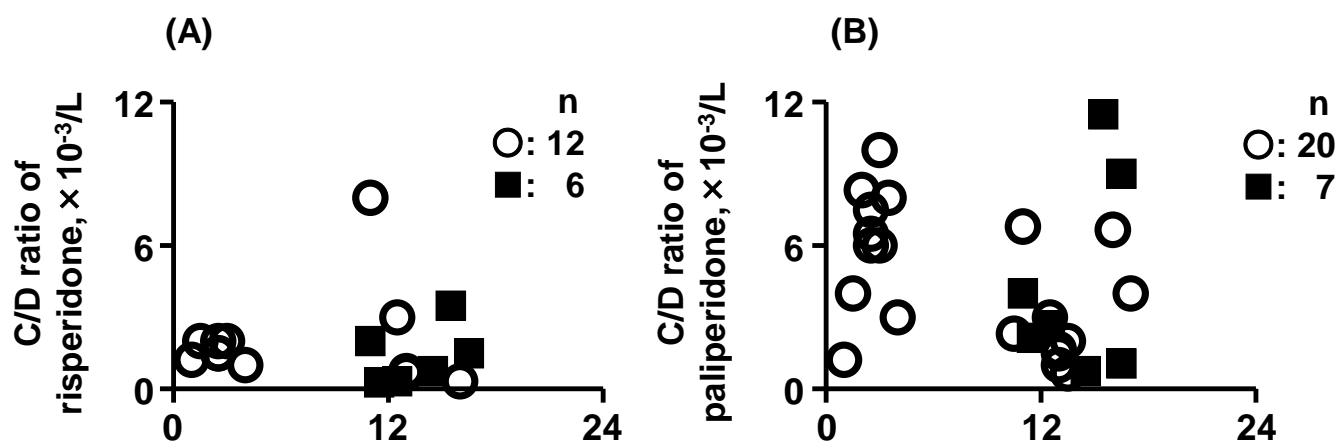


Fig. III-10. Association between smoking behavior and C/D ratios of risperidone and paliperidone in 27 patients.

(A), C/D ratio of risperidone; and (B), C/D ratio of paliperidone. ○, nonsmokers; and ■, smokers.

第 4 節 考察

古典的な三環系抗うつ薬アミトリプチリンなどの精神疾患治療薬はその代謝消失が *P450* 遺伝子多型に依存することが報告されている⁸²⁾。しかしながらリスペリドンに関しては相反する報告が存在している。リスペリドンの主要代謝物であるパリペリドンの血漿中濃度は *P450* 遺伝子多型に影響しているとされるものとされないものがそれぞれ報告されている。さらにリスペリドンの血漿中濃度が仮に *P450* 遺伝子多型に影響されていた場合、その主代謝物であるパリペリドンも同様に多型の影響をうけるはずである。Yasui-Furukori らは *CYP2D6* が (+)-9-水酸化体を生成し、(-)体は生成せず、*CYP3A* はどちらのエナンチオマーも生成することを報告している²⁰⁾。しかし

ながら日本人において定常状態におけるこれら 2 つのエナンチオマーは *CYP2D6*5* および *CYP2D6*10* による影響を受けないと報告されている⁷⁶⁾。これらのことからリスペリドンおよびパリペリドンの消失は複雑であり、十分明らかとなっていない。

本章では *CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型の影響を含めてリスペリドンの代謝消失に対する *CYP2D6* および *CYP3A5* の寄与について、*in vitro* および *in vivo* の両面から検討した。個別ヒト肝ミクロゾームを用いて測定したデキストロメトルファン *O*-脱メチル化酵素活性およびミダゾラム 1'-水酸化酵素活性との相関関係 (Figs. III-3B, 3C, 3E, 3F) からリスペリドン代謝に *CYP2D6* および *CYP3A* が関与していることが確認できた。さらにキニジンによる阻害実験 (Fig. III-2) と組換え *CYP2D6* によるリスペリドン 9-水酸化反応に対する低い K_m 値と高い V_{max}/K_m 値 (Table III-2) から低濃度におけるリスペリドン代謝は主に *CYP2D6* が担っていることが示唆された。一方、ケトコナゾールによる阻害実験 (Fig. III-2) および組換え *CYP3A* によるリスペリドン 9-水酸化反応の高い K_m 値および V_{max} 値 (Table III-2) から、高濃度においては *CYP3A4/5* の寄与が大きくなることが示唆された。その他の P450 の寄与は小さいと考えられた (Fig. III-4)。

CYP2D6.10 の酵素活性値は低く、 V_{max}/K_m 値は *CYP2D6.1* の 100 分の 1 以下であり (Fig. III-5, Table III-2)、リスペリドン終濃度が低いときの個別ヒト肝ミクロゾームでの IM 群のリスペリドン 9-水酸化酵素活性が低かったこと (Fig. III-6A) から、*CYP2D6* 遺伝子多型はリスペリドン代謝に影響を与え得ることが示唆された。しかしながら *CYP2D6* 遺伝子型間で認められた個別ヒト肝ミクロゾームによる代謝酵素活性の有意差はリスペリドンが高濃度では消失した (Fig. III-6C)。さらに個別ヒト肝ミクロゾームの速度論的解析の結果、各検体で K_m 値に大きな変化はなく、 V_{max} 値は *CYP2D6* 遺伝子型よりも *CYP3A* 酵素活性に依存していることが考えられた (Table III-2)。これは高濃度領域においては、個別ヒト肝ミクロゾームの低い *CYP2D6* 酵素活性を *CYP3A* 酵素活性の高さが補完しているものと考えられた。

組換え CYP3A4 の K_m 値はプールドヒト肝ミクロゾームの K_m 値と同等の値であったが、CYP3A5 ではその 3 倍高い値であった (Table III-2)。さらに基質終濃度が低濃度であっても高濃度であっても、CYP3A5 遺伝子多型間で個別ヒト肝ミクロゾームによるリスペリドン 9-水酸化酵素活性の値は差が認められなかった (Figs. III-6B,6D)。これら結果よりリスペリドン 9-水酸化反応に対する CYP3A5 の寄与は小さく、CYP3A5 遺伝子多型はリスペリドンの代謝消失に影響を与える因子とはならないと考えられた。

さらにリスペリドン投与患者での血漿中リスペリドンおよびパリペリドン濃度に対する CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型の影響は認められなかった (Figs. III-8C, 8D, 9C, 9D)。このことは *in vitro* による結果と一致するものであった。

外的因子として CYP2D6 阻害薬併用数 (Figs. III-8A, 9A) や BMI (Figs. III-8B, 9B)、喫煙 (Fig. III-10) などとも検討を行ったが、本条件下ではいずれも血漿中リスペリドンおよびパリペリドン濃度に影響を与えなかった。CYP2D6 阻害薬併用数が増えると個々の薬物の阻害能に依るものの、CYP2D6 によるリスペリドン代謝酵素活性が低下するという報告があり⁸³⁾、本研究では異なる結果がでているが、併用薬や多型のアリル頻度 (特に PM 群がいなかった) といった患者背景の違いが影響していることが原因の一つとして考えられる。

以上、本章では CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型の内的因子と、喫煙や併用薬といった外的因子がリスペリドン代謝消失に影響を与え得るか検討を行った。CYP3A5 はリスペリドン代謝に対する寄与が小さく、さらに CYP2D6 の低酵素活性は CYP3A4 が補完し得ることが示唆され、CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型はリスペリドン代謝消失に影響しないと考えられた。CYP2D6 阻害薬数といった外的因子を含めても、リスペリドン代謝消失に影響を与える単独因子は認められなかった。よって前章でのオランザピン同様、リスペリドンは日本人患者において遺伝子多型や併用薬について特別な配慮の必要がなく、比較的安全に使用できる薬剤であることが考えられた。

第IV章 ミルタザピン体内動態の個人差

第1節 緒言

ミルタザピンは2009年に本邦で承認されたノルアドレナリン・セロトニン作動性抗うつ薬であり、うつ病あるいはうつ状態の患者に対して使用されている⁸⁴⁾。ミルタザピンは第一世代の抗うつ薬に比べて比較的安全な薬とされているが、依然として特徴的な傾眠といった副作用の頻度は高い⁸⁴⁾。いくつかの症例報告を除いて^{85, 86)}、ミルタザピンは2剤間での相互作用を起こしにくいことが知られている⁸⁷⁻⁸⁹⁾が、これら報告では3剤以上の複数薬剤投与の際の安全性を十分検討できていない。

ミルタザピンはヒトではCYP1A2、CYP2D6 および CYP3A4 によって代謝されて8-水酸化体、N-脱メチル化体およびN-酸化体を生成することが報告されている (Fig. IV-1)²¹⁾。したがってこれら酵素活性の変動はミルタザピンの体内動態に影響を与え得る。CYP2D6 の UM 患者および喫煙による酵素誘導がされた患者ではミルタザピンのクリアランスが大きいことが報告されている^{90, 91)}。しかしながらアジア人特有のCYP2D6 遺伝子変異による影響は十分に検討されていない。さらにCYP3A5 のミルタザピン代謝への寄与は詳細に検討されておらず、CYP3A5 遺伝子多型によるミルタザピンの体内動態への影響はわかっていない。

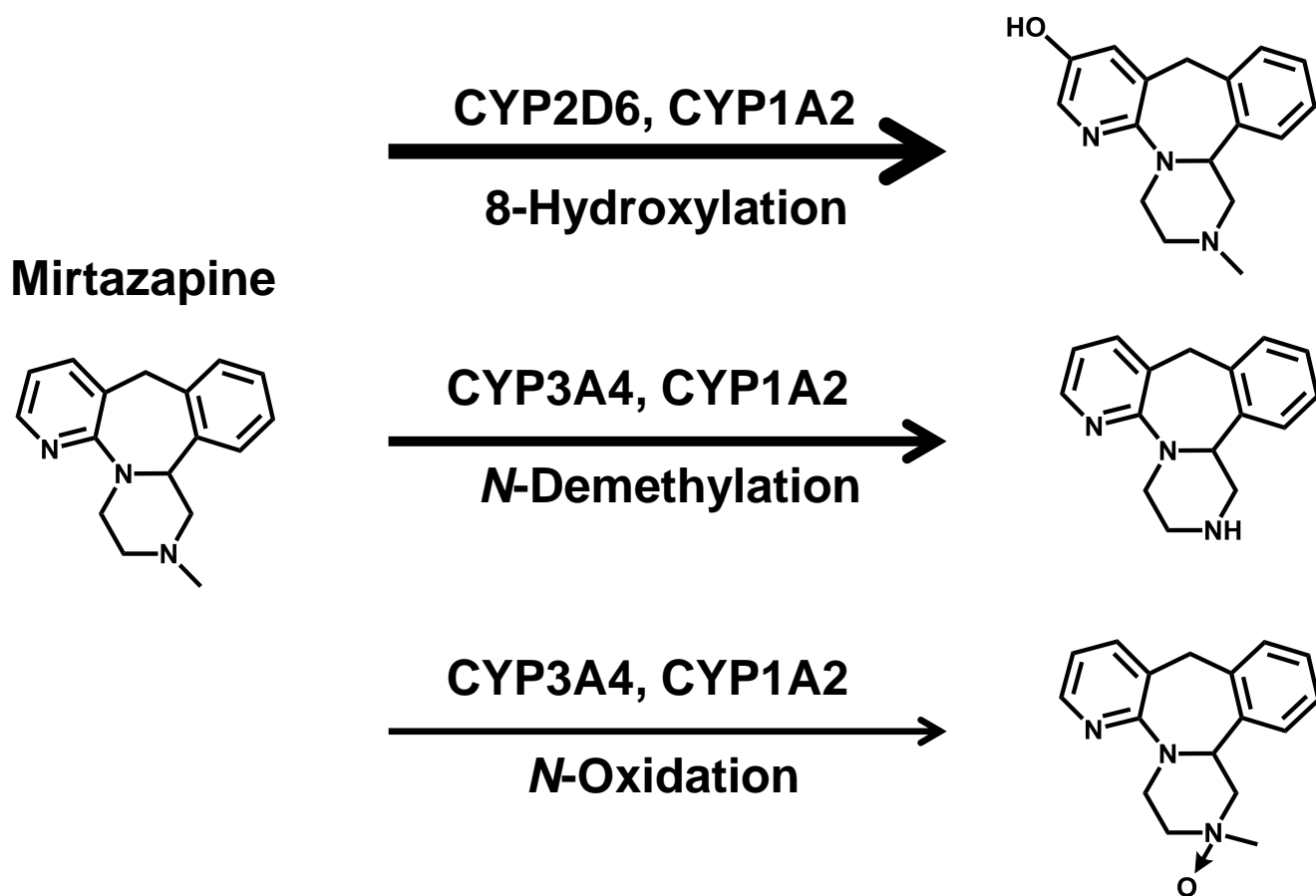


Fig. IV-1. Metabolic pathways of mirtazapine mediated by P450 enzymes.

本章ではミルタザピンの代謝消失に影響を与えている因子についてヒト肝ミクロゾームおよび組換え P450 ならびにミルタザピン投与患者血液試料を用いて検討した。ミルタザピン代謝消失に *CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型ならびに 3 種以上の併用薬が影響する可能性について明らかにしたので以下に詳述する。

第 2 節 実験材料および方法

IV-2-1 実験材料、試薬および使用機器

第 I 章、第 II 章および第 III 章で用いた実験材料、試薬および機器は記載を

省略した。

個別ヒト肝ミクロゾーム 14 検体は Corning より購入した。本肝ミクロゾームは *CYP2D6* 遺伝子多型および各種 P450 指標酵素活性の情報が添付されている。

ミルタザピンおよび抗うつ薬デュロキセチンは東京化成工業より購入した。

IV-2-2 研究対象および検体

対象は 2013 年 10 月から 2014 年 10 月、千寿会三愛病院および鶴が丘ガーデンホスピタルを受診した 26—96 歳の男女 14 名の血液をヘパリンおよび EDTA 採血管にそれぞれ約 5 mL ずつ供与いただいた。千寿会三愛病院からのヘパリン採血管で採取した血液試料は直ちに遠心分離後、上層の血漿をとり -80°C で保存した後使用した。鶴が丘ガーデンホスピタルからのヘパリン採血管で採取した血液試料は 1 晩冷蔵保存した後、2,500 × g で遠心分離後得られた上層の血漿を取り使用した。ヒトゲノム DNA は EDTA 管で採取した患者血液から I-2-1 の項に準じて調製を行った。本研究は千寿会三愛病院において承認され、それぞれの被験者またはその家族に本研究の趣旨を十分に説明し、書面にて承諾を得て行われた。

IV-2-3 ミルタザピン代謝酵素活性の測定

ヒト肝ミクロゾームおよび組換え P450 によるミルタザピン 8-水酸化、*N*-脱メチル化および *N*-酸化酵素活性ならびに基質消失速度は HPLC により測定して算出した。反応混液は 0.40 mg protein/mL ヒト肝ミクロゾームあるいは 10 pmol/mL 組み換え P450、NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺、2.5 mM G-6-P および 0.25 unit/mL G-6-P DHase)、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) ならびに 0.5—2000 μM ミルタザピンを含み、全量を 250 μL とした。阻害実験では 5 μM 各 P450 阻害剤 (フェナセチン、キニジンおよびケトコナゾール)、基質と同量のリスペリドン、デュロキセチンまたはリスペリドンとデュロキセチン双方を添加した。37°C の水浴上で 15—60 分間振とうして反応させ、氷冷した

アセトニトリル 250 μ L を添加して反応を停止させた。攪拌後 10,000 \times g で遠心分離した後、上清を HPLC に注入した。カラムは Kinetex XB-C18 (4.6 mm \times 100 mm、2.6 μ m) を、ガードカラムは SecurityGuard Ultra C18 (4.6 mm) を使用し、カラムオーブンは 40°C とした。移動相には 30 mM リン酸緩衝液 (pH3.0):アセトニトリル (80:20、v/v) を使用し、流速は 1.0 mL/min とした。測定は励起波長 295 nm、蛍光波長 365 nm とした。代謝物の定量は、親化合物で検出された HPLC ピーク面積と同量として算出した。反応前後のミルタザピン量の差を代謝消失量とした。

IV-2-4 患者血漿中ミルタザピン濃度の測定

患者血漿より II-2-4 の項と同様に前処理を行った。HPLC の条件は IV-2-3 の項に準じて行った。

IV-2-5 P450 遺伝子型の判定

CYP1A2、CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型の判定は II-2-5、II-2-6 および I-2-2 の項に準じて行った。

第 3 節 結果

IV-3-1 ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン酸化酵素活性と P450 指標酵素活性との間の相関関係

市販ヒト個別肝ミクロゾームを用いて、ミルタザピン 8-水酸化酵素活性、N-脱メチル化酵素活性および代謝消失と、各 P450 指標基質代謝酵素活性との間の相関関係を調べた。添付資料記載の値を用い、指標酵素活性は CYP1A2 ではフェナセチン O-脱エチル化酵素活性、CYP2D6 ではブフラロール 1'-水酸化酵素活性、CYP3A4/5 ではテストステロン 6 β -水酸化酵素活性とした。有意な正の相関関係が得られたのはミルタザピン 8-水酸化酵素活性とフェナセチ

ン *O*-脱エチル化酵素活性 ($r=0.53, p<0.05$) およびブフラロール 1'-水酸化酵素活性 ($r=0.91, p<0.0001$)、ミルタザピン *N*-脱メチル化酵素活性とテストステロン 6 β 位水酸化酵素活性 ($r=0.88, p<0.0001$) ならびにミルタザピン代謝消失とブフラロール 1'-水酸化酵素活性 ($r=0.59, p<0.05$) およびテストステロン 6 β -水酸化酵素活性 ($r=0.79, p<0.001$) であった (Fig. IV-2)。基質終濃度が 5 μ M (臨床投与量投与時のヒト肝臓中の最大濃度程度^{92,93}) ではヒト肝ミクロゾームにおいてミルタザピン *N*-酸化酵素活性は検出限界以下であった。他の組み合わせではミルタザピン代謝酵素活性と指標基質酵素活性との有意な相関関係は得られなかった (data not shown)。

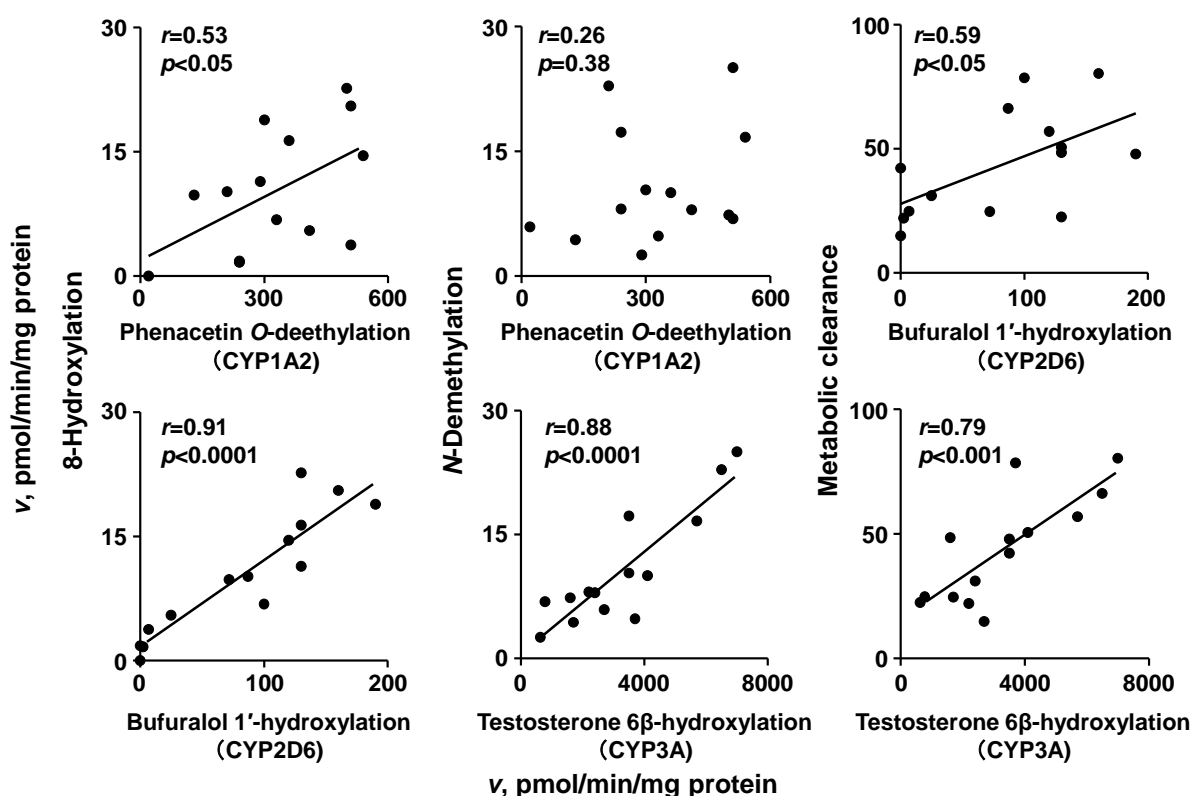


Fig. IV-2. Correlation of 8-hydroxylation activities, *N*-demethylation activities, and metabolic clearance of mirtazapine with three probe oxidation activities in human liver microsomes from 14 individuals.

Mirtazapine (5 μ M) was incubated with human liver microsomes. Metabolic clearance was calculated by differences of initial and measured mirtazapine concentrations based on mg microsomal protein per incubation time.

IV-3-2 ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン酸化酵素活性および代謝消失に対する P450 分子種阻害剤の影響

CYP1A2 阻害剤である α -ナフトフラボン、CYP2D6 阻害剤であるキニジンおよび CYP3A4/5 の阻害剤であるケトコナゾールを用いて、ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン代謝酵素活性に対する影響を調べた。ミルタザピン 8-水酸化酵素活性および *N*-脱メチル化酵素活性はそれぞれキニジンおよびケトコナゾールによって阻害された (Fig. IV-3)。ミルタザピン代謝消失はキニジンとケトコナゾールの組み合わせで著しく阻害された (Fig. IV-3)。ミルタザピン代謝酵素活性および代謝消失に対する α -ナフトフラボンの影響はほとんど認められなかった (Fig. IV-3)。

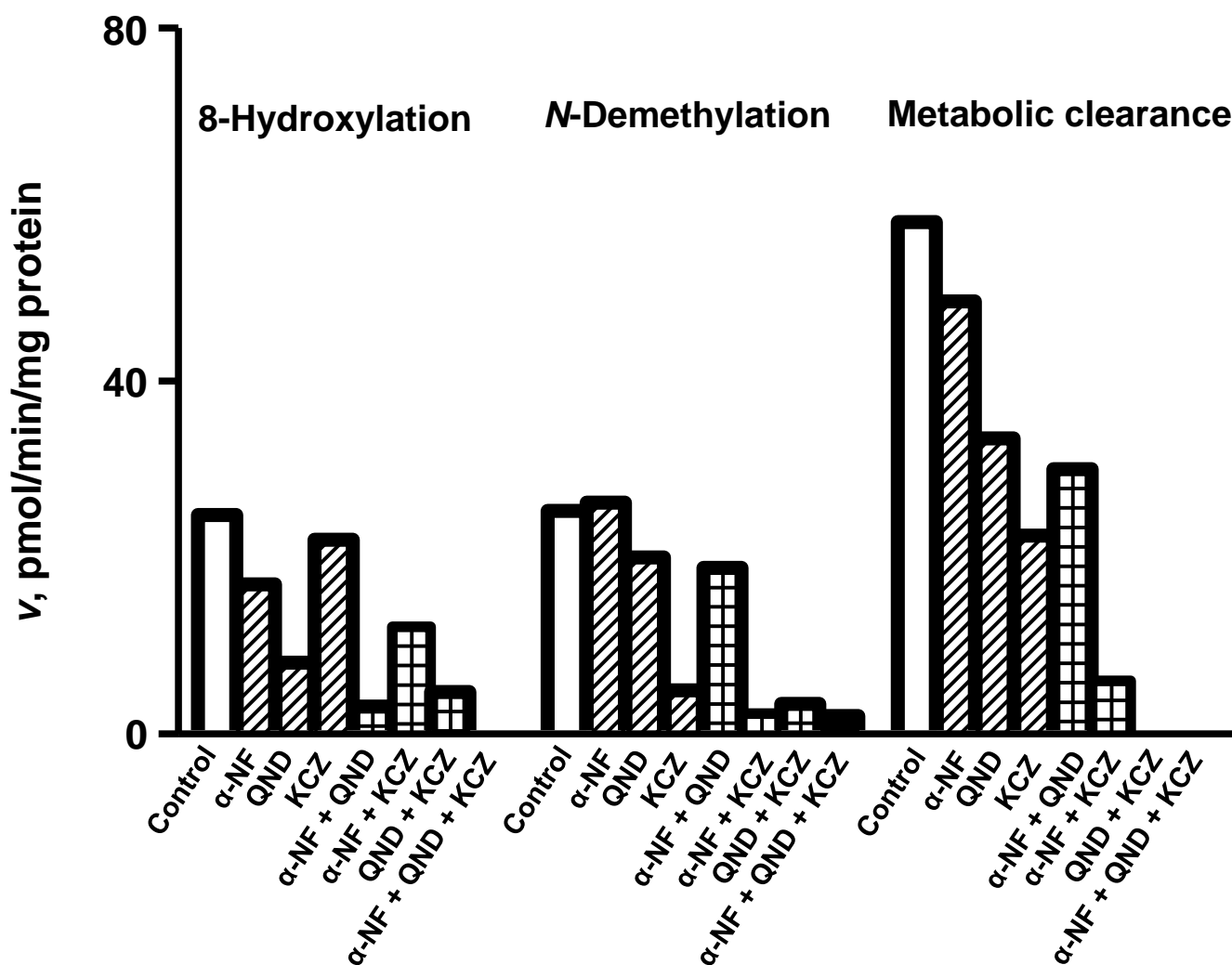


Fig. IV-3. Effects of P450 inhibitors (5 μ M) on mirtazapine oxidations and metabolic clearance at a substrate concentration of 5 μ M in pooled human liver microsomes.

α -NF, α -naphthoflavone, a CYP1A2 inhibitor; QND, quinidine, a CYP2D6 inhibitor; and KCZ, ketoconazole, a CYP3A inhibitor.

IV-3-3 ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン代謝消失に対する併用薬の影響

临床上、ミルタザピンと併用しうる薬剤であるリスペリドンおよびデュロキシセチンを添加し、ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン代謝への影響を調べた。リスペリドンおよびデュロキシセチンをそれぞれ単独で添加した場合、

ミルタザピン代謝消失はほとんど影響を受けなかった (Fig. IV-4)。一方、リスペリドンおよびデュロキセチンを双方加えた場合、ミルタザピン代謝消失は用量依存的に減少した (Fig. IV-4)。いずれの場合においてもリスペリドンおよびデュロキセチンの代謝消失は他剤の影響を受けなかった (data not shown)。

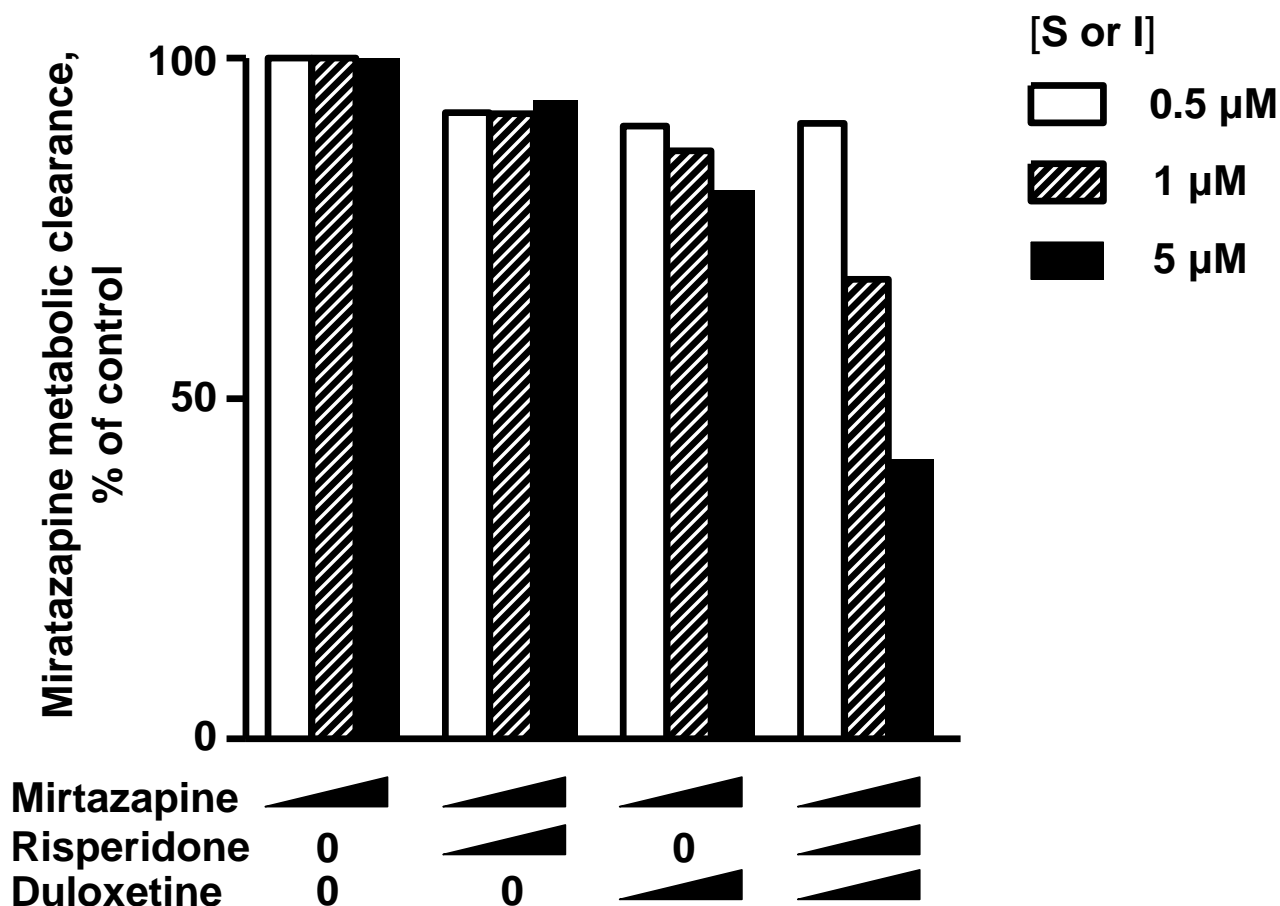


Fig. IV-4. Inhibitory effects of risperidone and duloxetine, separately and in combination, on mirtazapine metabolic clearance in pooled human liver microsomes.

Mirtazapine (0.5, 1, and 5 μM) was incubated with human liver microsomes in the presence of risperidone and duloxetine (0.5, 1, and 5 μM) at the same concentrations as those of the substrate. Mirtazapine metabolic clearance was determined and expressed as a percentage of control (no effector medicine) in this figure. Data are means of triplicate determinations.

IV-3-4 組換え P450 によるミルタザピン酸化酵素活性

10種の組み換え P450 分子種 (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 および 3A5) を用いてミルタザピン酸化酵素活性を測定した。基質終濃度 5 μM のとき、CYP1A2, 2D6, 3A4 および 3A5 でミルタザピン代謝が認められ、その他の P450 分子種は検出限界以下であった (Fig. IV-5A)。基質終濃度を 1000 μM としたとき、CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6, 3A4 および 3A5 でミルタザピン代謝が認められた (Fig. IV-5B)。8-水酸化体および *N*-脱メチル化体の生成は 5 μM で認められたのに対し (Fig. IV-5B)、*N*-酸化体の生成は 5 μM では認められなかった (Fig. IV-5A)。

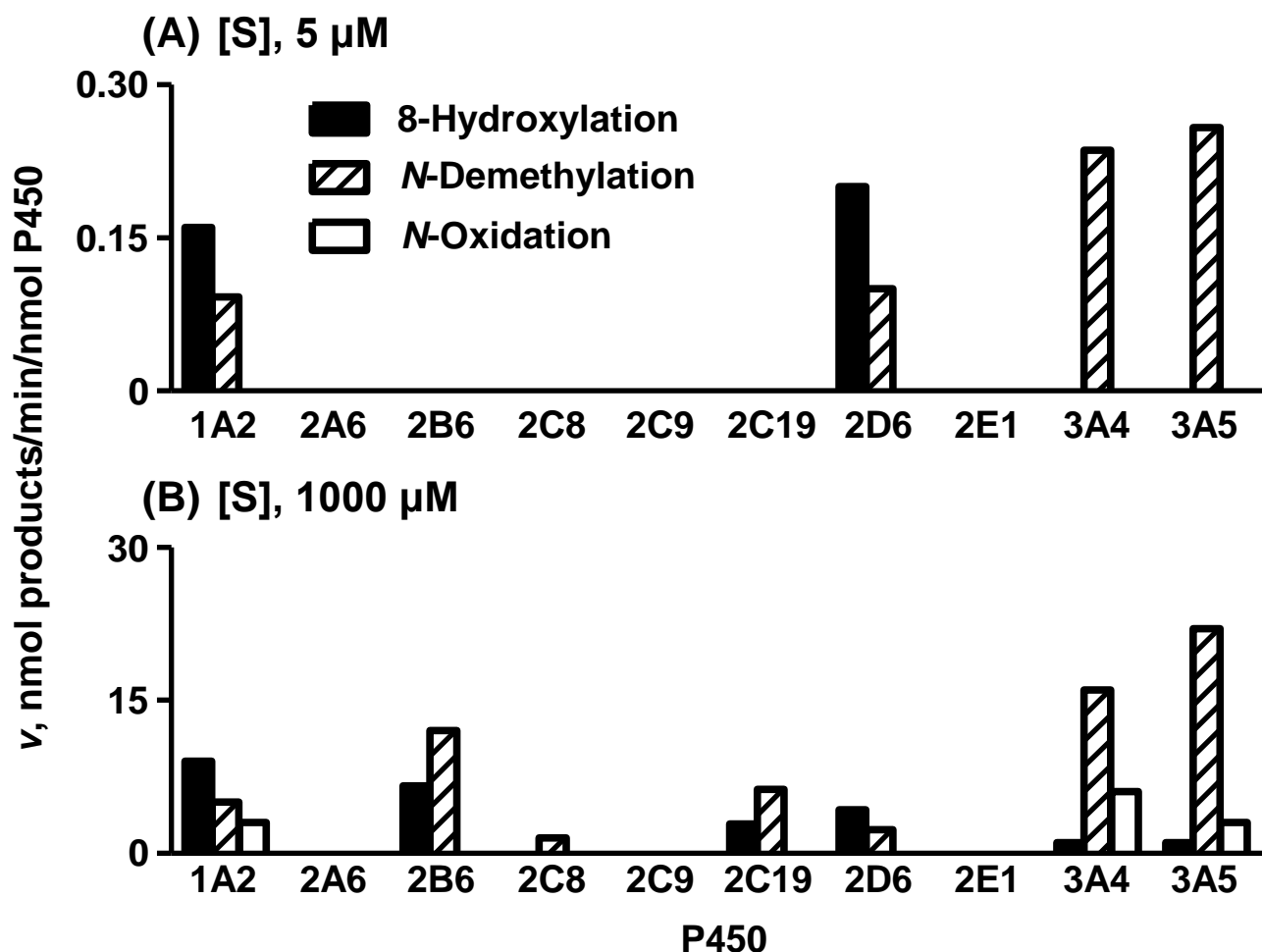


Fig. IV-5. Mirtazapine 8-hydroxylation (solid bars), *N*-demethylation (hatched bars), and *N*-oxidation (open bars) activities at substrate concentrations of 5 μM (A) and 1000 μM (B) catalyzed by ten recombinant human P450 enzymes.

IV-3-5 ミルタザピン酸化酵素活性の速度論的解析

プールドヒト肝ミクロゾーム、組換え CYP1A2, 2D6, 3A4 および 3A5 を用いてミルタザピン代謝の速度論的解析を行った (Fig. IV-6)。キネティックパラメータを Table IV-1 に示す。ミルタザピン *N*-脱メチル化酵素活性における CYP3A4 および 3A5 の K_m 値はそれぞれ 0.50 および 0.68 mM であり、 V_{max} 値はそれぞれ 25 および 36 min^{-1} であった (Table IV-1)。ミルタザピン 8-水酸化酵素活性における CYP2D6 の K_m 値は低く、0.014 mM であった (Table IV-1)。CYP2D6.10 の 8 位水酸化および *N*-脱メチル化反応に対する V_{max}/K_m 値は著しく低値を示し、CYP2D6.1 の 20 分の 1 以下であった (Table IV-1)。CYP1A2 は全ての反応において酵素活性が認められたが、いずれの反応でも V_{max}/K_m 値は最大とならなかった (Table IV-1)。

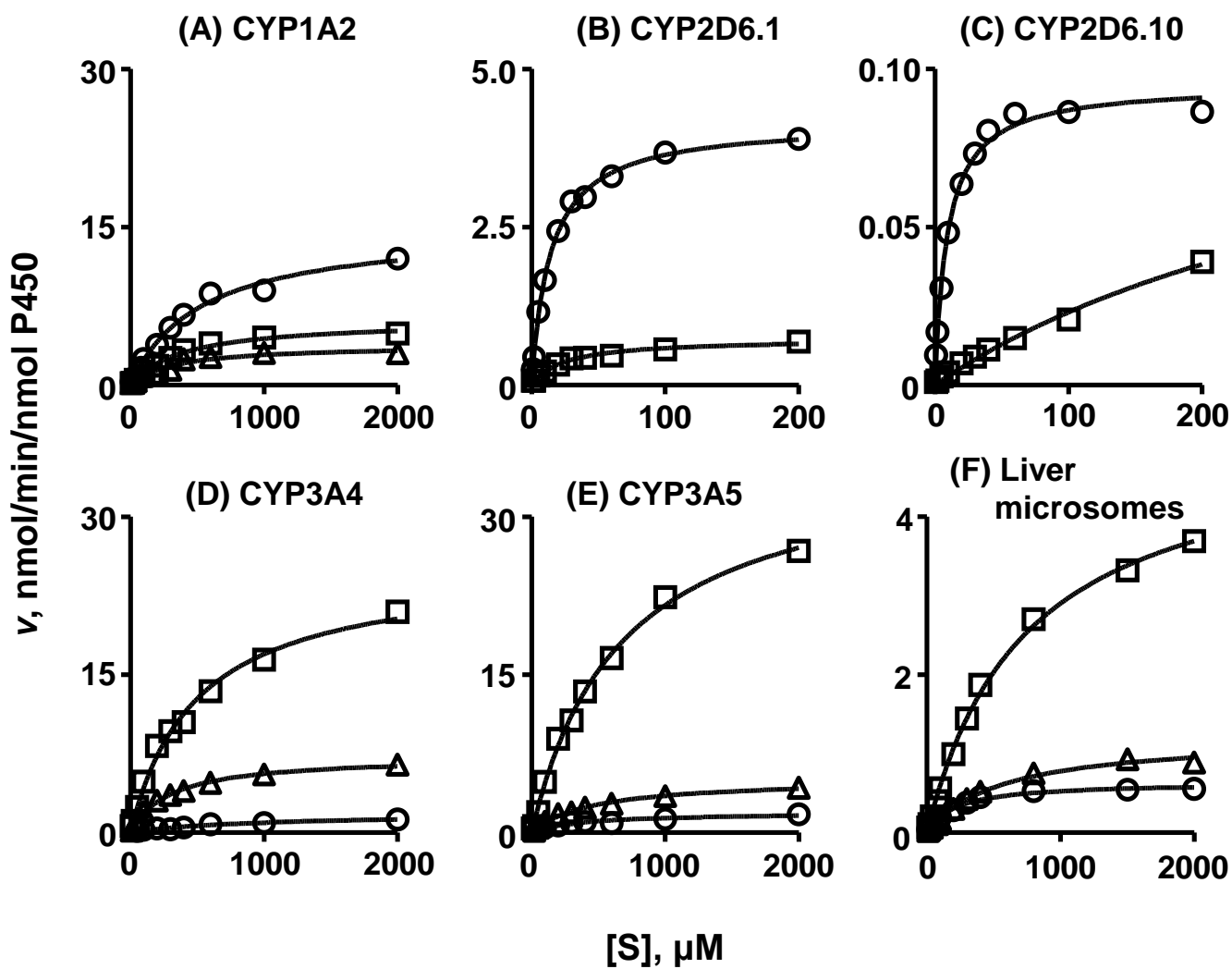


Fig. IV-6. Kinetic analyses for mirtazapine 8-hydroxylation (circles), N-demethylation (squares), and N-oxidation (triangles) catalyzed by pooled human liver microsomes and recombinant human P450 enzymes.

Table IV-1. Kinetic parameters for mirtazapine 8-hydroxylation, *N*-demethylation, and *N*-oxidation catalyzed by recombinant P450s and pooled human liver microsomes (HLM).

| Enzyme | 8-Hydroxylation | | | <i>N</i> -Demethylation | | | <i>N</i> -Oxidation | | |
|--------|-----------------|-----------------------------------|---|-------------------------|-----------------------------------|---|---------------------|-----------------------------------|---|
| | K_m (mM) | V_{max} (min ⁻¹) | V_{max}/K_m (mM min) ⁻¹ | K_m (mM) | V_{max} (min ⁻¹) | V_{max}/K_m (mM min) ⁻¹ | K_m (mM) | V_{max} (min ⁻¹) | V_{max}/K_m (mM min) ⁻¹ |
| 1A2 | 0.53 ± 0.06 | 15 ± 1 | 28 | 0.40 ± 0.04 | 6.1 ± 0.3 | 15 | 0.33 ± 0.07 | 3.8 ± 0.3 | 12 |
| 2D6.1 | 0.014 ± 0.001 | 4.2 ± 0.1 | 300 | 0.025 ± 0.004 | 0.73 ± 0.04 | 29 | - | < 0.05 | - |
| 2D6.10 | 0.009 ± 0.001 | 0.10 ± 0.01 | 11 | 0.38 ± 0.09 | 0.11 ± 0.02 | 0.3 | - | < 0.05 | - |
| 3A4 | 0.88 ± 0.20 | 1.8 ± 0.2 | 2 | 0.50 ± 0.05 | 25 ± 1 | 50 | 0.30 ± 0.02 | 7.2 ± 0.2 | 24 |
| 3A5 | 0.38 ± 0.10 | 1.9 ± 0.2 | 5 | 0.68 ± 0.05 | 36 ± 1 | 53 | 0.46 ± 0.05 | 5.1 ± 0.2 | 11 |
| HLM | 0.21 ± 0.02 | 0.64 ± 0.02 | 3 | 0.75 ± 0.05 | 5.1 ± 0.1 | 7 | 0.57 ± 0.07 | 1.2 ± 0.1 | 2 |

IV-3-6 ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン代謝酵素活性および代謝消失に対する遺伝子多型の影響

CYP2D6 遺伝子型既知の個別肝ミクロゾームを用いてミルタザピン代謝酵素活性および代謝消失を測定した。*CYP2D6* IM および PM の群では EM の群に比べてミルタザピン 8-水酸化酵素活性および代謝消失が有意に低値を示した (Fig. IV-7)。

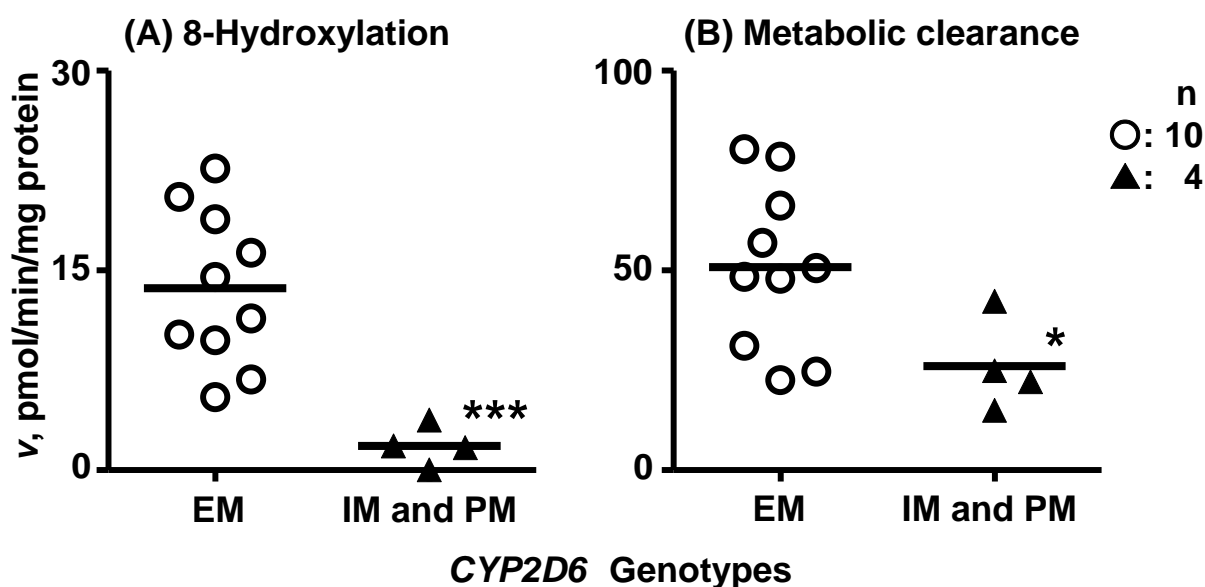


Fig. IV-7. Mirtazapine 8-hydroxylation activities (A) and metabolic clearance (B) catalyzed by individual human liver microsomes genotyped for the *CYP2D6* gene.

The horizontal lines indicate the mean values. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, significantly different by unpaired *t*-test with Welch correction.

IV-3-7 ミルタザピン投与患者での血漿中薬物濃度に対する内的・外的因子の影響

ミルタザピン投与患者より採取したトラフ時点での血液より、血漿中薬物濃度測定ならびに *CYP1A2*、*CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型判定を行った。判定結果およびその他患者背景を Table IV-2 に示す。

Table IV-2. *CYP1A2*, *CYP2D6*, and *CYP3A5* genotypes and plasma concentrations of mirtazapine determined for patients.

| ID | <i>CYP1A2</i> | <i>CYP2D6</i> | <i>CYP3A5</i> | Age (years) | Dose (mg) | Mirtazapine (ng/mL) | Smoking, S | 2D6 inhibitor |
|----|--------------------|---------------|---------------|----------------|--------------|------------------------|---------------|------------------|
| 1 | *1F/*1L | *1/*2 (EM) | *3/*3 (P) | 59 | 15 | 3 | | |
| 2 | *1A/*1F | *10/*10 (IM) | *3/*3 (P) | 36 | 15 | 21 | S | |
| 3 | *1A/*1F | *1/*10 (EM) | *1/*3 (E) | 50 | 15 | 4 | | |
| 4 | *1A/*1A | *1/*10 (EM) | *3/*3 (P) | 91 | 15 | 3 | | |
| 5 | *1A/*1A | *10/*10 (IM) | *3/*3 (P) | 84 | 7.5 | 11 | | Chlorpromazine |
| 6 | *1A/*1F | *10/*10 (IM) | *3/*3 (P) | 96 | 3.75 | 14 | | |
| 7 | *1A/*1A | *1/*10 (EM) | *3/*3 (P) | 83 | 7.5 | 21 | | |
| 8 | *1F/*1L | *5/*10 (IM) | *3/*3 (P) | 81 | 7.5 | 18 | | |
| 9 | *1A/*1A | *1/*10 (EM) | *1/*3 (E) | 82 | 7.5 | 6 | | |
| 10 | *1C/*1F or *1A/*1L | *2/*5 (IM) | *3/*3 (P) | 71 | 15 | 31 | | Duloxetine |
| 11 | *1L/*1L | *1/*10 (EM) | *1/*1 (E) | 92 | 15 | 10 | | |
| 12 | *1C/*1F or *1A/*1L | *2/*10 (EM) | *3/*3 (P) | 96 | 3.75 | 6 | | |
| 13 | *1A/*1F | *2/*10 (EM) | *1/*3 (E) | 26 | 7.5 | 5 | S | |
| 14 | *1A/*1F | *1/*1 (EM) | *3/*3 (P) | 81 | 15 | 12 | | Sertraline |

血漿中ミルタザピン濃度に対する内的・外的因子の影響について調べた。本薬物では内的因子として、年齢、*CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型、外的因子として *CYP2D6* 併用薬の有無および喫煙の有無を検討した。本集団では一人の患者を除き全員が女性であったため、性別の影響は解析するには至らなかった。

年齢および *CYP2D6* 阻害剤併用の有無によるミルタザピン C/D に対する影響について Fig. IV-8 に示す。ミルタザピン C/D 比の平均値は 65 歳未満の群に比べて、65 歳以上の群で有意に高値を示した (Fig. IV-8A)。一方、*CYP2D6* 阻害薬併用の有無はミルタザピン C/D 比に影響を受けなかった (Fig. IV-8B)。

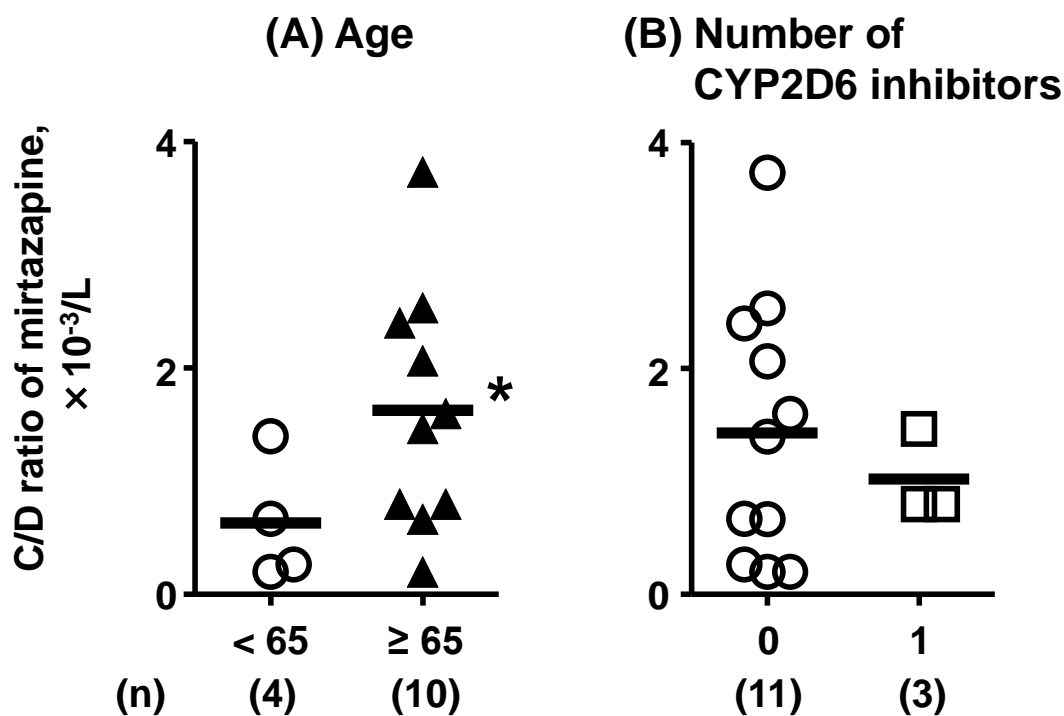


Fig. IV-8. Plasma concentrations normalized with the dose (C/D ratios) of mirtazapine in 14 patients associated with age (A) and the number of CYP2D6 inhibitors (B).

The horizontal lines indicate the mean values. * $p < 0.05$, significantly different by unpaired *t*-test with Welch correction.

CYP2D6 および *CYP3A5* 遺伝子多型のミルタザピン C/D 比に対する影響を調べた。ミルタザピン C/D 比の平均値は *CYP2D6* EM 群に比べて IM 群で有意に高値を示した (Fig. IV-9A, $p < 0.05$)。同様にミルタザピン C/D 比の平均値は *CYP3A5* 発現群に比べて低発現群で高値を示した (Fig. IV-9B, $p < 0.05$)。さらにこれら遺伝子多型を組み合わせた場合も同様の傾向が認められ、*CYP2D6* EM かつ *CYP3A5* 発現群に比べて *CYP2D6* IM かつ *CYP3A5* 低発現群でミルタザピン C/D 比の平均値は有意に高値を示した (Fig. IV-9C, $p < 0.05$)。喫煙者は *CYP2D6* EM かつ *CYP3A5* 発現群および *CYP2D6* IM かつ *CYP3A5* 低発現群にそれぞれ 1 検体ずつ見出され、両者とも遺伝子型は *CYP1A2* の誘導応答性が十分備わっていると考えられる *CYP1A2*1A/*1F* であった (Table IV-2)。

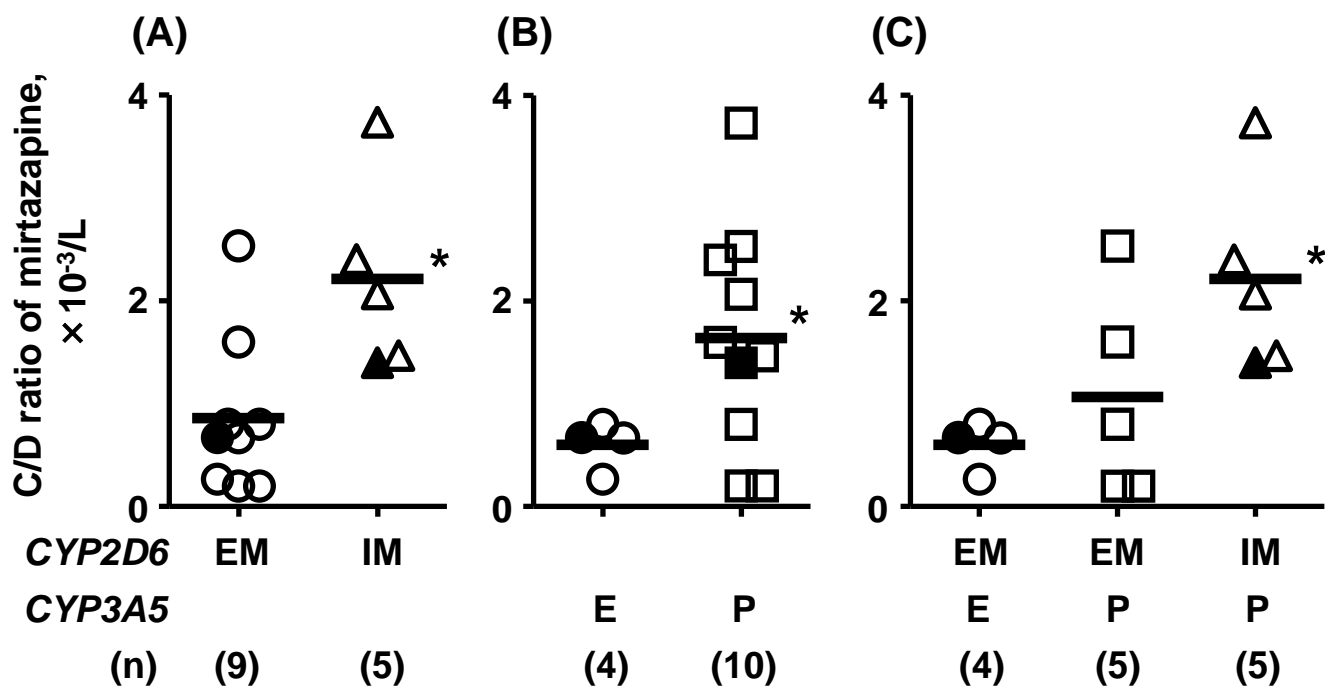


Fig. IV-9. Plasma concentrations normalized with the dose (C/D ratios) of mirtazapine in 14 patients associated with specific *CYP2D6* and *CYP3A5* genotypes separately and in combination.

The horizontal lines indicate the mean values. Closed symbols indicate two smokers. E, extensive expressors; P, poor expressors. * $p < 0.05$, significantly different by unpaired *t*-test with Welch correction in comparison with *CYP2D6* EM, *CYP3A5* E, and *CYP2D6* EM plus *CYP3A5* E groups, as shown in Table IV-2.

第 4 節 考察

Anderson らおよび Moore らの報告^{92, 93)}により、ミルタザピン臨床投与量投与時のヒト肝臓中ミルタザピン濃度は最大 5 μM 程度であると考えられる^{92, 93)}。組換え P450 を用いた検討より、ミルタザピン 8-水酸化反応は低い K_m 値および高い V_{\max}/K_m 値であった *CYP2D6* が主に代謝に関与し、*N*-脱メチル化反応では高い V_{\max} 値であった *CYP3A4/5* が主に関与していることが推察された (Table IV-1)。個別およびプールドヒト肝ミクロゾームを用いた検討より、

CYP2D6 および CYP3A4/5 指標酵素活性との間の相関関係 (Fig. IV-2)、キニジンおよびケトコナゾールによる阻害 (Fig. IV-3) ならびに基質終濃度が低濃度のときの組換え P450 での酵素活性 (Fig. IV-5) より、ヒト肝では CYP2D6 および CYP3A4/5 がミルタザピン代謝を主に担っていると考えられた。一方、ミルタザピン 8-水酸化および *N*-脱メチル化反応ならびにミルタザピン代謝消失に α -ナフトフラボンの阻害効果はほとんど認められず (Fig. IV-3)、個別肝マイクロゾームによるフェナセチン *O*-脱エチル化反応とミルタザピン代謝との相関関係は 8-水酸化で相関係数が 0.53 で正の相関関係が認められたのみであり (Fig. IV-2)、*N*-脱メチル化 (Fig. IV-2) および代謝消失 (data not shown) との間に相関関係は認められなかった。さらに組換え CYP1A2 によるミルタザピン代謝はいずれの反応でも V_{max}/K_m 値は最大とならなかった (Table IV-1)。以上より、CYP1A2 はミルタザピン代謝の主たる酵素ではないと考えられた。

個別ヒト肝マイクロゾームによるミルタザピン代謝消失および 8-水酸化酵素活性は CYP2D6 EM 群に比べて IM および PM 群で有意に低値を示したことから (Fig. IV-7)、日本人患者でのミルタザピン代謝の個人差にも CYP2D6*10 が関わることを推察された。同マイクロゾームで CYP3A5 の遺伝子型の情報は得られなかったため、CYP3A5*3 の影響については *in vitro* で調べることはできなかったが、CYP2D6 との影響同様、CYP3A5*1 をもつ検体ではもたない検体に比べ、ミルタザピン *N*-脱メチル化酵素活性およびミルタザピン代謝消失が高値を示す可能性が考えられる。

ミルタザピンは *R* 体 *S* 体が等量混合されたラセミ体である。*S*-ミルタザピンの代謝は CYP2D6 および CYP1A2 が、*R*-ミルタザピンの代謝は CYP3A4 が担っており、血漿中 *S*-ミルタザピン濃度は CYP2D6 遺伝子型の影響を受けることが報告されている^{90, 91)}。14 名の患者のミルタザピン C/D 比は CYP2D6 IM 群および CYP3A5 低発現群で有意に高値を示した (Fig. IV-9)。欧米白人では CYP3A5*1 の頻度が低いため、ミルタザピン代謝への寄与を含めて詳細な検討がなされていなかったが、本研究によって CYP3A5 遺伝子多型もミルタザピン血漿中濃度に影響しうることを初めて示された。CYP2D6 EM かつ CYP3A5

発現の喫煙者は同群内で平均の C/D 比であり (Fig. IV-9)、*CYP2D6* IM かつ *CYP3A5* 低発現である喫煙者では同群内では最も低い C/D 比を示した (Fig. IV-9)。本研究で見出された喫煙者は 2 名であったが、いずれも *CYP1A2*1A/*1F* の遺伝子型を有しており (Table IV-2)、喫煙による *CYP1A2* の誘導応答性は十分に備わっていると考えられるにもかかわらず、ミルタザピン C/D 比に大きな影響は認められなかった。喫煙者では *CYP1A2* 誘導を介してミルタザピン代謝が速いとされている過去の報告^{91, 94)}と一致しなかった原因として、喫煙者が 2 名と少なかったことが挙げられるが、*in vitro* 実験よりミルタザピン代謝に対する *CYP1A2* の寄与が小さいことから、ミルタザピン C/D 比に対する影響は *CYP2D6* および *CYP3A5* 遺伝子多型の方が大きく、本研究結果は妥当であると考えられた。

ミルタザピンは一部の症例報告を除き^{85, 86)}、他の医薬品との併用が概ね安全であると報告されている⁸⁷⁻⁸⁹⁾。本研究でも *CYP2D6* 阻害薬併用の有無 (併用数は 1 剤のみ) でミルタザピン C/D 比に影響が認められず (Fig. IV-8B)、これまでの報告と一致した。ミルタザピンはヒト P450 分子種に対して阻害作用をほとんど示さず⁹⁵⁾、第 III 章で検討を行った *CYP2D6* および *CYP3A4* によって代謝されるリスペリドンはミルタザピンと併用しても、薬物相互作用を起こさないと報告されている^{87, 89)}。さらにデュロキシセチンは主に *CYP1A2* および *CYP2D6* によって代謝され、*CYP2D6* に対して弱く阻害作用を示す⁹⁶⁾。プールドヒト肝ミクロゾームを用いてミルタザピン代謝消失を測定したところ、キニジン、ケトコナゾールおよび両方を添加した場合に阻害作用が認められた (Fig. IV-3)。同様にリスペリドンおよびデュロキシセチンを双方添加した場合に阻害作用が認められた (Fig. IV-4)。しかしながら本研究で、リスペリドンとデュロキシセチンを併用している患者が見出されなかったため、*in vivo* での影響を確認することはできなかったが、ミルタザピン代謝において 2 つの主な代謝経路が双方阻害された場合にはミルタザピン代謝消失が遅延しうることが推察された。

患者試料を用いた検討においてミルタザピン代謝に対する年齢や性別の影響

響についての報告がいくつかなされている^{90, 91, 97-99})。患者血漿から得たミルタザピン消失速度の平均値は男性が女性よりもわずかに早い(用量調整の必要のない程度)とする少数の患者群での報告があるが⁹⁷)、血漿中濃度からミルタザピン代謝消失は性別に影響しないとの報告も存在する⁹⁹)。本研究での性別の影響については一人の患者を除き全員が女性であったため、解析には至らなかった。さらに年齢の影響は、投与量調整の必要のない程度で65歳以上の患者群で有意にミルタザピン血漿中濃度が上がると少数例での報告がある⁹⁷)。本研究では65歳以上の患者群が65歳未満の患者群に比べてミルタザピンC/D比は有意に高値を示したことから(Fig. IV-8A)、過去の報告を支持する結果が得られた。

以上、本研究により、ミルタザピン代謝消失はCYP2D6およびCYP3A5遺伝子多型ならびに3種以上の薬物の併用により影響を受けることが示唆された。ミルタザピン投与の際は遺伝子多型および併用薬を考慮することでより安全な投与設計が可能となることが考えられた。

総 括

統合失調症やうつ病といった精神疾患は多くの新薬が上市される一方で、未だ治療効果は十分ではない。治療効果が上がらない要因の一つとして、治療薬体内動態に個人差が生じていることが挙げられる。本研究では精神疾患個別化治療の開発を目指し、治療薬体内動態に影響を与える因子について主に薬物代謝酵素に着目して、*in vitro* および *in vivo* の両面から検討を行った。すわなち、代謝酵素活性変動の各医薬品代謝消失への影響を、ヒト由来酵素源と患者由来血液試料を用いて詳細に調べた。

第 I 章では分析法の検討として、日本人において重要な遺伝子多型の選別と判定法確立を行った。遺伝子型を判定した個別ヒト肝ミクロゾームで、CYP3A タンパク発現量および CYP3A 指標酵素活性は CYP3A4 野生型の群に比べて、CYP3A4*22 ヘテロ接合体の群で有意に低値を示した。しかしながら日本人 53 検体で CYP3A4*22 は見出されなかった。よって、CYP3A4*22 変異は CYP3A タンパク発現量を低下させることで CYP3A 活性を低下させるが、日本人においては頻度が非常に低いことから、考慮すべき重要な変異ではないことが推察された。他方、日本人で誤判定が報告されていた全欠損変異 CYP2D6*5 の判定法を確立した。この判定法によって誤判定の原因となった CYP2D6*10D を完全に区別することが可能となった。さらに、マルチプレックス法とすることで内部標準添加と作業工程の短縮によって、より正確で簡便となった。確立した判定法は第 II 章以降の遺伝子多型判定で用いたが、本研究での使用のみならず、CYP2D6 遺伝子多型により代謝消失に影響を受けることが知られている医薬品の治療や本多型の研究等に活用できるものと考えられる。

第 II 章では抗精神病薬オランザピンの体内動態に影響する因子について検討を行った。ヒト肝ミクロゾームおよび組換え酵素によるオランザピン代謝消失および主要代謝物生成速度ならびに指標酵素活性との相関性より、N-脱

メチル化反応には CYP1A2 および CYP2D6、N-酸化酵素活性には FMO3 および CYP2D6 がそれぞれ寄与していることが明らかとなった。一方、個別ヒト肝ミクロゾームのオランザピン代謝消失および代謝物生成速度は、CYP2D6 および FMO3 遺伝子多型によって影響されないことが示唆された。臨床検体での検討結果からもオランザピン投与患者のトラフ時点での血漿中薬物濃度は CYP2D6 遺伝子多型および FMO3 遺伝子多型ならびに喫煙の影響は認められなかった。以上より、オランザピン代謝には 2 つの主代謝経路に複数の代謝酵素が関与しており、単独酵素の活性変動にオランザピン代謝消失は影響を受けないことが推察された。

第 III 章では抗精神病薬リスペリドンの体内動態に影響する因子について検討を行った。リスペリドン 9-水酸化反応には主に CYP3A と CYP2D6 が関与しているが、CYP3A については組換え CYP3A5 によるリスペリドン 9-水酸化酵素反応の V_{\max}/K_m 値が CYP3A4 の 2 分の 1 程度であることから、CYP3A5 の代謝への寄与は CYP3A4 に比べて小さいものと示唆された。個別ヒト肝ミクロゾームを用いたリスペリドン 9-水酸化反応は基質低濃度時でのみ CYP2D6 遺伝子多型の影響が認められ、CYP3A5 遺伝子多型の影響は認められなかった。さらにリスペリドン投与患者の血漿中リスペリドンおよびパリペリドン濃度は CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型の影響は受けなかった。以上より、リスペリドン代謝には CYP3A5 の寄与が小さく、CYP2D6 と CYP3A4 が補完し得ることが示唆された。よって実臨床にてリスペリドン投与の際には、オランザピンと同様、調べた範囲において薬物代謝酵素遺伝子多型等に特別の配慮が必要ないことが推察された。

第 IV 章では抗うつ薬ミルタザピンの体内動態に影響する因子について検討を行った。組換え酵素によるミルタザピン代謝反応の速度論的解析の結果、これまで明らかにされていなかった CYP3A5 もミルタザピン代謝に寄与していることが示唆された。さらに阻害剤の影響とあわせて、CYP1A2 についてはミルタザピン代謝における寄与が小さいと示唆された。薬物代謝酵素遺伝子型既知の個別ヒト肝ミクロゾームによるミルタザピン代謝消失速度および

8-水酸化酵素活性は、CYP2D6 通常活性群に比べて低活性群で有意に低値を示した。併用薬の影響についてヒト肝ミクロゾームを用いて検討した結果、リスペリドンおよびデュロキセチン単独ではミルタザピン代謝消失に影響は認められなかったが、双方添加により阻害が認められたことから、3 薬以上の薬物により薬物相互作用が生じる可能性が示唆された。これらの検討をもとに臨床検体について検討した結果、トラフ時点での血漿中ミルタザピン濃度は CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型による影響が確認されたが、喫煙の影響は CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型に比べてわずかであった。以上より、比較的新しい薬物とされるミルタザピンを精神疾患患者に投与する際には患者の CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型ならびに併用薬を考慮することで、より適切な治療が可能となることが示唆された。

以上、本研究において代表的な 3 種精神疾患治療薬体内動態に及ぼす薬物酵素活性変動因子の異なる影響を詳しく明らかにした。すなわち、単一酵素の変動要因は無視しうる治療薬とそれら単一酵素の遺伝子多型を考慮すべき向精神薬が実臨床に混在することが明らかとなった。これらの要因に関する知見は、精神疾患治療の実臨床において適切な個別化治療の基盤となりうる情報である。オランザピンおよびリスペリドンのように単一の代謝経路に複数代謝酵素が関与する場合、単一酵素の活性は薬物の代謝消失に影響を及ぼさないことが示唆された。一方、ミルタザピンのように単一の代謝経路に単一の酵素が寄与している場合には、その主たる酵素の遺伝子多型や併用薬による活性変動は薬物の代謝消失に影響を及ぼすことが示唆された。本研究で検討した 3 種薬物は全て、上限量の範囲内で適宜増減できることが添付文書に記載されている¹⁰⁰⁻¹⁰³⁾。本知見を基盤情報とし、個人に合わせた正しい治療薬の選択および適切な用量の決定により、高頻度で出現する精神疾患治療薬の副作用リスクを軽減し、治療効果を最大限に発揮させることを通して、今後の精神疾患個別化治療が進んでいくものと期待される。さらに、医薬品の代謝消失に対する各酵素の寄与と酵素活性変動および併用薬の影響について、分析法を含め *in vitro* 系で詳細に検討した本手法は、他の精神疾患治療薬

における実臨床での患者薬物体内動態の個人差を評価する上でも有用である。
以上を総合すると、本基礎研究成果は精神疾患患者の実臨床治療満足度向上
に貢献できるものと考えられる。

本研究の誌上発表

本研究の一部は以下に誌上発表した。

- 1) Okubo M., Murayama N., Miura J., Shimizu M., Yamazaki H., A rapid multiplex PCR assay that can reliably discriminate the *cytochrome P450 2D6* whole-gene deletion allele from *2D6*10* alleles. *Clin. Chim. Acta*, **413**, 1675-1677 (2012).
- 2) Okubo M., Murayama N., Shimizu M., Shimada T., Guengerich F. P., Yamazaki H., The *CYP3A4* intron 6 C>T polymorphism (*CYP3A4*22*) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes, *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 349-354, (2013).
- 3) Okubo M., Murayama N., Miura J., Chiba Y., Yamazaki H., Effects of *cytochrome P450 2D6* and *3A5* genotypes and possible coadministered medicines on the metabolic clearance of antidepressant mirtazapine in Japanese patients, *Biochem. Pharmacol.*, **93**, 104-109 (2015).
- 4) Okubo M., Narita M., Murayama N., Akimoto Y., Goto A., Yamazaki H., Individual differences in *in vitro* and *in vivo* metabolic clearances of the antipsychotic drug olanzapine from non-smoking and smoking Japanese subjects genotyped for *cytochrome P450 2D6* and *flavin-containing monooxygenase 3*, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, DOI: 10.1002/hup.2515.
- 5) Okubo M., Morita S., Murayama N., Akimoto Y., Goto A., Yamazaki H., Individual differences in *in vitro* and *in vivo* metabolic clearances of antipsychotic risperidone from Japanese subjects genotyped for *cytochrome P450 2D6* and *3A5*, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, DOI: 10.1002/hup.2516.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、長年にわたり御指導御鞭撻賜りました昭和薬科大学薬物動態学研究室教授 山崎浩史先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究の主査として本論文の御審査を賜りました昭和薬科大学薬物治療学研究室教授 水谷顕洋先生、副査として御審査を賜りました薬理学研究室教授 渡邊泰男先生、統合感染免疫学研究室教授 石戸 聡先生に深く感謝致します。

論文作成にあたり、御指導いただきました昭和薬科大学薬物動態学研究室講師 村山典恵先生、清水万紀子先生、同研究室特任助教 上原正太郎先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、貴重な患者様の血液検体を御供与下さいました、北海道薬科大学薬物治療学分野教授 三浦 淳先生、千寿会三愛病院院長 千葉泰二先生、鶴が丘ガーデンホスピタル院長 後藤晶子先生、同病院副院長 秋元洋一先生ならびにご協力いただいた医師、薬剤師の皆様、そして血液を提供して下さいました患者の皆様には深く感謝致します。

本研究にご助言いただきました信州大学医学部附属病院薬剤部長 大森栄先生、同病院副薬剤部長 山折 大先生に深謝の意を表します。

最後に、種々ご便宜を図っていただきました昭和薬科大学薬物動態学研究室 成田桃子氏、森田翔子氏、森亜沙美氏、倉林優貴氏、日川美紀子氏ならびに同研究室の皆様には感謝いたします。

引用文献

- 1) 厚生労働省, 患者情報, (2014).
- 2) 奥村泰之, 野田寿恵, 伊藤弘人, 日本全国の統合失調症患者への抗精神病薬の処方パターン: ナショナルデータベースの活用, *臨床精神薬理*, **16**, 1201-1215 (2013).
- 3) 厚生労働省, 平成 26 年度診療報酬改定個別改訂項目について, 113-115 (2014).
- 4) 医薬品産業政策研究所, 政策研ニュース, **45**, 30-33 (2015).
- 5) Steen V. M., Andreassen O. A., Daly A. K., Tefre T., Borresen A. L., Idle J. R., Gulbrandsen A. K., Detection of the poor metabolizer-associated *CYP2D6(D)* gene deletion allele by long-PCR technology, *Pharmacogenetics*, **5**, 215–223 (1995).
- 6) Chida M., Yokoi T., Fukui T., Kinoshita M., Yokota J., Kamataki T., Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron 1 of human *CYP1A2* in the Japanese population, *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 899–902 (1999).
- 7) Nakajima M., Yokoi T., Mizutani M., Kinoshita M., Funayama M., Kamataki T., Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human *CYP1A2* gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans, *J. Biochem.*, **125**, 803–808 (1999).
- 8) Sachse C., Brockmoller J., Bauer S., Roots I., Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 *CYP1A2* gene tested with caffeine, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **47**, 445-449 (1999).
- 9) Han X. M., Ouyang D. S., Chen X. P., Shu Y., Jiang C. H., Tan Z. R., Zhou H. H., Inducibility of CYP1A2 by omeprazole *in vivo* related to the genetic polymorphism of *CYP1A2*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **54**, 540-543 (2002).

- 10) Ozawa S., Soyama A., Saeki M., Fukushima-Uesaka H., Itoda M., Koyano S., Sai K., Ohno Y., Saito Y., Sawada J., Ethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP2C19, CYP3As and MDR1/ABCB1, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**, 83–95 (2004).
- 11) Fukuda T., Maune H., Ikenaga Y., Naohara M., Fukuda K., Azuma J., Novel structure of the *CYP2D6* gene that confuses genotyping for the *CYP2D6*5* allele, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 345–350 (2005).
- 12) Elens L., Becker M. L., Haufroid V., Hofman A., Visser L. E., Uitterlinden A. G., Stricker B., van Schaik R. H., Novel *CYP3A4* intron 6 single nucleotide polymorphism is associated with simvastatin-mediated cholesterol reduction in the Rotterdam Study, *Pharmacogenet. Genomics*, **21**, 861–866 (2011).
- 13) Elens L., Bouamar R., Hesselink D. A., Haufroid V., van der Heiden I. P., van Gelder T., van Schaik R. H., A new functional *CYP3A4* intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients, *Clin. Chem.*, **57**, 1574–1583 (2011).
- 14) Elens L., van Schaik R. H., Panin N., de Meyer M., Wallemacq P., Lison D., Mourad M., Haufroid V., Effect of a new functional *CYP3A4* polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients, *Pharmacogenomics*, **12**, 1383–1396 (2011).
- 15) Wang D., Guo Y., Wrighton S. A., Cooke G. E., Sadee W., Intronic polymorphism in *CYP3A4* affects hepatic expression and response to statin drugs, *Pharmacogenomics J.*, **11**, 274–286 (2011).
- 16) Elens L., Bouamar R., Hesselink D. A., Haufroid V., van Gelder T., van Schaik R. H., The new *CYP3A4* intron 6 C>T polymorphism (*CYP3A4*22*) is associated with an increased risk of delayed graft function and worse renal function in cyclosporine-treated kidney transplant patients, *Pharmacogenet. Genomics*, **22**, 373–380 (2012).
- 17) Elens L., Nieuweboer A., Clarke S. J., Charles K. A., de Graan A. J.,

- Haufroid V., Mathijssen R. H., van Schaik R. H., *CYP3A4* intron 6 C>T SNP (*CYP3A4*22*) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin, *Pharmacogenomics*, **14**, 137–149 (2013).
- 18) Ring B. J., Catlow J., Lindsay T. J., Gillespie T., Roskos L. K., Cerimele B. J., Swanson S. P., Hamman M. A., Wrighton S. A., Identification of the human cytochromes P450 responsible for the *in vitro* formation of the major oxidative metabolites of the antipsychotic agent olanzapine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 658–666 (1996).
- 19) Fang J., Bourin M., Baker G. B., Metabolism of risperidone to 9-hydroxyrisperidone by human cytochromes P450 2D6 and 3A4, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **359**, 147–151 (1999).
- 20) Yasui-Furukori N., Hidestrand M., Spina E., Facciola G., Scordo M. G., Tybring G., Different enantioselective 9-hydroxylation of risperidone by the two human CYP2D6 and CYP3A4 enzymes, *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1263–1268 (2001).
- 21) Stormer E., von Moltke L. L., Shader R. I., Greenblatt D. J., Metabolism of the antidepressant mirtazapine *in vitro*: contribution of cytochromes P-450 1A2, 2D6, and 3A4, *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1168–1175 (2000).
- 22) Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F. P., Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 414–423 (1994).
- 23) Rendic S., Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data, *Drug Metab. Rev.*, **34**, 83–448 (2002).
- 24) Lamba J. K., Lin Y. S., Schuetz E. G., Thummel K. E., Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism, *Adv Drug Deliv Rev*, **54**,

- 1271–1294 (2002).
- 25) Westlind A., Lofberg L., Tindberg N., Andersson T. B., Ingelman-Sundberg M., Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 201–205 (1999).
 - 26) Westlind-Johnsson A., Malmebo S., Johansson A., Otter C., Andersson T. B., Johansson I., Edwards R. J., Boobis A. R., Ingelman-Sundberg M., Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism, *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 755–761 (2003).
 - 27) Wang D., Sadee W., *CYP3A4* intronic SNP rs35599367 (*CYP3A4**22) alters RNA splicing, *Pharmacogenet. Genomics*, **26**, 40-43 (2016).
 - 28) Wrighton S. A., Stevens J. C., The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism, *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**, 1–21 (1992).
 - 29) Kuehl P., Zhang J., Lin Y., Lamba J., Assem M., Schuetz J., Watkins P. B., Daly A., Wrighton S. A., Hall S. D., Maurel P., Relling M., Brimer C., Yasuda K., Venkataramanan R., Strom S., Thummel K., Boguski M. S., Schuetz E., Sequence diversity in *CYP3A* promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression, *Nat. Genet.*, **27**, 383–391 (2001).
 - 30) van Schaik R. H., van der Heiden I. P., van den Anker J. N., Lindemans J., *CYP3A5* variant allele frequencies in Dutch Caucasians, *Clin. Chem.*, **48**, 1668–1671 (2002).
 - 31) Yamaori S., Yamazaki H., Iwano S., Kiyotani K., Matsumura K., Saito T., Parkinson A., Nakagawa K., Kamataki T., Ethnic differences between Japanese and Caucasians in the expression levels of mRNAs for CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7: lack of co-regulation of the expression of CYP3A in Japanese livers, *Xenobiotica*, **35**, 69–83 (2005).

- 32) Ingelman-Sundberg M., Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity, *Pharmacogenomics J.*, **5**, 6–13 (2005).
- 33) Ebisawa A., Hiratsuka M., Sakuyama K., Konno Y., Sasaki T., Mizugaki M., Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *CYP2D6* gene in Japanese individuals, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 294–299 (2005).
- 34) Matsunaga M., Yamazaki H., Kiyotani K., Iwano S., Saruwatari J., Nakagawa K., Soyama A., Ozawa S., Sawada J., Kashiyama E., Kinoshita M., Kamataki T., Two novel *CYP2D6*10* haplotypes as possible causes of a poor metabolic phenotype in Japanese, *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 699–701 (2009).
- 35) Shimada T., Tsumura F., Yamazaki H., Guengerich F. P., Inoue K., Characterization of (+/-)-bufuralol hydroxylation activities in liver microsomes of Japanese and Caucasian subjects genotyped for *CYP2D6*, *Pharmacogenetics*, **11**, 143–156 (2001).
- 36) Soyama A., Kubo T., Miyajima A., Saito Y., Shiseki K., Komamura K., Ueno K., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Ozawa S., Sawada J., Novel nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the *CYP2D6* gene, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**, 313–319 (2004).
- 37) Droll K., Bruce-Mensah K., Otton S. V., Gaedigk A., Sellers E. M., Tyndale R. F., Comparison of three *CYP2D6* probe substrates and genotype in Ghanaians, Chinese and Caucasians, *Pharmacogenetics*, **8**, 325–333 (1998).
- 38) Broly F., Gaedigk A., Heim M., Eichelbaum M., Morike K., Meyer U. A., Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype: analysis of common mutations and alleles of *CYP2D6* in a European population, *DNA Cell Biol.*, **10**, 545–558 (1991).
- 39) Gaedigk A., Blum M., Gaedigk R., Eichelbaum M., Meyer U. A., Deletion of the entire cytochrome *P450 CYP2D6* gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine

- polymorphism, *Am. J. Hum. Genet.*, **48**, 943–950 (1991).
- 40) Schaeffeler E., Schwab M., Eichelbaum M., Zanger U. M., *CYP2D6* genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR, *Hum. Mutat.*, **22**, 476–485 (2003).
- 41) Inoue K., Yamazaki H., Imiya K., Akasaka S., Guengerich F. P., Shimada T., Relationship between *CYP2C9* and *2C19* genotypes and tolbutamide methyl hydroxylation and S-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations, *Pharmacogenetics*, **7**, 103–113 (1997).
- 42) Kiyotani K., Shimizu M., Kumai T., Kamataki T., Kobayashi S., Yamazaki H., Limited effects of frequent *CYP2D6**36-*10 tandem duplication allele on in vivo dextromethorphan metabolism in a Japanese population, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **66**, 1065–1068 (2010).
- 43) Adler G., Loniewska B., Parczewski M., Kordek A., Ciechanowicz A., Frequency of common *CYP3A5* gene variants in healthy Polish newborn infants, *Pharmacol. Rep.*, **61**, 947–951 (2009).
- 44) Uno Y., Uehara S., Kohara S., Murayama N., Yamazaki H., Cynomolgus monkey CYP2D44, newly identified in liver, metabolizes bufuralol, and dextromethorphan, *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1486–1492 (2010).
- 45) Kronbach T., Mathys D., Umeno M., Gonzalez F. J., Meyer U. A., Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4, *Mol. Pharmacol.*, **36**, 89–96 (1989).
- 46) Yamazaki H., Shimada T., Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **346**, 161–169 (1997).
- 47) Soyama A., Saito Y., Ohno Y., Komamura K., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Ozawa S., Sawada J., Diverse structures of chimeric CYP-REP7/6-containing *CYP2D6* and a novel defective *CYP2D6* haplotype harboring single-type *36 and CYP-REP7/6 in Japanese, *Drug Metab.*

- Pharmacokinet.*, **21**, 395–405 (2006).
- 48) Yamazaki H., Inui Y., Wrighton S. A., Guengerich F. P., Shimada T., Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in *Escherichia coli* and by human liver microsomes, *Carcinogenesis*, **16**, 2167–2170 (1995).
- 49) Shi Y., Li Y., Tang J., Zhang J., Zou Y., Cai B., Wang L., Influence of *CYP3A4*, *CYP3A5* and *MDR-1* polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and early renal dysfunction in liver transplant recipients, *Gene*, **512**, 226–231 (2013).
- 50) Callaghan J. T., Bergstrom R. F., Ptak L. R., Beasley C. M., Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, *Clin. Pharmacokinet.*, **37**, 177–193 (1999).
- 51) Constantinos Z., Eleni P., Goulas A., Iakovidou-Kritsi Z., Olanzapine: evaluation of the *in vivo* cytogenetic effect, *Hum. Psychopharmacol.*, **30**, 189–192 (2015).
- 52) Kroon L. A., Drug interactions with smoking, *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **64**, 1917–1921 (2007).
- 53) Carrillo J. A., Herraiz A. G., Ramos S. I., Gervasini G., Vizcaino S., Benitez J., Role of the smoking-induced cytochrome P450 (CYP)1A2 and polymorphic CYP2D6 in steady-state concentration of olanzapine, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **23**, 119–127 (2003).
- 54) Nozawa M., Ohnuma T., Matsubara Y., Sakai Y., Hatano T., Hanzawa R., Shibata N., Arai H., The relationship between the response of clinical symptoms and plasma olanzapine concentration, based on pharmacogenetics: Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP), *Ther. Drug Monit.*, **30**, 35–40 (2008).
- 55) Hagg S., Spigset O., Lakso H. A., Dahlqvist R., Olanzapine disposition in humans is unrelated to *CYP1A2* and *CYP2D6* phenotypes, *Eur. J. Clin.*

- Pharmacol.*, **57**, 493–497 (2001).
- 56) Shimizu M., Allerston C. K., Shephard E. A., Yamazaki H., Phillips I. R., Relationships between flavin-containing mono-oxygenase 3 (*FMO3*) genotype and trimethylaminuria phenotype in a Japanese population, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **77**, 839–851 (2014).
- 57) Yamazaki H., Shimizu M., Survey of variants of human flavin-containing monooxygenase 3 (*FMO3*) and their drug oxidation activities, *Biochem. Pharmacol.*, **85**, 1588–1593 (2013).
- 58) Soderberg M. M., Haslemo T., Molden E., Dahl M. L., Influence of *FMO1* and 3 polymorphisms on serum olanzapine and its N-oxide metabolite in psychiatric patients, *Pharmacogenomics J.*, **13**, 544–550 (2013).
- 59) Cashman J. R., Zhang J., Nelson M. R., Braun A., Analysis of *flavin-containing monooxygenase 3* genotype data in populations administered the anti-schizophrenia agent olanzapine, *Drug Metab. Lett.*, **2**, 100–114 (2008).
- 60) Samer C. F., Lorenzini K. I., Rollason V., Daali Y., Desmeules J. A., Applications of CYP450 testing in the clinical setting, *Mol. Diagn. Ther.*, **17**, 165–184 (2013).
- 61) Uehara S., Uno Y., Inoue T., Sasaki E., Yamazaki H., Substrate Selectivities and Catalytic Activities of Marmoset Liver Cytochrome P450 2A6 Differed from Those of Human P450 2A6, *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 969–976 (2015).
- 62) Taniguchi-Takizawa T., Shimizu M., Kume T., Yamazaki H., Benzydamine N-oxygenation as an index for flavin-containing monooxygenase activity and benzydamine N-demethylation by cytochrome P450 enzymes in liver microsomes from rats, dogs, monkeys, and humans, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **30**, 64–69 (2015).
- 63) Fukuda T., Yamamoto I., Nishida Y., Zhou Q., Ohno M., Takada K., Azuma J., Effect of the *CYP2D6*10* genotype on venlafaxine pharmacokinetics in

- healthy adult volunteers, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **47**, 450–453 (1999).
- 64) Shimizu M., Kobayashi Y., Hayashi S., Aoki Y., Yamazaki H., Variants in the flavin-containing monooxygenase 3 (*FMO3*) gene responsible for trimethylaminuria in a Japanese population, *Mol. Genet. Metab.*, **107**, 330–334 (2012).
- 65) Conley R. R., Meltzer H. Y., Adverse events related to olanzapine, *J. Clin. Psychiatry*, **61 Suppl 8**, 26–29; discussion 30 (2000).
- 66) Perry P. J., Argo T. R., Carnahan R. M., Lund B. C., Holman T. L., Ellingrod V. L., Miller D., The association of weight gain and olanzapine plasma concentrations, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **25**, 250–254 (2005).
- 67) McGinnity D. F., Parker A. J., Soars M., Riley R. J., Automated definition of the enzymology of drug oxidation by the major human drug metabolizing cytochrome P450s, *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1327-1334 (2000).
- 68) Korprasertthaworn P., Polasek T. M., Sorich M. J., McLachlan A. J., Miners J. O., Tucker G. T., Rowland A., *In Vitro* Characterization of the Human Liver Microsomal Kinetics and Reaction Phenotyping of Olanzapine Metabolism, *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 1806-1814 (2015).
- 69) Grant S., Fitton A., Risperidone. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the treatment of schizophrenia, *Drugs*, **48**, 253–273 (1994).
- 70) Yagihashi T., Mizuno M., Chino B., Sato Y., Sakuma K., Takebayashi T., Takao T., Kosaki K., Effects of the *CYP2D6*10* alleles and co-medication with CYP2D6-dependent drugs on risperidone metabolism in patients with schizophrenia, *Hum. Psychopharmacol.*, **24**, 301–308 (2009).
- 71) Jovanovic N., Bozina N., Lovric M., Medved V., Jakovljevic M., Peles A. M., The role of *CYP2D6* and *ABCB1* pharmacogenetics in drug-naive patients with first-episode schizophrenia treated with risperidone, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **66**, 1109–1117 (2010).

- 72) Novalbos J., Lopez-Rodriguez R., Roman M., Gallego-Sandin S., Ochoa D., Abad-Santos F., Effects of *CYP2D6* genotype on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of risperidone in healthy volunteers, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **30**, 504–511 (2010).
- 73) Scordo M. G., Spina E., Facciola G., Avenoso A., Johansson I., Dahl M. L., *Cytochrome P450 2D6* genotype and steady state plasma levels of risperidone and 9-hydroxyrisperidone, *Psychopharmacology (Berl.)*, **147**, 300–305 (1999).
- 74) Roh H. K., Kim C. E., Chung W. G., Park C. S., Svensson J. O., Bertilsson L., Risperidone metabolism in relation to *CYP2D6*10* allele in Korean schizophrenic patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **57**, 671–675 (2001).
- 75) Mihara K., Kondo T., Yasui-Furukori N., Suzuki A., Ishida M., Ono S., Kubota T., Iga T., Takarada Y., de Vries R., Kaneko S., Effects of various *CYP2D6* genotypes on the steady-state plasma concentrations of risperidone and its active metabolite, 9-hydroxyrisperidone, in Japanese patients with schizophrenia, *Ther. Drug Monit.*, **25**, 287–293 (2003).
- 76) Yasui-Furukori N., Mihara K., Kondo T., Kubota T., Iga T., Takarada Y., De Vries R., Kaneko S., Tateishi T., Effects of *CYP2D6* genotypes on plasma concentrations of risperidone and enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in Japanese patients with schizophrenia, *J. Clin. Pharmacol.*, **43**, 122–127 (2003).
- 77) Suzuki Y., Fukui N., Tsuneyama N., Watanabe J., Ono S., Sugai T., Saito M., Inoue Y., Someya T., Effect of the *cytochrome P450 2D6*10* allele on risperidone metabolism in Japanese psychiatric patients, *Hum. Psychopharmacol.*, **27**, 43–46 (2012).
- 78) Kang R. H., Jung S. M., Kim K. A., Lee D. K., Cho H. K., Jung B. J., Kim Y. K., Kim S. H., Han C., Lee M. S., Park J. Y., Effects of *CYP2D6* and *CYP3A5* genotypes on the plasma concentrations of risperidone and

- 9-hydroxyrisperidone in Korean schizophrenic patients, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **29**, 272–277 (2009).
- 79) Xiang Q., Zhao X., Zhou Y., Duan J. L., Cui Y. M., Effect of *CYP2D6*, *CYP3A5*, and *MDR1* genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of risperidone and its active moiety, *J. Clin. Pharmacol.*, **50**, 659–666 (2010).
- 80) Leon J., Susce M. T., Pan R. M., Wedlund P. J., Orrego M. L., Diaz F. J., A study of genetic (*CYP2D6* and *ABCB1*) and environmental (drug inhibitors and inducers) variables that may influence plasma risperidone levels, *Pharmacopsychiatry*, **40**, 93–102 (2007).
- 81) Gunes A., Spina E., Dahl M. L., Scordo M. G., *ABCB1* polymorphisms influence steady-state plasma levels of 9-hydroxyrisperidone and risperidone active moiety, *Ther. Drug Monit.*, **30**, 628–633 (2008).
- 82) Shimoda K., Someya T., Yokono A., Morita S., Hirokane G., Takahashi S., Okawa M., The impact of *CYP2C19* and *CYP2D6* genotypes on metabolism of amitriptyline in Japanese psychiatric patients, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **22**, 371–378 (2002).
- 83) Mannheimer B., von Bahr C., Pettersson H., Eliasson E., Impact of multiple inhibitors or substrates of cytochrome P450 2D6 on plasma risperidone levels in patients on polypharmacy, *Ther. Drug Monit.*, **30**, 565–569 (2008).
- 84) Croom K. F., Perry C. M., Plosker G. L., Mirtazapine: a review of its use in major depression and other psychiatric disorders, *CNS Drugs*, **23**, 427–452 (2009).
- 85) Koch H., Nanev D., Important interaction between mirtazapine and ondansetron, *Afr J Psychiatry (Johannesbg)*, **15**, 160 (2012).
- 86) Rajpurohit N., Aryal S. R., Khan M. A., Stys A. T., Stys T. P., Propafenone associated severe central nervous system and cardiovascular toxicity due to mirtazapine: a case of severe drug interaction, *S. D. Med.*, **67**, 137–139 (2014).

- 87) Loonen A. J., Doorschot C. H., Oostelbos M. C., Sitsen J. M., Lack of drug interactions between mirtazapine and risperidone in psychiatric patients: a pilot study, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **10**, 51–57 (1999).
- 88) Ruwe F. J., Smulders R. A., Kleijn H. J., Hartmans H. L., Sitsen J. M., Mirtazapine and paroxetine: a drug-drug interaction study in healthy subjects, *Hum. Psychopharmacol.*, **16**, 449–459 (2001).
- 89) Zoccali R., Muscatello M. R., Torre D. L., Malara G., Canale A., Crucitti D., D'Arrigo C., Spina E., Lack of a pharmacokinetic interaction between mirtazapine and the newer antipsychotics clozapine, risperidone and olanzapine in patients with chronic schizophrenia, *Pharmacol. Res.*, **48**, 411–414 (2003).
- 90) Brockmoller J., Meineke I., Kirchheiner J., Pharmacokinetics of mirtazapine: enantioselective effects of the *CYP2D6* ultra rapid metabolizer genotype and correlation with adverse effects, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **81**, 699–707 (2007).
- 91) Lind A. B., Reis M., Bengtsson F., Jonzier-Perey M., Powell Golay K., Ahlner J., Baumann P., Dahl M. L., Steady-state concentrations of mirtazapine, *N*-desmethyilmirtazapine, 8-hydroxymirtazapine and their enantiomers in relation to *cytochrome P450 2D6* genotype, age and smoking behaviour, *Clin. Pharmacokinet.*, **48**, 63–70 (2009).
- 92) Anderson D. T., Fritz K. L., Muto J. J., Distribution of mirtazapine (Remeron) in thirteen postmortem cases, *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 544–548 (1999).
- 93) Moore K. A., Levine B., Smith M. L., Saki S., Schames J., Smialek J. E., Tissue distribution of mirtazapine (Remeron) in postmortem cases, *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 541–543 (1999).
- 94) Jaquenoud Sirot E., Harenberg S., Vandael P., Lima C. A., Perrenoud P., Kemmerling K., Zullino D. F., Hilleret H., Crettol S., Jonzier-Perey M.,

- Golay K. P., Brocard M., Eap C. B., Baumann P., Multicenter study on the clinical effectiveness, pharmacokinetics, and pharmacogenetics of mirtazapine in depression, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **32**, 622–629 (2012).
- 95) Spina E., Scordo M. G., D'Arrigo C., Metabolic drug interactions with new psychotropic agents, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **17**, 517–538 (2003).
- 96) Carter N. J., McCormack P. L., Duloxetine: a review of its use in the treatment of generalized anxiety disorder, *CNS Drugs*, **23**, 523–541 (2009).
- 97) Timmer C. J., Paanakker J. E., Van Hal H. J. M., Pharmacokinetics of mirtazapine from orally administered tablets: influence of gender, age and treatment regimen, *Hum. Psychopharmacol.*, **11**, 497–509 (1996).
- 98) Timmer C. J., Sitsen J. M., Delbressine L. P., Clinical pharmacokinetics of mirtazapine, *Clin. Pharmacokinet.*, **38**, 461–474 (2000).
- 99) Grasmader K., Verwohlt P. L., Kuhn K. U., Dragicevic A., von Widdern O., Zobel A., Hiemke C., Rietschel M., Maier W., Jaehde U., Rao M. L., Population pharmacokinetic analysis of mirtazapine, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **60**, 473–480 (2004).
- 100) 日本イーライリリー株式会社，添付文書，ジプレキサ ザイデイス錠 (2.5, 5, 10 mg)，改訂第 12 版 (2015)。
- 101) ヤンセンファーマ株式会社，添付文書，リスパダール錠 (1, 2, 3 mg)，細粒 (1%) 改訂第 24 版 (2015)。
- 102) Meiji Seika ファルマ株式会社，添付文書，リフレックス錠 15 mg，改訂第 12 版 (2015)。
- 103) MSD 株式会社，添付文書，レメロン錠 15 mg，改訂第 9 版 (2015)。