

別添1

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

薬物体内動態支配因子のファーマコゲノミクスに  
基づく医薬品開発評価

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 洋史

平成21(2009)年4月

## 研究要旨

薬の効果/副作用に個人差の原因の1つとして、薬物代謝能力の著しい個人差による動態(PK)の変化が指摘されている。本研究はこのようなPKの変化が、どのような薬剤に、どのような遺伝子変異あるいは併用薬により生ずるか、またPK変化がどの程度臨床問題かを網羅的に判断して具体的対処を可能とする方法論の確立を目的とした。

薬物代謝酵素CYPの基質薬のPK変化を決定するパラメータとして、経口クリアランスに対する当該代謝経路の寄与率(CR)に注目した。CRを*in vivo*および*in vitro*の実験から精度良く求める方法を考案した。CRとCYPの活性変動の情報から、遺伝子変異あるいは相互作用による数百に及ぶPK変化の網羅的予測に成功した。代謝酵素の遺伝子変異として、東洋人に特異的なCYP2D6\*10に特に注目し、複数の薬剤で*in vitro*実験により代謝速度を野生型酵素と比較した。CYP2D6\*10は9個の基質薬について73～91%もの大幅な活性減少が確認され、この変異が東洋人でβ遮断薬や抗てんかん薬の効果の個人差の1つの原因になっていると考えられた。以上の研究で予測されるPKの変化をランク分けすることで、薬効・安全性の変化へと系統的に読み替える新しいシステムPISCSを考案した。PISCSにより遺伝子変異や相互作用による用量調節の必要性が、臨床的重要性から合理的に判定可能となり、一方で現在の添付文書の相互作用の注意喚起の不備が明らかになった。

本研究により、市場の非常に多くの薬について、今後CRを評価することで、ファーマコゲノミクスや薬物間相互作用によるPK変化の精度の良い予測が可能となる展望が開けた。また、この方法論を新薬開発に適用することで、合理的に臨床試験を実施して候補品を適切に選択するとともに、適正使用のために真に必要な情報が提供されることが考えられる。

## 目 次

I. 総合研究報告	
薬物体内動態支配因子のファーマコゲノミクスに基づく医薬品開発評価 鈴木 洋史、樋坂 章博、北山 丈二	2
(資料1) CYP2D6*10遺伝多型の代謝活性評価:ミクロソーム代謝実験で得られた固有ク リアランスからのin vivo AUC上昇率の予測	4
(資料2) The Influence of East Asian Specific Variant, CYP2D6*10, on in vitro Formation of Endoxifen, an Active Metabolite of Tamoxifen	38
(資料3) General Framework for the Quantitative Prediction of CYP3A4-mediated Oral Drug Interactions Based on the AUC Increase by Coadministration of Standard Drugs (Clinical Pharmacokinetics, 2007: 46(8): 681-96)	51
(資料4) General framework for the prediction of oral drug interactions caused by CYP3A4 induction from in vivo information (Clinical Pharmacokinetics, 2008: 47(10): 669-80)	78
(資料5) A Proposal for a Pharmacokinetic Interaction Significance Classification System (PISCS) Based on Predicted Drug Exposure Changes and its Potential Application to Alert Classification in Product Labeling (Clinical Pharmacokinetics, 2009, in press)	102
(資料6) しくみから理解する薬物間相互作用 (PharmaTribune, 2009: 1(3))	131
(資料7) Systematic Prediction of Pharmacokinetic Drug-drug Interactions Caused by Changes in Cytochrome P450 Activity (under review)	141
(資料8) ポリコナゾールおよびフルコナゾールの及ぼすCYP基質に対する薬物間相互 作用のIn vitro代謝試験からの予測	216
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	229

## 別添3

### A. 研究目的

薬物治療は医療の主力に位置づけられる治療手段であるが、その効果/副作用には個人差が大きく、結果として効果不十分に陥る、あるいは反対に薬害とまで称される顕著な副作用の発現の例の少なくない点が大きな課題となっている。薬物治療の不確実性を除くためには、薬効発現部位に薬を安定に供給し、薬物動態(PK)を適正化することが重要であるの言うまでもない。これはすなわち、比較的脂溶性の高い経口薬においては、個人の薬物代謝能力を精度良く予測して、用法用量をそれにより適切に調整することに集約される。

本研究は以上の視点から、薬物代謝、特にチトクロームP450(CYP)の代謝能力の個人差の大きな原因となっている遺伝子変異、および酵素の活性を著しく変動させる他薬の併用による相互作用を適切に予測することを目的とした。

薬物動態の予測に関する研究は過去に多くの報告があるが、本研究は多数の薬剤についての網羅的予測を行ったこと、薬物動態の変化だけではなく、変化の臨床的重要性に注目したこと、薬物動態の変化に関する医療関係者への注意喚起の方法を考察したこと、以上の点で独自性を持つ。また、その知見は新薬開発時に収集すべき情報の選択についても、有用な知見を与える物である。

### B. 研究方法

薬物代謝酵素の基質薬を経口投与時のPK変化を決定する最も重要なパラメータとして、経口クリアランスに対する当該代謝経路の寄与率(contribution ratio, CR)に注目した。そしてCRを*in vivo*および*in vitro*の実験から精度良く求める方法を考察した。CRに加えてCYP活性変動を表すパラメータを用いることで、遺伝子変異あるいは相互作用によるPK変化を網羅的に予測した。代謝酵素CYPの遺伝子変異としては、東洋人に特異的なCYP2D6\*10に特に注目し、複数の薬剤で*in vitro*実験により代謝速度を野生型酵素と比較した。以上の研究で予測される薬物間相互作用あるい

は遺伝子変異によるPKの変化をランク分けすることで、薬効・安全性の変化へと系統的に読み替える新しいシステムPISCS(Pharmacokinetic Interaction Significance Classification System)を考案した。

本研究は関連法規および東京大学医学部附属病院の研究倫理指針に従い、また本院規定の研究倫理審査を受けて実施された。

### C. 研究結果

東洋人に特異的なCYP2D6\*10変異をホモで保有する場合に、薬物代謝クリアランスについては9個の基質薬について73~91%もの大幅な活性減少が確認され、この変異が東洋人でβ遮断薬や抗てんかん薬の効果の個人差の1つの原因になっていると考えられた(資料1: CYP2D6\*10 遺伝多型の代謝活性評価: ミクロソーム代謝実験で得られた固有クリアランスからの*in vivo* AUC上昇率の予測)。また、活性代謝物がCYP2D6により生成するタモキシフェンに関して、poor metabolizerでは薬理活性が1/3に減少すると予測されるとともに、CYP2D6\*10をホモで保有する場合は1/2とほぼ同様に減少すると予測された(資料2: The Influence of East Asian Specific Variant, CYP2D6\*10, on *in vitro* Formation of Endoxifen, an Active Metabolite of Tamoxifen)。

さまざまな薬物代謝経路の経口クリアランスへの寄与率を求める方法として、薬物間相互作用によるPK変化の臨床情報から算出する方法を新たに提案し、特にCYP3A4の阻害を介する薬物間相互作用の網羅的予測に成功した(資料3: General Framework for the Quantitative Prediction of CYP3A4-mediated Oral Drug Interactions Based on the AUC Increase by Coadministration of Standard Drugs)。また、同様の方法論を用いることで、これまでに報告の少ないCYP3A4の誘導を介する薬物間相互作用の予測にも成功した(資料4: General framework for the prediction of oral drug interactions caused by CYP3A4 induction from *in vivo* information)。

このようなPKの変化の予測を、薬効・

安全性を考慮した臨床的重要性に読み替える表を利用することで、適切に注意喚起するシステム PISCS を提案し、国内外の薬物間相互作用に関する添付文書の注意喚起との整合性を総合的に検証した（資料 5：A Proposal for a Pharmacokinetic Interaction Significance Classification System (PISCS) Based on Predicted Drug Exposure Changes and its Potential Application to Alert Classification in Product Labeling）。

寄与率 CR が特定の CYP 分子種に偏り、従って遺伝子変異や薬物間相互作用により顕著な PK 変化を示す、あるいはその可能性の高い薬剤を網羅的に検索し、広く公表して注意喚起に努めた（資料 6：しくみから理解する薬物間相互作用）。なお、本資料は日本全国の薬局、病院薬局、薬科大学、製薬会社に配布された。本資料のオリジナルに添付されていたポスターは本報告書に添付されていないが、資料 7 の Table 1 (203-205 ページ) に相当する。CYP を介する薬物間相互作用と遺伝子変異による PK 変化について、さらに総説としてまとめ、特に予測理論として多くの提案を行った（資料 7：Systematic Prediction of Pharmacokinetic Drug-drug Interactions Caused by Changes in Cytochrome P450 Activity）。また新薬開発における、本理論の適用を提案した。

また寄与率 CR について、*in vitro* ミクロソーム代謝実験から良好に評価する方法として、RAF 法を改良して用いることを提案し、実際に多くの薬物の PK 変化を精度良く予測することに成功した（資料 8：ポリコナゾールおよびフルコナゾールの及ぼす CYP 基質に対する薬物間相互作用の *In vitro* 代謝試験からの予測）。

#### D. 考察

本研究により、市場の非常に多くの薬について、今後寄与率 CR を評価することで、ファーマコゲノミクスや薬物間相互作用による PK 変化の精度の良い予測が可能になるとの展望が開けた。また、この方法論を新薬開発に利用することで、CYP の遺伝子変異、あるいは薬物間相互作用による PK 変化を適切に予測し、合理的に臨床試験を実施して候補品を適切に評価し選択するとともに、臨床で適正使用のために有用な情報の提供が可能となった。

PK 変化を網羅的に予測した上で臨床的重要性に基づいて注意喚起するシステム PISCS の完成により、遺伝子変異や相互作用による処方変更や用量調節の必要性が合理的に判定可能となり、一方で現在の添付文書の相互作用の注意喚起の不備が明らかになった。

#### E. 結論

一連の研究の完成により、個別化医療時代の必要性に応える薬物代謝酵素 CYP に関する基本情報の収集法、解析法、利用法のフレームワークが完成された。

#### F. 研究発表

11. 研究成果の刊行に関する一覧表に記載 (229 ページを参照)

#### G. 知的所有権の取得状況

(該当ありません)

## 資料 1

### CYP2D6\*10 遺伝多型の代謝活性評価：ミクロソーム代謝実験で得られた固有クリアランスからの *in vivo* AUC 上昇率の予測

#### Abstract

CYP2D6 は既存の医薬品の約 20-25%の代謝に関わる重要な酵素であり、80 種類以上の遺伝多型が知られている。そのうち CYP2D6\*10 は東アジア人でアレル頻度が約 50%と非常に多い変異であり、そのホモ保因者は欧米人の野生型 (extensive metabolizer, EM) と活性欠損型 (poor metabolizer, PM) の中間の代謝活性を持つことから、一般に中間型 (intermediate metabolizer, IM) に分類される。一方で、*in vitro* 実験により、CYP2D6\*10 の EM に比しての活性低下の程度を *in vivo* のクリアランス低下と関係付けた研究は極めて少ない。そこで本研究は、CYP2D6 の基質薬物を対象に CYP2D6\*10SNP による代謝活性の低下を定量的に評価した上で、代謝における CYP2D6 の寄与率を考慮し、\*10/\*10 保因者における血中濃度の予測可能性を検討することを目的とした。

基質として metoprolol、venlafaxine、desipramine、tropisetron、risperidone、propafenone、bufuralol、及び dextromethorphan を選択し、ヒト肝ミクロソームを用いて CYP2D6\*10 SNP による活性低下を定量的に評価した。ヒト肝ミクロソームは、中国人の\*10/\*10 保因者 (n=3)、欧米人の EM (pooled)、及び PM (n=1~3) より調製されたものを用いた。EM における CYP2D6 の選択的阻害剤である quinidine の有無による  $CL_{int}$  変化から EM の CYP2D6 代謝寄与率と CYP2D6 の固有クリアランス ( $CL_{int,2D6}$ ) を算出し、\*10/\*10 保因者の活性を EM に対する相対比で示した。 $CL_{int}$  および  $CL_{int,2D6}$  の絶対値は基質ごとに著しく異なったが、\*10/\*10 保因者の EM に対する  $CL_{int,2D6}$  の相対値は 9-30% であり、いずれの基質も例外なく EM に対して顕著に低下していた。また、CYP2D6 の代謝寄与率は 57-99% だった。ヒト肝ミクロソームにおける CYP2D6 の発現量を Western blot により定量化したところ、\*10/\*10 保因者の発現量は EM の約 1/2 であった。

EM の肝ミクロソームの *in vitro* 代謝活性と血中濃度の文献報告値から求めた *in vivo* のクリアランスを比較した。両者の間には明確な相関関係が認められ、特に *in vitro* 代謝活性の極めて低かった化合物を除くと、*in vitro* 固有クリアランスと *in vivo* から求められる肝固有クリアランスが 0.5-1.5 倍の範囲で良く一致した。ヒト肝ミクロソーム代謝実験で求めた EM と \*10/\*10 保因者の  $CL_{int}$  比より、\*10/\*10 保因者の EM に対する AUC 上昇率を予測し、実際の *in vivo*

の上昇率と比較した。*in vitro* より予測した AUC の上昇率は、論文の報告値との誤差が 2 倍の範囲内であった。

市販のパキュロウイルス発現系 CYP2D6\*1 及び\*10 ミクロソームを用いて、同様の方法で代謝実験を行い固有クリアランスを評価した。しかし、パキュロウイルス発現系による CYP2D6 の\*10 変異体の活性比は、全ての基質で 5.4%以下と極端に低下しており、この結果は本研究におけるヒト肝ミクロソームの活性値のみならず、酵母発現系ミクロソームの文献報告値や *in vivo* 体内動態の文献報告値とも整合せず、パキュロウイルス発現系の活性から CYP2D6\*10 保因者の薬物動態を予測することは適切でないと考えられた。

以上より、ヒト肝ミクロソームを使った *in vitro* 実験より求めた\*10/\*10 保因者の CYP2D6 相対活性は、mg ミクロソーム蛋白量当たりでは多くの基質で EM の約 9-30%程度であり、従って、CYP2D6 の代謝寄与率が 60~100%と高い薬物の血中濃度 AUC は、2~5 倍程度に上昇すると予測された。この上昇は PM の場合の 3~∞倍の AUC 上昇に比べると少ないが、\*10 アリル頻度の高い東アジア人では医薬品開発や臨床使用において留意すべき多型であることが示された。

## Introduction

Cytochrome P450 は、体内に投与された薬物の肝臓における第 1 相の代謝を担っている。その一つの分子種である CYP2D6 は、ヒト肝臓の全 P450 のうち存在比は 2%程度と [1]、発現量は少ないにも関わらず、臨床で使われる薬物の約 20-25%の代謝に関与し [2, 3]、CYP3A4 に次いで重要な薬物代謝酵素と言われる。基質としては、β-遮断薬、抗不整脈、抗うつ薬、抗精神病薬、モルヒネ誘導体、抗ヒスタミン薬等が知られる [3]。CYP2D6 は CYP3A4 とは異なり遺伝子変異が多く、現在までに約 80 種以上が知られている [2] (参考 <http://cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>)。活性の変化を伴う変異も多く、そのフェノタイプとしては、活性を欠損するアリルを全く持たない野生型の extensive metabolizer (EM)、活性を欠損するアリルをヘテロで持ち EM の半分程度に代謝活性である intermediate metabolizer (IM)、活性欠損のアリルをホモで持ち活性の欠如する poor metabolizer (PM)、さらに遺伝子重複により活性が EM より亢進する ultrarapid metabolizer (UM) の 4 種類に分類される [2]。

CYP2D6 のフェノタイプの頻度は、人種毎に大きなばらつきがある (Table A) [4]。PM の割合は、欧米人は 7-10%と高頻度であるのに対し、Japanese, Korean, Chinese では 1%程度に過ぎない [3]。欧米人で PM が多い理由は、特に\*4 型の頻度が 20-25%と高いため

あるが、東アジア人では\*4型は1%以下にすぎない。PMの患者では、薬物治療において、薬物血中濃度の上昇により副作用を生じる、あるいはCYP2D6による代謝生成物が薬理活性を有す場合は十分な治療効果が得られないなどの可能性がある。このため、欧米では個別治療化を目指した研究が多く行われており、抗うつ薬等で表現型に応じた投与量設定が提唱され [5, 6]、大きなインパクトを与えている。

東アジア人は欧米人に比べてPMの割合が少ないが、CYP2D6の代謝活性の平均は欧米人よりも低い。その原因の1つに、活性の減弱する\*10変異が東アジア人では高頻度に存在があると考えられている。東アジア人以外の人種では\*10型は非常に頻度が少ない [7, 8]。CYP2D6\*10変異は、これまでもTable B-1, B-2に示すように野生型に対して代謝活性が減少すると報告されてきた。しかし、*in vitro*と*in vivo*の活性変化が同じ薬物で検討された例はほとんどなく、また*in vitro*研究による活性の変化は、数倍から数100倍程度と報告ごとに大きく違っているなど、\*10変異による活性の変化について系統的研究はなかった。また、フェノタイプとしては\*10変異は活性を完全には欠損しないことから、一般に中間型、IMに分類され、そのため\*10変異では活性は大きくは変わらないとのイメージが先行してしまった。以上のように、CYP2D6\*10変異は東アジア人における発現頻度の高さにも関わらず、その臨床的重要性が十分に検証されることはなかった。

本研究では、*in vivo*の\*10/\*10保因者の薬物動態が報告されている7種類の薬物を特に選択し、*in vitro*代謝実験で\*10/\*10保因者の肝ミクロソームおよび変異型発現酵素の代謝活性を検討した。その結果、\*10変異によるCYP2D6代謝活性の変化の程度の共通性について情報を得た。また、\*10変異による*in vivo*の血中濃度の変化を*in vitro*実験から予測する方法を構築した。特に、*in vitro*の実験系として発現系酵素を用いる場合には注意が必要であることも明らかとなった。

## Materials and Methods

### Materials

ヒト肝ミクロソームとして、\*10/\*10である3名の中国人の個人肝ミクロソームをRILD (Shanghai, China) より、EM (\*1/\*1)の欧米人のプールドヒト肝ミクロソーム、及び活性欠損型変異であるPM (\*4/\*4) 3名の欧米人の個人肝ミクロソームをGentest (Massachusetts, USA) より購入した。バキュロウイルス発現系ミクロソームは、Gentest (Massachusetts, USA) よりヒトCYP2D6\*10 Allelic Variant Kitを購入し、実験に用いた。

ウェスタンブロットの一次抗体は mouse monoclonal anti-CYP2D6 antibody (Gentest, Massachusetts, USA)、二次抗体は ECL Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) を用いた。HRP の反応は、Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England) の ECL plus Western Blotting Detection System キットを使用し、BioLad (Tokyo, Japan) の ChemiDocXRS を用いて検出した。イメージの定量解析には BioLad (Tokyo, Japan) の Quantity One ソフトを使用した。その他の試薬、補酵素等は、試薬特級品以上のものを使用した。

## Methods

### 代謝実験

リン酸塩緩衝液 (pH = 7.4) (終濃度 0.1 M)、EDTA (終濃度 0.1 mM)、各種ヒト肝ミクロソーム (蛋白質濃度は全てのミクロソームで同じに調製)、基質、さらに阻害実験では CYP2D6 の選択的阻害剤である quinidine (終濃度  $1 \cdot 10 \mu\text{M}$ ) を 1.5 mL プラスチックチューブに加え、37 度に温めたインキュベータ (水浴) で 5 分間ブレインキュベーションしたのち、予め混合しておいた NADPH 産生ミックス溶液 [NADP<sup>+</sup> (終濃度 0.5 mM)、glucose 6-phosphate (終濃度 2 mM)、MgCl<sub>2</sub> (終濃度 4 mM)、glucose 6-phosphate dehydrogenase (終濃度 1 unit/mL) を加えることで反応を開始した。全ての試薬を加えた後の液量は、100  $\mu\text{L}$  で行った。所定時間反応させた後、10  $\mu\text{L}$  の 60% 過塩素酸を添加することにより反応を停止させた。続いて反応液に 12  $\mu\text{M}$  内部標準物質 (internal standard, IS) 溶液を 10  $\mu\text{L}$  添加後 (終濃度 1  $\mu\text{M}$ )、14,000G で 5 分間、4 °C で遠心分離し、上清を測定試料とした。

### HPLC 測定

HPLC 分析には島津 (Kyoto, Japan) のシステムコントローラー (SLC-10A<sub>vp</sub>)、ポンプ (LC-10AD<sub>vp</sub>)、オートインジェクター (SIL-10AD<sub>XL</sub>)、デガッサー (DGU-14A)、カラムオープン (CTO-10A<sub>vp</sub>)、蛍光検出器 (RF-10A<sub>x</sub>)、紫外可視分光光度計検出器 (SPD-10A) 及びインテグレーター (C-R7A<sub>plus</sub>) を用いた。カラムは CAPCELL PACK C<sub>18</sub> MGII 250×4.6mm, 5  $\mu\text{m}$ 、ガードカラムは Guard Cartridge C<sub>18</sub> MGII 4×10 mm を資生堂 (Tokyo, Japan) より購入して用いた。Desirpamine、venlafaxine、propafenone、risperidone、metoprolol、tropisetron では基質未変化体の減少速度を、bufuralol、dextromethorphan では代謝物 (1'-bufuralol、dextrorphan) の生成速度を測定した。移動



相はアセトニトリル / 0.05M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH = 2) もしくはアセトニトリル / 0.1M 酢酸アンモニウム水溶液を流速 1.0 mL/min で用いた。カラム温度は 1'-hydroxybufurlol 測定では 45 度、他の測定では 40 度とした。注入容量は 40  $\mu$ L (bufuralol は 20  $\mu$ L) とした。全ての薬物濃度の測定は、紫外部の吸光度あるいは蛍光を検出し、内部標準物質と被験物質のピークの高さ比により行った。

#### 蛋白非結合率

マイクロソーム代謝実験試料中の薬剤蛋白非結合率の測定を超遠心分離法により行った。検体 130  $\mu$ L を 100,000g (40,000 rpm、37 度) で 60 分間遠心し、上清中の薬物濃度を遠心分離前と比較して HPLC で測定し、蛋白非結合率を算出した。

#### Western blotting を用いた CYP2D6 発現量の定量解析

サンプルを各ウェルに注入し、ポリアクリルアミドゲル 1 枚あたり 20 mA の定電流で室温にて約 90 分間電気泳動した後、蛋白質を PVDF メンブレンに転写した (15V、1 時間)。メンブレンを 0.05 % Tween20 含有の 0.01M Tris 緩衝液 (TTBS : pH 8、0.15 M NaCl、3% BSA 含有) 5 mL に浸し、室温で 1 時間回転振とうしてブロッキングした。メンブレンを洗浄後、マウス腹水由来抗 CYP2D6 抗体 1.25  $\mu$ L を 5 mL の 0.1% BSA 含有 TTBS で希釈して浸し、室温で 1 時間インキュベートした。メンブレンを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ由来抗マウス抗体 1  $\mu$ L を 5 mL の 0.1% BSA 含有 TTBS に希釈して浸し、室温でさらに 1 時間インキュベートした。メンブレンを洗浄後、ECL Plus Western Blotting Detection System によりペルオキシダーゼの発色反応を行い、化学発光を定量した。

#### 解析方法

##### 1) 親化合物の減少速度の算出

固有クリアランスを (式 2) を用いて算出した。

$$CL_{int} = \frac{\ln(C_0/C_t)}{t \times [\text{microsome}] \times fu} \quad (\text{式 2})$$

$CL_{int}$  : 固有クリアランス ( $\mu$  L / min / mg MS)

$C_t$  : インキュベーションしたサンプルの基質濃度

$C_0$  : time point  $t = 0$  で反応をストップさせたサンプルの基質濃度

$t$  : インキュベーション時間

[microsome] : 反応液中マイクロソーム濃度

$fu$  : 蛋白非結合率

また、quinidine 存在下で代謝反応を行ったサンプルの濃度(Cq)を上と同様な方法で求め、quinidine 存在下での固有クリアランス (CL<sub>int,quin</sub>) を求めた。(式 3)

$$CL_{int,quin} = \frac{\ln(C_0/C_q)}{t \times [\text{microsome}] \times f_u} \quad (\text{式 3})$$

CL<sub>int,quin</sub> : quinidine 存在下での固有クリアランス (μ L/min/ mg MS)

Cq : quinidine 存在下で代謝反応を行ったサンプルの濃度

quinidine 非存在下の固有クリアランスから quinidine 存在下の固有クリアランスの差を取ることで、CYP2D6 成分の固有クリアランス (CL<sub>int,2D6</sub>) を求めた (式 4)。

$$CL_{int,2D6} = CL_{int} - CL_{int,quin} = \frac{\ln(C_q/C_t)}{t \times [\text{microsome}] \times f_u} \quad (\text{式 4})$$

CL<sub>int,2D6</sub> (μ L/min/mg MS) : CYP2D6 の固有クリアランス

CYP2D6 の代謝に占める割合 (寄与率) は、(式 5) より求めた。

$$f_{2D6} = \frac{CL_{int,2D6}}{CL_{int}} \quad (\text{式 5})$$

f<sub>2D6</sub> : CYP 2 D 6 の代謝に占める割合

なお、上記の CL<sub>int</sub>、CL<sub>int,2D6</sub>、および f<sub>2D6</sub> の概念図を Fig. 1 に示した。

#### 代謝物の生成速度測定

Bufuralol、dextromethorphan については、CYP2D6 によって選択的に代謝される代謝物 (それぞれ 1'-hydroxybufuralol、dextrorphan) の生成速度を測定した。検量線用の試料は 1'-hydroxybufuralol の濃度が 0.03、0.1、0.3、1、10 μ M、dextrorphan の濃度が 0.01、0.05、0.1、0.5 μ M になるように、ブランクマイクロソーム溶液に加えて調製した。

#### \*10/\*10 保因者の経口クリアランス及び AUC 上昇率の *in vitro* からの予測方法

薬物を経口投与後の経口クリアランスは、肝外クリアランスの無視できる場合に、全身クリアランスをバイオアベイラビリティで除して示される。

$$CL_{oral} = \frac{CL_{tot}}{F} = \frac{CL_{tot}}{F_a \times F_g \times F_H} \quad (\text{式 9})$$

$CL_{\text{oral}}$ : 経口クリアランス  
 $CL_{\text{tot}}$ : 全身クリアランス  
 $F$ : バイオアベイラビリティ  
 = 吸収率 ( $F_a$ ) × 小腸アベイラビリティ ( $F_g$ ) × 肝アベイラビリティ ( $F_H$ )

ここで、本研究で扱った基質は脂溶性の高い薬物なので、吸収率 ( $F_a$ ) を 1 とみなすこととする。また、CYP2D6 は腸管に殆ど発現していないため、消化管通過率 ( $F_g$ ) も 1 と仮定する。このとき、経口クリアランスは Well-stirred model の仮定の下で (式 10) に示したように、血漿中非結合分率と肝固有クリアランスの積で現される。

$$CL_{\text{oral}} = \frac{CL_{\text{tot}}}{F_H} = \frac{Q_H \cdot f_p \cdot CL_{h,\text{int}}}{Q_H + f_p \cdot CL_{h,\text{int}}} = f_p \cdot CL_{h,\text{int}} \quad (\text{式 10})$$

$f_p$ : 血漿中非結合分率

$CL_{h,\text{int}}$ : 肝固有クリアランス

今回、各基質について、1\*1 型ヒト肝マイクロソーム及びバキュロウイルス発現系 CYP2D6\*1 ミクロソームを使った *in vitro* 代謝実験より  $CL_{h,\text{int}}$  を求め、その値を実際に *in vivo* で報告されている経口クリアランスから血漿中結合分率の文献値を用いて (式 10) により算出した  $CL_{h,\text{int}}$  と比較した。また、バキュロウイルス発現系マイクロソーム CYP2D6\*1 を用いた際は、CYP2D6 の寄与率と mg ミクロソーム蛋白量当たりの CYP2D6 発現量を考慮して、ヒト肝と対応する値に変換した (式 11)。

$$CL_{h,\text{int MS}} \times 5 = CL_{h,\text{int buculo}} \times 5 \quad (\text{式 11})$$

【左項】  $CL_{h,\text{int MS}}$ : ヒト肝マイクロソームの代謝活性 ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ )

$f_{2D6}$ : 2D6 の代謝寄与率

【右項】  $CL_{h,\text{int MS}}$ : バキュロウイルス発現系マイクロソームの代謝活性 ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol P450}$ )

5: 発現量 5 pmolCYP2D6/mg (文献値) [19]

薬物を経口投与後の AUC は、(式 11) の関係を用いて (式 12) で表される。

$$AUC_{po} = \frac{dose}{CL_{Lorat}} = \frac{dose}{f_p \times CL_{int}} \quad (式 12)$$

$AUC_{po}$  : 経口投与後の AUC

dose : 投与量

$f_p$  : 血漿中薬物非結合型分率

(式11)より、\*10/\*10 型、\*1/\*1 型の被験者の  $AUC_{po}$  比は、肝固有クリアランスの比で表される (式 13)。

$$\frac{AUC_{po,*10/*10}}{AUC_{po,*1/*1}} = \frac{CL_{h,int,*1/*1}}{CL_{h,int,*10/*10}} \quad (式 13)$$

\*10/\*10 型、\*1/\*1 型ヒト肝マイクロソームを使った代謝実験より肝固有クリアランスを求め、その比をとることで、野生型に対する\*10/\*10 保因者の  $AUC_{po}$  の上昇率を予想した。その結果を、実際に報告されている *in vivo*  $AUC_{po}$  上昇率と比較した。

## Results

### 1) Bufuralol 及び dextromethorphan のヒト肝マイクロソーム代謝活性

CYP2D6 の選択的基質として標準的に用いられている bufuralol 及び dextromethorphan を用い、EM 型、\*10/\*10 (n=3) 及び PM 型マイクロソームの代謝活性の測定を行った。Dextromethorphan の結果は Fig. 1 に、bufuralol の結果は Fig. 2 に示した。

Dextromethorphan, bufuralol のいずれにおいても、各マイクロソームの活性は EM、\*10/\*10 (n = 3)、PM マイクロソームの順に高かった。CYP2D6 の選択的阻害剤として知られる quinidine (1-10  $\mu$ M) 存在下では、これらの活性は殆ど消失した (Fig. 1, 2 参照)。また、PM の肝マイクロソームの場合も、ほぼ活性は認められなかった。\*10/\*10 保因者の肝マイクロソームでは、活性は EM に対し dextromethorphan では  $20.1 \pm 6.49\%$ 、bufuralol では  $21.5 \pm 5.75\%$  に減少した。

### 2) 低クリアランス化合物のヒト肝マイクロソーム代謝活性

CP2D6 の代謝活性の絶対値が低かった venlafaxine, metoprolol 及び tropisetron の結果

を低クリアランス化合物としてまとめて述べる。これらの基質は、基質濃度  $0.3 \mu\text{M}$ 、ミクロソームの蛋白濃度を  $0.9\text{-}2 \text{ mg/mL}$  とし、 $30\text{-}60$  分間インキュベーションした後の基質の減少を定量することで活性を評価した。これらの実験条件は、予備実験の結果から EM の肝ミクロソームの場合に基質の減少が  $20\%$  程度となるように調節して定めた。venlafaxine、metoprolol 及び tropisetron の EM、\*10/\*10 及び PM ミクロソームの基質毎の  $\text{CL}_{\text{int}}$  は Fig. 3 に示した。いずれの基質においても、\*10/\*10 では EM に対して大きく  $\text{CL}_{\text{int}}$  の低下が認められた (EM に対して  $7\text{-}37\%$ )。さらに\*10/\*10 は PM と同程度か、やや高い活性を示した。

Venlafaxine について、EM、\*10/\*10 及び PM の肝ミクロソームと quinidine の存在下及び非存在下でインキュベーションした詳細の結果を例として挙げる。Fig. 4, 5 に代謝活性を示した。Venlafaxine を基質に用いた場合、\*10/\*10 型の  $\text{CL}_{\text{int}}$  は EM に対して  $37 \pm 8.2\%$  (平均  $\pm$  SD、以下同様) に減少した。\*10/\*10 型の  $\text{CL}_{\text{int}}$  は quinidine で阻害され、さらに活性が半分以下に低下した。これに対し、PM の  $\text{CL}_{\text{int}}$  は EM に対して  $23 \pm 20\%$  に減少し、quinidine による阻害は殆ど認められなかった。

本章で検討した基質の、肝ミクロソームにおける quinidine 存在下及び非存在下の代謝活性の詳細は、Table 1 に示した。

### 3) 高クリアランス化合物のヒト肝ミクロソーム代謝活性

Propafenon、desipramine、及び risperidone は CYP2D6 の代謝活性の絶対値が比較的高かったことから、ここで高クリアランス化合物としてまとめて述べる。これらの基質は、基質濃度  $0.3 \mu\text{M}$ 、ミクロソームの蛋白濃度を  $0.08\text{-}0.5 \text{ mg/mL}$  とし、 $10\text{-}30$  分間インキュベーションした後の基質の減少を定量することで活性を評価した。これらの実験条件についても、予備実験の結果から EM の肝ミクロソームの場合に基質の減少が  $20\%$  程度となるように調節して定めた。各基質の EM、\*10/\*10 及び PM ミクロソームの基質毎の  $\text{CL}_{\text{int}}$  は Fig. 6 に示した。いずれの基質においても、\*10/\*10 では EM に対して大きく  $\text{CL}_{\text{int}}$  の低下が認められた (EM に対して  $17\text{-}26\%$ )。さらに\*10/\*10 は PM と同程度か、やや高い活性を示した。

以上の結果より、本章で検討したいずれの基質においても\*10/\*10 ミクロソームは  $\text{CL}_{\text{int}}$  の絶対値が EM に比べて著しく減少するが、若干は CYP2D6 による代謝活性が残存するため、CYP2D6 活性の欠如した PM 型よりは高い代謝活性を持つことが分かった。

### 4) バキュロウイルス発現系ミクロソームによる代謝活性

バキュロウイルス発現系 CYP2D6\*1、\*10 ミクロソームを用いて、ヒト肝ミクロソームと同様の方法で代謝実験を行い、pmol P450 当たりの固有クリアランスを算出した (Table 2、Table 3)。なお、Table 3 には比較として、文献値も含めてヒト肝ミクロソーム及び酵母発現系ミクロソームの同様の値を記載した。

バキュロウイルス発現系ミクロソームを用いて求めた  $CL_{int,2D6}$  の \*10/\*10 保因者の相対的活性は、全ての基質で 0.2~5.4% 未満と顕著な減少が認められた。この結果は、ヒト肝ミクロソームの対応する値や、臨床で使われている薬 (debrisoquine, spartein, dextromethorphan, bufuralol 等) で \*10/\*10 保因者に一定の CYP2D6 活性がみられるという事実と矛盾するものである。また、バキュロウイルス発現系ミクロソームの結果は、文献で報告されている酵母発現系ミクロソームの結果とも一致しなかった。

#### 5) \*10/\*10 型の CYP2D6 成分の固有クリアランスの変動の評価

Quinidine は CYP2D6 の阻害剤として優れた阻害活性と選択性を持つことから、quinidine 存在及び非存在下の活性差をヒト肝ミクロソームの CYP2D6 の固有クリアランス ( $CL_{int,2D6}$ ) と見なして解析を行なった。Table 2 に EM 型の CYP2D6 の代謝寄与率及び \*10/\*10 (n = 3) の EM に対する  $CL_{int,2D6}$  の相対活性を表した。

以上より、今回検討した基質は  $CL_{int}$  の絶対値には約 200 倍の違いがあったが (Fig. 3、6)、\*10/\*10 型の  $CL_{int,2D6}$  相対活性はそれぞれ 9%-27% (Table 2) であり、比較的一定の割合であった。その中では metoprolol の相対活性が 9% と低かったが、その他の 7 化合物は 17% 以上であった。また、\*10/\*10 のロット間の  $CL_{int,2D6}$  の大小は、基質に関わらず同様のパターンを示し、 $CL_{int,2D6}$  活性は PM においては 0 もしくは数% と無視できる程度に小さかった。(data not shown)

#### 6) \*10/\*10 型 CYP2D6 発現量の変動

$CL_{int,2D6}$  は、CYP2D6 の発現量の変動による影響を受けると考えられる。そこで EM、3 つのロットの \*10/\*10 型、及び PM の肝ミクロソームの CYP2D6 含量を、モノクローナル抗 CYP2D6 抗体を用いて Western blotting を行うことで定量した。なお、control として、0.02 pmol のバキュロウイルス発現系 CYP2D6\*1 ミクロソームを同時に分析した。その結果を Fig. 7 に示した。

\*10/\*10 ミクロソームは、3 つのロットいずれにおいても EM に対してバンドが薄くなっており、定量解析の結果、\*10/\*10 型は EM の  $54 \pm 6.7\%$  に CYP2D6 発現量が低下していた。PM のミクロソームにおいて、CYP2D6 由来のバンドが検出されなかった。

#### 7) EM の肝マイクロソームを用いた *in vitro* 実験の肝固有クリアランスと *in vivo* 文献値より算出した肝固有クリアランスの比較

最初に EM の肝マイクロソームの *in vitro* 代謝活性から求めた肝固有クリアランスと、*in vivo* から求められる肝固有クリアランスを比較した。両者の間には Fig. 8 に示すように明確な相関関係が認められ、特に *in vitro* 代謝活性の極めて低かった tropisetron、metoprolol 及び venlafaxine を除く propranolol、paroxetine、risperidone、carvedilol、及び nortriptyline は、Table 5 に示すように *in vitro* 実験から求めた肝固有クリアランスと *in vivo* の肝固有クリアランスが 0.5-1.5 倍の範囲で良く一致した。なお、tropisetron ではこの差は 15 倍、metoprolol で 3.5 倍、venlafaxine で 3.1 倍の違いが認められた。パキエロ発現系マイクロソームを用いた場合には、得られた固有クリアランスと *in vivo* の固有クリアランスの差は大きく、tropisetron では約 43 倍、metoprolol と propafenone では約 8 倍の乖離が認められた。以上より、本研究で用いた多くの薬物については、肝マイクロソームの代謝活性から *in vivo* の薬物動態を良好に予測可能であることが示された。

#### 8) \*10/\*10 保因者の AUC 上昇率の予測及び文献報告の *in vivo* AUC 上昇率との比較

次に EM に対する\*10/\*10 保因者の AUC 上昇の予測性について検討を加えた。比較する薬物としては、基質未変化体の減少で固有クリアランスを測定しており、同時に *in vivo* で比較的信頼度の高い\*10/\*10 保因者の AUC 情報がある risperidone、propafenone、metoprolol、tropisetron、及び venlafaxine を選択した。EM と\*10/\*10 保因者の固有クリアランス  $CL_{int}$  比を (\*10/\*10 保因者の野生型に対する AUC 比に対応)、実際に報告されている *in vivo* の AUC 上昇率と比較した (Table 6)。その結果、*in vitro* より予測した AUC の上昇率についても、論文の報告値との誤差が 0.5-2 倍の範囲で良く一致した。ただし、AUC の上昇率は 2.1-6.3 倍と比較的狭い範囲に分布していたことから、今回の予測値と実測値の間には明確な相関関係は認められなかった。なお、今回選択した比較的信頼性が高いと考えられる *in vivo* の文献情報についても、AUC の上昇率にはバラつきが比較的大きく、Table 6 に示すように\*10/\*10 保因者と PM の上昇率の間においても明確な相関関係は認められなかった。

## Discussion

ヒト肝マイクロソームを使った *in vitro* 実験より求めた\*10/\*10 の固有クリアランス  $CL_{int}$  は、今回検討した全ての薬物で EM と比べると著しく減少することが示された。また、

\*10/\*10 保因者の CYP2D6 相対活性に注目すると、多くの基質で EM の約 20-30% 程度であり、\*10/\*10 の各ロットの  $CL_{int,2D6}$  は、非常に良く似た大小のパターンを示した。なお、今回用いた基質の中で metoprolol は、CYP2D6 相対活性が 9% であり、他の基質より低い値であった。

これらの結果より、\*10/\*10 保因者の活性低下率は基質毎に違い、CYP2D6 の代謝活性が野生型 EM に比して 20% に減少するものが多いが、基質によっては多少の変動のあることが示唆された。今後は更に基質の数を増やし、この可能性について検討を加えていくことが必要であると言える。

抗 CYP2D6 モノクローナル抗体を用いて CYP2D6 含量の定量を行った結果、\*10/\*10 ミクロソームは EM の約半分程度に発現量が低下しているという結果を得た。なお、以前の論文で、島田らが日本人の肝ミクロソームの CYP2D6 の発現量を調べており、\*10/\*10 保因者 (n = 7) の発現量は、\*1/\*1 保因者 (n = 9) に比べて 1/3 に低下していると報告している [15]。今回の結果は、n 数及び実験精度を考慮すると、島田らのものと一致するものであると考えられる。

EM の酵素に比べて CYP2D6\*10 で薬物代謝活性が低下する理由としては、第一に、上記の通り、発現量の低下が挙げられる。CYP2D6\*10 の発現系を調製するとき、mRNA レベルは CYP2D6\*1 と同程度であるにも関わらず発現量が低いことが報告されている [9]。発現量減少の理由は不明であるが、EM に比べて酵素の安定性が悪いのですぐ分解されてしまう可能性が考えられる。CYP2D6\*10 分子は EM に比べて熱安定性が悪いという報告がある [14]。

本研究のミクロソームの実験結果や *in vivo* 情報との比較により、CYP2D6\*10 のミクロソームとしてバキュロウイルス発現系を用いた場合には、CYP2D6\*1 と \*10 の固有クリアランス比を過大評価してしまう危険性が明らかとなった (Table 4)。なお、CYP2D6\*10 酵素は野生型に比べて熱安定性の悪いことが報告されているが [14]、バキュロウイルス発現系 CYP2D6\*10 ミクロソームの Western blot の結果、分解物が認められなかったことから (data not shown)、実験前に分解してしまっている可能性は薄いと考えられる。

酵母発現系ミクロソームとヒト肝ミクロソームの比較を文献情報に基づき調査したところ、bufuralol と dextromethorphan の代謝活性の 2 例が見出され、bufuralol では酵母発現系の \*10 型酵素の相対活性が 12 あるいは 17% でありヒト肝ミクロソームの実験値 19% と同程度の値であったが、dextromethorphan では酵母発現系の \*10 型酵素の相対活性が 3% でありヒトの実験値 21% よりかはバキュロウイルス発現系の結果の 0.3~1% に近い値であった。酵母発現系 CYP2D6\*10 ミクロソームが実験ツールとしてヒト CYP2D6\*10 分子の代



替と成り得るかについては、今後さらなる検討が必要と考えられる。

バキュロウイルスの発現系はヒト肝マイクロソームの酵素と多少の性質の違いが報告されることはあるが、一般には定性的に基質特異性等を論ずるには十分に有用なツールとして広く認められている。今回の CYP2D6\*10 のように顕著な違いの見出された例はなく、今後さらに原因や活性の差を少なくするための対策が探求されるべきと考えられる。

本研究の結果により、用いた多くの薬物については、肝マイクロソームの代謝活性から EM の *in vivo* の薬物動態を良好に予測可能であることが示された。これに対し、バキュロウイルスの発現系の代謝活性から *in vivo* への外挿性は良好ではなかった。限られた化合物についての知見ではあるが、この結果は、バキュロウイルスの発現系の\*10 変異型ではない野生型の CYP2D6 の活性についても、何らかの肝マイクロソームの代謝活性とは異なる性質を有することを疑わせるものである。

これに対し、肝マイクロソーム実験による *in vivo* への外挿性は一般に良好であった。しかし、低クリアランスである tropisetron, metoprolol 等については、偏差が認められた。この原因は不明であるが、可能性としては、これらの化合物の *in vivo* における transporter や CYP 以外の代謝排泄経路のクリアランスへの寄与が考えられる。

本研究を通じて、東アジア人で発現頻度の高い CYP2D6\*10 変異のホモ保因者では、CYP2D6 に代謝消失を依存する薬物のクリアランスの低下により、大幅な薬物血中濃度の上昇を生ずる可能性の高いことが示唆された。そのクリアランスの低下の程度を予測するためには、\*10 変異型の肝マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝研究が有用であると考えられる。

## Conclusion

本研究の結果、ヒト肝マイクロソームを使った *in vitro* 実験より求めた\*10/\*10 保因者の CYP2D6 相対活性は、多くの基質で野生型の 20-30%程度であることが示された。従って、CYP2D6 の代謝寄与率が 60-100%と高い基質の場合に、\*10/\*10 保因者の固有クリアランスは一般に 20-48%程度に減少し、その結果、薬物血中濃度 AUC は、2-5 倍程度に上昇すると考えられる。この上昇は CYP2D6 の PM の場合に予想される 3- $\infty$  倍の AUC 上昇に比べると緩和ではあるが、東アジア人にとって臨床上十分な注意の必要な薬物もあると考えられた。なお、metoprolol では\*10/\*10 保因者の CYP2D6 相対活性が 9%であり、この値は他の基質に対して低かったように、CYP2D6\*10 変異による代謝活性の変化は基質ごとに違う場合もあると予想された。今後、より多くの基質で更に EM と\*10/\*10 のロットを増やした検討が有用であると考えられる。

今回、*in vitro* ヒト肝マイクロソーム代謝活性から *in vivo* の経口クリアランスと AUC 上昇率を予測し、多くの薬物で誤差 0.5-2 倍の範囲内の良好な精度を得ることに成功した。しかし一方で、経口クリアランスの予測は tropisetron や metoprolol 等の低クリアランスの薬物では、予測値と *in vivo*

の文献報告値に乖離が認められた。今後はさらに、低濃度(臨床の血中濃度に近いもしくは  $K_m$  値より低い濃度が望ましい)及び低クリアランスの実験を可能とする分析法の改良、これらの薬物の代謝消失機構の詳細な検討、及び精度の高い *in vivo* 研究の追加により、*in vitro* 実験からの *in vivo* 体内動態変動の良好な予測が可能になるものと考えられる。

さらに今後は、CYP2D6 によって代謝される薬物を服用する\*10/\*10 保因者が、同時に他の代謝酵素の阻害剤を併用した際の薬物間相互作用の研究を進めたいと考える。実際、単一の酵素分子種で代謝される基質は少なく、また臨床の現場では併用薬のある場合が非常に多い。例えば CYP2D6 (50%)と CYP3A4 (50%)によって代謝される薬物を服用する\*10/\*10 保因者が、CYP3A4 の阻害剤を併用する場合には、CYP2D6 の活性が 20%程度残存しているとしても、AUCは5倍に上昇する可能性がある。CYP2D6 が代謝に大きく関与する薬物には、 $\beta$ -遮断薬や抗精神病薬、抗うつ薬等、臨床で使用頻度の高いものも多く、併用薬が他の分子種を阻害することによって、CYP2D6 で代謝される薬物の血中濃度が上がる例が数例報告されている[21, 22]。このような薬物について、更に *in vitro* の研究及び *in vivo* の臨床試験の数を増やして、\*10/\*10 保因者の pharmacokinetics を詳細に調べていくことは非常に重要と考える。

本研究のような *in vitro* の実験手法による\*10/\*10 保因者の血中濃度上昇の予測を実用に行うことは、効果的、効率的な薬物治療を目指すうえで、非常に有用であると考ええる。

## References

1. Rodrigues, A.D., *Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes*. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57(5): p. 465-80.
2. Zanger, U.M., S. Raimundo, and M. Eichelbaum, *Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2004, 369(1): p. 23-37.
3. Gardiner, S.J. and E.J. Begg, *Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice*. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): p. 521-90.
4. Lee, S.Y., et al., *Sequence-based CYP2D6 genotyping in the Korean population*. *Ther Drug Monit*, 2006, 28 (3) p.382-7.
5. Kirchheiner, J., et al., *Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response*. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(5): p. 442-73.
6. Kirchheiner, J., et al., *CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages*. *Acta Psychiatr Scand*, 2001, 104(3): p. 173-92.
7. Ozawa, S., et al., *Ethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP2C19, CYP3As and MDR1/ABCB1*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, 19(2): p. 83-95.
8. Tateishi, T., et al., *Analysis of the CYP2D6 gene in relation to dextromethorphan O-demethylation capacity in a Japanese population*. *Clin Pharmacol Ther*, 1999, 65(5): p. 570-5.

9. Johansson, I., et al., *Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation*. *Mol Pharmacol*, 1994. **46**(3): p. 452-9.
10. Fukuda, T., et al., *The impact of the CYP2D6 and CYP2C19 genotypes on venlafaxine pharmacokinetics in a Japanese population*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000. **56**(2): p. 175-80.
11. Kim, M.K., et al., *Effect of the CYP2D6 genotype on the pharmacokinetics of tropisetron in healthy Korean subjects*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003. **59**(2): p. 111-6.
12. Yu, A., et al., *Expression, purification, biochemical characterization, and comparative function of human cytochrome P450 2D6.1, 2D6.2, 2D6.10, and 2D6.17 allelic isoforms*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **303**(3): p. 1291-300.
13. Ramamoorthy, Y., R.F. Tyndale, and E.M. Sellers, *Cytochrome P450 2D6.1 and cytochrome P450 2D6.10 differ in catalytic activity for multiple substrates*. *Pharmacogenetics*, 2001. **11**(6): p. 477-87.
14. Nakamura, K., et al., *CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **293**(3): p. 969-73.
15. Shimada, T., et al., *Characterization of (+/-)-bufuralol hydroxylation activities in liver microsomes of Japanese and Caucasian subjects genotyped for CYP2D6*. *Pharmacogenetics*, 2001. **11**(2): p. 143-56.
16. Yamazaki, S., et al., *Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s*. *J Biochem (Tokyo)*, 1993. **114**(5): p. 652-7.
17. Ramamoorthy, Y., et al., *Reduced (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") metabolism with cytochrome P450 2D6 inhibitors and pharmacogenetic variants in vitro*. *Biochem Pharmacol*, 2002. **63**(12): p. 2111-9.
18. Fukuda, T., et al., *The decreased in vivo clearance of CYP2D6 substrates by CYP2D6\*10 might be caused not only by the low-expression but also by low affinity of CYP2D6*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. **380**(2): p. 303-8.
19. Shimada, T., et al., *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*, 1994. **270**(1): p. 414-23.
20. Marheineke, K., et al., *Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection*. *FEBS Lett*, 1998. **441**(1): p. 49-52.
21. Kubo, M., et al., *Influence of itraconazole co-administration and CYP2D6 genotype on the pharmacokinetics of the new antipsychotic ARIPIPRAZOLE*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005. **20**(1): p. 55-64.
22. Park, J.Y., et al., *Combined effects of itraconazole and CYP2D6\*10 genetic polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of haloperidol in healthy subjects*. *J Clin Psychopharmacol*, 2006. **26**(2): p. 135-42.
23. Chou, W.H., et al., *Comparison of two CYP2D6 genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships*. *Clin Chem*, 2003. **49**(4): p. 542-51.
24. Lai, M.L., et al., *Propranolol disposition in Chinese subjects of different CYP2D6 genotypes*. *Clin Pharmacol Ther*, 1995. **58**(3): p. 264-8.
25. Honda, M., et al., *Multiple regression analysis of pharmacogenetic variability of carvedilol disposition in 54 healthy Japanese volunteers*. *Biol Pharm Bull*, 2006. **29**(4): p. 772-8.
26. Yoon, Y.R., et al., *Relationship of paroxetine disposition to metoprolol metabolic ratio and CYP2D6\*10 genotype of Korean subjects*. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. **67**(5): p. 567-76.
27. Gan, S.H., et al., *Correlation of tramadol pharmacokinetics and CYP2D6\*10 genotype in Malaysian subjects*. *J Pharm Biomed Anal*, 2002. **30**(2): p. 189-195.

28. Yin, O.Q., et al., *Effect of cyp2d6\*10 allele on the pharmacokinetics of loratadine in chinese subjects*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(9): p. 1283-7.
29. Cho, H.Y. and Y.B. Lee, *Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of risperidone in healthy male subjects with different CYP2D6 genotypes*. Arch Pharm Res, 2006. **29**(6): p. 525-33.
30. Sawamura, K., Y. Suzuki, and T. Someya, *Effects of dosage and CYP2D6-mutated allele on plasma concentration of paroxetine*. Eur J Clin Pharmacol, 2004. **60**(8): p. 553-7.
31. Fukuda, T., et al., *Effect of the CYP2D6\*10 genotype on venlafaxine pharmacokinetics in healthy adult volunteers*. Br J Clin Pharmacol, 1999. **47**(4): p. 450-3.
32. Yue, Q.Y., et al., *Pharmacokinetics of nortriptyline and its 10-hydroxy metabolite in Chinese subjects of different CYP2D6 genotypes*. Clin Pharmacol Ther, 1998. **64**(4): p. 384-90.
33. Chen, B. and W.M. Cai, *Influence of CYP2D6\*10B genotype on pharmacokinetics of propafenone enantiomers in Chinese subjects*. Acta Pharmacol Sin, 2003. **24**(12): p. 1277-80.
34. Otani, M., et al., *Impact of CYP2D6\*10 on mexiletine pharmacokinetics in healthy adult volunteers*. Eur J Clin Pharmacol, 2003. **59**(5-6): p. 395-9.
35. Hanioka, N., et al., *Catalytic roles of CYP2D6.10 and CYP2D6.36 enzymes in mexiletine metabolism: in vitro functional analysis of recombinant proteins expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(9): p. 1386-95.
36. Tsuzuki, D., et al., *Functional evaluation of cytochrome P450 2D6 with Gly42Arg substitution expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(8): p. 709-18.
37. Senda, C., et al., *Influence of the CYP2D6\*10 allele on the metabolism of mexiletine by human liver microsomes*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **52**(1): p. 100-3.
38. Hemeryck, A., C. De Vriendt, and F.M. Belpaire, *Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the oxidative metabolism of propafenone: in vitro studies using human liver microsomes*. J Clin Psychopharmacol, 2000. **20**(4): p. 428-34.
39. Yasui-Furukori, N., et al., *Different enantioselective 9-hydroxylation of risperidone by the two human CYP2D6 and CYP3A4 enzymes*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(10): p. 1263-8.
40. Schmider, J., et al., *Metabolism of dextromethorphan in vitro: involvement of cytochromes P450 2D6 and 3A3/4, with a possible role of 2E1*. Biopharm Drug Dispos, 1997. **18**(3): p. 227-40.
41. Fogelman, S.M., et al., *O- and N-demethylation of venlafaxine in vitro by human liver microsomes and by microsomes from cDNA-transfected cells: effect of metabolic inhibitors and SSRI antidepressants*. Neuropsychopharmacology, 1999. **20**(5): p. 480-90.
42. Firkusny, L., H.K. Kroemer, and M. Eichelbaum, *In vitro characterization of cytochrome P450 catalysed metabolism of the antiemetic tropisetron*. Biochem Pharmacol, 1995. **49**(12): p. 1777-84.
43. Narimatsu, S., et al., *Species difference in enantioselectivity for the oxidation of propranolol by cytochrome P450 2D enzymes*. Chem Biol Interact, 2000. **127**(1): p. 73-90.
44. Olesen, O.V. and K. Linnet, *Hydroxylation and demethylation of the tricyclic antidepressant nortriptyline by cDNA-expressed human cytochrome P-450 isozymes*. Drug Metab Dispos, 1997. **25**(6): p. 740-4.
45. Oldham, H.G. and S.E. Clarke, *In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol*. Drug Metab Dispos, 1997. **25**(8): p. 970-7.
46. Ellis, S.W., et al., *Influence of amino acid residue 374 of cytochrome P-450 2D6*