

として「ファーマコゲノミクスの合理的使用のための医薬品開発と医薬品行政のあり方に関する研究」がはじまりました。私が主任研究者をしています。この研究班ではこのテーマに関係する人をお呼びして講演などをしてもらっています。

表2は、千葉大学の広井良典先生に来ていただいたときに紹介されたもので、1998年に「医療と社会」誌に発表されたものです。横軸に「技術革新のフロー」として、基礎研究と臨床、ここで臨床はさらに臨床研究と採用・普及・標準化に分かれます。縦軸は「政策の各局面」として、推進、評価、規制です。

		→ 技術革新のフロー	
↓ 政策の各局面		基礎研究 (laboratory)	臨床
			臨床研究 採用・普及・標準化
	推進	・基礎研究支援 ・技術移転政策	・臨床研究の位置づけの明確化 ・医療保険への導入(含高度先進医療)等
	評価	・研究費配分システムや医療資源配分のあり方	・有効性、経済性等の評価研究 ・診療ガイドライン、成果研究等
規制	・研究規制(ex. ヒト遺伝子研究)	・臨床治験、遺伝子治験～臨床研究全般の規制 ・医療計画を通じた普及規制等	

出典：広井良典. 医学・生命科学研究のあり方と経済. 医療と社会 1998; 7(4): 37-51

表2 医療技術政策の全体的なフレーム

この表は1998年に作成されたもので2001年のヒトゲノムシーケンスのドラフト完成というニュースの前です。現在の2003年の時点では若干ずれていると思われるところもありますが、たいへん分かりやすくまとめられた表だと思います。

政策としての「推進」では、基礎研究支援と技術移転政策、臨床研究では位置づけの明確化、最後に医療保険の導入となっています。PGxは基礎研究や臨床研究の段階で、まだ医療保険の導入にまではいっていません。私はPGxという新技術が世の中に登場し、それは各方面に関係する技術であり、そのような場合には早い時期に各方面でディスカスしておくべきではないかと考え、今回のシンポジウムを企画し、鎌滝先生と相談しながら人選を進めました。

政策の局面としての「規制」に、例としてヒト遺伝子研究とあります。ここでは個人情報や倫理に関係した「規制」という意味です。この「規制」という用語に関してですが、現在はレギュラトリーサイエンスという言葉も日本では使われ、それはトップダウン式の上からコントロールするというだけでなく、水平型の「調整」という意味合いも入ってくるのですが、ここでは後者の意味は入ってないようです。

5つのクエスチョン

問題を明確にするためにクエスチョンの形でお話しすると分かりやすいと思います。

(1) クエスチョン1：臨床試験での患者数

まず患者数です。表3に示します。一体、Pharmacogenetic test (PGx test) を行うと、臨床試験での患者の数は減るのでしょうか？

ここで、しばしば有効性のみを考えがちですが、有効性と安全性の両方を考えなければいけません。世の中に出る前には一定の安全性が保証されないといけないのです。

また患者数は、臨床開発のどの相での患者数か、と分けて考える必要があります。

さらに、すでに世の中に出ている薬についての臨床試験、表ではstudy/trialと両方を示しました。広い意味での臨床研究も含んでいます。開発段階における患者数とは意味が違ってきます。先のCIOMS Reportの構成案での(8)既存治療の改善に対応し

表3 Questions to address 1 : number of patients

<ul style="list-style-type: none"> • By using PGx test, will the number of patient in clinical trial be reduced ? • How about safety ? • How about in different phase ? • How about in post marketing stage study/ trial ?
--

ます。

(2) クエスチョン 2 : レスポンダーとノンレスポナー

2つ目のクエスチョンは, outcomeに関して, responder, non-responderの話です。表4に示します。PGx testによってNNTは減るのでしょうか? NNTとは (Number Needed to Treat), 治療必要症例数とも訳します。ある1人にイベントを得るのに, あと何人治療が必要かを表します。NNTは少ないほうがよく, NNT=1がベストです。NNTが1とは, 目の前の患者に治療して必ず意味があるということです。現在の治療は生活習慣病に対するものが多くなり, NNTが100, 1000またそれ以上になることもあります。

一方, NNS (Number Needed to Screen), PGx testを行うことによって薬剤による副作用を予防できるとすると, 1人の副作用を予防するのに何人にスクリーニングが必要かを表します。NNH (Number Needed to Harm), これは害をなすほうで, 1人の患者に副作用を起こさせるのに何人治療するかです。NNSとNNHは似ていますが異なる概念です。

ここでNNT値が100から10になった, 10から2になったとしても実際にはバラツキがあります。先ほど野中さんのプレゼンテーションの中でも信頼区間 (confidence interval: CI) が出てきていました。

統計の基本は, バイアス (bias) とバラツキ (variation) です。バラツキを論ずるならば, バイアスについても当然目を向けるべきです。臨床試験・臨床研究で得られるデータには, バイアスの可能性があります。そこでつぎのクエスチョンになります。

(3) クエスチョン 3 : バイアス

PGx testを用いた研究の結果は正確 (accurate) なのかと問う必要があります。正確さ (accuracy) は, EBMの用語でいうとエビデンスの質のgradeとも称しますが, それは研究デザインに主たる基礎をおくものです。表5に示します。

CIOMS WGの薬剤経済学のトピックの議論においてもこの研究デザインが出てきました。薬剤経済学は「効き目」と「コスト」の双方を考えますが, 研究デザインへの対応は基本的に臨床研究と同じです。

CIOMS WGでの議論で出てきたいくつかの研究デザインについて説明しましょう。

図1は一番シンプルなデザインです。Target Populationを, PGx testをする群と, しない群に分けます。した群で結果がpositiveの人には治療して, マイナスの人には治療しません。その結果を, PGx testをしないでそのまま治療する群をcontrolとして用い比較します。ここで2群を構成する時にrandomizeするのがバイアスを避けるうえでは理想的ですが, それが可能でacceptされるかどうかは, 倫理や文化的要素が関係します。

図2は図1をもう少し詳しく描いたものです。PGx testを行いpoor metabolizer (PM) には通常量 (average dose), extensive metabolizer (EM) には高用量 (high dose) を投与します。

表4 Q2: responder / non-responder

-
- **What will the reduction of NNT (number needed to treat)?**
 - **How about NNS? (number needed to screen)?**
 - **How about its variation (CI)?**
-

表5 Questions 3: bias

-
- **Is it accurate?**
 - **How about study design?**
-

有効性 (efficacy : E) で効く人と効かない人がいると同様に, ある割合で有害事象 (adverse event : AE) も 出てきますので, 図のような tree が描けます。下部の arm は PGx test をしない群です。

図 3 は, 有害事象 (adverse event) を低減することを主目的としたものです。PGx test が positive の人には投与しないというデザインです。

図 4 は, まず Target Population 全員に PGx test をするところから始まります。そして positive な人のみを対象にし, 2 群に分け, 治療する群と治療しない群にわけます。そして長期のエンドポイントで見ましようというものです。

図 5 は, 2 種類の PGx test があり, その評価をしようというデザインです。先ほどの野中明日香さんの話はこれにあります。Target Population を 2 群に分け 2 種の test を行います。各 test で positive, negative の割合がそれぞれことになってきます。Positive な人に治療をして, その結果を比較しようというものです。先と同じで, 有害事象を含んでデザインすることも出来ます。

これまでの, 有効性と安全性というヘルスアウトカムについて述べてきましたが, それぞれの node でのコストを考慮して arm ごとに集計し, 2 群のヘルスアウトカムの差分と, コストの差分を出して, そのバランスを計算すると, 費用対効果 (cost-effectiveness) となり「効率」(efficiency) をみる薬剤経済学的分析 (pharmacoeconomics study) が出来あがります。

では日本ではどういうデザインの研究がなされているのでしょうか? デザインによって先のエビデンスの質が異なり, 臨床的な意味合いが違ってきます。昨2002年の大阪での日本臨床薬理学会年会で, 英国の University of Sheffield の G.T.Tucker 先生が “Genetic variability in cytochromes P450 – How good is the evidence for clinical relevance?” と題して招待講演をされましたが, 表 6 は, 彼の考えもいっぺん入れて研究デザインを 9 種に分類したものです。

2002年の学会の抄録と学会誌に載った長めの proceeding には PGx test を用いたものが 16 編入

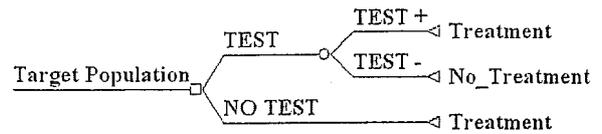


図 1 Cost-effectiveness Study design for patient screening using PGx test identifying responder patients

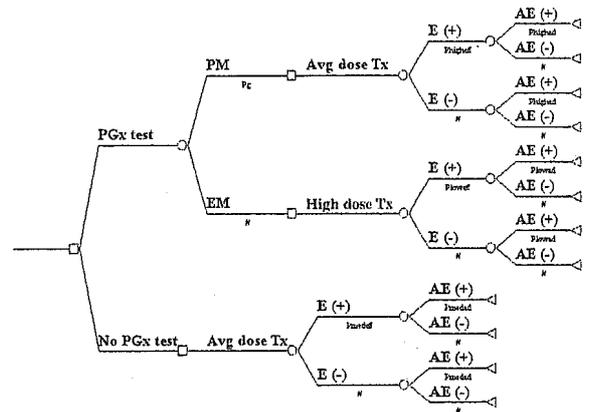


図 2 Study design for Patient screening using PGx test identifying PM/EM

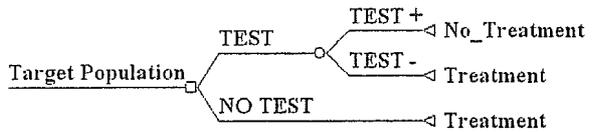


図 3 Study design for patient screening using PGx test identifying high risk of adverse events

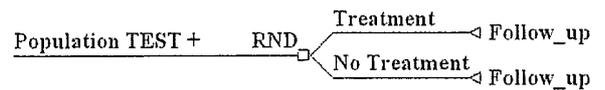


図 4 Long term study design in responder patients (Test +)

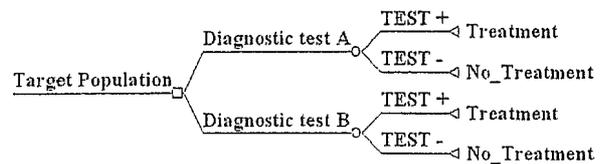


図 5 Prospective study design to assess Diagnostic test properties

りました。それが9種のどこに入るかを判断しました。

(1)case reportは1例もしくは少数例の報告、これは0編です。(2)PK studyは9編、(3)PK/PD studyは3編、(4)Cross-sectional Studyはある時間の断面で切ったstudyで0編。(5) Retrospective clinical analysis, 有害事象のある人とない人の背景を見る、あるいは改善した人の背景を見るといったもので4編。(6)Cohort Study, (7)Prospective Clinical Trial, ここではrandomizeするしないかという話がでてきます。(8)Pharmacoeconomics Assessment, 経済評価, (9)Development of PGx diagnosis/test検査法の開発, ということです。(6)から(9)まではいずれも0編です。

まとめますと、2002年の日本臨床薬理学会年会では、PK studyが一番多く、PK/PD studyとretrospectiveな解析が若干あるということで、前向きなデザインはありません。

また企業スポンサーのものはありません。ただしまだ調べていませんが他の学会の発表には存在するかもしれません。

エビデンスの質は、上記の研究デザインだけではなく、実際のstudyがどの程度しっかりなされたかにもよります。治験であれば表7に示すようなモニタリングやオーデッティングがあり、quality control (QC), quality assurance (QA) がなされていますが、治験ではないもの、最近は研究者主導型とか医師主導型臨床試験といいますが、そういったシステムを使わないものが多いのです。

先ほど佐藤大作先生の話で、一定のverificationがないといけないとされました。どのレベルであれば世の中に出してよいか、という判断にこれらが必要になるのです。

またパブリケーションバイアスという問題があります。個々のスタディの質だけではなく、あるresearch questionに対して研究がなされた時、よい結果しか発表されないということがあり得ます。このパブリケーションバイアスを避けるのに一番よいのは、臨床試験の登録制というものです。世界的にいくつかの試みがありますが、なかなか理想的にはいきません。

PGx testでresponderが区別できるのにその結果が公表されないことは、それが有害事象の予防に使えるときには大きな問題です。また有効性についてもそうです。私は研究班の活動として、現在、図6に示すようなwebサイトを作りました。まだアルファ・バージョンですが、スタディの名前、研究デザイン、疾患名、サンプルサイズ、この4項目だけ入れていただくというものです。なるべく簡単にしました。あとはどこへコンタクトするかというものです。

表6 Grade of evidence—study design

JSCPT 2002	
1. Case Report	0
2. PK Study	9
3. PK-PD Study	3
4. Cross-sectional Study	0
5. Retrospective Clinical Analysis	4
6. Cohort Study	0
7. Prospective Clinical trial	0
8. Pharmacoeconomics Assessment	0
9. Development of PGx diagnosis/test	0
total	16

表7 QC/QA & Publication bias

- Quality control/
quality assurance
- Publication bias

図6 Registration of clinical trials using pharmacogenetics in Japan (PGxJ) (alpha version)

このシステムは“Registration of clinical trials using pharmacogenetics in Japan” (PGxJ) と呼ぼうかと思っています。しかしこの話を知り合いの研究者や企業の方に話すと、「うーん」と唸って、積極的にやろうという人はあまりおりません。それもよく分かります。

本日の私の話は「ファーマコジェネティクスとインセンティブ」としたのですが、この登録制を用いることになにかインセンティブを与えることはできないかと考えています。皆さん、何か知恵があったらお貸しいただきたいです。

作って公開したのはよいけどあまり登録がないというのも困りますので、このプロジェクトは慎重に進める予定です。

以上が、PGx testを用いたときの、バイアスの防止、正確度 (accuracy) を高めることに関しての議論です。

(4) クエスチョン4：支払い

4番目のクエスチョンは、一体誰がこういった検査に要するお金を払うかということです。表8に示します。税金か、insurance companyか。ここでは広い意味での公的な保険者も含まれます。あるいは患者が自分で払うのです。

またPGx testは薬物の予防投与にも用いられます。発症しない健康な状態で使われるのです。そういった時にはどこが払うかということも考えるべきです。

これは、国によって社会保障のシステムが異なるので、共通の解は出ません。それぞれの国が慎重に考えるべきです。

(5) クエスチョン5：コスト

では、一体それはどういうコストについて払っているのでしょうか？。これが最後の5つ目のクエスチョンです。表9に示します。

ここでまず直接と間接とに分けます。薬の価格、検査の価格、PGxの情報をどこかのデータベースに蓄積して必要なときに引き出す、そのためのコスト、あるいはICカードなどで個人が管理する方法もあります。

一方では、PGxによってコストの削減ができます。不必要で不適切な薬の使用を減らすことができます。あるいは副作用によって生じる時間や経費も軽減することができます。“try and error”つまりある薬を使ってよくなるから他のものにしてみようではなく、最初から適切な薬剤を適切な量で使うことができ、医療機関の訪問を少なく出来る。

また間接費用として、PGxによってsick leaveなどが減り、労働生産性が向上し間接コストを下げることもあるでしょう。

ダイナミズムとインセンティブ

こうした医療技術を考える時には、基本的に3Eを考えろといえます。表10に示します。第1

表8 Q4: Payment

-
- **Who should pay PGx test in “disease” condition ? Tax, insurance company, or patient ?**

 - **Who should pay PGx test in “healthy” condition ? Tax, insurance company, or public ?**
-

表9 Q5 Cost for what ?

-
- **Direct cost**
 - Drug cost**
 - Pharmacogenetic test**
 - Cost for data storage and retrieval**
 - Cost saving**
 - unnecessary and inadequate drug use**
 - time and expense for treatment of ADR**
 - number of clinic visit, instead of “try and see”**
 - **Indirect cost**
 - sick leave**
-

に Effectiveness, 効果です。ここでは広い意味での安全性も含みます。第2に Efficiency, 効率です。先の費用対効果です。第3に Equity, 公平です。あとへいくほど、その国のヘルスサービスシステムとの関係が強くなり、また各国の文化や価値観が反映されます。

この3Eだけでなく、PGxには産業育成という意味もあります。すなわち「ダイナミズム」が必要だとも考えています。

また別の見方として、医療技術に対する2つのアプローチがあると思われます。表11に示します。1つは強制的 (coercitive)。CIOMS WGのメンバーで、私と一緒に pharmacoconomics を担当しているのはフランス人ですが、彼は難しい英語を使います。彼と議論すると、強圧的にコントロールするやり方だけではなく、むしろ刺激的 (incitative) つまりインセンティブを与えながら物事を動かしていくというやり方があり、こちらを使うべきではないかというのです。確かにそれもそうで、私も考えているところです。

HS財団によるアンケート調査

HS財団の遺伝子・ゲノム関連のワーキンググループは、1998年度から情報収集・分析の活動を行っています。経緯を表12に示します。2002年度に『ゲノム科学の臨床応用に向けて』という報告書を出しています。HSレポート・41というものです。この中でアンケート調査を行っています。表13に示します。53社から回答を得ています。HS財団のメンバーは、基本的に内資系の製薬会社が多いのですが、解析対象になった会社の中には診断用機器メーカーも7社あります。

この調査から、本日のテーマに近いクエスチョンを、いくつか取り上げて紹介したいと思います。

図7のQ16は、「現在開発中の薬物で、レトロスペクティブに特定遺伝子型との関連を調査した成績の取り扱いについて、申請にあたっての要望はありますか。添付文書への汎用にあたり、規制当局はプロスペクティブ試験を要求するという観測があります。」というものです。ここでは、「プロスペクティブ試験」がきちんとは定義がされていませんが、先ほど言ったように control を持つのか、control を持ったらランダム化するかという話もでてくるはずのもので

表10 3 Es and ...

- Effectiveness
- Efficiency
- Equity
- Dynamism

表11 2つのアプローチ

- 強制的(coercitive)
- 刺激的(incitative)

表12 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
遺伝子・ゲノム関連調査報告書

1998年度 ゲノム創薬—現状と展望—
1999年度 ファーマコゲノミクス—臨床応用への展開—
2000年度 ゲノム医療—ファーマコプロテオミクスに向けて—
2001年度 ゲノム医療・創薬におけるインフォマティクスの動向
—バイオインフォマティクス、
—ケモインフォマティクス、システム生物学—
2001年度 規制動向調査報告書
—ゲノム科学の進展と医薬品開発環境の変化—
2002年度 ゲノム科学の臨床応用に向けて
2003年度 (仮称)ゲノム創薬最前線
—評価系を中心に先端科学技術の応用による可能性
を探る—

表13 製薬企業におけるゲノム情報を用いた臨床開発の課題—アンケート調査結果より

- 目的：ゲノム情報を用いた臨床開発の現状の把握と課題の抽出
- 期間：2002年9月27日～11月1日
- 対象：HS賛助会員企業91社
- 方法：メールによるアンケート調査
- 回収状況：53社から回答、有効回答数44件
(9社は開発予定なし/業務上関係なし)
- 解析対象44社の内訳：
製薬企業37社、診断薬・機器メーカー等7社

す。

この質問に対する回答で最も多いのは「必要ならば、プロスペクティブ試験は第IV相で認めて欲しい」というものです。つまり、先ほどのエビデンスのグレードがexploratoryからconfirmatoryまでありますが、confirmatoryまで待つのではなく、ある一定のところまで世の中に出してもらいたいということです。

図8, Q25は「遺伝子型との関連が明らかになることにより、市販時に処方対象となる患者数が減少することについての懸念はありますか。」という質問です。「ある」が66%で、そのうち「遺伝子検査を望まない患者のために予測以上に処方数が減る」が83%、「薬価が対象患者の減少に見合ったものになるかどうか不透明」が58%で、「市場サイズが縮小することに対する営業側の抵抗」が同じく58%です。

それぞれ企業の立場で考えればもっともですが、PGx testを望まない患者が多そうというのは気になります。先のCIOMS reportでも取り上げられた患者・市民へのコミュニケーションと教育の必要性がここでも現れています。

図9, Q26は「特定遺伝子との関連が明らかにされ、ノンレスポンドーへの無用な投薬が激減するとの理由がある時、承認・上市に当たり行政に求めるもの（インセンティブ）とはどのようなことでしょうか。」です。

一番多いのは「高い薬価」、ついで「審査期間の短縮」、「遺伝子型との関連が示されていない同一効能を有する市販品への行政指導」です。この最後は皆さんお分かりでしょうか？

我が社がPGx testをとまなう臨床試験を行って、marketが小さくなったとき、competitorの企業の薬物に対しても同様な使用方法にしてくれというものです。これはなかなか難しい問題だと思いますが、先に述べましたように、こういう時にインセンティブをどう設計していくかは重要です。

図10, Q20は「ノンレスポンドーの存在が明らかになった時、ノンレスポンドーを対象とした医薬品の開発にあたり、行政に求めるのは何でしょうか。」です。PGxによって薬物治療のオーファンがぞろぞろ出てくることも予想されます。

Q16. 現在開発中の薬物で、レトロスペクティブに特定遺伝子型との関連を調査した成績の取り扱いについて、申請にあたっての要望はありますか。添付文書への反映にあたり、規制当局はプロスペクティブ試験を要求するという観測があります。

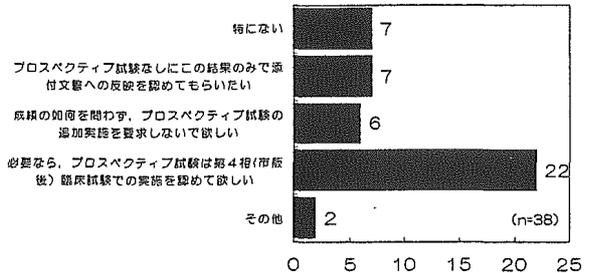


図7 レトロスペクティブな遺伝子型の調査

Q25. 遺伝子型との関連が明らかになることにより、市販時に処方対象となる患者数が減少することについての懸念はありますか。

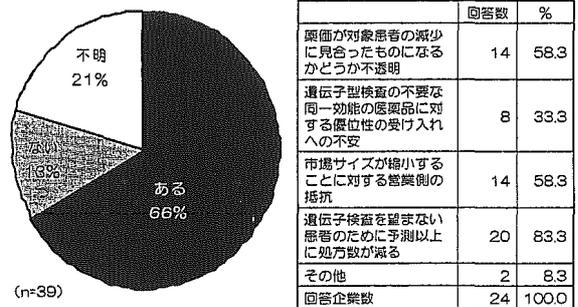


図8 患者数減少の懸念

Q26. 特定遺伝子との関連が明らかにされ、ノンレスポンドーへの無用な投薬が激減するとの理由がある時、承認・上市にあたり、行政に求めるもの（インセンティブ）とはどのようなことでしょうか。

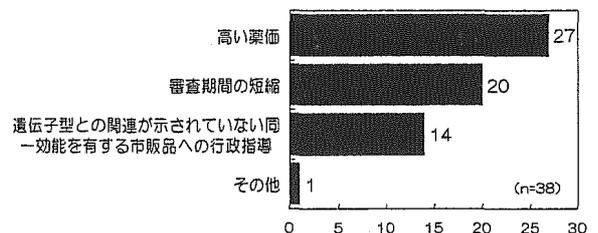


図9 患者数減少に対するインセンティブ

回答としてはオーファン型開発が最も多くなっています。そこでは公的な研究ファンドや審査期間の短縮などが考えられます。治験費用の一部国庫負担はオーファンにある面よく似ています。またプレミアムのついた薬価という回答もありますが、このノンレスポンドーに対する医薬品開発には、国の強力な関与が必要のようです。

おわりに

このHS財団のレポートのアンケート調査の部分のまとめに「光と影」と書いてあります。表14に示します。なかなかうまく書くものだと思います。

私は影をなるべく少なくするためには、2つ対応法があるのではないかと思います。ひとつはリスクマネジメント、ここで言っているリスクというのは副作用という意味ではなくて、先ほど「3つのE」といいました。“effectiveness”として広い意味での効果に関するリスク、“efficiency”効率に関するリスク、“equity”公平に関するリスクです。PGxによっていろいろなリスクが起きてくると思いますが、あらかじめ考えて対策を立てておくということです。

また先に述べましたように、インセンティブを上手に組み立てていく方法です。これは頭を絞る必要がありそうです。

最後に、これまでの治療に対する支払いというのは、基本的には治療に「かかったコスト」について支払ってきたわけです。現在のシステムは、出来高払いを中心にして、一部包括化もあるというのが現状です。

しかし、支払いは「薬のアウトカム」に払うという時代が来ると思われます。つまり効いた人だけがお金を払う、「治ってなんぼ」という時代がくる。薬の価値はその有効性と安全性にあるのですから、ある面、その方が正しい姿なのです。

先ほどの鎌滝先生の話の中で、「いつこういう時代がくるか？」とおっしゃられましたが、五月雨式に少しずつついているのではないかと思います。

以上で私の話をおわります。今回の発表にあたり、HS財団開発進行委員会・ゲノム医療ワーキンググループの方々、特にリーダーの玉起美恵子さんと、アンケート調査を企画してまとめられた中川英彦さんに、お礼を申したいと思います（表15）。

鎌滝 どうもありがとうございました。

Q20. ノンレスポンドーの存在が明らかになった時、ノンレスポンドーを対象とした医薬品の開発にあたり、行政に求めるものは何でしょうか。

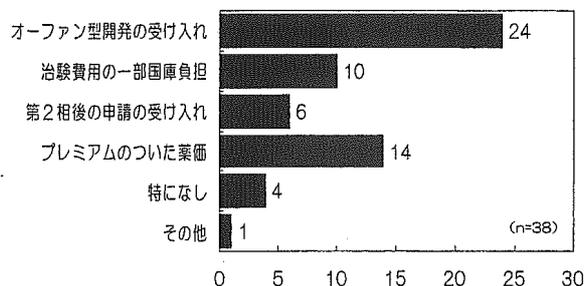


図10 ノンレスポンドーを対象とした医薬品開発

表14 光と影

risk management incentive

かかったコストに払う No
薬のアウトカムに払う Yes

表15 謝辞

HS財団開発振興委員会
ゲノム医療ワーキンググループ
(リーダー: 玉起美恵子)
(中川英彦)

総合討論

鎌滝 それでは総合討論を始めさせていただきます。

最初に、私から2つ質問をさせていただきます。1つは佐藤先生に、もう1つは仁平先生にお願いしたいのですが、最初の佐藤先生への質問は、おそらく製薬会社の方々が一番気になっているのではないかと考えている質問です。その次の質問をお聞きしてから、また佐藤先生に戻ってお考えいただく必要があるのではないかと思います。

最初に佐藤先生にお聞きしたいのは、例えば今、津谷先生がスライドに出されていましたが、非常に患者数が少なくなった。例えばこういう遺伝子を持っている人に、あるいは遺伝子の変異を持っている人にこの薬を使うという、ハーセプチン®の場合もそうですが、患者数が大変限られてしまいます。すると、市場の規模は小さくなる、患者数が少なくなり、薬価が今までと同じならば製薬会社はやっていけないのではないかと、という懸念です。そのあたりの基本的な厚労省の考え方というのをお聞きしたい。

もう1つは、仁平先生にお聞きしたいのですが、いわばハーセプチン®の開発した結果をお聞きしましたが、実はその前のdecision makingを、誰がどのようにしたのか、責任体系がどうで、多分これはかなり大きなdecisionだったと思うのです。そのあたり、裏話がもしお分かりでしたらお聞きしたいと思っています。まず佐藤先生をお願いします。

患者が限られてしまうことによる影響

佐藤 最初のご質問ということで承りましたが、患者数が少ない、しかし、場合によっては開発コストが結構高いものに対して、そこをどのように保険上評価していくかということです。非常に難しいご質問で、その難しさには2つポイントがあります。1つは、私の今いる立場が、医薬食品局という審査をやる側でして、保険を担当しているサイドではないということです。もう1つは、実際にそのような医薬品として、ハーセプチン®以外のものはまだ上市されていない状況という中で、保険的な部分で希望的なことが申し上げられるかということ、なかなか難しいだろうということです。

ただ、審査と保険の世界でも共通する部分は当然あるわけで、そういうところから一言お答えとして言えるとすれば、やはりそのもの自体がどれだけ画期的なものかということが1つポイントになるだろうということです。当然保険の世界も今、非常に財政が厳しい折ですし、そこでどれだけ医療経済的なものを取り上げられるか分かりませんが、こういった開発を行うことによってどれだけ画期的なものが出るかということ、ぜひ企業の方にも考えていただきたい、というお答えでいかがでございましょうか。

鎌滝 仕方がないでしょうね。それでは仁平先生、お願いします。

仁平 本剤は、皆さんご存じのように米国のジェネンテック社、米国以外ではロシュが開発をしております。日本では日本ロシュが担当しまして、現在は中外製薬となっております。そういう経過の中で、どこの段階でというよりも、いろいろなステップでかなりcriticalなdecisionがされてきたのだろうと、私は想像しております。

ただ、本剤の場合、非常に幸せだったというのは、1つは本剤が「抗体」であったということで、当然のことながら非常に特異性の高いものであることがはじめから明らかに分かっていた、そしてHER2に対して非常に特異性が高いということから、そこに患者集団を限定しようという発想が自然の流れとして出ていたという意味では、幸せな薬だったのではないかと想像します。

実際問題として、これがもし一般的な乳癌という対象で臨床試験をしますと、第Ⅱ相試験で

second, third line等の患者さんを対象としますと、単剤では15%くらいの奏効率しか示しておりません。乳癌全体のpopulationで見ますと、これはおそらく5%で、通常、開発の対象にはならなかったという意味では、逆に絞ったが故に生き残ってこれたという部分があったかと思っています。

もう1点、decision makingですが、日本においてこれを開発、そして上市するという一連の作業の中で、やはりHER2の検査をきちんとやって、positiveな患者にのみ限定するというところを、どこまでcriticalにやるかというのが、我々も含めて経験がなかったので、そこをどの程度厳密にやるかというのが、行政当局からは審査の過程で厳密さを求められていました。社内でもどのようにやったらいいかということも含めて、いろいろ議論がありましたが、可能な限りやはりやりましょうと。確かに限定はされるけれども、それでHER2 positiveの転移性乳癌という、難しい予後をたどる患者が、延命として3ヵ月、5ヵ月延びるかもしれないという意味では、人によってはたった3ヵ月とおっしゃいますが、患者さんにとっては例えば「子供の入学式を見ることができる」などということもありました。きちんとした形で、この薬を日本の市場に生み出していったらよいのではないかというところでは、私は開発サイドにいる人間ですか、営業サイドからは歓迎されてはいなかったかもしれないですが、トラスツマブ部会とか、あるいはそういうものも含めてきちんとしたものを導入したいというdecisionはあったかと思います。

鎌滝 ありがとうございます。それではフロアから質問を受けたいと思います。

どこまでインセンティブに結びつけるか

別府宏園 (TIP) 津谷先生に質問です。養老孟司流に言えば、「ああすればこうなる」式に原因と結果を余りに単純化した議論は非常に危険です。ここで話しになった事柄も、いろいろな要素が入ってきて、必ずしも非常にきれいな答えがすぐに出るとは限らない、そういう前提を皆さん踏まえた上で話しになっていますが、現実の話になると、どこでインセンティブを与えるかはなかなか難しい問題です。

現実にはゲフィチニブの話でもありましたように、一度情報が動き出しますと、益のある部分だけ非常に拡大され、害の部分は無視されて、結局思わぬ方向へ行くという危険性があります。そういう意味での配慮というのが、こういう先端の技術に関しては非常に大事だと思います。その点についての注意がやはり必要なのではないかという気がいたしますが、いかがでしょうか。

津谷 先ほどのCIOMS Reportのトピック中に、「コミュニケーション&エデュケーション」とありましたが、やはり消費者も含めて、エンドユーザーに近いところの人が合理的な判断ができるというのが理想なのだと思います。

先ほど私は、コミュニケーションにあたって、同じ言葉を使うべきだと言いました。またそのトピックでディスカッションされたことの1つはメディアに対する教育です。こうした技術においては、どうしても光の面だけ見て、それがメディアに乗り伝わります。情報をcriticalに見るだけの力を持った人というのはそれほどいないのです。確かに別府先生のお話を聞くと、レポートには情報伝達がうまくいかなかった例なども入れておくというのも、1つの手かもしれません。

私はリスクマネジメントという言い方もしましたが、このリスクマネジメントにインセンティブを与えるということも考えられます。なんでもかんでもインセンティブに結びつけることはないかもしれませんが、こうした新技術の合理的使用に関係する人々の自覚だけでは不十分なのではないかとも思われます。

鎌滝 他にフロアの方からご質問ありませんでしょうか。

遺伝子評価とTDM

津谷 こういうセッションだと行政の人に多く質問がいつて大変申し訳ないのですが、佐藤さんに質問があります。TDMをPGx testで代替できるとすると、その価格もTDMと同じ程度になる可能性がある。類似薬効方式に似たシステムです。本日、野中さんが話されたような、経済評価を行った上で、その価格を決める方向にそろそろ進むべきだと思います。

これまで、検査と薬物治療のペアの経済評価というのはあまりなされてきませんでした。ただ考えてみますと、薬剤の経済評価もさほどなされていない。その問題の1つとして、その結果が行政で使われていないという現状があります。そうするとPGx testを含めた経済評価を用いての価格づけは、現在の保険制度の中でははずいぶん先かと、悲観的な感じもしますが、その辺の見通しをお聞かせ願います。これも所轄外の質問で申し訳ありません。

佐藤 医療経済的な見通しを、もう少し医薬品の評価の中に入れるべきではないか、検査手法の評価の中に入れるべきではないかという、そういうご質問だと私は理解をしました。大体想定外の質問をいただいた時には、役所の見解というものはないわけで、あくまで個人的にどういうことを私が答えるかということになってくるかと思えます。

そういうお断りのもとでお話をすると、先ほどのTDMの話は期待ということであって、必ずしも本当に、遺伝子検査というものはTDMに置き変わるということをお断りしたわけではなく、そういうことも将来的に起こり得るだろうということをお断りしたままです。もしそういうことが起こるのだとすると、まさしくそれは津谷先生のおっしゃるような、経済評価的に見て、費用対効果というところから見て、TDMに優るといえることが前提としてあるのだろうということになってくるのだと思えます。

ただ、TDMで価格が高いからといってそれは駄目だということではなく、そこに出てくるサービス、そういうものの質が向上すれば、当然そのマーケットというか、ユーザー側から求められてくることにもなってきますし、そういうファクターを考えていくのは、非常に難しいところだと思います。それは我々頭の堅い審査当局の発想では、なかなかまだ十分に追いつけない、そういう部分かと思っております。

鎌滝 私は研究の方をやっていますが、厚生労働省の方に知っていただきたいと思うのですが、現状では、確かにTDMが一番確実な方法だし、よいと思えますが、将来を考えると、1回遺伝子診断をしておけばそれは一生使えるわけです。ですから、そういう具体例が出てくるか、出てこないかの問題ですが、もし具体例が出てくるとすると、そのコストは明らかに安くなるはずですが、もう1つは、TDMの場合は、薬を投与しなくてはわからない。ところが、遺伝子の場合は、投与する前にわかってしまう、ある程度予測ができるということがあります。ですから、今すぐという意味ではなくて、長い将来を言えば、そちらの方が明らかにコストは安くなるはずだと私は思います。その都度やるということと、1回やっておけば一生使えるということになります。

津谷 他にご質問はありませんか。

加藤隆一(慶應大) 一番重要なことは、企業が遺伝的多型に強く影響される、特に代謝の面では、そういうような薬はできるだけ開発の早い時期に、eliminationするという考え方を持つということです。ただし、化学構造などを変換しても、遺伝的多型をさけることは非常に難しいことも事実です。ですから、遺伝的多型の影響の大きいものの開発は難しいということではなくて、そういうものは例外的に新規性とか、効力によっては市場に出してもかまわないと思えます。その場合には二次的に必ず遺伝子検査ということがついてくるということになるのではないかと思います。医療経済から見ても、やはり遺伝子検査が臨床で必要なものというのはいくらでも少なくしていくというのが今後の重要な姿勢ではないかと思います。

津谷 どうもありがとうございました。

検査を行わない場合の倫理的問題

津谷 野中さんにお聞きします。例えば、すでにある PGx test が開発されている、その際、PGx test をせず、投薬後、有害反応が出てしまうとか、あるいは無効の人を test で除外できるのにそのまま使ってしまう。そうすると、倫理的問題が出てきますね。野中さん、その辺はどう考え、あるいは世界の現状はどうなっているのですか。

野中 例えば、検査を行わずにハーセプチン[®]を投与してしまうような例の場合では、それは副作用の影響がありますので、少し倫理的問題があると思われれます。また IHC のような感度があまりよくない検査で、HER 2 検査を行って、その結果に従ってトラスツズマブを投与してしまったような場合には、もしその患者さんが FISH 法で検査していたら陽性と出たような場合に、もしかしたらハーセプチン[®]を投与すれば助かったかもしれない、何か月間は median TTP の延長があったかもしれない、そういうことがリスクになりまして、例えば IHC だけでしか検査を行わなかった患者さんが訴訟を起こしてしまうとか、そういう可能性も生じると思います。

津谷 そろそろまとめに入りたいと思います。実はこのセッションのタイトルは、当初「国民皆保険の中のファーマコジェネティクス」にしようかと思ったのですが、あまりにも生々しすぎるということで、それで「ヘルスサービスシステムの中のファーマコジェネティクス」というタイトルにしました。全部調べたわけではありませんが、日本臨床薬理学会の年会として経済のことを含めたセッションはこれまでなかったと思います。それがファーマコジェネティクスという先端的な領域と重なって初めてなされたということになります。日本臨床薬理学会の兄弟学会として日本薬剤疫学会があります。市販後におけるファーマコジェネティクスの研究のセッションはそこでもあってもいいのかなという気もします。

今回、イントロの鎌滝先生の教育的な講演から始まって、仁平さんの企業の立場での開発を中心にした話、野中さんには先駆的な経済評価の実際を話していただきました。佐藤さんからは行政の考え方が述べられました。いろいろなプレイヤーがいる中でこの領域では、行政の持つ意味合いは特に大きいと思います。正しくガイドをするというのは言い過ぎかもしれませんが、やはり明確な方向性を出していただきたいと思っております。私はインセンティブについて話しました。

このセッションを終わりますが、これを機会にファーマコジェネティクスの領域でのナチュラルサイエンスだけではなくて、ソーシャルサイエンスとしてのディスカッションが今後ますます盛んになってもらいたいと思っております。皆様どうも長時間ありがとうございました。

Pharmacokinetic Evaluation of Anticonvulsants in a Patient with Porphyria

Masanori OHMOTO*¹ Etsuko UEJIMA*² Kyoko TAKAHASHI*¹
Kazuo ABE*³ Saburo SAKODA*³ Nobuo KUROKAWA*²
and Junichi AZUMA*¹

*¹ Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

*² Department of Pharmacy, Osaka University Hospital, 2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

*³ Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

The aim of this study was to establish the appropriate regimen of anticonvulsants for a female patient with porphyria by pharmacokinetic evaluation of the influence of anticonvulsants on porphyria. The pharmacokinetics of phenytoin, carbamazepine, clonazepam, and clobazam were estimated by the Bayesian method. The urinary 6β -hydroxycortisol/cortisol (6β -OHF/F) ratio was also evaluated as an index of hepatic CYP3A4 induction.

The phenytoin concentrations in the toxic area fitted the predicted value for *CYP2C9**1/*3 better than that for *CYP2C9**1/*1 (her genotype). The concomitant phenytoin altered the clearance of carbamazepine considerably. The clearances of clonazepam and clobazam were not altered, although hepatic CYP3A4 induction was implied from the value of the urinary 6β -OHF/F ratio.

From the pharmacokinetic evaluations, the following were concluded: (1) phenytoin was not the proper medication for this patient, (2) carbamazepine can be used safely within a relatively small dose, 500 mg/day, (3) the combination of clonazepam and carbamazepine can be used, and (4) a concomitant small dose of clobazam with carbamazepine can also be used.

Key words : anticonvulsant, porphyria, cytochrome P450, Bayesian method, urinary 6β -hydroxycortisol/cortisol ratio

Introduction

Although many anticonvulsants are known to deteriorate porphyria, some patients with porphyria have seizures and require anticonvulsant therapy. Part of the deteriorating mechanism has been conjectured to cause an imbalance of heme protein biosynthesis, which is due to the induction of cytochrome P450 (CYP) by anticonvulsants. We previously demonstrated that the measurement of the human urinary 6β -hydroxycortisol/cortisol (6β -OHF/F) ratio is a useful indicator of safe medication in a patient with hereditary coproporphyria¹⁾. The previous results implied that hepatic CYP induction was profoundly related to her condition of porphyria.

In the present paper, the pharmacokinetic param-

eters of the anticonvulsants used in the patient during two hospitalizations (phenytoin, carbamazepine, clonazepam, and clobazam) were retrospectively evaluated by the Bayesian method^{2,3)}. We established the effective and safe dose of anticonvulsants for her seizures based on the alteration of the estimated pharmacokinetic parameters and the measurement of the urinary 6β -OHF/F ratio.

Case

A female in her twenties was diagnosed with rare dual porphyria involving partial δ -aminolevulinatase deficiency with epilepsy. She had been treated with sodium valproate, phenytoin and carbamazepine when she was admitted to our hospital on June 24, 1998. Sodium valproate was discontinued because of abdominal side effects. For

Address for correspondence : Azuma J, MD. Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
(Manuscript received April 15, 2004 ; revised August 2, 2004 ; accepted September 11, 2004)

better control of the epilepsy, phenytoin was increased from 100 to 125 mg/day and carbamazepine was gradually increased from 800 to 1200 mg/day. However, her condition deteriorated, and the serum concentrations of phenytoin were within the toxic range. The frequency of her seizures decreased eventually by discontinuing phenytoin, gradually reducing carbamazepine, and adding clonazepam. She was discharged from our hospital after four months.

She was re-hospitalized 2 years later (March 22, 2001) for reevaluation of the medication for epilepsy. She had been treated with carbamazepine, clobazam, and zonisamide. Zonisamide was discontinued. The clobazam dose, 15 mg/day, was not changed. The carbamazepine dose was gradually increased from 450 to 500 mg/day. The frequency of her seizures decreased 2 weeks after receiving modified treatment. The urinary 6 β -OHF/F ratio gathered over 24 hours was measured and compared with the value from before she left our hospital the first time¹⁾.

Methods

The patient's genotype of the metabolic enzymes of phenytoin had been judged to be *CYP2C9*1/*1* and *CYP2C19*1/*2*¹⁾. The pharmacokinetic parameters of phenytoin were estimated from serum phenytoin concentrations in the toxic area, with the use of subpopulation parameters of *CYP2C9*1/*1* and *CYP2C9*1/*3*⁴⁾. The typical predicted dose of phenytoin was calculated from equation (1) (below), based on these estimated parameters. The percentage of deviation between the predicted dose and the administered dose was calculated from equation (2) (below).

Each alteration of carbamazepine and clonazepam clearance was estimated to evaluate the pharmacokinetic influence of these agents on porphyria. In the second hospitalization, the alteration of carbamazepine and clobazam clearances was estimated. The alteration of the N-desmethylclobazam/clobazam ratio was also evaluated, because clobazam is metabolized to N-desmethylclobazam by CYP3A4. The original data used for this study were obtained as described previously¹⁾.

Her pharmacokinetic parameters of anticonvulsants were estimated by the software PEDAs (parameter estimation and dosage adjustment)⁵⁾ incor-

porating the Bayesian method, using the population pharmacokinetic parameters described in the literature^{4,6-8)}. The phenytoin dose was calculated by the following equation from the observed concentration of phenytoin:

$$\text{Dose}_{\text{pre}} = V_{\text{max}} C_{\text{ss}} / (K_m + C_{\text{ss}}) \quad (1)$$

where V_{max} , K_m , Dose_{pre} , and C_{ss} are the maximal elimination rate of the Michaelis-Menten equation (mg/day), the Michaelis-Menten constant ($\mu\text{g}/\text{mL}$), the serum concentration of phenytoin at a steady state ($\mu\text{g}/\text{mL}$), and the predicted dose (mg/day), respectively. The deviation between the dose predicted from equation (1) and the actual dose was calculated by the following equation:

$$\text{Dev} = (\text{Dose}_{\text{act}} - \text{Dose}_{\text{pre}}) / \text{Dose}_{\text{act}} \quad (2)$$

where Dev, Dose_{act} , and Dose_{pre} are the deviation, the actual dose, and the predicted dose, respectively. The plasma concentrations of carbamazepine, clonazepam, and clobazam were calculated by the following equations:

$$C = D \cdot K_a / V_d / (K_a - K_e) \cdot \{ \text{Exp}(-K_e t) - \text{Exp}(-K_a t) \} \quad (3)$$

$$C_{\text{ss}} = D / \text{CL} \quad (4)$$

where D, C, and C_{ss} are the dosage (mg), carbamazepine or clobazam concentration in plasma ($\mu\text{g}/\text{mL}$), and plasma clonazepam concentration at a steady state ($\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively; and K_e , K_a , V_d , t , and CL are the elimination rate constant (hr^{-1}), absorption rate constant (hr^{-1}), apparent volume of distribution normalized with bioavailability (L), time from initial administration (hr), and apparent total body clearance normalized with bioavailability (L/hr), respectively. From this point on, the term "clearance" will be used for "apparent total body clearance normalized with bioavailability". Equation (3) was used for carbamazepine and clobazam, and equation (4) was used for clonazepam.

Results

The pharmacokinetic parameters of phenytoin in *CYP2C9*1/*1* were estimated by the Bayesian method, as follows: $V_{\text{max}} = 3.8 \text{ mg/kg/day}$ and $K_m = 5.6 \mu\text{g}/\text{mL}$. The typical predicted dose of phenytoin was calculated to be approximately 141 mg/day. The percentage of deviation was approxi-

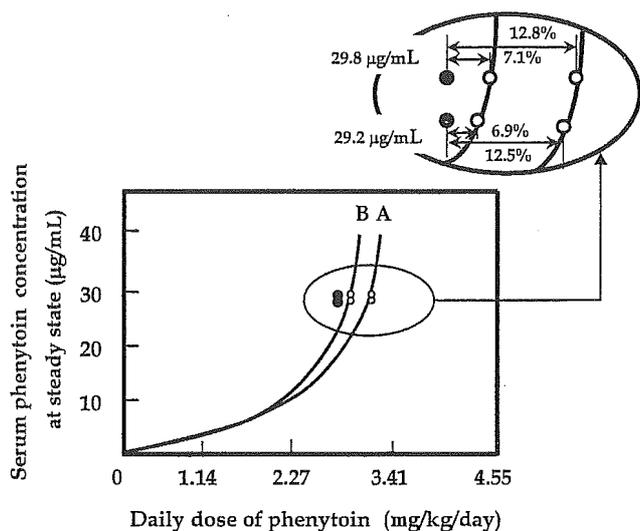


Fig. 1 Profile between serum concentration and dose of phenytoin

Curves A and B were the estimated curves from the subpopulation parameters⁶⁾ of *CYP2C9*1/*1* with *CYP2C19*1/*2* and *CYP2C9*1/*3* with *CYP2C19*1/*2*, respectively, by the Bayesian method. Closed circles (29.8, 29.2 µg/mL) represent serum phenytoin concentrations on July 31 and August 3, below 125 mg/day, respectively. Open circles are the predicted dose of phenytoin.

mately 11%. The estimated parameters in *CYP2C9*1/*3* were also calculated, as follows: $V_{max}=3.3$ mg/kg/day and $K_m=4.1$ µg/mL. The typical estimated dose was approximately 129 mg/day. The percentage of deviation was about 3%. Therefore, the predicted dose for *CYP2C9*1/*3* better fits the model used [equation(1)] than that for *CYP2C9*1/*1* (Fig. 1).

Carbamazepine clearance was altered between 1.7 and 3.4 L/hr, whereas clonazepam clearance was almost unaltered (Fig. 2). Although the carbamazepine dose was decreased by 80%, from 1200 to 1000 mg/day, the plasma concentration increased by 1.2 times when carbamazepine was combined with phenytoin, in the relationship between the daily dose and plasma concentration of carbamazepine. The clearance decreased by 50% based on the alteration. However, clonazepam clearance did not show a remarkable alteration even when clonazepam was combined with carbamazepine and phenytoin.

The alteration of carbamazepine and clobazam clearances and the N-desmethyloclobazam/clobazam ratio after re-hospitalization are shown in Table. The carbamazepine and clobazam clear-

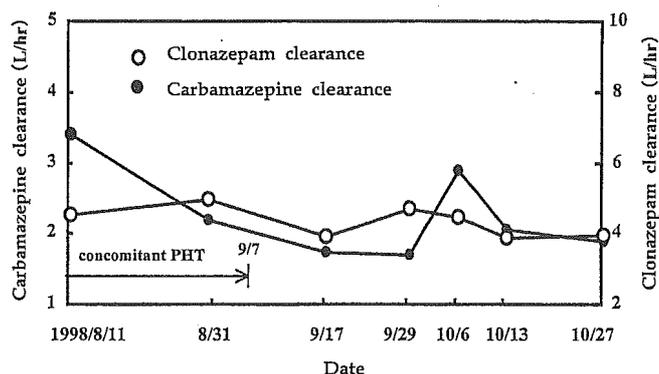


Fig. 2 Alteration of carbamazepine and clonazepam clearances

Open and closed circles represent carbamazepine and clonazepam clearances, respectively.

Table Alteration of the N-desmethyloclobazam/clobazam ratio and the clearance of clobazam and carbamazepine

	April 3, 2001	May 11, 2001
Carbamazepine clearance (L/hr)	2.54	2.22
Clobazam clearance (L/hr)	2.25	2.25
Clobazam (µg/mL)	0.26	0.26
N-desmethyloclobazam (µg/mL)	3.52	3.95
N-desmethyloclobazam/clobazam ratio	13.8	15.49

ances remained almost unaltered. The N-desmethyloclobazam/clobazam ratio was unaltered. The measured value of the urinary 6β-OHF/F ratio was 20.2.

Discussion

1. Discrepancy between the patient's genotype and phenotype of phenytoin metabolism

The patient was an extensive metabolizer of *CYP2C9*, which is the main metabolizing enzyme of phenytoin¹⁾. Her genotype was *CYP2C9*1/*1*, whereas her phenotype as indicated by the behavior of her serum phenytoin concentration was identical to that of *CYP2C9*1/*3*. *CYP2C9*3* is generally known to be a genetic polymorphism that decreases the enzyme activity. In addition, she had no inhibitor of *CYP2C9* in her medications. The reason underlying the discrepancy between her genotype and phenotype of phenytoin metabolism remains an

area of considerable interest. One proposal is that phenytoin as an inducing agent of CYP3A4 might have destroyed the equilibrium of her abnormal heme pathway and depleted CYPs. Her metabolism of phenytoin might have been saturated by the reduction of CYP synthesis.

2. Alteration of the clearance of carbamazepine and clonazepam

The decrease in carbamazepine clearance (Fig. 2) leads us to conjecture that the suppression of CYP biosynthesis was brought on by a mechanism similar to that of the metabolic saturation of phenytoin by the concomitant phenytoin. In addition, an increase in carbamazepine clearance was transiently observed (Fig. 2), which might have been due to a high blood concentration of carbamazepine resulting from the improvement of the equilibrium of CYP biosynthesis, because a month had passed after the discontinuation of phenytoin. The results suggest that phenytoin markedly affected CYP biosynthesis in this patient with porphyria. The influence on CYP might have caused saturation of phenytoin metabolism and an excessive decrease in carbamazepine clearance.

The clonazepam clearance (CL/F) was estimated to be approximately 4.3 L/hr as the mean value (Fig. 2). The total body clearance (CL_{tot}) is calculated to be 4.4 L/hr because the bioavailability of clonazepam is reported to be approximately 0.98⁹⁾. The product of the value of unbound fraction and the hepatic intrinsic clearance was calculated to be 4.4 L/hr from equation (5) when the absorption ratio was regarded to be 1.0 according to the high bioavailability (see "Appendix"). The general value of hepatic blood flow is about 90 L/hr. Therefore, the hepatic extraction ratio of clonazepam was calculated to be approximately 0.05 from equation (7) (see "Appendix"). Clonazepam is considered to be a metabolic capacity-limited agent, according to the calculated value of the hepatic extraction ratio. Carbamazepine is a similar type agent. Carbamazepine clearance seems to be excessively affected by the alteration of hepatic CYP3A4 activity, whereas the clonazepam clearance was not altered in spite of concomitant phenytoin.

The metabolic pathway of clonazepam proceeds by nitroreduction, acetylation, and hydroxylation.

The acetylation is reported to be affected by the polymorphic N-acetyltransferase (NAT) that determines the acetylation phenotype of the individual¹⁰⁾. This patient was considered to be an intermediate acetylator since her genotype was NAT2*4/*6. There has been no report of a relationship between the NAT2 genotype and a phenotype of clonazepam pharmacokinetics. The influence of the NAT2 genotype on the alteration of clonazepam clearance was unclear.

Seree et al, suggested that the nitroreduction of clonazepam is catalyzed by CYP3A4¹¹⁾. Therefore, clonazepam metabolism might also be affected by the suppression of CYP biosynthesis (Fig. 2). However, the alteration of clonazepam and carbamazepine clearances was different. Binding plasma proteins of phenytoin, clonazepam, and carbamazepine is 90-95%, 80-90%, and 70-80%, respectively^{12,13)}. This result implies that the difference in the affinity ratio of binding to plasma proteins affects the alteration of these clearances.

3. Pharmacokinetic evaluation of anticonvulsants after the second hospitalization

The patient's medication after the second hospitalization was evaluated according to the alteration of carbamazepine clearance, clobazam clearance, and the N-desmethyloclobazam/clobazam ratio (Table). The carbamazepine and clobazam clearances and N-desmethyloclobazam/clobazam ratio were unaltered after re-hospitalization. However, the measured value of the urinary 6 β -OH/F ratio was slightly high compared with the value (15.4) before the patient left our hospital the first time¹⁾.

Her condition had not improved with a carbamazepine dose of 450 mg/day (see "Case"), whereas the frequency of seizures decreased by increasing the carbamazepine dose to 500 mg/day. Carbamazepine was considered to be effective and safe at a dose of 500 mg/day. The dosage regimen after the second hospitalization was considered to have been appropriately modified as a result.

4. Conclusions

From the pharmacokinetic evaluations for this patient, the following conclusion was established: phenytoin was not a proper medication. Carbamazepine was effective and safe, within a moderate

dose. In addition, the clearance of clonazepam was not affected by carbamazepine. Therefore, the concomitant use of carbamazepine and clonazepam was also considered effective. Clobazam and carbamazepine might be used safely for controlling seizures of porphyria within relatively small doses, at 15 mg/day for the former and at 500 mg/day for the latter.

The influence of anticonvulsants on porphyria was pharmacokinetically evaluated by estimating the clearance of anticonvulsants, in addition to the measurement of urinary 6β -OHF/F. We obtained information on effective and safe medications for porphyria on the basis of estimation of pharmacokinetic parameters.

Acknowledgements

We thank Professor Kenji Matsuyama and Professor Koichi Takahashi of the School of Pharmaceutical Sciences at Mukogawa Women's University, and Choichiro Miyazaki Ph.D. of Miyazaki Pharmacy.

References

- 1) Uejima E, Takahashi K, Morisaki T, Takahashi K, et al. Microsomal enzyme induction and clinical aggravation of porphyria: the evaluation of human urinary 6β -hydroxycortisol/cortisol ratio as the index of hepatic CYP3A4 activity. *J Clin Pharmacol* 2002; **42**: 1374-9.
- 2) Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res* 1972; **5**: 411-59.
- 3) Vozeh S, Muir KT, Sheiner LB, Follath F. Predicting individual phenytoin dosage. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; **9**: 131-46.
- 4) Mamiya K, Ieiri I, Shimamoto J, Yukawa E, Imai J, Ninomiya H, Yamada H, Otsubo K, Higuchi S, Tashiro N. The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. *Epilepsia* 1998; **39**: 1317-23.
- 5) Higuchi S, Aoyama T, Horioka M. PEDAS: a microcomputer program for parameter estimation and dosage adjustment in clinical practice. *J Pharmacobiodyn* 1987; **10**: 703-18.
- 6) Hori R, Okumura K, Kitazawa S, Koshiro A, Saitoh Y, Higuchi S, Mizugaki M, Yamaji A, Rikihisa T, Tanigawara Y. Estimation of population pharmacokinetic parameters in Japanese patients II. Carbamazepine. *Yakuzaigaku* 1989; **49**: 304-12 (in Japanese).
- 7) Yukawa E, Satou M, Nonaka T, Yukawa M, Ohdo S, Higuchi S, Kuroda T, Goto Y. Pharmacoeconomic investigation of clonazepam relative clearance by mixed-effect modeling using routine clinical pharmacokinetic data in Japanese patients. *J Clin Pharmacol* 2002; **42**: 81-8.
- 8) Monjanel-Mouterde S, Antoni M, Bun H, Botta-Frindlund D, Gauthier A, Durand A, Cano JP. Pharmacokinetics of a single oral dose of clobazam in patients with liver disease. *Pharmacol Toxicol* 1994; **74**: 345-50.
- 9) Berlin A, Dahlstrom H. Pharmacokinetics of the anticonvulsant drug clonazepam evaluated from single oral and intravenous doses and by repeated oral administration. *Eur J Clin Pharmacol* 1975; **19**: 155-9.
- 10) Miller ME, Garland WA, Min BH, Ludwick BT, Ballard RH, Levy RH. Clonazepam acetylation in fast and slow acetylators. *Clin Pharmacol Ther* 1981; **30**: 343-7.
- 11) Seree EJ, Pisano PJ, Placidi M, Rahmani R, Barra YA. Identification of the human and animal hepatic cytochromes P450 involved in clonazepam metabolism. *Fundam Clin Pharmacol* 1993; **7**: 69-75.
- 12) Tokola RA, Neuvonen PJ. Pharmacokinetics of antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand Suppl* 1983; **97**: 17-27.
- 13) Thomson AH, Brodie MJ. Pharmacokinetic optimisation of anticonvulsant therapy. *Clin Pharmacokinet* 1992; **23**: 216-30.
- 14) Wilkinson GR, Shand DG. A physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin Pharmacol Ther* 1975; **18**: 377-90.
- 15) Wilkinson GR. Pharmacokinetics of drug disposition: hemodynamic considerations. *Annu Rev Pharmacol* 1975; **15**: 11-27.

Appendix

The total body clearance (CL_{tot}) for a drug is generally expressed as follows, when a drug is mostly eliminated in the liver :

$$CL_{tot} = f_{ub} \cdot CL_{int,h} / F_a \quad (5)$$

where F_a is the absorption ratio of the drug ; f_{ub} is the unbound fraction in the blood ; and $CL_{int,h}$ is the hepatic intrinsic clearance. Furthermore, the hepatic clearance (CL_h) and hepatic extraction ratio (ER_h) of drugs are expressed as follows :

$$CL_h = Q_h \cdot f_{ub} \cdot CL_{int,h} / (Q_h + f_{ub} \cdot CL_{int,h}) \quad (6)$$

$$ER_h = f_{ub} \cdot CL_{int,h} / (Q_h + f_{ub} \cdot CL_{int,h}) \quad (7)$$

where Q_h is the hepatic blood flow ; f_{ub} is the unbound fraction in the blood ; and $CL_{int,h}$ is the hepatic intrinsic clearance. A drug with an ER_h of more than 0.8 is classified as an agent of the hepatic flow-limited type^{14,15}. A drug with an ER_h of less than 0.2 is classified as an agent of the metabolic capacity-limited type.

An oral drug absorbed in the gut passes the liver via the portal vein. Only a drug which passes to the liver flows in circulating blood. Therefore, such a drug can be described by the following equation :

$$AUC_{po} = F_h \cdot F_a \cdot AUC_{iv} \quad (8)$$

where F_h is the hepatic availability ; F_a is the fraction absorbed into the portal vein from the gut ; and AUC_{iv} and AUC_{po} are the areas under the blood concentration-time curve after intravenous bolus and oral dosing, respectively.

AUC_{po} is expressed as a function of dosage (D) and total body clearance after oral dosing ($CL_{tot,po}$) as follows :

$$AUC_{po} = D / CL_{tot,po} \quad (9)$$

The following equation is obtained from equations (8) and (9) :

$$CL_{tot,po} = CL_{tot,iv} / (F_h \cdot F_a) \quad (10)$$

F_h is described by the following equation according to the literature^{14,15} :

$$F_h = Q_h / (Q_h + f_{ub} \cdot CL_{int,h}) \quad (11)$$

$CL_{tot,iv}$ assumes CL_h as the hepatic clearance, and equation (5) is obtained from equations (6), (10), and (11).



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Molecular Brain Research 129 (2004) 117–123

**MOLECULAR
BRAIN
RESEARCH**

www.elsevier.com/locate/molbrainres

Research report

Effect of genetic polymorphism on the metabolism of endogenous neuroactive substances, progesterone and *p*-tyramine, catalyzed by CYP2D6

Toshiro Niwa^{a,1}, Toyoko Hiroi^a, Daisuke Tsuzuki^b, Shigeo Yamamoto^b, Shizuo Narimatsu^b,
Tsuyoshi Fukuda^c, Junichi Azuma^c, Yoshihiko Funae^{a,*}

^aDepartment of Chemical Biology, Osaka City University Medical School, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

^bLaboratories of Health Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

^cClinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Accepted 26 June 2004

Available online 3 August 2004

Abstract

Metabolic activities toward endogenous substrates in the brain, progesterone and *p*-tyramine, by cytochrome P450 2D6.2 (CYP2D6.2), CYP2D6.10A, CYP2D6.10C, and P34S, G42R, R296C, and S486T mutants expressed in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* were compared with those by CYP2D6.1 (wild-type) in order to clarify the effects of genetic polymorphism of CYP2D6 on the metabolism of neuroactive steroids and amines in the brain. For the 6 β -hydroxylation of progesterone, the V_{\max} values for CYP2D6.2, CYP2D6.10A, and the P34S and G42R mutants, were less than half of those for CYP2D6.1, and CYP2D6.10C had a higher K_m and a lower V_{\max} than the wild-type. The V_{\max}/K_m values for CYP2D6.10A, CYP2D6.10C, and the P34S and G42R mutants were 12–31% of that for CYP2D6. The 16 α -hydroxylation and 21-hydroxylation of progesterone by CYP2D6.10A, CYP2D6.10C, and the P34S and G42R mutants were not detected, and the R296C mutant had a higher K_m for the 16 α -hydroxylation and a lower V_{\max} for the 21-hydroxylation than those for CYP2D6.1. For dopamine formation from *p*-tyramine, the K_m values for CYP2D6.2 and the R296C mutant were higher than those for CYP2D6.1, CYP2D6.10A, and CYP2D6.10C had a higher K_m and a lower V_{\max} than the wild-type. The V_{\max}/K_m values for CYP2D6.2, CYP2D6.10A, CYP2D6.10C and the P34S, G42R and R296C mutants were less than 45% of those for the wild-type. These results suggest the possibility that the polymorphism of CYP2D6, including CYP2D6*2, CYP2D6*10 and CYP2D6*12, might affect an individual behavior and the central nervous system through endogenous compounds, such as neuroactive steroids and tyramine, in the brain.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Other systems of the CNS

Topic: Brain metabolism and blood flow

Keywords: CYP2D6; Progesterone hydroxylation; Dopamine formation from *p*-tyramine; Human brain; Polymorphism

1. Introduction

Cytochrome P450s (P450 or CYP) comprise a superfamily of enzymes that catalyze the oxidation of a wide

variety of xenobiotic chemicals including drugs, carcinogens, and steroids [10,12,35]. In spite of the fact that CYP2D6 constitutes only 2–9% of constitutively expressed hepatic P450s among humans [17,36], it plays important roles in the metabolism of a wide range of therapeutic agents including drugs affecting the central nervous system [5,9,30,35]. Interestingly, CYP2D6 is expressed in the brain, especially the midbrain [27], as well as in the liver. The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6645 3915; fax: +81 6 6645 3917.

E-mail address: funae@med.osaka-cu.ac.jp (Y. Funae).

¹ Current address: Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 3-4-7 Doshomachi, Chuo-ku, Osaka 541-8514, Japan.

product from CYP2D4, the predominant CYP2D isoform in rat brain, is more abundant in cerebellum, striatum, pons, and medulla oblongata [21]. However, the physiological and pharmacological functions of CYP2D isoforms in the brain are still unknown.

Progesterone not only is one of the female steroid hormones secreted from the placenta and corpus luteum but also has various functions in the central nervous system as a neurosteroid in the brain [2,19]. For example, progesterone has the ability to increase myelin-specific protein levels and to enhance γ -aminobutyric acid (GABA)-induced chloride current [19,39], and the progesterone metabolites, 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one (allopregnanolone) and 3 α ,5 α -tetrahydrodeoxycorticosterone, act as positive allosteric modulators of GABA type A receptors, and thereby reduce brain excitability and elicit sedative-hypnotic, anxiolytic, and anticonvulsant effects [32]. Recently, we have shown that CYP2D6 catalyzes the 2 β -, 6 β -, 16 α -, and 21-hydroxylation of progesterone [15,29], and that progesterone 2 β - and 21-hydroxylation activities in rat brain microsomes are completely inhibited by CYP2D antibodies, suggesting that CYP2D may be involved in the regulation (metabolism and/or synthesis) of endogenous neuroactive steroids, such as progesterone and its derivatives, in the brain [15]. Additionally, we have reported that the 21-hydroxylation of allopregnanolone as well as progesterone and 17 α -progesterone is catalyzed by CYP2D isoforms in the brain [9,20].

Tyramine is not only an exogenous compound, which is found in fermented foods such as cheese and wine, but also an endogenous compound, which exists in the brain. Tyramine is especially present in the basal ganglia or limbic systems, which are thought to be related to an individual behavior and emotion [33], and dopamine is a neurotransmitter and a precursor of norepinephrine and epinephrine [14]. Previous studies conducted in this laboratory demonstrated that dopamine is formed from *p*-tyramine as well as *m*-tyramine by CYP2D6 [14].

CYP2D6 is one of the most extensively characterized polymorphic drug-metabolizing enzymes; the CYP2D6 gene is highly polymorphic, with more than 70 allelic variants [4,6,26]. Interestingly, it has been shown that CYP2D6 polymorphism has some relationship with an individual behavior [3,24]. Five to ten percent of Caucasians [1] and less than 1% of Japanese and Chinese [16] lack in vivo metabolic activity toward CYP2D6 substrates estimated by use of the urinary metabolic ratio, and are referred to as poor metabolizers. The CYP2D6*12 allele, which is associated with a deficient activity and consequently with the poor metabolizer phenotype, carries three functional mutations, G42R, R296C, and S486T [6,26]. On the other hand, in spite of the very low prevalence of CYP2D6 poor metabolizers in Asians, these groups display less CYP2D6 activity, and this has been attributed to the high frequency of the CYP2D6.10 enzyme [40]. That is, the CYP2D6*10 allele, including both CYP2D6*10A and CYP2D6*10B

variants, is widely observed in Japanese (31–38%) [22,28] and Chinese (51%) [18], and has two amino acid substitutions, P34S and S486T [6,26]. Additionally, CYP2D6*10C has the gene conversion in exon 9 derived from CYP2D7 and has 13 base substitutions more than CYP2D6*10B [18]. Fukuda et al. [8] reported that the K_m values of CYP2D6.10A and CYP2D6.10C for bufuralol 1'-hydroxylation and venlafaxine *O*-demethylation were higher than those of CYP2D6.1, and Tsuzuki et al. [37] reported that the substitution G42R increased the K_m and decreased the V_{max} for debrisoquine 4-hydroxylation, whereas it increased both V_{max} and K_m for bunitrolol 4-hydroxylation. Recent studies have shown that CYP2D6.10A had a higher K_m and/or a lower V_{max} than CYP2D6.1 for various exogenous substrates, including dextromethorphan, methamphetamine, and amitriptyline [34]. On the other hand, it has been reported that the R296C and S486T substitution (CYP2D6.2) affected only minimally the metabolism of dextromethorphan, bufuralol, and debrisoquine [25]. Furthermore, a number of investigators have proposed the key residues of CYP2D6 for exogenous substrates containing a basic nitrogen [7,13,38]. However, the key residues of CYP2D6 for the metabolism of other substrates, including the endogenous chemicals, which exist in the brain, and non-nitrogen containing compounds, are still unknown.

The present study was designed to elucidate the effects of CYP2D6 polymorphism, especially P34S, G42R, R296C, and S486T substitutions such as CYP2D6.2, CYP2D6.10A, and CYP2D6.10C, on CYP2D6 activities toward endogenous substrates in the brain, progesterone and *p*-tyramine.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Progesterone and 16 α - and 21-hydroxyprogesterone were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 6 β -Hydroxyprogesterone, dopamine hydrochloride, and NADPH were purchased from Steraloids (Newport, RI, USA), Research Biochemicals International (Natick, MA, USA), and Oriental Yeast (Tokyo, Japan), respectively. *p*-Tyramine and other reagents and organic solvents were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

2.2. Microsomal fraction specifically expressing human P450

Cloning of human CYP2D6 cDNA, site-directed mutagenesis, the expression of mutated cDNA in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* and the preparation of microsomal fractions from the cells were carried out according to methods described previously [8,37]. With these methods, we prepared CYP2D6.2 (R296C/S486T), CYP2D6.10A (P34S/S486T), CYP2D6.10C, and four mutant proteins