博士（獣医学）　齋　藤　　愛

学 位 論 文 題 名

Polymorphism of diazepam metabolism in rats

（ラットのジアゼパム代謝における多型）

学位論文内容の要旨

CytochromeP450(CYP)における遺伝的多型は薬効・薬物動態、薬物代謝に関する系統差、個体差を引き起こす原因となっている。ジアゼパムはCYPにより代謝を受けるが、雄性ラットでは、CYP2D1、CYP3A2、CYP2C11が、それぞれp位水酸化、3位水酸化、N位脱メチル化の代謝に関与していることが報告されている。一方で、ラットにおけるジアゼパムの薬効には系統差が存在することも報告されている。そこで、本研究では、Wistar（W)、Sprague-Dawley（SD)、Brown-Norway（BN)、Dark-Agouti（DA）の4系統のラットにおけるジアゼパム代謝の系統差について検討することを目的とした。

第一章では、Wラットにおけるジアゼパム p 位水酸化には高活性個体（Extensive Metabolizers：EM）と低活性個体（Poor Metabolizers：PM）が存在することを見出した。Wラット肝ミクロソームを用いてジアゼパム代謝活性を測定したところ、Wラットの約83%（15/ 18匹）はジアゼパムp-位水酸化に殆ど活性を示さず(PM W)、一方で約17%の個体がPM Wのおよそ200倍高い活性を示すことが明らかとなった（EM W)。Kinetics解析の結果、ジアゼパムp-位水酸化のKm値はPM Wでは23.3μMであったが、EM Wでは6.3μMと小さかった。ジアゼパムp-位水酸化について、Vmax およびKmから、EM Wでは高最大活性・高基質親和性をもつ酵素が存在することが示唆された。これまでの報告により、ジアゼパムのp位水酸化はCYP2D1によると考えられてきた。しかし、Western blottingの結果ではEM WとPM Wの肝ミクロソームに発現するCYP2D1量に差は見られなかった。

第二章では、4系統のラットにおけるジアゼパム代謝の系統差について検討した。第1章で示したWラットのジアゼパムp-位水酸化の代謝多型に加え、SDおよびBNラットはp-位水酸化の高活性（EM）系統であり、DAは低活性（PM）系統であることが分かった。また、DAラットは高い3位水酸化活性とN脱メチル化活性を有する系統であることも明らかになった。ジアゼパム p-位水酸化における Kinetics 解析の結果、ラット EM 系統とPM系統間のKm値の差は、第1章でWラットのEMおよびPM個体間 に見られた結果と同様であった。　また、ラットCYP抗体を用いてジアゼパム代謝の阻害実験を行った結果、CYP2D2抗体によってジアゼパムp-位水酸化が阻害されることが分かった。しかし、

各ラット系統に発現するCYP2D2量や、CYP2D2によって代謝されるデブリソキン4位水酸化活性の結果からは、ジアゼパムp-位水酸化の系統差はCYP2D2にも起因しないことが分かった。一方で、CYP2D2抗体によってp-位水酸化が阻害されたことから、この代謝がCYP2D2抗体と交差する他のCYP2Dサブファミリーによって行われることが推測された。

第三章では、ジアゼパムp-位水酸化を行うCYP分子種について同定を試みた。ラット抗CYP2D2抗体でp-位水酸化が阻害されることから、この抗体を用いて免疫沈降を行った。得られた蛋白画分を低濃度BISポリアクリルアミドゲルのSDS-PAGEで展開したところ、p-位水酸化活性が高いラット(SD、BN、EM W)にのみ発現する特異的な蛋白質(CYP2DX)が確認された。そこで、CYP2DXを単離し、N末端のアミノ酸についてシークエンスしたところ、そのアミノ酸配列はCYP2D3と一致することが分かった。以上のことから、ジアゼパムp-位水酸化はCYP2D3によって代謝され、CYP2D3の多型がジアゼパムp-位水酸化におけるphenotypeの多型の原因となっていることが示唆された。

前章より、ジアゼパムp-位水酸化はCYP2D3によって代謝されることが推測された。そこで、第4章では、SD、BNおよびEM Wラットにおける、ジアゼパムp-位水酸化の酵素科学的特徴について検討した。基質(ジアゼパム)濃度の範囲をより広く0.4～400μMに設定して代謝活性を測定したところ、p-位水酸化反応のみにおいて基質阻害が起こることが分かった。

以上の結果により、本研究では、ラット系統間および個体間におけるジアゼパム代謝の多型について明らかにした。特にジアゼパムp-位水酸化に関しては酵素科学的特徴を明らかにし、その代謝をCYP2D3が行っている可能性を新たに示した。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　藤　田　正　一
副　査　教　授　伊　藤　茂　男
副　査　助教授　佐々木　宣　哉
副　査　助教授　石　塚　真由美

学位論文題名

Polymorphism of diazepam metabolism in rats

（ラットのジアゼパム代謝における多型）

CytochromeP450(CYP)における遺伝的多型は薬効・薬物動態、薬物代謝に関する系統差、個体差を引き起こす原因となっている。ジアゼパムはCYPにより代謝を受けるが、雄性ラットでは、CYP2D1、CYP3A2、CYP2C11が、それぞれp位水酸化、3位水酸化、N位脱メチル化の代謝に関与していることが報告されている。一方で、ラットにおけるジアゼパムの薬効持続時間はDark-Agouti（DA）ラットで顕著に短く、その薬理効果にラット間で系統差が存在することも報告されている。そこで、齋藤愛氏は、その原因がジアゼパム代謝の差によるという作業仮説を立て、Wistar（W）、Sprague-Dawley（SD）、Brown-Norway (BN)、DAの4系統のラットにおけるジアゼパム代謝の系統差について検討した。

本研究から、Wラットにおけるジアゼパムp位水酸化には高活性個体（Extensive Metabolizers：EM）と低活性個体（Poor Metabolizers：PM）が存在することを見出した。また、SDおよびBNラットはp-位水酸化の高活性（EM）系統であり、DAは低活性（PM）系統であることが分かった。DAラットは高い3位水酸化活性とN脱メチル化活性を有する系統であることも明らかになった。

また、ラットCYP抗体を用いてジアゼパム代謝の阻害実験を行った結果、CYP2D2抗体によってジアゼパムp-位水酸化が阻害されることが分かった。しかし、各ラット系統に発現するCYP2D2量や、CYP2D2によって代謝されるデブリソキン4位水酸化活性の結果から、ジアゼパムp-位水酸化の系統差はCYP2D2に起因しないことが分かった。そこで、CYP2D2抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、得られた蛋白のアミノ酸配列はCYP2D3と一致することが分かった。

以上の結果により、齋藤愛氏は、ラット系統間および個体間におけるジアゼパムの薬理

効果の系統差が代謝の多型によることを明らかにした。さらに、ジアゼパム p-位水酸化に関する酵素化学的特徴を明らかにし、その代謝をCYP2D3が行っている可能性を新たに示した。よって審査委員一同は、上記学位論文提出者齋藤愛氏の論文が、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規程による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。