

200400218A

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル
及び薬剤反応性遺伝子の解析

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 平塚 真弘

平成17 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル
及び薬剤反応性遺伝子の解析

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 平塚 真弘

平成17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル及び 薬剤反応性遺伝子の解析	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 5

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル及び薬剤反応性遺伝子の解析

主任研究者 平塚 真弘 東北薬科大学講師

研究要旨

本研究は、薬剤反応性遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) が代謝物発現プロファイルや副作用発現にどのように影響するかを解析し、トキシコゲノミクス及びトキシコメタボロミクスの情報をより効果的かつ安全な薬物療法に利用するために立案した。本年度は、日本人集団において、シロスタゾール代謝に影響を及ぼす薬剤反応性遺伝子の新規 SNP が存在するか否かを検討した。その結果、今回採取されたシロスタゾール投与患者由来の DNA 検体からは、CYP3A4、CYP2B6、RXR α のエクソン領域における新規 SNP は見いだされなかった。次に、シロスタゾールの体内動態を末梢血中に存在する薬剤反応性遺伝子 mRNA 量を定量することで予測可能か否かを検討した。その結果、末梢血における CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXR α 及び MDR1 の mRNA 量は血中シロスタゾール濃度、OPC-13015 濃度、OPC-13213 濃度、代謝物/親化合物比のすべてにおいて、相関性は認められなかった。よって、シロスタゾールの体内動態を今回ターゲットとした薬剤反応性遺伝子 (CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXR α 、MDR1) の異所性 mRNA 定量によって予測することは困難であると考えられた。

A. 研究目的

ある種の薬物を服用すると、副作用が発現しやすい人たちが存在する。この要因として、肝や小腸における薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) や CYP 以外の代謝酵素が遺伝的に機能低下していることが最近報告されている。したがって、ファルマコゲノミクスやトキシコゲノミクス研究は、厚生労働省が推進する医薬品の適正使用という点で、重篤な副作用発現の回避や QOL の低下防止に貢献することが期待されている。しかし、これまでに薬剤反応性遺伝子の SNP がトキシコメタボロミクスの側面

で、どのような影響を及ぼしているかを詳細に解析した例は非常に少ない。特に広範な薬物の代謝酵素として知られる CYP3A4 の機能や発現量に影響する SNP に関しては、統一した見解が得られていないのが現状である。もし、遺伝子診断や代謝物発現プロファイルの情報が副作用発現予測に応用できるなら、より安全かつ効果的な薬物療法が行われ、国民医療に貢献できると考えられる。

本研究では CYP3A4 の基質薬物である抗血小板薬シロスタゾールをモデル薬物として、その代謝物プロファイルや副作用発現に影響

を及ぼす薬剤反応性遺伝子の SNP 解析及び異所性 mRNA 定量解析を行う。このことにより、CYP3A4 で代謝される薬物の体内動態がどのような因子により影響を受けるかが明らかとなり、薬剤効果や副作用発現予測を支援できるものとする。

そこで、本年度は研究の最終年度として、シロスタゾール投与患者において、同薬物の代謝に影響を及ぼす薬剤反応性遺伝子 (CYP3A4、CYP2B6、RXR α) の新規 SNP が存在するか否かを検討した。また、シロスタゾールの体内動態を末梢血 (白血球) 中に存在する薬剤反応性遺伝子 (CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXR α 、MDR1) mRNA 量を定量することで予測可能か否かを検討した。

B. 研究方法

(1) 薬剤反応性遺伝子の新規 SNP スクリーニング

日本人集団において、シロスタゾール代謝に影響を及ぼす薬剤反応性遺伝子の新規 SNP が存在するか否かを検討した。シロスタゾール投与患者 47 名のゲノム DNA を鋳型として、CYP3A4、CYP2B6、RXR α のエキソン領域における新規 SNP をダイレクトシーケンシング法および Denaturing HPLC 法によりスクリーニングした。また、対象群として健常人ボランティア 200 名のゲノム DNA を用い、同様の検討を行った。

(2) シロスタゾールの体内動態と異所性 mRNA 発現の相関解析

シロスタゾール 100mg を 1 日 2 回、1 週間以上服用し、薬物血中濃度が定常状態となっている患者の末梢血を採取した。採血ポイントは早朝薬物投与前のトラフレベルとした。末梢血から常法に従い総 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法により、CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXR α 及び MDR1 の mRNA 量を定量した。なお、各遺伝子の mRNA の定量値は、それぞれの遺伝子を cDNA クローニングし、プラスミドに挿入したもののコピー数より検量線を作成し求めた。また、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH mRNA 量を定量し、検体間の RNA 収率や cDNA 合成効率を補正した。それらの異所性 mRNA 量を血中のシロスタゾール濃度、主要代謝物 OPC-13015 及び OPC-13213 濃度、代謝物/親化合物比との間で統計学的解析を行い、相関性の有無を評価した。

(倫理面への配慮)

今回の研究プロトコールは本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、東北薬科大学倫理委員会及び東北大学医学部倫理委員会に申請・承認された課題名「薬剤反応性遺伝子の多型性が薬効及び薬物動態に与える影響」に従って実施された。今回使用するサンプルは、東北大学医学部附属病院受診患者及び健常人ボランティアに対し、研究内容の十分な説明を行い、書面による同意 (インフォームドコンセント) が得られたものを用いた。説明と同意は東北大学医学部附属病院における研究協力者の医師 (佐

藤成、秋元弘治)又は薬剤師(菱沼隆則、岸川幸生)によって行われた。研究対象者に対する人権擁護上の配慮をするにあたり、すべてのサンプルは連結可能あるいは不可能匿名化を行い、一切の個人情報が漏洩しないようにした。

C. 研究結果

(1) 薬剤反応性遺伝子の新規SNPスクリーニング

今回採取されたシロスタゾール投与患者由来のDNA検体からは、CYP3A4、CYP2B6、RXR α のエキソン領域において、平成14及び15年度に解析済みの既知SNPは多数検出されたが、新規SNPは見いだされなかった。しかし、対照群として用いた健常人ボランティアの検体より、CYP2B6のアミノ酸置換を伴う新規SNPを3種(1375A>G (Met459Val)、1427G>A (Gly476Asp)、1454A>T (Gln485Leu))を見いだした。

(2) シロスタゾールの体内動態と異所性 mRNA 発現の相関解析

末梢血における CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXR α 及びMDR1 の mRNA 量は血中シロスタゾール濃度、OPC-13015 濃度、OPC-13213 濃度、代謝物/親化合物比のすべてにおいて、相関性は認められなかった。図に各遺伝子を代表して、末梢血中 CYP3A4 mRNA 値とシロスタゾール濃度、OPC-13015 濃度あるいは代謝比(OPC-13015 濃度/シロスタゾール濃度比)の相関関係を示した。

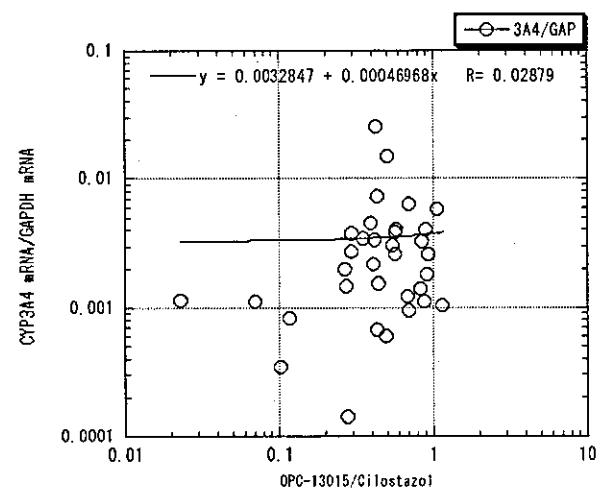
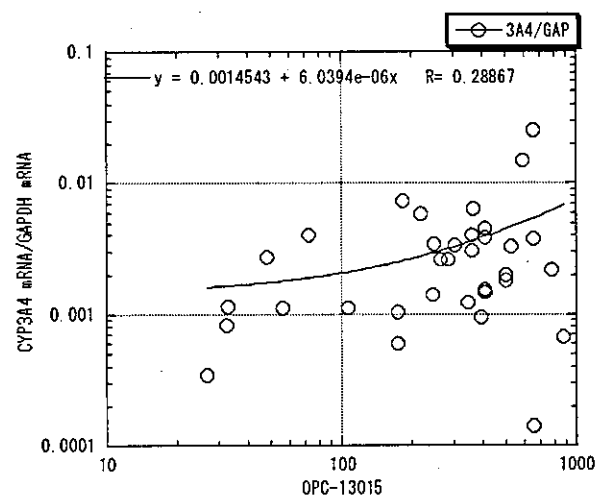
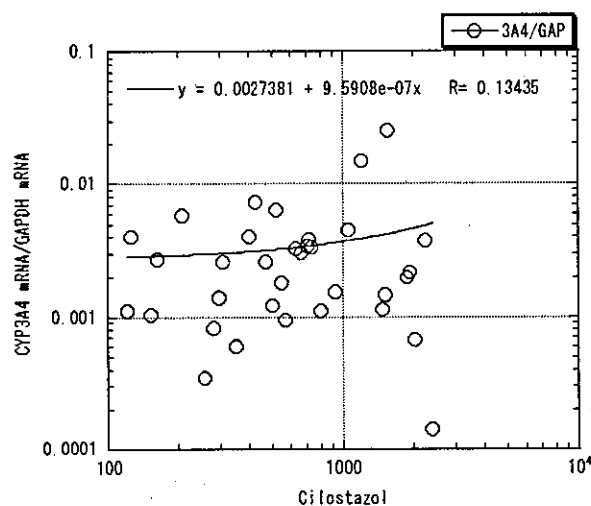


図. 末梢血中CYP3A4 mRNA量 vs シロスタゾール濃度、OPC-13015濃度、代謝比 (OPC-13015/シロスタゾール)

D. 考察

今回の検討により、シロスタゾールの体内動態を今回ターゲットとした薬剤反応性遺伝子

(CYP3A4、CYP3A5、CYP2B6、RXR α)の異所性 mRNA 定量によって予測することは困難であると考えられた。つまり、本プロジェクトの前年次までの結果と総合すると、少なくともシロスタゾール及び主要代謝物の体内動態に関して、CYP3A4 自体の遺伝子多型や異所性 CYP3A4 mRNA 量を調べるよりも、CYP3A4 の発現調節に関与する遺伝子 (RXR α や HNF4) や CYP2B6 の多型をサロゲートマーカーとする方が患者個々の薬物動態予測につながることを示唆された。今回、このようなデータが得られたことは、今後、「どの医薬品の薬物動態あるいは副作用発現はどの遺伝子のどの SNP あるいは異所性 mRNA で予測可能か」を明確にする上でも非常に有益であり、社会的意義が大きいと言える。現在、副作用回避を目的としたトキシコゲノミクスやファルマコゲノミクス研究は、テーラーメイド医療が展開されていく中で、非常に重要な位置を占めると考えられる。したがって今後は、今回行ったような研究スタイルをベースに、さらに解析対象患者数、医薬品数、解析遺伝子数等を増すことによって、より精度の高い薬剤反応性及び副作用発現予測システムが構築され、国民医療に貢献できることが期待される。

E. 結論

抗血小板薬シロスタゾール投与患者47名のDNA検体からは、同薬剤の体内動態に影響を及ぼすと考えられる薬剤反応性遺伝子

(CYP3A4、CYP2B6、RXR α)の新規SNPは検出されなかった。また、末梢血中CYP3A4 mRNA量を薬物動態予測や副作用発現予測のサロゲートマーカーとして用いることは非常に困難であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masahiro Hiratsuka, Yudai Hinai, Yumiko Konno, Hisayoshi Nozawa, Shoetsu Konno, Michinao Mizugaki.

Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2B6 gene in Japanese individuals.

Drug Metab. Pharmacokinet., 19 (2), 155-158 (2004)

2. 学会発表

日本人におけるCYP2B6遺伝子のアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型

比内雄大、平塚真弘、伊藤慶彦、佐々木崇光、金野由美子、水柿道直、日本薬学会第125年会、東京都、2005年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masahiro Hiratsuka, Yudai Hinai, Yumiko Konno, Hisayoshi Nozawa, Shoetsu Konno, Michinao Mizugaki	Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the <i>CYP2B6</i> gene in Japanese individuals.	Drug Metabol. Pharmacokin.	19 (2),	155-158	(2004)

SNP Communication

Three Novel Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the CYP2B6 Gene in Japanese Individuals

Masahiro HIRATSUKA¹, Yudai HINAI¹, Yumiko KONNO¹, Hisayoshi NOZAWA^{1,2},
Shoetsu KONNO³ and Michinao MIZUGAKI^{1,*}

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

²Department of Pharmacy, NTT East Tohoku Hospital, Sendai, Japan

³Department of Pharmacy, Hoshi General Hospital, Koriyama, Japan

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

Summary: We sequenced all exons and exon-intron junctions of the *CYP2B6* gene from 200 Japanese individuals. We found three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) (1375A>G, 1427G>A and 1454A>T) causing amino acid substitutions (Met⁴⁵⁹Val, Gly⁴⁷⁶Asp and Gln⁴⁸⁵Leu in exon 9), respectively.

The detected SNP was as follows:

- 1) SNP, 031226Hiratsuka01; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CAGAACTTCTCCA/GTGGCCAGCCCCG-3'.
- 2) SNP, 031226Hiratsuka02; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CCCAGGAGTGTGG/ATGTGGGCAAAT-3'.
- 3) SNP, 031226Hiratsuka03; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CCCCAACATACCA/TGATCCGCTTCT-3'.

Key words: CYP2B6; genetic polymorphism; Japanese

Introduction

CYP2B6 is involved in the metabolism of clinically important drugs; including cyclophosphamide,¹⁾ ifosfamide,²⁾ bupropion,^{3,4)} tamoxifen,⁵⁾ and diazepam.⁶⁾ The capacity of the activation has been reported to vary among individuals from four to nine times. Recent publications indicate that the extensive interindividual variability of CYP2B6 expression and function is due not only to regulatory phenomena, but also to a common genetic polymorphism.⁷⁾ In addition to the wild-type allele *CYP2B6*1*, to date there are eight variants, designated *CYP2B6*2* (64C>T), *CYP2B6*3* (777C>A), *CYP2B6*4* (785A>G), *CYP2B6*5* (1459C>T), *CYP2B6*6* (516G>T and 785A>G), *CYP2B6*7* (516G>T, 785A>G and 1459C>T),

*CYP2B6*8* (415A>G), and *CYP2B6*9* (516G>T) (see <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>).^{7,8)} Recently, we have reported allele frequencies for *CYP2B6*2-7* in 256 Japanese subjects using genotyping methods.⁹⁾ In this study, we sequenced all exons and exon-intron junctions of the *CYP2B6* gene from 200 Japanese individuals. We identified three novel SNPs of the *CYP2B6* gene.

Materials and Methods

Venous blood was obtained from 200 unrelated Japanese volunteers of Tohoku University Hospital. The local Ethics Committee of Tohoku University Hospital and Tohoku Pharmaceutical University approved the study and written, informed consent was obtained from all blood donors. DNA was isolated from anticoagulated (with K₂EDTA) peripheral blood using a DNA Extractor WB-Rapid Kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) or a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

Table 1 lists the primer pairs (PCR) used to amplify

On December 26, 2003, the SNP did not appear either in the "Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee database (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>)" or the "JSNPs database (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)".

Received; December 20, 2003, Accepted; January 17, 2004

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

Table 1. Primers used for amplification and sequencing of the *CYP2B6* gene

Exon	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Annealing Temp. (°C)	Note
Exon 1	ccacacaccacacattcactgtctcaact gcagggtcaggataaaaggcccagttggag	tgtttgggaagcttcccagaagtaaccaagg	60.0	PCR and sequence sequence
Exons 2-3 Exon 2	taaccattaacccttaattgctgggtccca	cagtttctgtctgtctgtctgtgcctta cccagtgccctctgaggctct	65.0	PCR and sequence sequence
Exon 4	gcctctcgggtctgccctctataaac	tgttctgggtgttcacctacccccacacc	60.0	PCR and sequence
Exon 5-6 Exon 5 Exon 6	aaaagtatgagaaagacaataaacaggct caccaccctctcttctctgc acggagggcagccaggagatggcgctata	tagccccatttctgcagctcagaaggaggt ccttttctctctccagacc	64.3	PCR and sequence sequence sequence
Exon 7-8 Exon 8	gaaatgcctctttaaagatgagattcattgg ccggctggaaccocatagccctcctgttt	tctcgttgttttctcaagttggggatagt	60.0	PCR and sequence sequence
Exon 9	cttatgcaaatctgttcagtgacatttg agagcgaagtgtatgcacct	taatctcactctgcactcacttgcattgt agagccattgtctacagagg	60.0	PCR and sequence sequence

CYP2B6 exons. These primers were designed based on the genomic sequence reported in the Genbank with accession number: AC023172. Amplicons for exons 1, 4, 7-8, and 9 were generated with the AmpliTaq Gold PCR Master Mix by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). The PCR reactions proceeded using a BIO-RAD iCycler (Hercules, CA, USA). The thermal profile consisted of denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing for 30 seconds, extension at 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes. The annealing temperatures are indicated in Table 1. Amplicons for exons 2-3 were generated with the LA-Taq DNA polymerase by TaKaRa Co. (Kyoto, Japan). The thermal profile consisted of denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 65°C for 60 seconds, extension at 72°C for 90 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes. Amplicons for exons 5-6 were generated with the Ex-Taq DNA polymerase by TaKaRa Co. (Kyoto, Japan). The thermal profile consisted of denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 64.3°C for 60 seconds, extension at 72°C for 90 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

Sequences were determined using the CEQ8000® automated DNA sequencer (Beckman-Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). The PCR products were sequenced by the fluorescent dideoxy termination reaction method using the DTCS DNA Sequencing Kit (Beckman-Coulter Inc.) according to manufacturer's instructions with the primers (sequence) listed in Table 1.

Results and Discussion

We found three novel SNPs as follows:

- 1) SNP, 031226Hiratsuka01; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CAGAACTTCTCCA/GTGGC-CAGCCCCG-3'.
- 2) SNP, 031226Hiratsuka02; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CCCAGGAGTGTGG/ATGT-GGGCAAAT-3'.
- 3) SNP, 031226Hiratsuka03; GENE NAME, *CYP2B6*; ACCESSION NUMBER, AC023172; LENGTH, 25 base; 5'-CCCCAACATACCA/TGAT-CCGCTTCT-3'.

The electropherograms of the novel SNPs are shown in Fig. 1. The positions of these SNPs were 459 (031226Hiratsuka01), 476 (031226Hiratsuka02), and 485 (031226Hiratsuka03) in exon 9. All of the SNPs were heterozygous, and their frequencies were 0.0075 for 031226Hiratsuka01, 0.005 for 031226Hiratsuka02, and 0.0025 for 031226Hiratsuka03 in the Japanese population. Sequences from each sample were obtained from at least three different PCR amplifications.

Ariyoshi *et al.* have reported that the 516G>T (Gln¹⁷²His) mutation enhances 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity of the *CYP2B6* enzyme in an *in vitro* assay.¹⁰ Further, Jinno *et al.* have also reported that compared with *CYP2B6*1*, the alleles *CYP2B6*4* (Lys²⁶²Arg), *CYP2B6*5* (Arg⁴⁸⁷Cys), *CYP2B6*6* (Gln¹⁷²His; Lys²⁶²Arg), and *CYP2B6*7* (Gln¹⁷²His; Lys²⁶²Arg; Arg⁴⁸⁷Cys) are associated with a higher intrinsic clearance of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin.¹¹ Xie *et al.* have reported that the *CYP2B6*6* carriers has significantly higher cyclophosphamide 4-hydroxylation.¹² In contrast Lang *et al.* have reported that

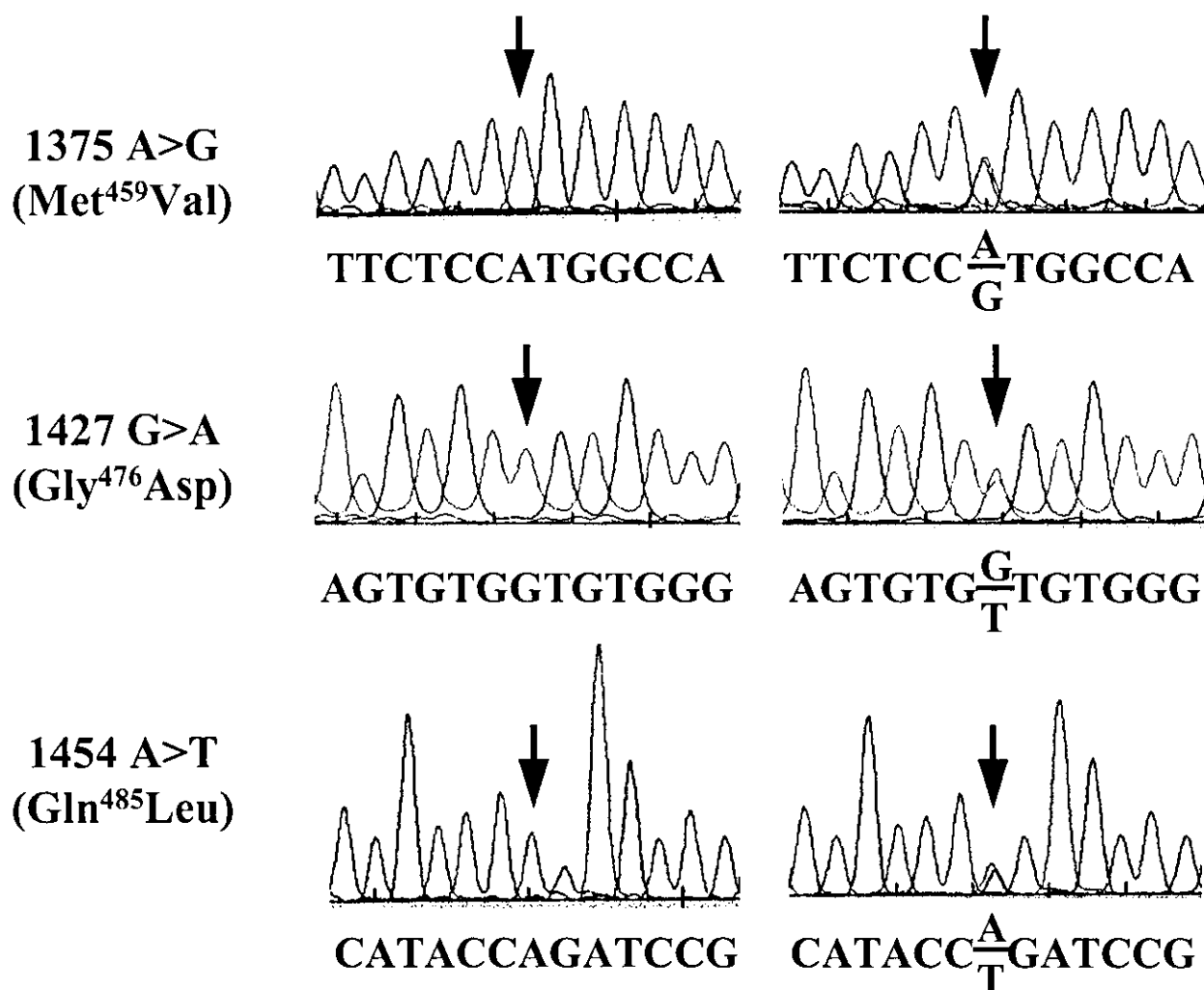


Fig. 1. The nucleotide sequences of the *CYP2B6* gene at exon 9. The sequences are shown for sense strands. Arrows indicate the variant nucleotide positions.

significantly reduced *CYP2B6* protein expression and S-mephenytoin N-demethylase activity were found in carriers of the 1459C>T (Arg⁴⁸⁷Cys) mutation (alleles *CYP2B6**5 and *CYP2B6**7).⁷⁾ Furthermore, it has been reported that the 1459C>T (Arg⁴⁸⁷Cys) are associated with the lowest level of *CYP2B6* activity in livers of females.⁸⁾ The 1459C>T SNP in exon 9 are closely located in the substrate recognition site.¹³⁾ These three SNPs in this study are also located in the site. In particular, the Gly476 is conserved in the CYP2 family.¹³⁾ Thus, these amino acid substitutions are expected to alter the catalytic properties of the *CYP2B6*.

Acknowledgements: This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Research on Advanced Medical Technology from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- 1) Chang, T. K., Weber, G. F., Crespi, C. L. and Waxman, D. J.: Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer. Res.*, **53**: 5629-5637 (1993).
- 2) Granvil, C. P., Madan, A., Sharkawi, M., Parkinson, A. and Wainer, I. W.: Role of *CYP2B6* and *CYP3A4* in the *in vitro* N-dechloroethylation of (R)- and (S)-ifosfamide in human liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.*, **27**: 533-541 (1999).
- 3) Hesse, L. M., Venkatakrisnan, K., Court, M. H., Von Moltke, L. L., Duan, S. X., Shader, R. I. and Greenblatt, D. J.: *CYP2B6* mediates the *in vitro* hydroxylation of bupropion: Potential drug interactions with other antidepressants. *Drug. Metab. Dispos.*, **28**: 1176-1183 (2000).
- 4) Faucette, S. R., Hawke, R. L., Lecluyse, E. L., Shord, S. S., Yan, B. F., Laethem, R. M. and Lindley, C. M.: Validation of bupropion hydroxylation as a selective

- marker of human cytochrome P4502B6 catalytic activity. *Drug. Metab. Dispos.*, **28**: 1222-1230 (2000).
- 5) White, I. N., De Matteis, F., Gibbs, A. H., Lim, C. K., Wolf, C. R., Henderson, C. and Smith, L. L.: Species differences in the covalent binding of [¹⁴C]tamoxifen to liver microsomes and the forms of cytochrome P450 involved. *Biochem. Pharmacol.*, **49**: 1035-1042 (1995).
 - 6) Ono, S., Hatanaka, T., Miyazawa, S., Tsutsui, M., Aoyama, T., Gonzalez, F. J. and Satoh, T.: Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP2B6, 2C19 and the 3A subfamily. *Xenobiotica*, **26**: 1155-1166 (1996).
 - 7) Lang, T., Klein, K., Fischer, J., Nussler, A. K., Neuhaus, P., Hofmann, U., Eichelbaum, M., Schwab, M. and Zanger, U. M.: Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*, **11**: 399-415 (2001).
 - 8) Lamba, V., Lamba, J., Yasuda, K., Strom, S., Davila, J., Hancock, M. L., Fackenthal, J. D., Rogan, P. K., Ring, B., Wrighton, S. A. and Schuetz, E. G.: Hepatic CYP2B6 expression: Gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**: 906-922 (2003).
 - 9) Hiratsuka, M., Takekuma, Y., Endo, N., Narahara, K., Hamdy, S. I., Kishikawa, Y., Matsuura, M., Agatsuma, Y., Inoue, T. and Mizugaki, M.: Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **58**: 417-421 (2002).
 - 10) Ariyoshi, N., Miyazaki, M., Toide, K., Sawamura, Y. and Kamataki, T.: A single nucleotide polymorphism of CYP2B6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**: 1256-1260 (2001).
 - 11) Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Ohno, A., Makino, Y., Matsushima, E., Hanioka, N. and Ando, M.: Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug. Metab. Dispos.*, **31**: 398-403 (2003).
 - 12) Xie, H.-J., Yasar, U., Lundgren, S., Giskevicius, L., Terelius, Y., Hassan, M. and Rane, A.: Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J.*, **3**: 53-61 (2003).
 - 13) Lewis, D. F. V.: The CYP2 family: models, mutants and interactions. *Xenobiotica*, **28**: 617-661 (1998).