



Title	クロザピン誘発性流涎症のリスク因子の解明と治療法の探索
Author(s)	石川, 修平
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13774号
Issue Date	2019-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13774
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79294
Type	doctoral thesis
File Information	Shuhei_ISHIKAWA.pdf



博士学位論文

クロザピン誘発性流産症の
リスク因子の解明と治療法の探索

石川 修平

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床薬剤学研究室

令和元年 9 月

目次

略語表

序論	1
----	---

第1章 クロザピン誘発性流涎症(CIS)のリスク因子の同定

第1節 緒言	3
第2節 研究方法	5
第1項 研究デザイン	5
第2項 評価項目	5
第3項 試料の種類と採取方法	6
第4項 観察、測定項目	6
第5項 観察、測定項目の評価方法	7
第6項 症例数の設定根拠	7
第7項 LC/MS/MS によるクロザピン、活性代謝物の定量方法	8
第8項 統計解析	10
第3節 研究結果	11
第1項 研究参加者	11
第2項 患者背景	12
第3項 クロザピンの服用量と嚥下機能、錐体外路症状、流涎症重症度の 関連性	13
第4項 クロザピンの服用量とクロザピン、活性代謝物の血中濃度 の関連性	15
第5項 嚥下機能、錐体外路症状と流涎症重症度の関連性	16
第6項 クロザピン、活性代謝物の血中濃度と嚥下機能の関連性	17
第7項 クロザピン、活性代謝物の血中濃度と錐体外路症状 の関連性	18
第8項 クロザピン、活性代謝物の血中濃度と流涎症重症度の関連性	19
第9項 クロザピン、活性代謝物の唾液中濃度と流涎症重症度 の関連性	20

第4節 考察	21
第5節 まとめ	23
第2章 CISモデル動物を用いた CIS リスク因子の同定	
第1節 緒言	24
第2節 実験材料および実験方法	25
第1項 使用薬物、試薬	25
第2項 使用物品	25
第3項 使用動物	25
第4項 クロザピンの投与方法と各種検体の採取方法	26
第5項 血中、顎下腺および脳内薬物濃度の測定法	27
第6項 統計解析	27
第3節 実験結果	28
第1項 クロザピン単回投与による唾液分泌量の変化	28
第2項 クロザピン反復投与による体重の変化	30
第3項 クロザピン反復投与による唾液分泌量の変化	31
第4項 クロザピン単回、7日間反復投与後の血中濃度	33
第5項 クロザピン単回、7日間反復投与後の顎下腺内濃度	35
第6項 クロザピン単回、7日間反復投与後の脳内濃度	37
第4節 考察	39
第5節 まとめ	41
第3章 唾液腺細胞内 Ca^{2+}濃度を指標とした CIS 原因物質の評価	
第1節 緒言	42
第2節 実験材料および実験方法	43
第1項 使用薬物、試薬	43
第2項 使用細胞	43
第3項 細胞培養の方法	43
第4項 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定方法	44
第5項 統計解析	46

第3節	実験結果	47
第1項	カルバコール、アトロピンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化	47
第2項	クロザピン、活性代謝物による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化	48
第3項	唾液腺細胞に対する N-デスメチルクロザピンの用量 依存的な作用	49
第4項	N-デスメチルクロザピン誘発性 Ca^{2+} 応答に対する アトロピンの作用	50
第4節	考察	51
第5節	まとめ	54
総括		55
参考文献		57
謝辞		67

略語表

本論文においては以下の略語を用いた。

ABC	ATP-binding cassette
BMI	body mass index
CE	collision energy
CEP	collision cell entrance potential
CIS	clozapine-induced sialorrhea
CLZ	clozapine
CNO	clozapine N-oxide
CPMS	Clozaril Patient Monitoring Service
CXP	collision cell exit potential
CYP	cytochrome P450
DFS	drooling frequency scale
DIEPSS	drug induced extra-pyramidal symptoms scale
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DP	declustering potential
DSFS	drooling severity and frequency scale
DSS	drooling severity scale
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid

EGTA	ethylene glycol-bis (2-aminoethylether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid
EP	entrance potential
ESI	electrospray ionization
FBS	fetal bovine serum
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HSY	human salivary gland epithelial cell line
IS	internal standard
LC/MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry
NDMC	N-desmethylozapine
PBS	phosphate-buffered saline
RSST	repetitive saliva swallowing test
SRM	selected reaction monitoring
T _{1/2}	half-life
T _{max}	time of maximum concentration

序論

2011年、厚生労働省は4大疾病「がん、脳卒中、心臓病、糖尿病」に「精神疾患」を加え、5大疾病とすることを決定し、精神疾患は医療法の医療計画上、重要疾病として位置づけられた。精神疾患のひとつである統合失調症は、人口の約1%が罹患する頻度の高い疾患であり、思春期から青年期に好発し、再発率が高いことから、その疾病負担は非常に大きいことが知られている¹⁾。統合失調症の治療は薬物療法と非薬物療法が包括的に行われるが、薬物療法の中でも、ドパミンD₂受容体遮断作用を有する抗精神病薬による治療は有効性の高い治療法であり、主症状である陽性症状の改善に有用である。しかしながら、複数の抗精神病薬を十分量、十分期間服薬しても治療反応性を示さない治療抵抗性統合失調症が30%程度存在することが報告されており、臨床上大きな問題となっている²⁾。

クロザピン (CLZ) は治療抵抗性統合失調症に対して適応を有する唯一の薬剤であり、他の抗精神病薬と比較して高い治療効果を示すこと、抗精神病薬の代表的な副作用である錐体外路障害の発現率が低いことが報告されている³⁾。一方、クロザピンは無顆粒球症、糖代謝異常、流涎症、便秘、起立性低血圧、過鎮静、けいれん発作などの多種多様な副作用を呈することが知られている。中でも、クロザピン誘発性流涎症 (clozapine-induced sialorrhea; CIS) はクロザピン服用患者に高頻度で認められ⁴⁾、quality of life やアドヒアランスの低下に加え、二次的に誤嚥性肺炎を誘発することから⁵⁻⁷⁾、クロザピン中止理由の上位に位置する重症度の高い副作用である⁸⁻⁹⁾。しかしながら、CIS のリスク因子や発現機序は明らかとなっておらず、治療法も確立されていないことから、この副作用への対策は困難を極める¹⁰⁻¹⁴⁾。

クロザピンは薬理的には強力な抗コリン作用を有する薬剤であり¹⁵⁾、重症度の高い便秘 (腸閉塞や麻痺性イレウス) などの抗コリン性の副作用を示すことは前述の通りである。一方で、流涎症はコリン作動性の副作用として知られており、その発現はクロザピンの薬理特性と矛盾する。クロザピンは肝臓の薬物代謝酵素の一つであるシトクロム P450 (CYP) によって代謝を受け、活性代

謝物である N-デスメチルクロザピン (NDMC)、クロザピン N-オキシド (CNO) が生成される。これら活性代謝物はクロザピンとは異なる薬理・動態特性を有する¹⁵⁻²⁰⁾ことから、CIS 発現への関与が示唆される。しかしながら、基礎・臨床研究において、クロザピンならびに活性代謝物と流涎症の関連性を検証した報告は乏しく、有効性の高い治療法も確立されていない。

そこで、本研究は Fig. 1 で示す通り、基礎および臨床研究から CIS の原因物質やリスク因子、発現機序を明らかにし、CIS の治療法の確立に繋がる新規知見を得ることを目標に、種々の検討を行った。

【研究計画】

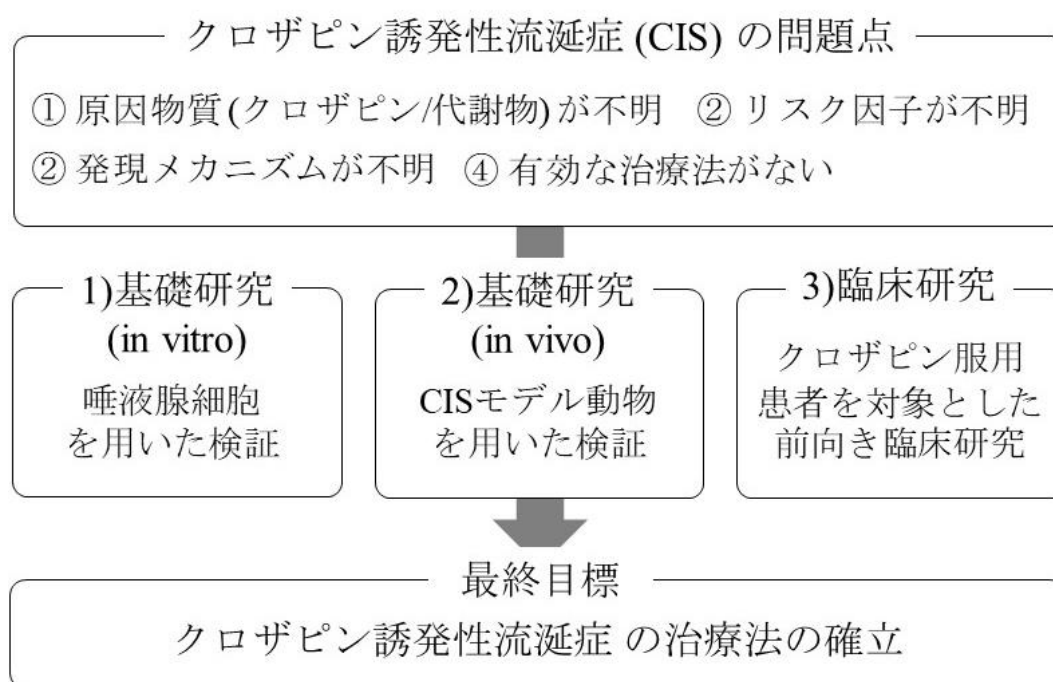


Fig. 1 Clinical and basic research program

第1章 クロザピン誘発性流涎症 (CIS) のリスク因子の同定

第1節 諸言

本邦の統合失調症患者はおおよそ 70-80 万人であり、その 20-30%にあたる約 15-25 万人が治療抵抗性と予測されている²¹⁾。先述の通り、クロザピンは治療抵抗性統合失調症に対して適応を有する唯一の薬剤であり、本邦を含む各国のガイドラインにおいて、その使用が推奨されている。しかし、本邦において、クロザピンの治療を受けている割合は治療抵抗性統合失調症患者の 1-2%程度であり、その普及率は他国と比較して極めて低い²¹⁻²³⁾。この背景の一つとして、クロザピンの多種多様かつ頻度、重症度の高い副作用の存在が挙げられる。

CIS は白血球減少、過鎮静、てんかん発作に次いで、クロザピン中止の契機となる副作用であり⁹⁾、発現率が高く長期間に渡って、重症度の高い症状を呈することから、CIS の予防および治療法の確立はクロザピン普及の一助となることが予想される。

薬剤誘発性流涎症の原因として、唾液分泌の亢進あるいは唾液の口腔内過貯留が挙げられる。抗精神病薬は線条体のドパミン D₂ 受容体を遮断することで用量依存的に錐体外路障害を引き起こし、二次性の嚥下障害を誘発することが知られている²⁴⁾。嚥下障害は口腔内に分泌された唾液の嚥下を妨げ、唾液の口腔内過貯留を引き起こすため、流涎症のリスク因子となり得る。また、クロザピンの活性代謝物である N-デスメチルクロザピンは、ドパミン D₂ 受容体をはじめとする複数の受容体に対してクロザピンと類似した薬理活性を示す一方で、ムスカリン受容体に対しては、クロザピンとは異なる作用を示すことが報告されている¹⁵⁾。唾液腺は自律神経の二重支配による制御を受けており、副交感神経終末から分泌される神経伝達物質であるアセチルコリンがムスカリン受容体に結合することで、唾液分泌が誘発される。したがって、コリン作動性を示す N-デスメチルクロザピンは流涎症のリスク因子となる可能性がある。このように、嚥下および錐体外路障害、あるいはクロザピンや活性代謝物の存在が流涎症の発現に寄与している可能性が考えられるが、これらの因子と流涎症の関連性を検証した臨床研究は行われていない。

本章では、CIS のリスク因子を同定するため、前向きを観察研究を実施し、流涎症と関連性の高い因子を探索した。

第2節 研究方法

第1項 研究デザイン

本研究は2017年4月から2019年3月の間にクロザピンを服用している20歳以上の患者のうち、研究期間中にクロザピンの用法用量の変更がない25名を対象とした。なお、本研究は「ヘルシンキ宣言」や「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、「クロザピン誘発性流涎症 (CIS) の発現リスク因子の同定に関する臨床研究」(臨床研究番号：自016-0141)として、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受けて実施した。

第2項 評価項目

本研究では流涎症の評価尺度として、流涎症の重症度を評価する drooling severity scale (DSS) および頻度を評価する drooling frequency scale (DFS) の総スコアである drooling severity and frequency scale (DSFS) を用いて、各種因子との相関性を検証した。

1) 主評価項目

- ・クロザピン、活性代謝物 (N-デスメチルクロザピン、クロザピン N-オキシド) の血中濃度と DSFS の相関性

2) 副次評価項目

- ・クロザピン、活性代謝物の唾液中濃度と DSFS の相関性
- ・反復唾液嚥下テスト (repetitive saliva swallowing test; RSST) と DSFS の相関性
- ・薬原性錐体外路症状評価尺度 (drug induced extra-pyramidal symptoms scale; DIEPSS) と DSFS の相関性
- ・クロザピンの服用量と DSFS の相関性
- ・クロザピンの服用量と RSST および DIEPSS の相関性
- ・クロザピンの服用量とクロザピン、活性代謝物の血中濃度の相関性
- ・クロザピン、活性代謝物の唾液中濃度と RSST の相関性
- ・クロザピン、活性代謝物の唾液中濃度と DIEPSS の相関性

第3項 試料の種類と採取方法

採取検体は血液および唾液とした。本研究はクロザピンを1週間以上、同一の用法用量で継続している症例を対象としているため、検体採取時の薬物濃度は定常状態に到達しており、血液・唾液中濃度の日(週)間差異は小さいことが予想される。したがって、身体への侵襲や時間的拘束などの患者負担を要する検体採取は、研究期間内で統計解析が可能である最少回数(3回)とした。

1) 血液検体

薬物濃度の測定に用いる血液検体は定期採血の残余を用いた。なお、定期採血は採血時間を規定せず、Clozaril Patient Monitoring Service (CPMS) によって規定された採血日(1-2週間に1回)に実施した。得られた検体は遠心分離(1,500×g, 5 min, 4°C)を行い、上清の血清をサンプルとした。得られたサンプルは測定時まで-80°Cで保管した。

2) 唾液検体

薬物濃度の測定に用いる唾液検体は定期採血の前後おおよそ3時間以内に採取した。唾液検体は滅菌ガーゼ(医療ガーゼタイプIV, 10 cm×10 cm, 8 Ply)1枚を口腔内に挿入し、咀嚼せずに2分間口腔内に留置した後、口腔内から取り出した滅菌ガーゼを遠心分離(12,000×g, 10 min, 4°C)を行い、回収した。得られたサンプルは測定時まで-80°Cで保管した。

第4項 観察、測定項目

以下の項目について調査を行い、そのデータを本研究に利用した。

- 1) 研究対象者の基本情報：年齢、性別、体重、身長、喫煙およびカフェイン摂取の有無
- 2) 疾患情報：疾患名、治療内容、併用薬剤名
- 3) 流涎評価尺度のスコア：DSFS
- 4) 嚥下障害評価尺度のスコア：RSST
- 5) 錐体外路症状評価尺度のスコア：DIEPSS

第5項 観察、測定項目の評価方法

1) 流涎症の重症度評価

流涎症の重症度評価はCrysdaleらが作成した²⁵⁾ DSSおよびDFSの総スコアであるDSFSを用いて実施した。DSSは流涎の重症度を5段階、DFSは流涎の頻度を4段階でスコア化する自記式の評価であり、1日の中で最も流涎症の重症度が高い状態を基準に評価を実施した。

2) 嚥下機能の評価

RSSTの評価は座位で実施した。評価者は第2指と第3指の指腹を対象者の喉頭隆起および舌骨部に軽く当て、30秒間繰り返し唾液を嚥下するように指示し、喉頭挙上によって喉頭隆起が評価者の第2指を越えた回数をRSSTの値とした。

3) 錐体外路症状の評価

DIEPSSは歩行、動作緩慢、流涎、筋強剛、アカシジア、ジストニア、振戦、ジスキネジアの個別症状8項目と概括重症度1項目の全9項目に対して、それぞれ0から4までの5段階（0＝なし、正常、1＝ごく軽度、不確実、2＝軽度、3＝中等度、4＝重度）で評価し、総スコアをDIEPSSの値とした。

第6項 症例数の設定根拠

本研究の主目的は、CISの原因因子の探索であり、クロザピンおよび活性代謝物と流涎症の関連性を検証することである。したがって、流涎症の重症度と中程度以上の正の相関性を示す原因因子を探索するため、検出される因子の相関係数の効果量をFergusonらの報告²⁶⁾を基に0.5と仮定し、 α エラーを0.05、 β エラーを0.2、片側検定として、必要症例数を21例と算出した。

第7項 LC/MS/MSによるクロザピンならびに活性代謝物の定量方法

1) 使用機器

HPLCにはProminence 20A (Shimadzu)、質量分析にはトリプル四重極型質量分析計であるAPI 3200TM LC/MS/MS System (AB SCIEX)を用いた。

測定はESI正イオン検出モード selected reaction monitoring (SRM)により行った。SRMにおけるモニタリングイオンおよび分析部、質量分析計の各パラメーターおよび分離条件をTable 1に示した。

Table 1 SRM parameters for determination of clozapine and metabolites

Analyte	Transition (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CEP (V)	CXP (V)
Clozapine	327	50	10	30	10	4
N-Desmethyl clozapine	313	50	10	30	10	4
Clozapine N-oxide	343	50	10	30	10	4
Carbamazepine (IS)	271	50	10	30	10	4

2) 標準溶液および検量線

クロザピン、N-デスメチルクロザピン、クロザピン N-オキシドおよび内標準物質 (IS) として使用したカルバマゼピンは Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA) から購入した。メタノール、酢酸エチル、炭酸ナトリウム、ギ酸アンモニウムは Wako (Tokyo, Japan) より購入した。クロザピン、N-デスメチルクロザピン、クロザピン-N-オキシド、カルバマゼピンはメタノールに溶解し、1 mg/mL 溶液を stock solution として、-80℃で保存した。標準溶液は測定前に調製を行った。クロザピンおよび活性代謝物の stock solution をメタノールで 20 µg/mL に希釈した後、2 倍段階希釈を 8 回繰り返し、標準溶液を調製した。また、内標準物質であるカルバマゼピンはメタノールで希釈し 1 µg/mL 溶液とした。検量線の作成には標準溶液をブランク血清で 10 倍希釈した希釈液 (7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 ng/mL) を用いた。

3) サンプル調製および前処理の方法

薬物濃度の測定は、第1章、第2節、第3項で述べた方法で得られたサンプルを用いて、実施した。サンプルの前処理は溶媒抽出法を用いて実施した。サンプル 180 μL に内標準溶液 20 μL 、炭酸ナトリウム溶液 (100 g/L, pH=11) 400 μL 、酢酸エチル 600 μL を加え、10 分間振盪した。振盪後、遠心分離 (12,000 $\times$ g, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) を行い、有機溶媒相を回収し、40 $^{\circ}\text{C}$ 、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣を 100 μL の 1 mM ギ酸アンモニウム/メタノール混液 (8:2, v/v) で溶解し、溶解液 20 μL を LC/MS/MS へ注入した。

4) サンプルの測定方法

分析カラムは Synergi Polar RP (150 mm $\times$ 2 mm, 4 μm , Phenomenex)、ガードカラムは Polar RP (4 mm $\times$ 2 mm) を使用し、1 mM ギ酸アンモニウム/メタノール混液によるグラジエント溶出を行った (Table 2)。カラム温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ とし、移動相の流速は 0.4 mL/min で測定を行った。また、イオンソースにおける各種パラメーターは curtain gas, 20 psi; collision gas, 5 psi; ion spray voltage, 5500 V; ion source temperature, 400 $^{\circ}\text{C}$; ion source gas 1, 40 psi, ion source gas 2, 70 psi とした。測定データは Analyst software (version 1.5) を用いて、解析した。

Table 2 Optimized HPLC elution condition

Time (min)	1 mM Ammonium formate (%)	Methanol (%)
0	80	20
1	80	20
10	5	95
13	5	95
13.5	80	20
15.5	80	20

第 8 項 統計解析

相関分析にはスピアマンの順位相関係数を用いた。統計学的な検定は、SPSS Statistics 23 を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

第3節 研究結果

第1項 研究参加者

2017年4月から2019年3月の間にクロザピンを服用している20歳以上の患者33名のうち、除外基準に該当せず、かつ研究同意が得られた者は28名であった。そのうち、研究期間中にクロザピンの服用を中止した2名と精神状態が不安定となった1名を除いた計25名が本研究の対象者となった。

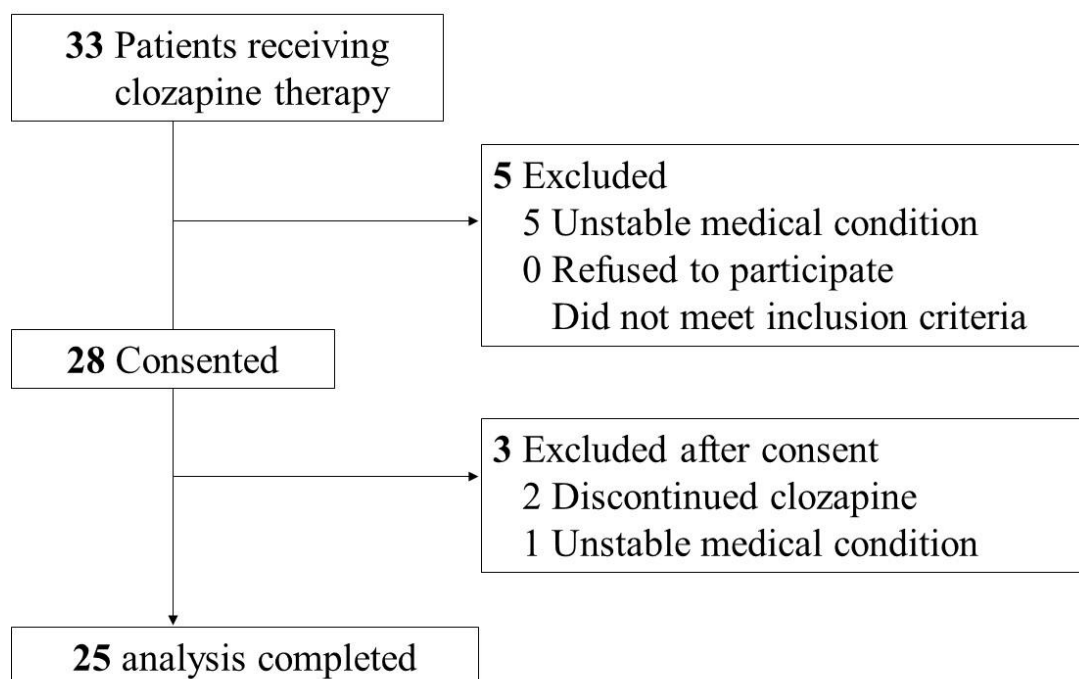


Fig. 2 Flowchart of study participants

第2項 患者背景

研究対象者 25 名の患者背景を Table 3 に示す。性別、体重、年齢、クロザピンの服用量および服用期間、抗精神病薬およびベンゾジアゼピン (BZD) 受容体作動薬の力価換算値 (クロルプロマジンおよびジアゼパム換算値) に明らかな偏りは認められなかった。また、クロザピンおよび活性代謝物の血中、唾液中濃度に影響を与える可能性がある嗜好品 (燃烧式タバコ、カフェイン含有飲料) の摂取や抗精神病薬の併用の有無に加え、唾液分泌量に影響を与える可能性があるムスカリン受容体遮断薬、BZD 受容体作動薬、アドレナリン β 受容体遮断薬、アドレナリン α 受容体作動薬の併用の有無に関しても、群内の明らかな偏りは認められなかった。

Table 3 Demographic and clinical characteristic

Measurement	Mean (SD)	Range
Age [year]	37 (± 10.5)	24-70
Weight [kg]	63 (± 13.1)	45-88
BMI [kg/m^2]	24.0 (± 4.7)	18-35
Daily clozapine dose [mg]	381 (± 139.3)	125-600
Duration of clozapine treatment [day]	1286 (± 922.2)	246-2960
Chlorpromazine equivalent value [mg]	840 (± 332.9)	250-1800
Diazepam equivalent value [mg]	13 (± 17.0)	0-60
Proportion	N	Percent
Gender (male)	9	36.0
Smoker	4	17.4
Caffeine drinker	10	43.5
Antipsychotics co-medication	3	12.0
Benzodiazepines	16	64.0
Anticholinergic agents	6	24.0
β blocker	4	16.0
Vasopressor	4	16.0

第3項 クロザピンの服用量と嚥下機能、錐体外路症状、流涎症重症度の関連性

クロザピンの服用量と嚥下機能 (RSST)、錐体外路障症状 (DIEPSS) の相関係数はそれぞれ $rs=-0.031$ 、 $rs=0.135$ であり、有意な相関関係は認められなかった (Fig. 3A, B)。また、嚥下障害のカットオフ値である $RSST<3$ を示す症例はなく、全例において嚥下障害は認められなかった (Fig. 3A)。さらに、クロザピンの服用量と流涎症重症度 (DSFS) の相関係数は $rs=0.189$ であり、有意な相関性を示さなかった (Fig. 3C)。これらの結果から、クロザピンは他の抗精神病薬で認められる用量依存的な嚥下障害および錐体外路障害を引き起こしにくいことが示され、その服用量から嚥下障害、錐体外路障害、流涎症重症度の予測は困難であることが明らかとなった。

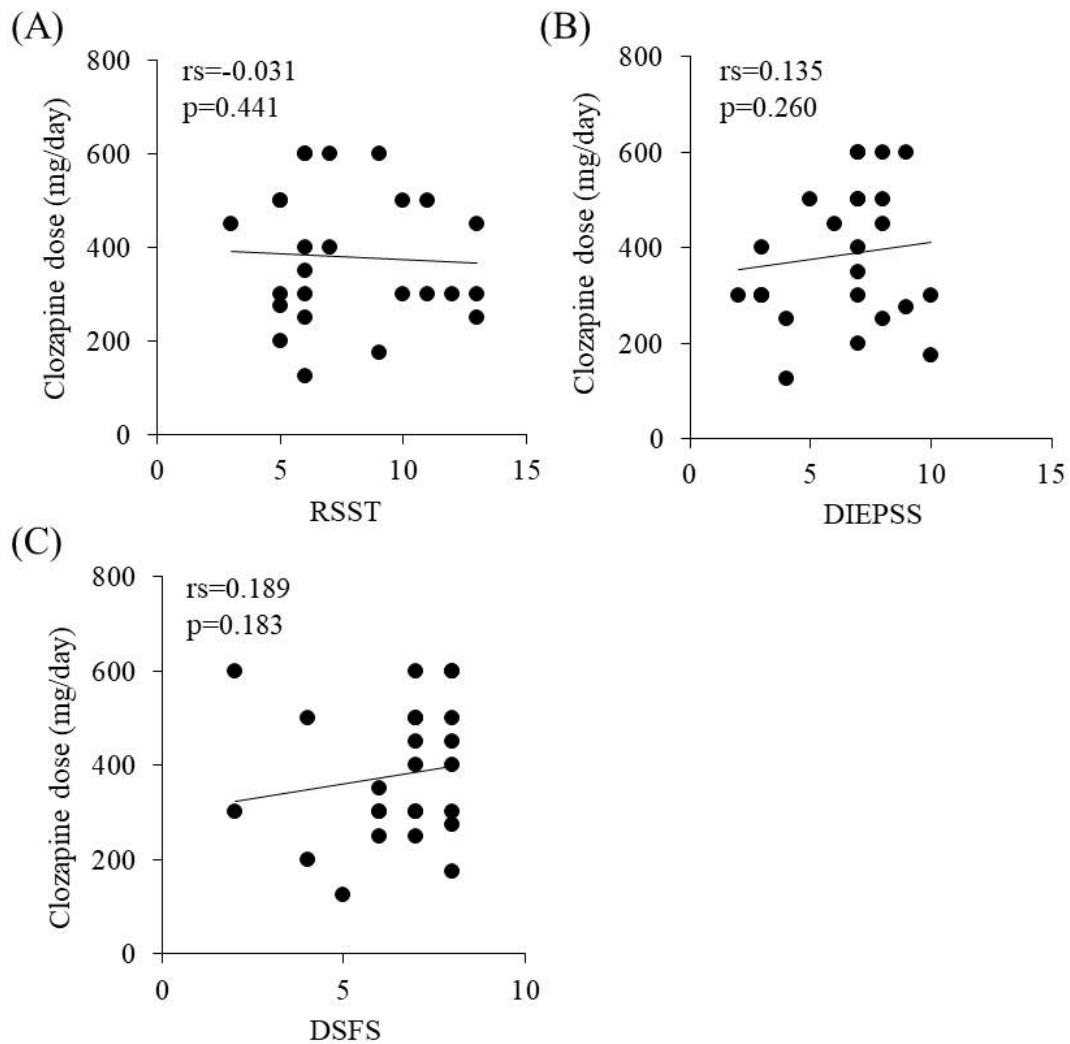


Fig. 3 Correlation between daily clozapine dose and clinical outcome

Repetitive saliva swallowing test (A), drug induced extra-pyramidal symptoms scale (B) and drooling severity and frequency scale (C) correlated with daily clozapine dose. One circle indicates the result per patient. The solid line indicates correlation coefficient rs . The Spearman rank correlation test was applied to relate relationship between daily clozapine dose and clinical outcomes. Significance was set at $p < 0.05$.

第4項 クロザピンの服用量とクロザピン、活性代謝物の血中濃度の関連性

クロザピン、N-デスメチルクロザピン、クロザピン N-オキシドの血中濃度とクロザピンの服用量との間に有意な相関が認められた (Fig. 4 A-C)。また、クロザピン高用量服用群においては血中濃度のばらつきが大きくなることが示された。

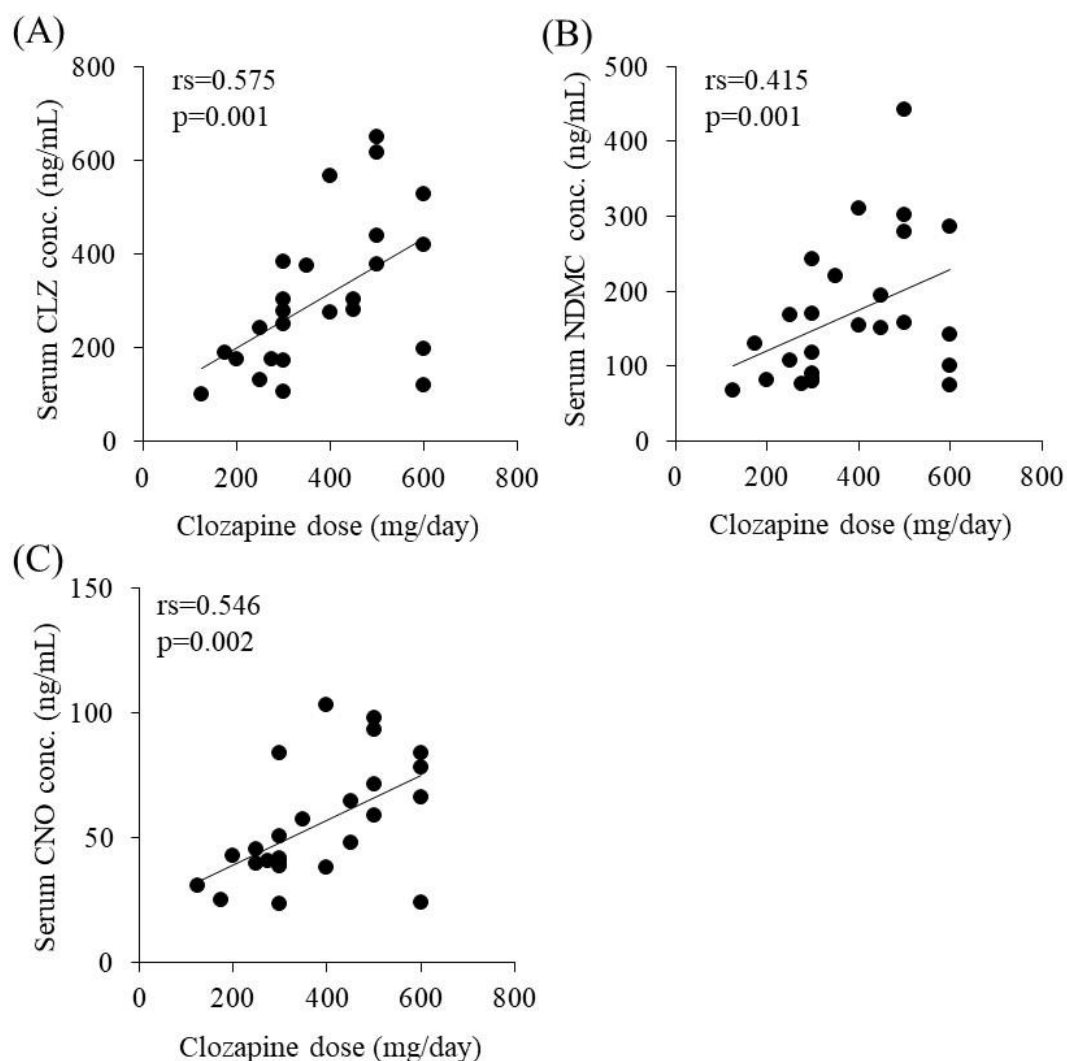


Fig. 4 Clozapine and its metabolites serum concentrations correlated with daily clozapine dose

One circle indicates the result per patient. The solid line indicates correlation coefficient rs . The Spearman rank correlation test was applied to relate relationship between clozapine (A), N-desmethylclozapine (B), clozapine N-oxide (C) serum concentrations and daily clozapine dose. Significance was set at $p < 0.05$.

第5項 嚥下機能、錐体外路症状と流涎症重症度の関連性

流涎症重症度 (DSFS) と嚥下機能 (RSST)、錐体外路症状 (DIEPSS) の関連性を検証するために、各評価尺度と DSFS の相関性を検討した。その結果、DSFS と RSST および DIEPSS の相関係数はそれぞれ $rs=-0.168$ 、 $rs=0.160$ であり、有意な相関関係は認められなかった (Fig. 5 A, B)。以上の結果から、他の抗精神病薬で誘発される流涎症のリスク因子である嚥下障害や錐体外路障害は、CIS のリスク因子とはならない可能性が示された。

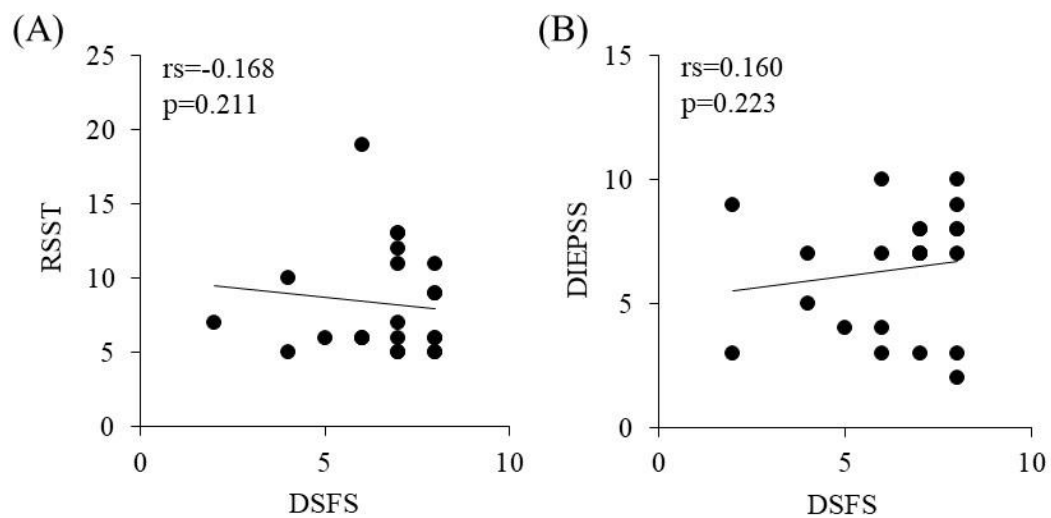


Fig. 5 Correlation between DSFS and RSST or DIEPSS

Repetitive saliva swallowing test (A), drug induced extra-pyramidal symptoms scale (B) correlated with drooling severity and frequency scale.

One circle indicates the result per patient. The solid line indicates correlation coefficient rs . The Spearman rank correlation test was applied to relate relationship between drooling severity and frequency scale and RSST or DIEPSS. Significance was set at $p < 0.05$.

第6項 クロザピン、活性代謝物の血中濃度と嚥下機能の関連性

クロザピン、N-デスメチルクロザピン、クロザピン N-オキシドの血中濃度と RSST の相関係数はそれぞれ $rs=-0.069$ 、 $rs=0.051$ 、 $rs=0.047$ であり、有意な相関関係は認められなかった (Fig. 6A-C)。

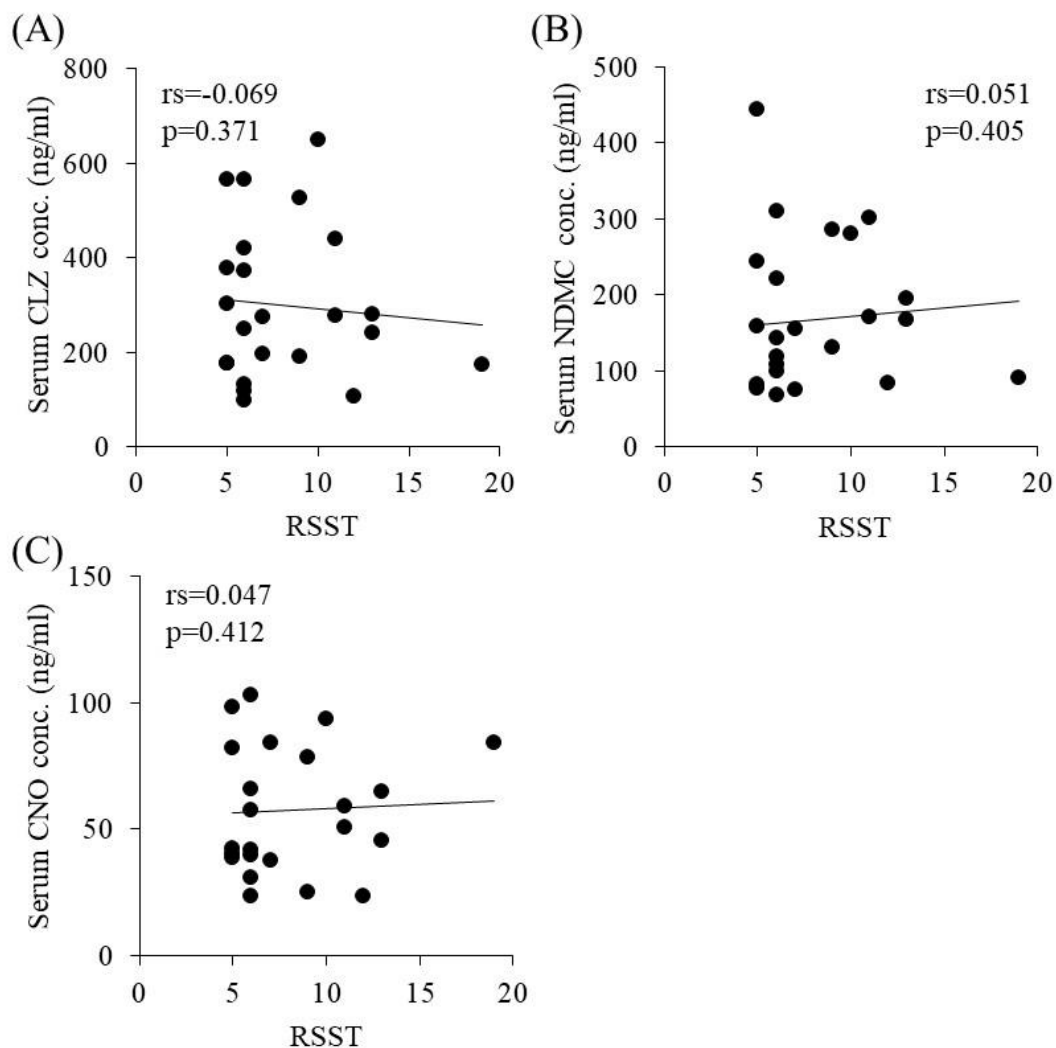


Fig. 6 Clozapine and its metabolites serum concentrations correlated with RSST

One circle indicates the result per patient. The solid line indicates correlation coefficient rs . The Spearman rank correlation test was applied to relate relationship between clozapine (A), N-desmethylclozapine (B), clozapine N-oxide (C) serum concentrations and RSST. Significance was set at $p < 0.05$.

第7項 クロザピン、活性代謝物の血中濃度と錐体外路症状の関連性

クロザピン、N-デスメチルクロザピン、クロザピン N-オキシドの血中濃度と DIEPSS の相関係数はそれぞれ $rs=-0.072$ 、 $rs=0.004$ 、 $rs=0.187$ であり、有意な相関関係は認められなかった (Fig. 7A-C)。

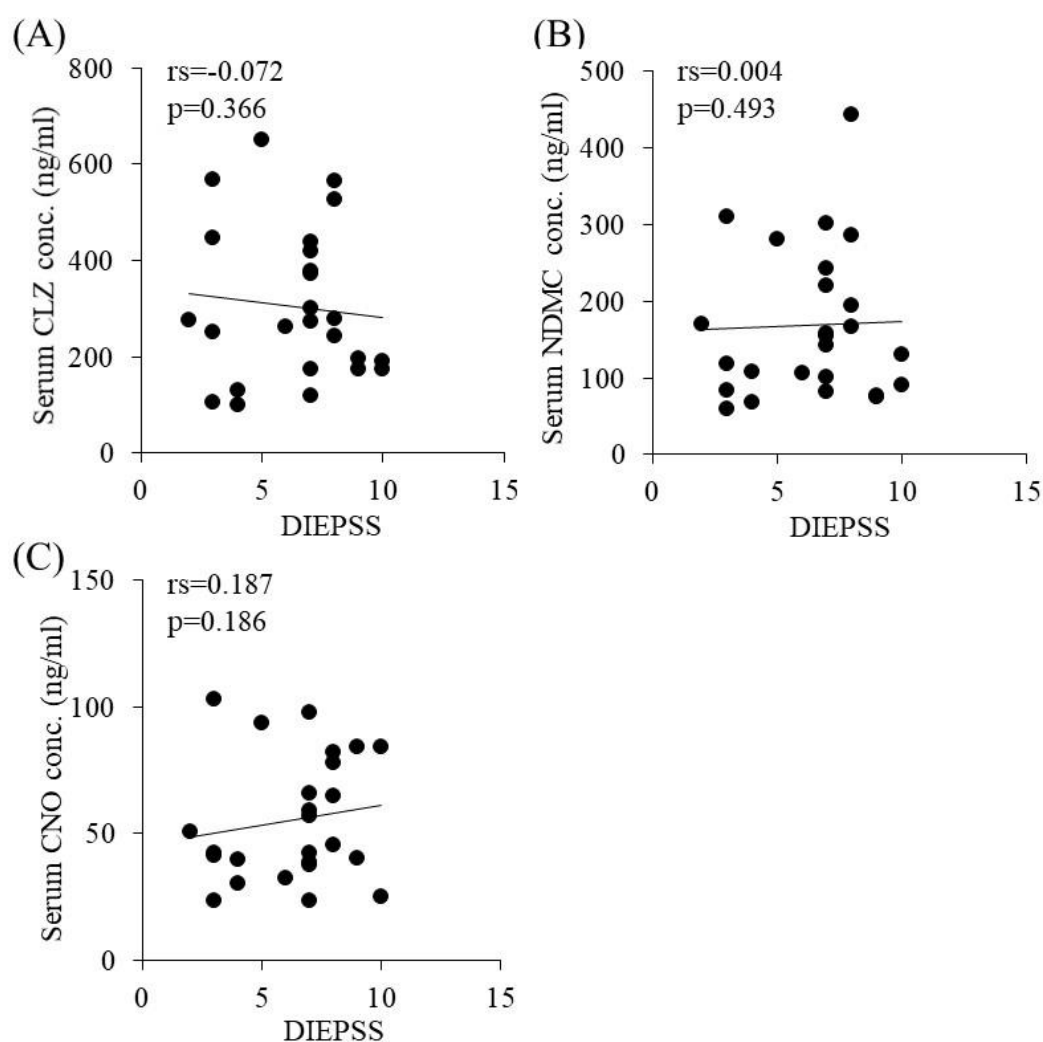


Fig. 7 Clozapine and its metabolites serum concentrations correlated with DIEPSS

One circle indicates the result per patient. The solid line indicates correlation coefficient rs . The Spearman rank correlation test was applied to relate relationship between clozapine (A), N-desmethylozapine (B), clozapine N-oxide (C) serum concentrations and DIEPSS. Significance was set at $p < 0.05$.

第8項 クロザピン、活性代謝物の血中濃度と流涎症重症度の関連性

クロザピンおよびクロザピン N-オキシドの血中濃度と DSFS の相関係数はそれぞれ $rs=0.272$ 、 $rs=0.065$ であり、有意な相関は認められなかった (Fig. 8A, C)。一方、N-デスメチルクロザピンの血中濃度と DSFS の相関係数は $rs=0.453$ であり、有意な相関が認められた (Fig. 8B)。

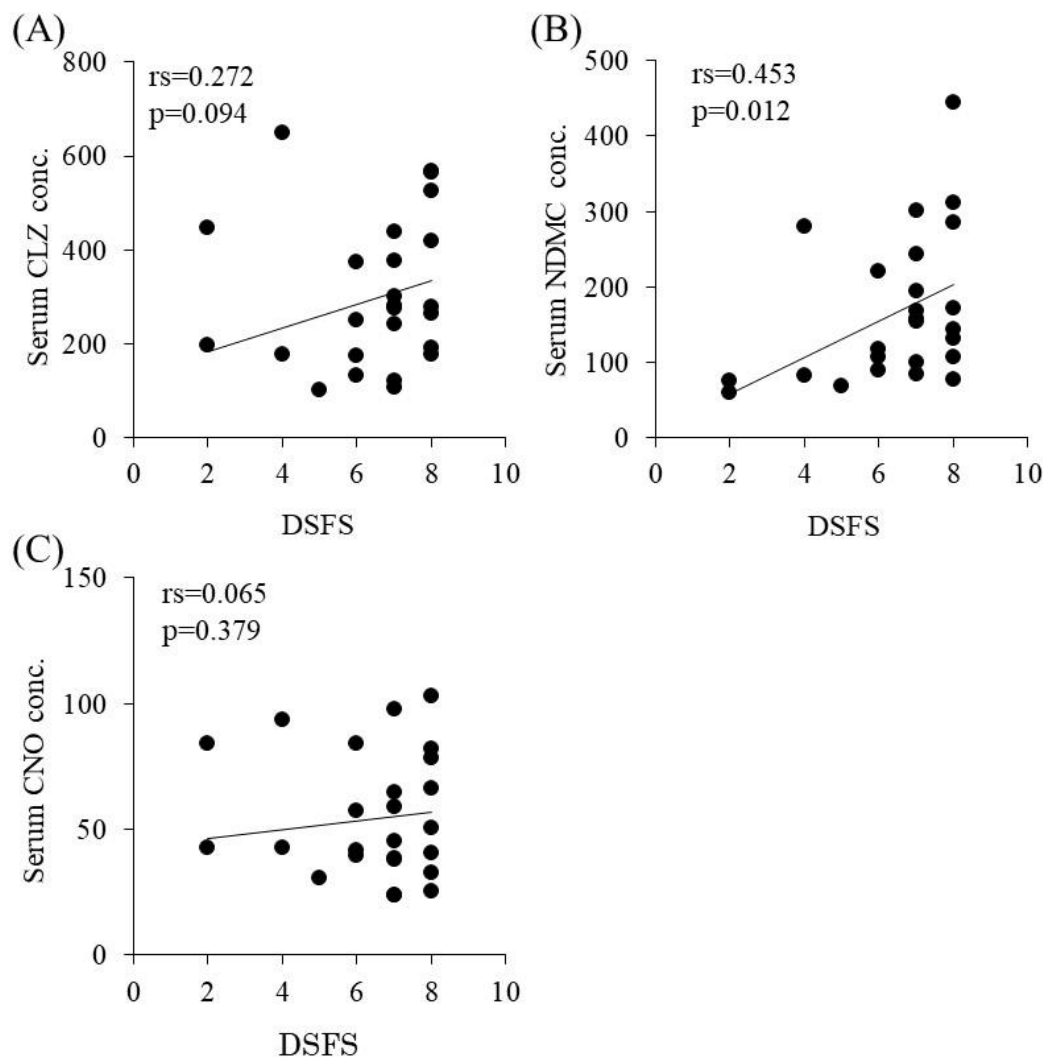


Fig. 8 Clozapine and its metabolites serum concentrations correlated with DSFS

One circle indicates the result per patient. The solid line indicates correlation coefficient rs . The Spearman rank correlation test was applied to relate relationship between clozapine (A), N-desmethylclozapine (B), clozapine N-oxide (C) serum concentrations and DSFS. Significance was set at $p < 0.05$.

第9項 クロザピン、活性代謝物の唾液中濃度と流涎症重症度の関連性

クロザピンおよびクロザピン N-オキシドの唾液中濃度と DSFS の相関係数はそれぞれ $rs=0.260$ 、 $rs=0.018$ であり、有意な相関は認められなかった (Fig. 9A, C)。一方、N-デスメチルクロザピンの唾液中濃度と DSFS の相関係数は $rs=0.340$ であり、有意な相関関係が認められた (Fig. 9B)。

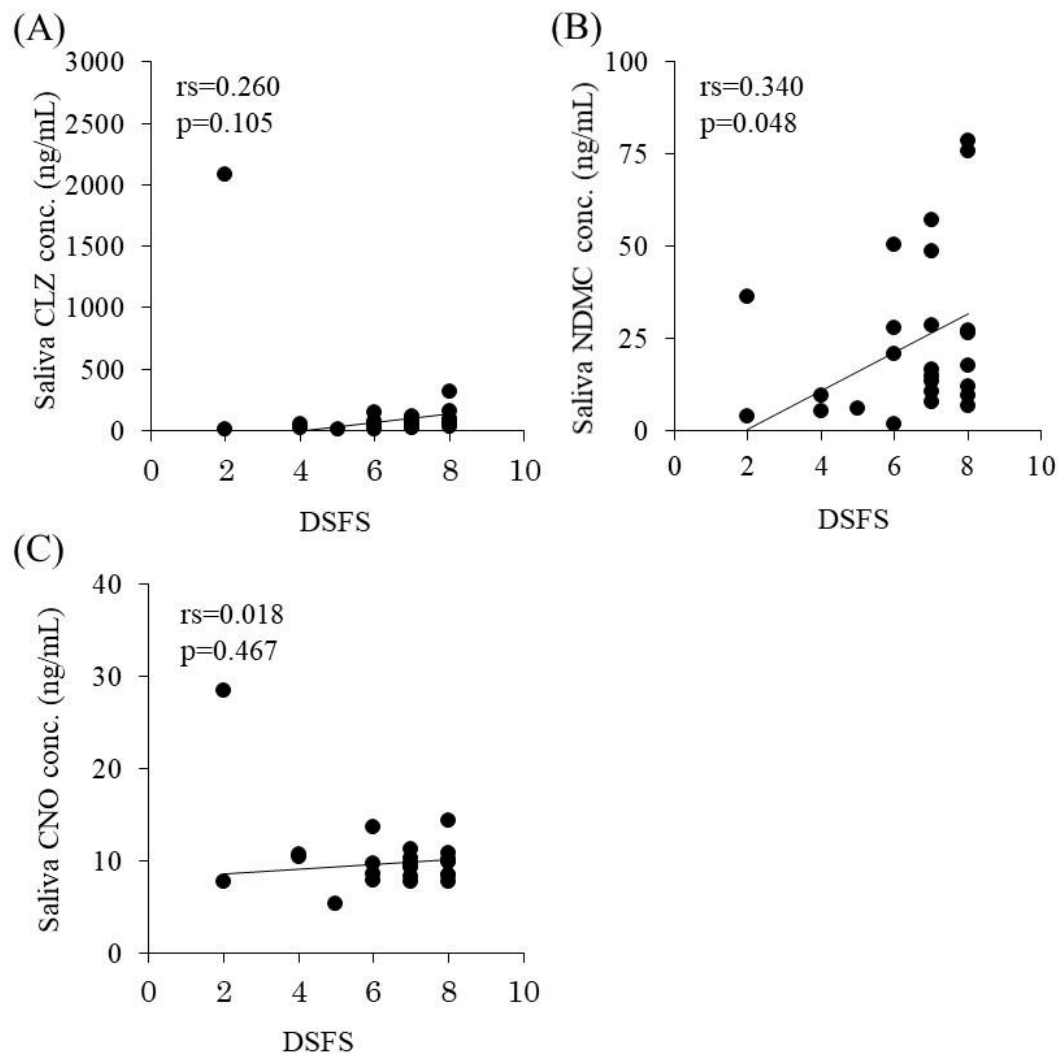


Fig. 9 Clozapine and its metabolites saliva concentrations correlated with DSFS

One circle indicates the result per patient. The solid line indicates correlation coefficient rs . The Spearman rank correlation test was applied to relate relationship between clozapine (A), N-desmethylclozapine (B), clozapine N-oxide (C) saliva concentrations and DSFS. Significance was set at $p < 0.05$.

第4節 考察

本研究では CIS のリスク因子を同定するため、流涎症の評価尺度である DSFS を主評価項目として、各種因子との関連性を検証した。その結果、クロザピンの服用量、嚥下機能、錐体外路症状、クロザピンおよびクロザピン N-オキシドの血中・唾液中濃度は DSFS とは相関関係を示さず、N-デスメチルクロザピンの血中・唾液中濃度のみが DSFS と有意な相関性を示すことが明らかとなった (Fig. 3, 5, 8, 9)。これらの結果から N-デスメチルクロザピンが CIS の原因物質である可能性が示された。しかしながら、本研究ではクロザピンの服用量とクロザピンおよび活性代謝物の血中濃度は有意な相関関係を示していたが、クロザピンの服用量やクロザピン、クロザピン N-オキシドの血中濃度は DSFS と相関関係を示していない (Fig. 4)。この一因として、クロザピンの服用量と血中濃度の相関性が用量に依存して低下することが挙げられる (Fig. 4)。特に N-デスメチルクロザピンの血中濃度は、クロザピン高用量服用群において、そのばらつきが大きいことが示されている (Fig. 4)。クロザピンおよび活性代謝物の血中濃度に影響を与える因子として、クロザピンの服用量、性別、体重、年齢、喫煙およびカフェインの摂取習慣、CYP1A2、3A5、2D6 ならびに ABC トランスポーターの遺伝子多型等が報告されており、クロザピンの服用量、性別、年齢および喫煙の有無は、クロザピンの血中濃度の変動要因の約 50% を占め、残りの 50% は薬物代謝酵素、トランスポーターの遺伝的多型ならびに併用薬の種類が影響を与えるとの報告もある²⁷⁻²⁸⁾。したがって、N-デスメチルクロザピンが CIS の原因物質であった場合、N-デスメチルクロザピンの血中濃度が高値となる因子を検証することで、CIS の予測因子を同定できる可能性がある。今後は、これらの因子に関しても CIS との関連性を検証していく必要があると考える。

本研究にはいくつかの研究限界が存在する。先述の通り、CIS の発現には様々な要因が複雑に関与している可能性があり、これらの相互的関与は交絡因子となり得るが、本研究のような小規模研究ではそれらの影響を除外することはできない。したがって、交絡因子の影響が評価可能となる大規模な研究によ

る検証が必要となる。また、本研究は研究参加者への負担を最小限に抑えるため、クロザピンの服用時間や検体採取時間に制限を設けずに研究を実施しており、クロザピンの服用時間や検体採取時間は一定していない。本研究で測定されたクロザピンの血中濃度とクロザピンの服用量の相関性は既報に近似しており^{27, 29-30)}、本研究の条件が他の臨床研究と著しく異なる可能性は低いことが予想されるが、以上の点も研究限界であると考えられる。そのため、本研究では先述の研究限界を踏まえ、臨床研究で得られた知見が真の事象であるのかを検証するため、後述する種々の基礎的検討を実施した。

第5節 まとめ

薬剤誘発性流涎症のリスク因子である嚥下機能や錐体外路症状は流涎症の重症度には影響を与えず、クロザピンの活性代謝物である N-デスメチルクロザピンの血中濃度が流涎症の重症度と相関性を示すことが明らかとなった。したがって、N-デスメチルクロザピンが CIS の原因物質である可能性が示された。

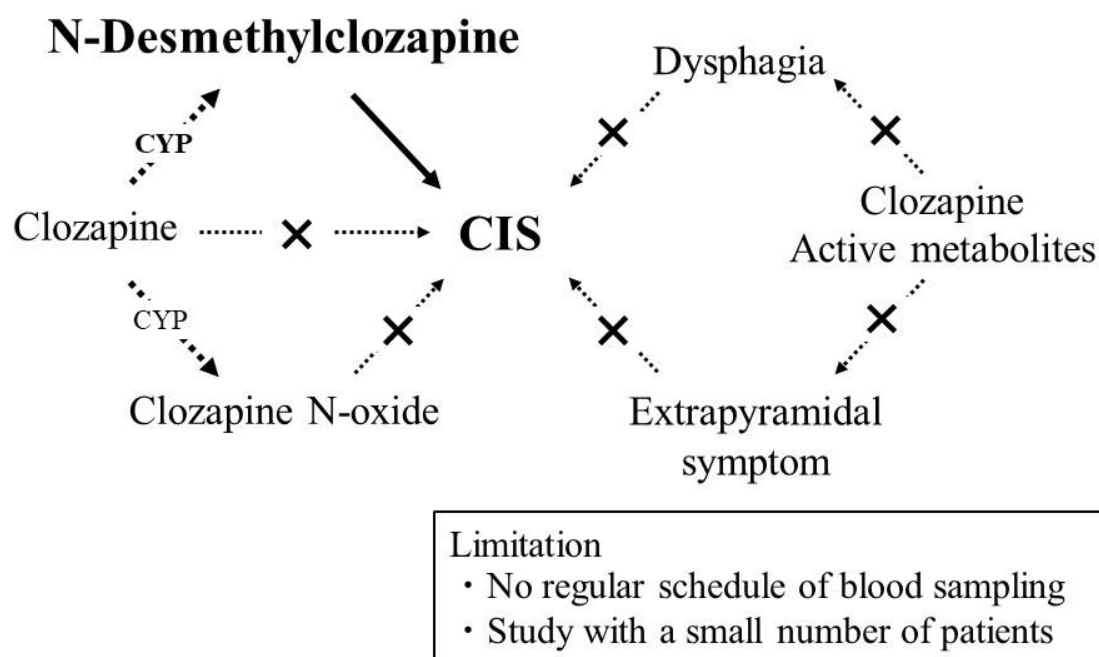


Fig.9 Conclusion of the clinical research and research limitations

第2章 CISモデル動物を用いたCISリスク因子の同定

第1節 諸言

第1章において、N-デスメチルクロザピンがCISの原因物質である可能性が示された。しかし、本研究で実施した臨床研究には複数の研究限界が存在するため、本検討では実験動物を用いたCISのリスク因子の検証を実施することで、臨床研究で同定されたリスク因子の妥当性を評価した。

唾液腺は交感神経・副交感神経の二重支配を受けており、標的受容体であるムスカリン受容体やアドレナリン受容体にリガンドが結合することで唾液分泌反応が誘発されるが、そのほとんどが即時的反応である。したがって、実験動物を用いた従来の研究手法の大半は、麻酔下において短期間の唾液分泌反応を評価するものである³¹⁾。しかしながら、臨床で認められるCISの発現は遅発性であり³²⁾、既存の研究手法とは異なる方法で検証を行う必要がある。現に、ラットやマウスなどのげっ歯類に対してクロザピンを投与し、流涎症の発現を評価する検討が今までに複数報告されているが³³⁻³⁶⁾、臨床を模したデザインにおいて、唾液分泌を認めた報告はなく、CISモデル動物が作製された例は未だにない。そこで、本研究では臨床を反映したCISモデル動物の作製を第一に行い、作製されたモデル動物を用いて、CISの原因因子を検証した。

第2節 実験材料および方法

第1項 使用薬物、試薬

ラットへの経口投与に用いるクロザピン懸濁液は Novartis (Tokyo, Japan) より購入したクロザリル®から調製した。

第2項 使用物品

ラットの唾液量の測定には Matsumae Surgical Dressing (Aichi, Japan) で購入した Benitsuru A. C. F. 綿球 No. 3 (直径 3.0 mm) を用いた。唾液採取前後の綿球は、アズワン株式会社 (Osaka, Japan) で購入したガラス瓶 (14 mL, No.1) で保管した。

第3項 使用動物

雄性 Wistar ラットを日本クレア (Tokyo, Japan) より購入し、1週間馴化した後、6-8週齢 (体重 130-200 g) の時点で実験を行った。全てのラットの飼育は気温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ で管理された北海道大学薬学部動物舎で行われ、Rodent Lab Diet EQ 5L37、新鮮水道水を唾液量測定前の1時間以外は自由に摂食、飲水させた。なお、本研究における全ての動物実験は「国立大学法人北海道大学 動物実験に関する規定」に則り実施した。

第4項 クロザピンの投与方法と各種検体の採取方法

1) クロザピンの投与方法

投与されるクロザピンの用量は既報³⁷⁻³⁸⁾で示されたヒト等価用量に基づき、25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg に設定した。投与薬はクロザリル[®]100 mg 錠を蒸留水 1 mL で懸濁したものを蒸留水で各濃度に段階希釈したものをを用いた。なお、対照群は蒸留水を投与した。ラットの薬液投与経路は経口とし、投与量が 1 mL/kg となるように経ロゾンデを用いて、投与した。ラットの体重は薬液を投与する直前に測定した。予備検討の結果から投与開始時間は唾液分泌量に大きな影響を及ぼさないことが明らかとなったため、薬液投与開始時刻は 20±2 時とし、前日の投与と同一時刻に投与を行った。

2) クロザピンの単回投与

薬液の投与は 1 日 1 回行い、薬液投与直後、投与後 6 時間、12 時間、18 時間、24 時間に覚醒下で口腔内に綿球を挿入し、全唾液量を測定した。

3) クロザピンの複数回投与

薬液の投与は 1 日 1 回、計 7 日間行い、唾液量の測定はクロザピン単回投与時に最も唾液分泌量が多かった投与後 24 時間毎とし、7 日間実施した。

4) 唾液量の測定方法

使用する綿球は密封式のガラス瓶に入れ、天秤により秤量した後、唾液を吸着させた。綿球の挿入時間は 30 秒とし、上顎・舌上・口蓋、左右の頬粘膜、舌下の 3 か所を各 10 秒間、1 か所あたり 1 個の綿球で拭った。唾液を吸着採取した綿球は再び、ガラス瓶に封入し、秤量した。唾液分泌量は前後の秤量値の差から算出した。

5) 採血、組織採取方法

単回、反復 (7 日間) 投与した 24 時間後にラットを麻酔し、心臓採血法で約 2 mL の血液を採取した。採取した血液は直ちに微量のヘパリンナトリウムと混和し、遠心分離 (1,500×g, 5 min, 4°C) 後、上清を分取し、測定用サンプルとした。また、心採血で脱血後、速やかに顎下腺と全脳を摘出し、氷冷の生理食塩水で 2 回洗浄したものを組織サンプルとした。なお、得られた全てのサンプルは測定まで -80°C で保管した。

第 5 項 血中、顎下腺および脳内薬物濃度の測定法

各組織サンプルは測定前に室温で解凍し重量測定後、氷冷の生理食塩水で 25 w/v % に希釈した。その後、氷冷下にてハサミを用いて、十分に細切した後、超音波ホモジナイザーを用いて破碎し、遠心分離 (12,000×g, 15 分, 4°C) 後、得られた上清を測定用サンプルとした。各サンプル内薬物濃度の測定は、第 1 章 第 2 節 第 7 項で述べた方法と同法で実施した。

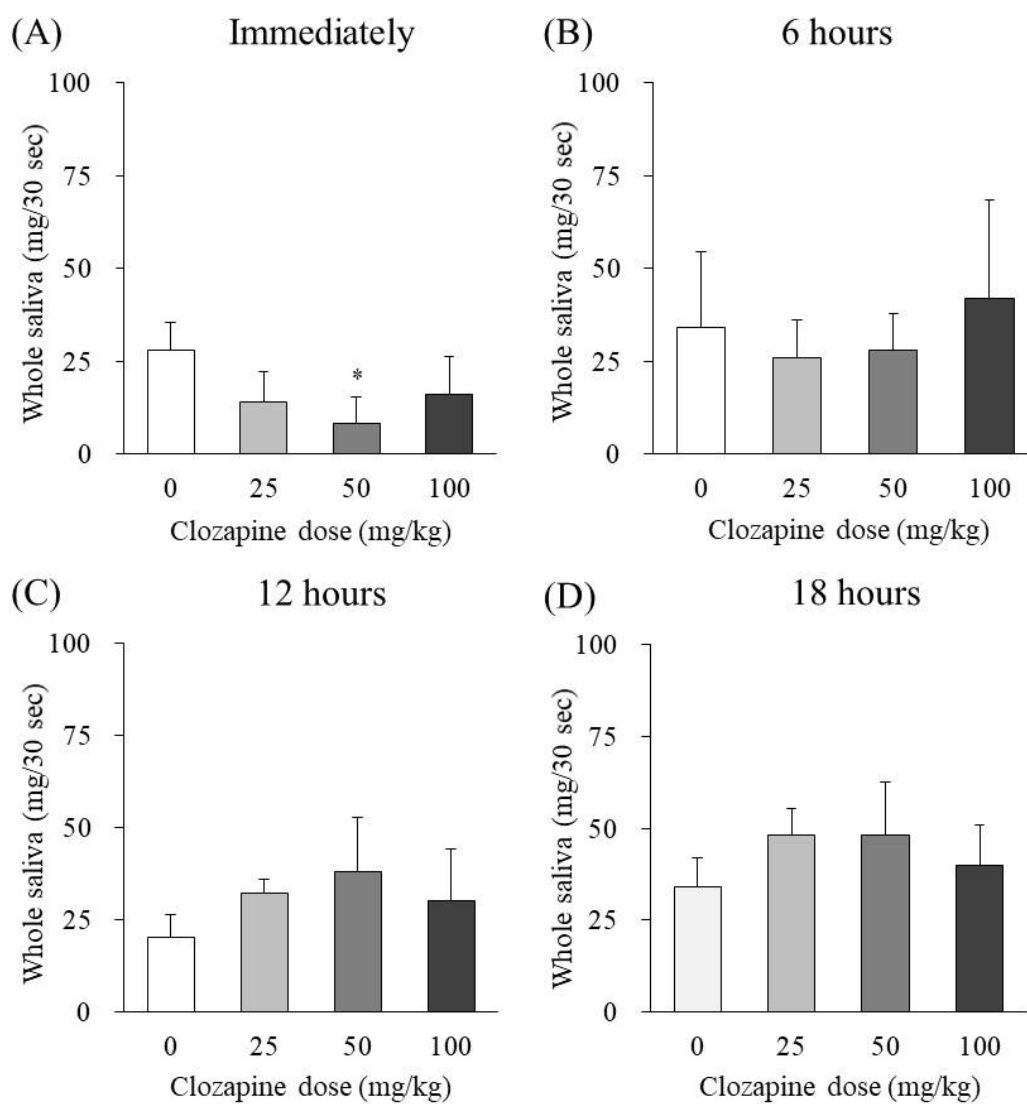
第 6 項 統計解析

実験結果は平均±標準偏差 (mean±S.D.) で示した。統計解析は Dunnett's test、Tukey's test のうち適したものを用いて行った。統計学的な検定は、SPSS Statistics 23 を使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

第3節 実験結果

第1項 クロザピン単回投与による唾液分泌量の変化

クロザピン 25、50、100 mg/kg の単回投与直後は唾液分泌量の減少が認められ、クロザピン 50 mg/kg 単回投与群の唾液分泌量は対照群と比較して、有意に減少した (Fig. 10A)。単回投与 6 時間後からは唾液分泌量の時間依存的な増加が認められ、投与 24 時間後に唾液分泌量が最大となった。しかし、いずれの投与群も対照群と比較して、唾液量の有意な増加は認められなかった (Fig. 10B-E)。



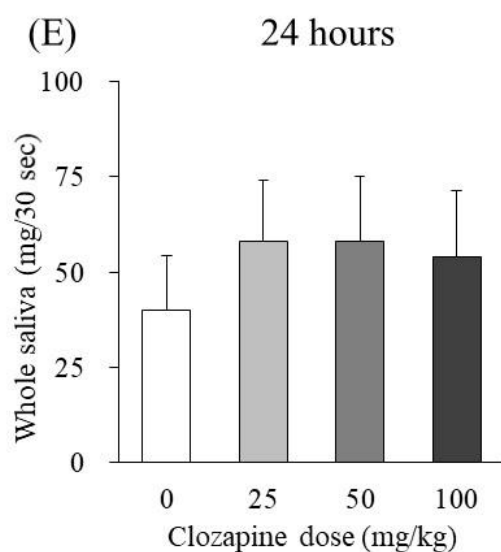


Fig. 10 Effects of a single administration of clozapine on salivary secretion in rats

Whole saliva was measured every 6 hours after a single oral administration of vehicle or several clozapine dose (25, 50, 100 mg/kg): (A) 0 hour; (B) 6 hours; (C) 12 hours; (D) 18 hours; (E) 24 hours. Each columns show the mass of saliva was calculated from the change in the weight (g) of cotton balls for 30 seconds. Each column represents the mean with SD of five determinations. * $p < 0.05$; significantly different from the control.

第2項 クロザピン反復投与による体重の変化

クロザピンの反復投与によって、用量依存的な体重増加量の減少が認められた (Fig. 11A)。体重増加量の減少の要因として、クロザピンの用量依存的な鎮静作用がラットの摂食量を減少させた可能性が考えられる。しかし、測定期間中、クロザピン 25、50、100 mg/kg 反復投与群の実体重は、対照群と比較して有意な差を示さなかった (Fig. 11B-D)。

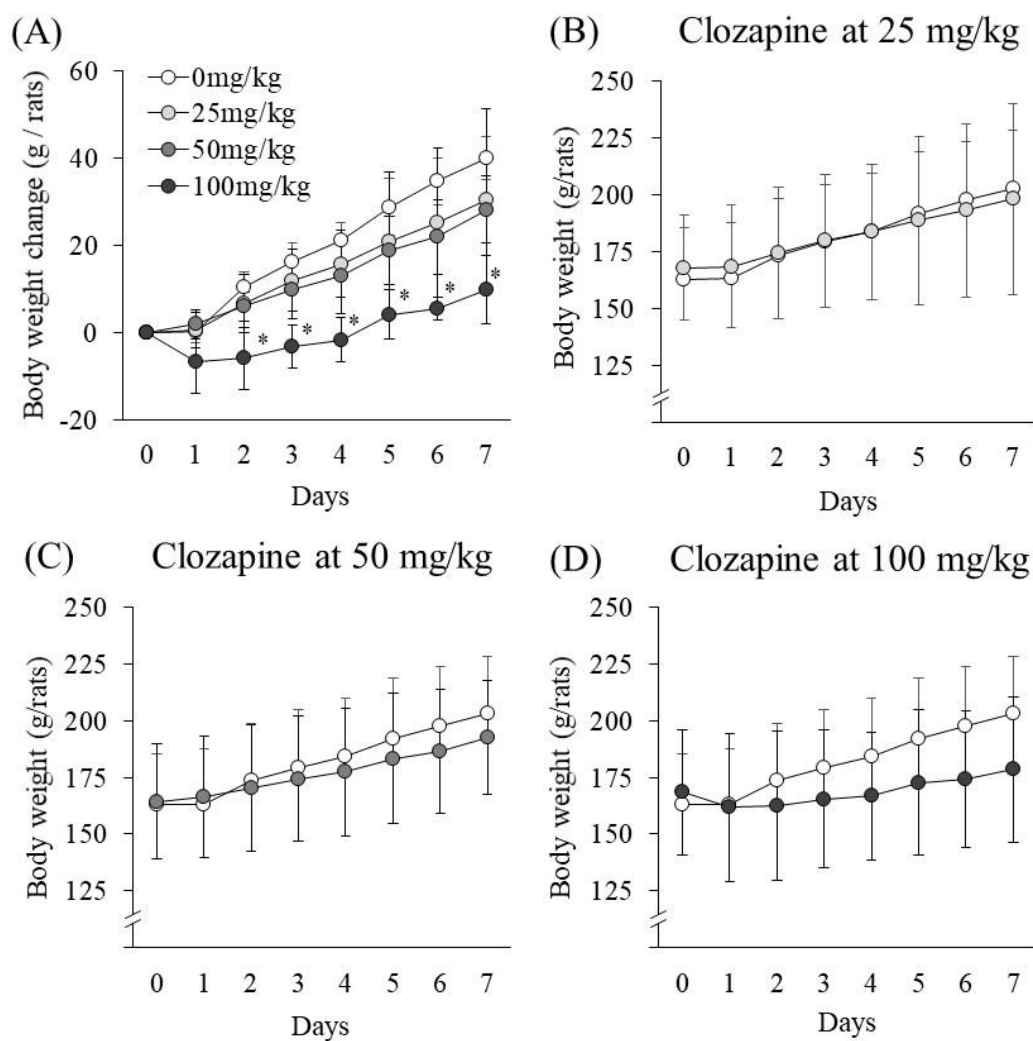
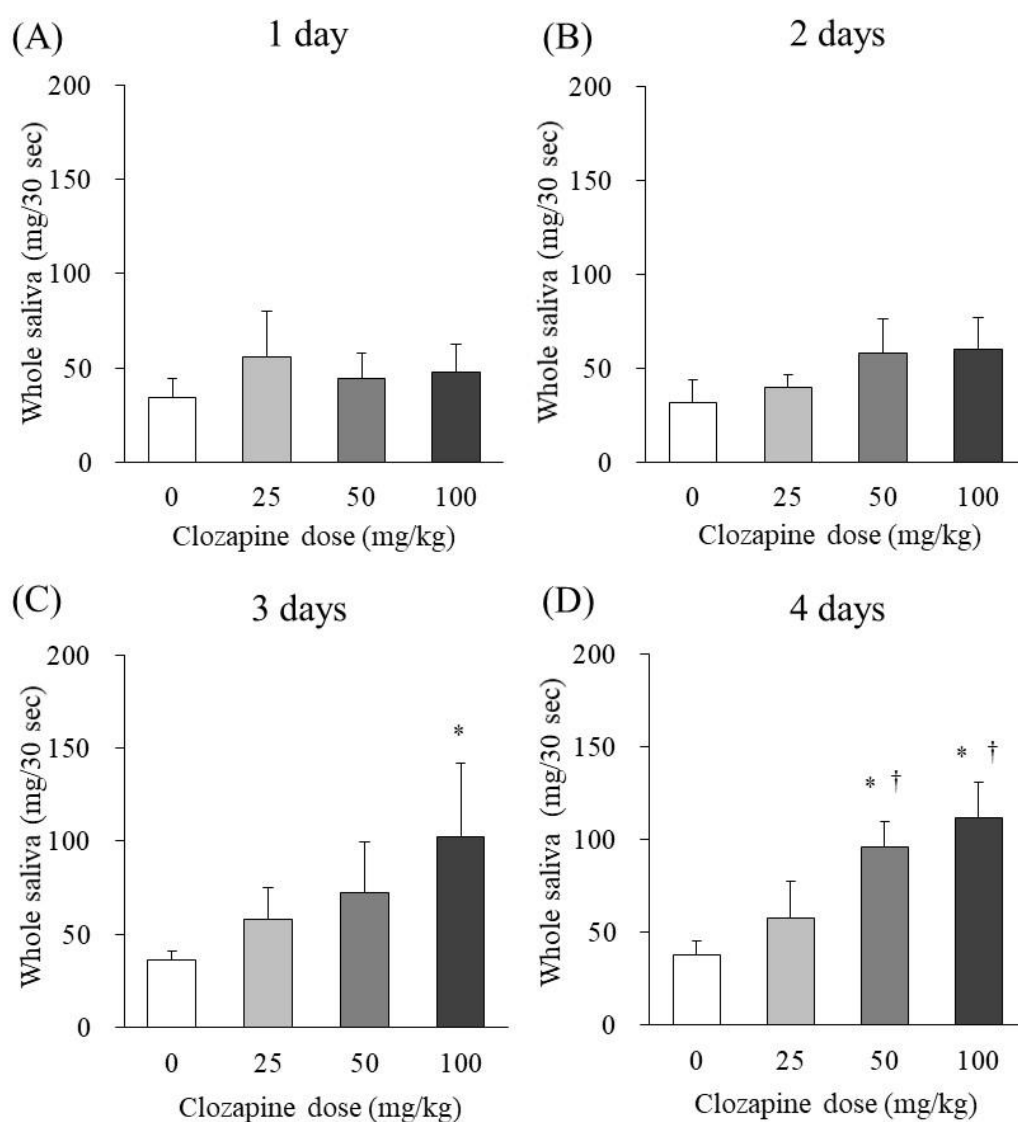


Fig. 11 Body weight change by a repeated administration of clozapine

Rats were administered daily for 7 days with vehicle or clozapine. Delta body weight (A) and body weight changes were compared between clozapine administration groups; (B) 25 mg/kg; (C) 50 mg/kg; (D) 100 mg/kg (closed circles) or control group (open circles). Each column represents the mean with SD of five determinations.

第3項 クロザピン反復投与による唾液分泌量の変化

クロザピン 100 mg/kg 反復投与群では、投与3日目から対照群と比較して、有意な唾液分泌量の増加が認められ、その反応は7日目まで持続した (Fig. 12C-G)。また、クロザピン 100 mg/kg を7日間反復投与した群においては、他の投与群と比較して、有意な唾液分泌量の増加を認めた (Fig. 12G)。これらの結果から、クロザピン 100 mg/kg の7日間反復経口投与によって CIS モデル動物が作製できる可能性が示された。



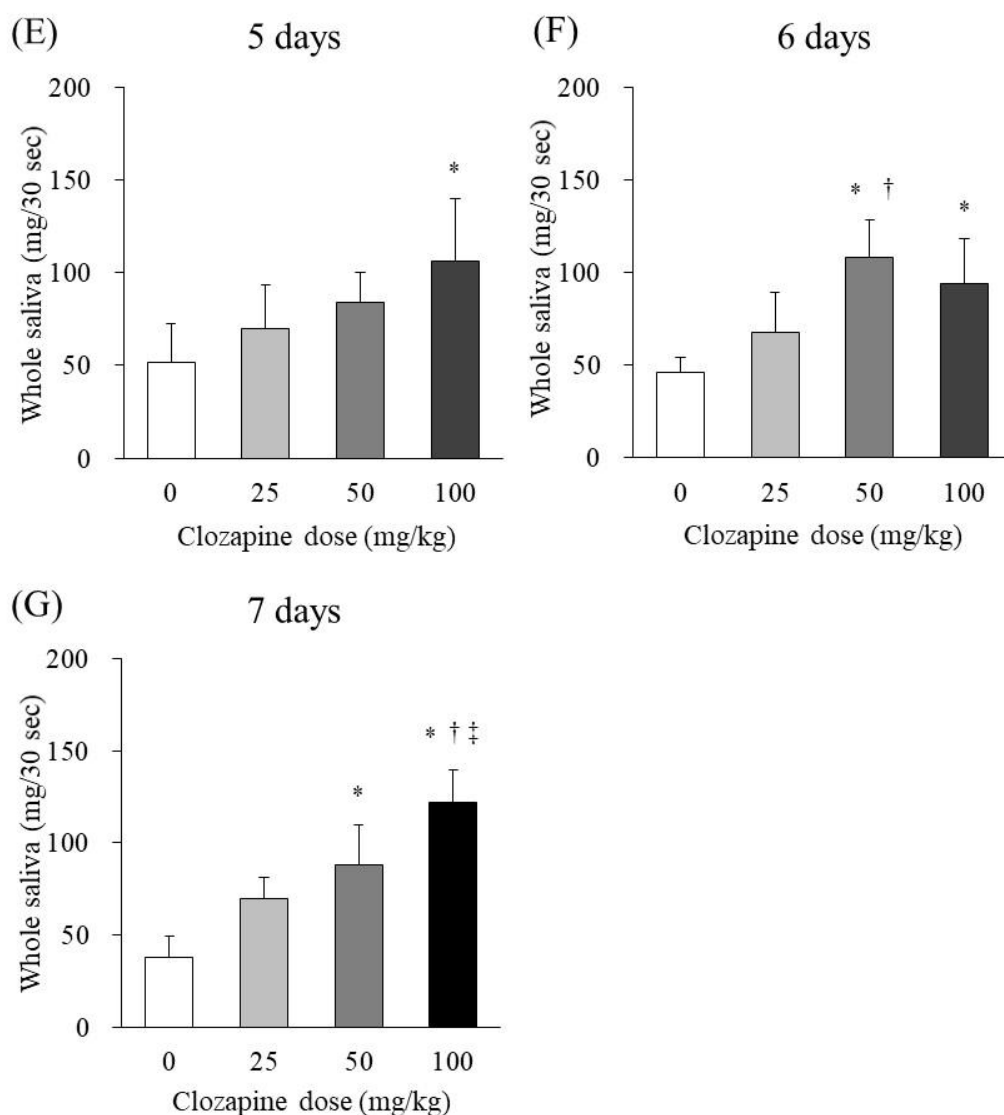


Fig. 12 Effects of a repeated administration of clozapine on salivary secretion in rats

Rats were administered daily for 7 days with vehicle or clozapine (25, 50, 100 mg/kg). Whole saliva was measured every 24 hours after oral administration of vehicle or several clozapine dose: (A) 1 day; (B) 2 days; (C) 3 days; (D) 4 days; (E) 5 days; (F) 6 days; (G) 7days after administration. Each column represents the mean with SD of five determinations. * $p < 0.05$ versus the control; † $p < 0.05$ versus clozapine at 25 mg/kg; ‡ $p < 0.05$ versus clozapine at 50 mg/kg.

第4項 クロザピン単回、7日間反復投与後の血中濃度

前述の検討で作製された CIS モデル動物 (クロザピン 100 mg/kg 7 日間反復経口投与) の各種薬物濃度を測定し、ヒトとの相関性を検証することで、臨床結果の妥当性を評価した。クロザピン 100 mg/kg 単回あるいは 7 日間反復経口投与 24 時間後の血中濃度を測定したところ、単回投与 24 時間後ではクロザピンおよび活性代謝物の血中濃度に有意な差は認められず、いずれも低値であった (Fig. 13A-C)。一方、7 日間反復投与 24 時間後では、クロザピンと N-デスメチルクロザピンの血中濃度が単回投与 24 時間後と比較して、有意に高値であった。また、7 日間反復投与群内で比較したところ、N-デスメチルクロザピンの血中濃度はクロザピン、クロザピン N-オキシドの血中濃度と比較して、有意に高値であった (Fig. 13D)。さらに、CIS モデル動物 (クロザピン 100 mg/kg 7 日間反復投与群) の薬物血中濃度は臨床濃度に近似していた⁴³⁻⁴⁵⁾。

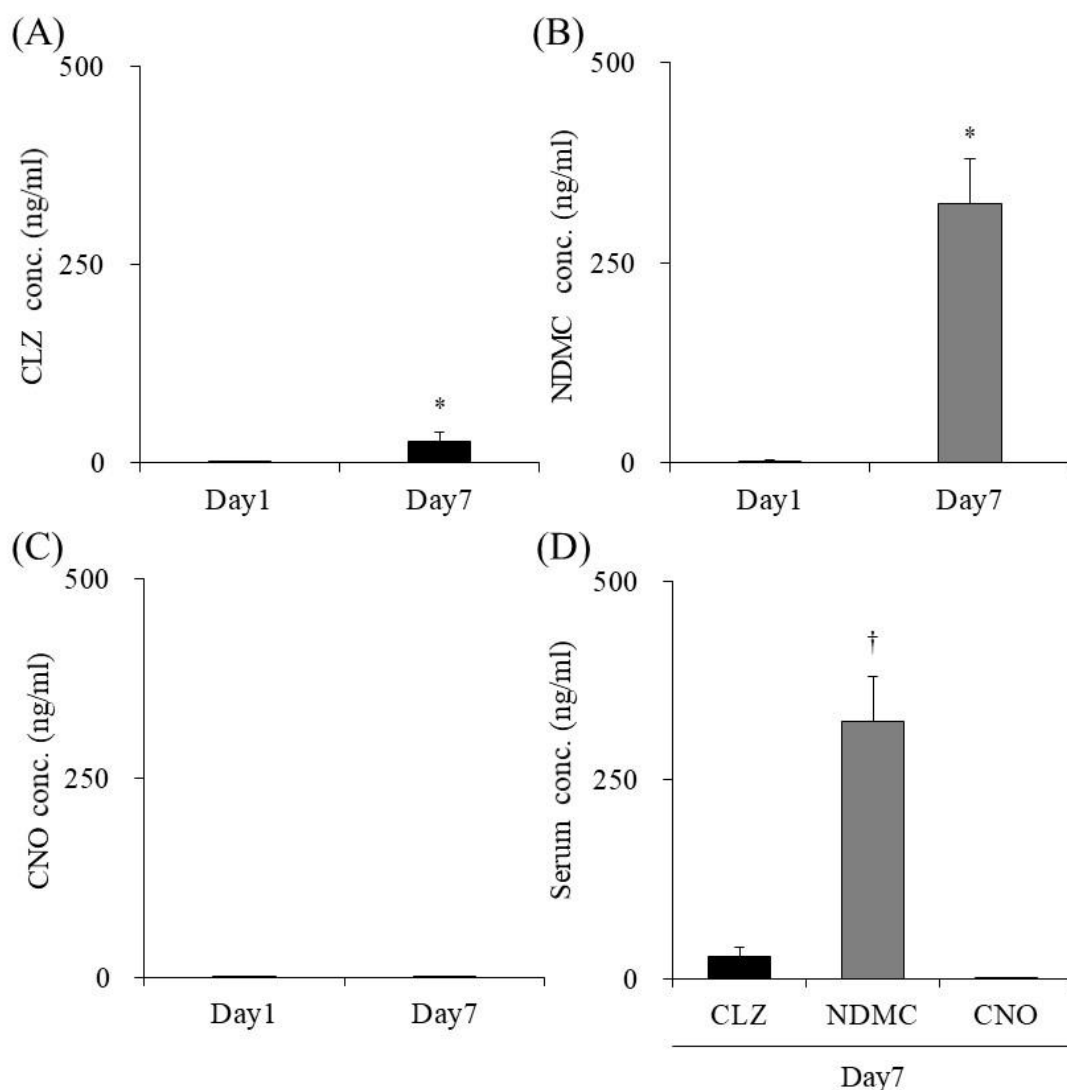


Fig. 13 Serum concentrations of clozapine and metabolites after a single or repeated for 7 days administration of clozapine

Serum concentrations of clozapine (A), N-desmethylozapine (B), and clozapine N-oxide (C) were measured 24 hours after a single or seventh oral administration of clozapine 100 mg/kg. Serum concentrations of clozapine and its metabolites were measured on day 7 after repeated administration of clozapine 100 mg/kg (D). Each column represents the mean with SD of three determinations. * $p < 0.05$; significantly different from a single oral administration group. † $p < 0.05$; significantly different from clozapine and clozapine N-oxide serum concentrations.

第5項 クロザピン単回、7日間反復投与後の顎下腺内濃度

クロザピン 100 mg/kg 単回あるいは7日間反復経口投与 24 時間後に採取した顎下腺の薬物濃度を測定したところ、単回投与 24 時間後ではクロザピンおよび活性代謝物の顎下腺内濃度に有意な差は認められず、いずれも低値であった (Fig. 14A-C)。また、7日間反復投与 24 時間後においては、クロザピンと N-デスメチルクロザピンの濃度が単回投与 24 時間後と比較して、有意に高値であった。さらに、7日間反復投与群内で比較したところ、N-デスメチルクロザピンの顎下腺内濃度は、クロザピンならびにクロザピン N-オキシドと比較して、有意に高値であった (Fig. 14D)。

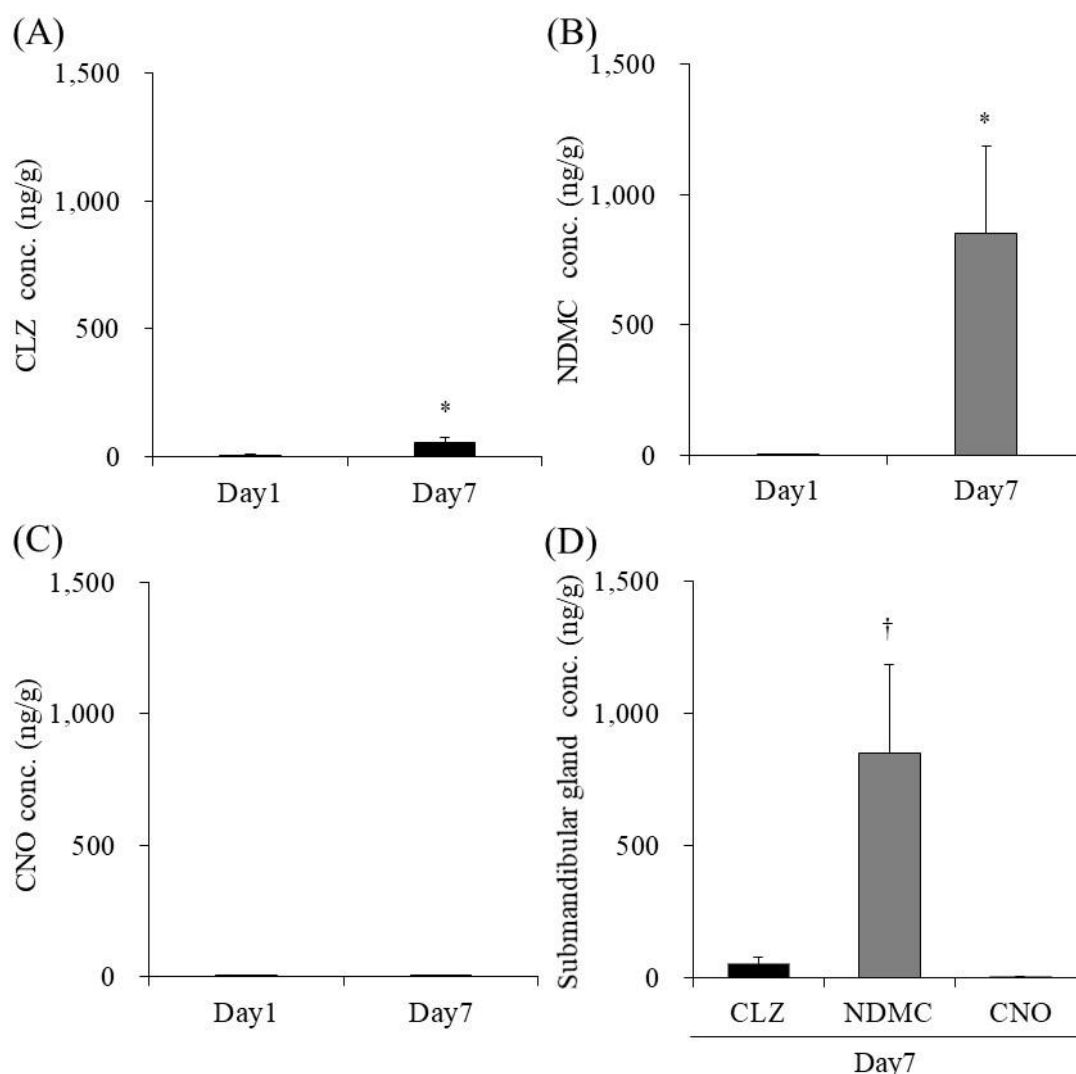


Fig. 14 Submandibular gland concentrations of clozapine and metabolites after a single or repeated for 7 days administration of clozapine

Submandibular gland concentrations of clozapine (A), N-desmethylozapine (B), and clozapine N-oxide (C) were measured 24 hours after a single or seventh oral administration of clozapine 100 mg/kg. Submandibular gland concentrations of clozapine and its metabolites were measured on day 7 after repeated administration of clozapine 100 mg/kg (D). Each column represents the mean with SD of three determinations. * $p < 0.05$; significantly different from a single oral administration group. † $p < 0.05$; significantly different from clozapine and clozapine N-oxide serum concentrations.

第6項 クロザピン単回、7日間反復投与後の脳内濃度

クロザピン 100 mg/kg 単回あるいは7日間反復経口投与 24 時間後に採取した全脳の薬物濃度を測定したところ、単回投与 24 時間後では血中濃度、顎下腺内濃度と同様にクロザピンおよび活性代謝物の脳内濃度に有意な差は認められず、いずれも低値であった (Fig. 15 A-C)。また、7日間反復投与 24 時間後においても、他組織と同様にクロザピンと N-デスメチルクロザピンの濃度が単回投与 24 時間後と比較して、有意に高値であった。しかしながら、7日間反復投与群内の比較においては、血液および顎下腺で認められた N-デスメチルクロザピンとクロザピンの有意な濃度差は全脳では認められなかった (Fig. 15 D)。

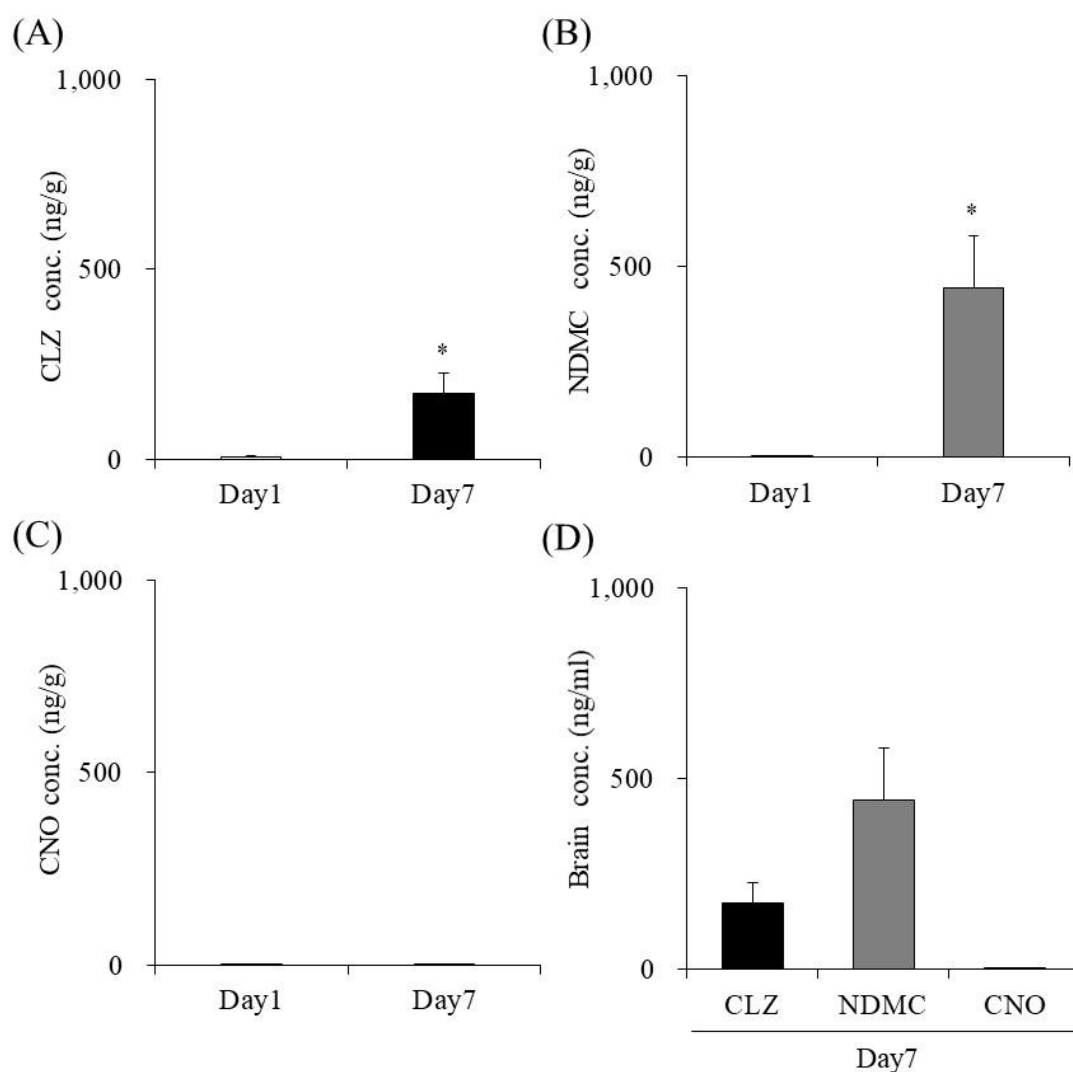


Fig. 15 Brain concentrations of clozapine and metabolites after a single or repeated for 7 days administration of clozapine

Serum concentrations of clozapine (A), N-desmethylozapine (B), and clozapine N-oxide (C) were measured 24 hours after a single or seventh oral administration of clozapine 100 mg/kg. Brain concentrations of clozapine and its metabolites were measured on day 7 after repeated administration of clozapine 100 mg/kg (D). Each column represents the mean with SD of three determinations. * $p < 0.05$; significantly different from a single oral administration group.

第4節 考察

本研究では臨床研究で得られた結果の妥当性を評価するため、臨床状況を模した研究デザインに基づき、実験動物を用いた基礎的検討を実施した。

クロザピンの単回経口投与では、投与直後に唾液分泌量が減少し、その後は時間経過とともに唾液分泌量の増加が認められた (Fig. 10A)。しかしながら、唾液分泌量が最大となったクロザピン投与 24 時間後においても対照群と比較して、唾液分泌量の有意な増加は認められなかった (Fig. 10B)。また、投与 24 時間後のクロザピンおよび活性代謝物の血中、顎下腺内、脳内濃度はいずれも低値であった (Fig. 13, 14, 15A-C)。これらの結果から、クロザピンの単回経口投与はコリン作動薬が引き起こす急性の唾液分泌反応を示さないことが明らかとなった。

クロザピン反復経口投与では、投与回数依存的に唾液分泌量の増加が認められ、クロザピン 100 mg/kg 7 日間反復投与においては対照群を含めた全投与群と比較して、有意な唾液分泌量の増加が認められた (Fig. 10A-E)。さらに、クロザピン 7 日間反復投与後の血中、顎下腺内、脳内濃度においては、いずれの組織でも N-デスメチルクロザピンの濃度が高値であった (Fig. 13, 14, 15A-C)。これらの結果から、クロザピンの反復経口投与は遅発性の唾液分泌反応を引き起こすことが明らかとなり、各種組織内の N-デスメチルクロザピン濃度が高値であったことから、実験動物を用いた基礎的検討においても、臨床研究と同様に N-デスメチルクロザピンが CIS の原因物質である可能性が示された。

临床上、CISの発現は遅発性に認められることが多く³²⁾、通常のコリン作動薬とは発現時期が異なる。クロザピンは低用量から開始し、その増量も緩徐に行うことが添付文書に明記されているため、クロザピンの増量には一定の期間を要する。そのため、臨床で認められるCISの発現が用量あるいは服用期間に依存するのかは、先述した用法用量の制限から推察は困難である。しかしながら、臨床研究でクロザピンの服用量と流涎症の重症度が相関しなかったことから、服用開始からの期間もCISの発現に重要な因子である可能性が考えられる。本検討で実験動物に認められたクロザピン反復経口投与による遅発性の唾

液分泌反応は臨床の発現状況に類似しており³²⁾、臨床状態を反映している可能性が高いと思われる。さらに、クロザピン100 mg/kg 7日間反復投与後に測定したクロザピンの血中濃度はヒトの血中濃度と近似している⁴⁰⁻⁴²⁾。したがって、クロザピン100 mg/kg 7日間反復経口投与は、CISモデル動物の作製に適した投与方法であり、この方法で作製されたモデル動物はCISの臨床像を反映している可能性が高いと考えられる。一方で、CISモデル動物のN-デスメチルクロザピン血中濃度はクロザピン血中濃度と比較して、著しく高値であり、クロザピンとN-デスメチルクロザピンの血中濃度比は臨床とは大きく異なっている。この理由として、両薬物の物性や薬物動態学的特性の違いが挙げられる。CISモデル動物を用いた検証において、クロザピンは脳内濃度が唾液腺内濃度に比して高値である一方で、N-デスメチルクロザピンは唾液腺内濃度が脳内濃度に比して高値であり、組織移行性の違いが認められた。さらに、クロザピンはCYPに加え、グルクロン酸抱合や硫酸抱合などの様々な経路を介した代謝を受ける⁴³⁻⁴⁶⁾が、N-デスメチルクロザピンの主代謝は第二相反応であり、その代謝過程は飽和を受けやすい。本研究で実験動物として用いたラットの薬物代謝は硫酸抱合に比してグルクロン酸抱合の寄与が大きいことが知られている⁴⁷⁻⁴⁸⁾。クロザピンはUDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A1をはじめとした複数種のUGTによる代謝を受けるのに対して、N-デスメチルクロザピンの代謝に関与するUGTはUGT1A4のみであり、代償する代謝機構が少ないラットにおいてはN-デスメチルクロザピンの代謝がヒトに比して飽和しやすく、半減期の延長による過蓄積を起こす可能性が考えられる。したがって、ムスカリン受容体に対して相反する薬理作用を有するクロザピンとN-デスメチルクロザピンの血中濃度比が、その薬物動態学的な差異によって日内変動することで唾液分泌量の経時的な変化がもたらされると推察される。しかしながら、両研究では、唾液分泌に重要な役割を果たす末梢器官である唾液腺に対するクロザピンおよび活性代謝物の直接的作用の有無を検証できておらず、各種薬物の唾液分泌反応への寄与は不明である。そこで、次に培養細胞を用いた*in vitro*の検討を実施し、各種薬物の唾液腺細胞に対する作用を検証した。

第5節 まとめ

実験動物を用いた検証によって、クロザピンの単回投与は唾液分泌反応を示さない一方、反復投与は遅発性の唾液分泌反応を示すことが明らかとなった。また、ラットにクロザピン 100 mg/kg を7日間反復経口投与することで、臨床状態を反映した CIS モデル動物が作製できること、CIS モデル動物の N-デスメチルクロザピンの血中濃度がクロザピンおよびクロザピン N-オキシド体の血中濃度と比較して、有意に高値であることが明らかとなった。これらの結果から実験動物を用いた基礎研究においても、臨床研究の結果と同様に N-デスメチルクロザピンが CIS の原因物質であることが示唆された。

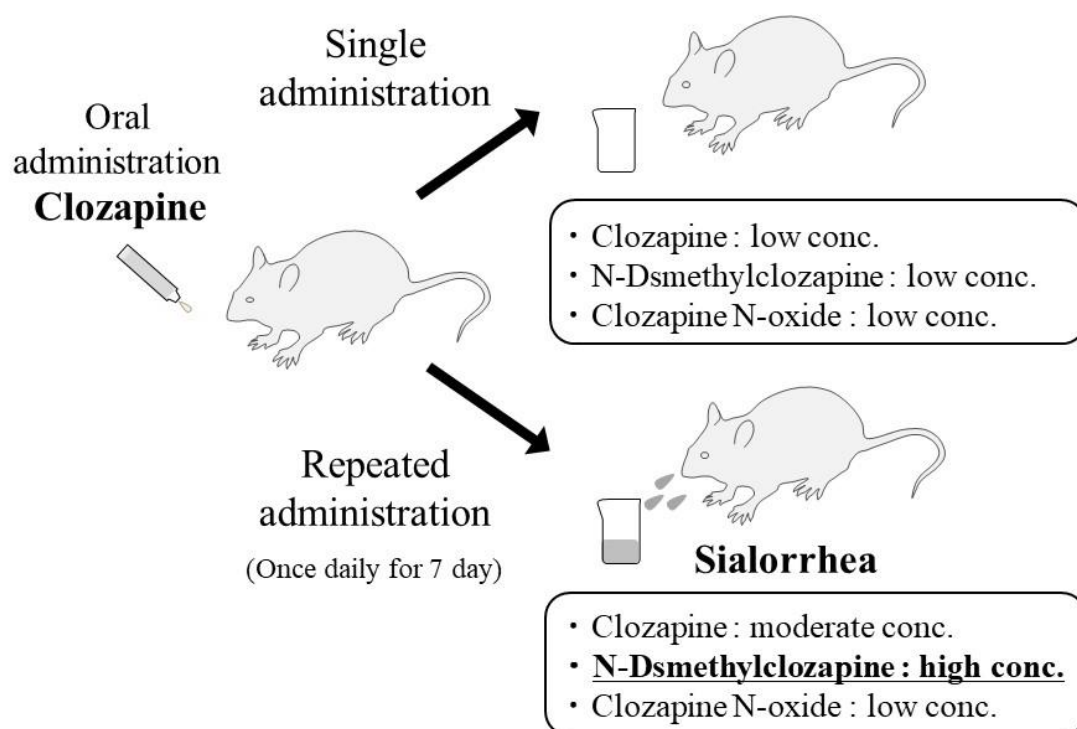


Fig.16 Conclusion of the *in vivo* research

第3章 唾液腺細胞内 Ca^{2+} 濃度を指標とした CIS 原因物質の評価

第1節 諸言

先の検討において、N-デスメチルクロザピンが CIS の原因物質として同定された。先述の通り、クロザピンと N-デスメチルクロザピンは異なる薬理活性および動態学的性質を有していることが報告されており¹⁵⁻²⁰⁾、特にムスカリン受容体への相反する作用が流涎症の発現に寄与している可能性が考えられる。しかしながら、唾液分泌への寄与が最も高い末梢器官である唾液腺に与える影響を検証した研究は未だになく、クロザピンおよび活性代謝物の唾液分泌反応への寄与は不明である。

唾液腺からの唾液分泌は自律神経 (交感神経と副交感神経) の二重支配を受けており、交感神経あるいは副交感神経終末から放出されたアドレナリンやアセチルコリンなどの神経伝達物質が器官側細胞の標的受容体に結合した後、細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇を誘発し、各種輸送担体やイオンチャネルを活性化させることで引き起こされる。そのため、唾液腺由来の培養細胞を用いて、細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化を評価することで、薬物の唾液分泌への関与を間接的に検証することが可能となる。したがって、唾液腺細胞を用いた本検討では、臨床研究ならびに実験動物を用いて実施した基礎研究で得られた結果の妥当性を異なる評価系で再検証することを目的とした。

第2節 実験材料および実験法

第1項 使用薬物、試薬

クロザピンは LKT Laboratories (Minnesota, USA)、N-デスメチルクロザピンは Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA)、クロザピン N-オキシドは Enzo Life Science (New York, USA) から購入した。メタノール、塩化マンガン四水和物、カルバコール、アトロピン、ペニシリン、ストレプトマイシンは Wako (Tokyo, Japan)、イオノマイシン、DMEM は Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan) で購入した。FBS (ウシ胎児血清) は Biosera (Nuaille, France)、EGTA は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、Fura-2 キットは Dojindo (Kumamoto, Japan) で購入した。

第2項 使用細胞

全ての検討はヒト唾液腺由来腺癌細胞株 HSY (human salivary gland epithelial cell line) 細胞を用いて行った。なお、HSY 細胞は北海道医療大学 歯学部歯学科 薬理学教室の谷村 明彦教授から提供頂いたものを使用した。

第3項 細胞培養の方法

HSY 細胞の培養は、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で行い、非働化した 10% FBS、100 IU/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマシを含む DMEM を培養液とした。細胞は 100 mm ディッシュ (TPP) で培養し、播種後 4-5 日目に継代を行った。継代は細胞を滅菌 PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) で洗浄後、0.25% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含む PBS により細胞をディッシュから剥離させて行った。

第4項 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定方法

1) 試薬の調製

Fura 2-AM DMSO 溶解液は Fura-2 AM 50 μg に DMSO 50 μL を添加し、ボルテックスで5分間攪拌し、調製した。loading buffer は 2×recording medium (20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 1.8 mM, CaCl_2 , 13.8 mM glucose, pH 7.4) 5 mL に Fura 2-AM DMSO 溶解液 50 μL 、界面活性剤 pluronic F-127 (最終濃度 0.04 % (w/v)), probenecid (最終濃度 1.25 mM) を添加し、蒸留水で全量 10 mL に希釈後、超音波処理し、混合した。

2) Ca^{2+} アッセイ

細胞の浮遊液を 1 well あたり 40,000 cells/ 100 μL で 96 穴ブラックボトムプレート (Nunc) に播種し、 CO_2 インキュベーターで一晩培養した。培地を除去後、37°C の PBS で 2 回洗浄し、100 μL /well ずつ 37°C の loading buffer を加え、37°C で 20 分間インキュベートした。loading buffer を除去後、37°C の PBS で 1 回洗浄し、37°C の recording medium を 100 μL /well 添加した。カルバコール、アトロピン、クロザピン、N-デスメチルクロザピン、クロザピン N-オキシド溶液を添加した後、蛍光マイクロプレートリーダー (Infinite Pro M200) を用いて、Table 4 に示す設定で蛍光強度比の変化を計測した。その後、イオノマイシン (最終濃度 1 μM)、EGTA トリス塩酸緩衝液 (最終濃度 5 mM)、過剰量の MnCl_2 溶液をそれぞれ添加し、各薬液投与後の蛍光強度比の変化を Table 5 に示す設定で計測し、キャリブレーションを実施した。 Ca^{2+} 濃度は Table 6 に示す計算式に各測定値を代入することで、その近似値を計算した。

Table 4 A fluorescence microplate reader setting

Mode	Top
Kinetic Cycle / Use kinetic interval	41 cycles
Kinetic condition	Handling for cycle 6
Injection	Injects 20 μ L with speed 100 μ L/sec.
Fluorescence Intensity (1)	Ex.340 nm/Em.510 nm, gain 100
Fluorescence Intensity (2)	Ex.380 nm/Em.510 nm, gain 100

Table 5 A fluorescence microplate reader setting for calibration

Mode	Top
Kinetic Cycle / Use kinetic interval	41 cycles
Kinetic condition	Handling for cycle 6
Injection	Injects 10 μ L with speed 100 μ L/sec.
Fluorescence Intensity (1)	Ex.340 nm/Em.510 nm, gain 100
Fluorescence Intensity (2)	Ex.380 nm/Em.510 nm, gain 100

Table 6 Calculation formula of intracellular calcium concentration

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times (F_{min}(380) / F_{max}(380))$$

$[Ca^{2+}]_i$: 細胞内 Ca^{2+} 濃度

K_d : 解離定数 (224 nM)

R : 二波長間の蛍光強度比 ($F(340) / F(380)$)

F_{min} : Ca^{2+} 非存在下 (EGTA トリス塩酸緩衝液添加後) の蛍光強度

F_{max} : 過剰 Ca^{2+} 存在下 (Ionomycin 添加後) の蛍光強度

R_{min} : Ca^{2+} 非存在下の蛍光強度比 ($F_{min}(340) / F_{min}(380)$)

R_{max} : 過剰 Ca^{2+} 存在下の蛍光強度比 ($F_{max}(340) / F_{max}(380)$)

F_{bank} : 自家 ($MnCl_2$ 溶液添加後) の蛍光強度 (全ての蛍光値から F_{bank} を差し引く)

第 5 項 統計解析

実験結果は平均±標準誤差 (mean±S.E.) で示した。また、独立二群間の有意検定は Student's t-test により実施した。統計学的な検定は SPSS Statistics 23 を使用し、 $p<0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

第3節 実験結果

第1項 カルバコール、アトロピンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化

HSY 細胞のムスカリン受容体作動薬に対する応答性を評価するため、ムスカリン受容体作動薬であるカルバコールを positive control として、 Ca^{2+} 応答を評価した。カルバコール 100 μM を処理した後、HSY 細胞内の Ca^{2+} 濃度を測定したところ、添加前と比較して有意な Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた (Fig. 16A)。また、ムスカリン受容体遮断薬であるアトロピン 1 μM を前処理した後、カルバコール 100 μM を処理したところ、カルバコールの処理による Ca^{2+} 濃度の上昇反応は認められなかった (Fig. 16B)。これらの結果から、HSY 細胞のムスカリン受容体を介した Ca^{2+} 応答性が確認された。

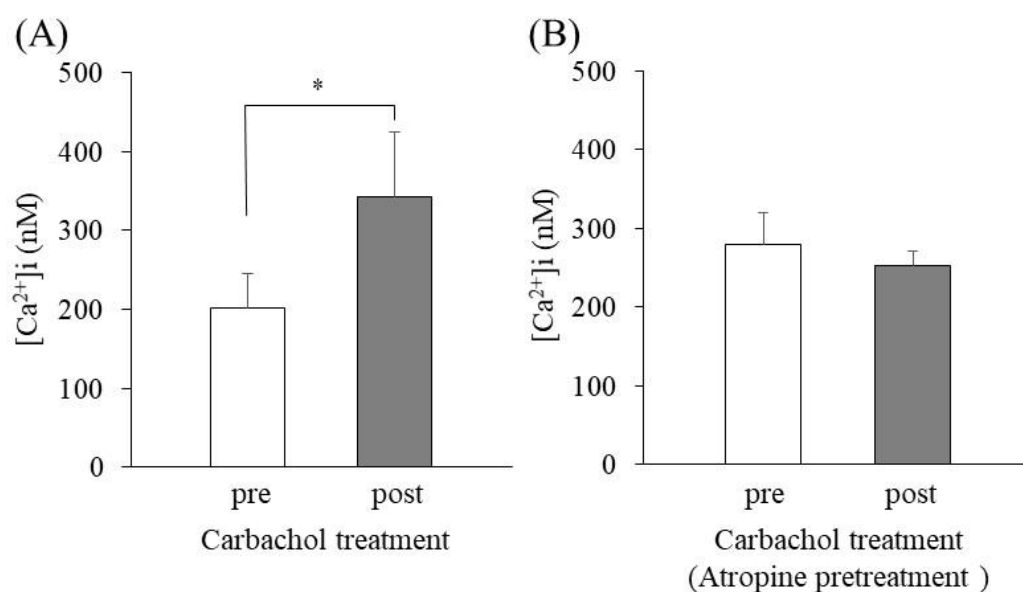


Fig. 16 Effects of carbachol and atropine on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HSY cells

(A) Carbachol (100 μM) -induced Ca^{2+} response in HSY cells and (B) the effect of pretreatment with atropine (1 μM) on the carbachol-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Each column represents means with S.D. of 3 determinations. Significance was set at *; $p < 0.05$.

第2項 クロザピン、活性代謝物による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化

HSY 細胞に対して、クロザピンおよび活性代謝物 (N-デスメチルクロザピン、クロザピン N-オキシド) を $100\ \mu\text{M}$ で処理した後に細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定し、各薬物の唾液腺細胞に対する作用を評価した。クロザピンおよびクロザピン N-オキシド処理群では処理前後の細胞内 Ca^{2+} 濃度を比較したところ、有意な差は認められなかった (Fig. 17A, C)。一方、N-デスメチルクロザピン処理群では、処理前と比較して細胞内 Ca^{2+} 濃度の有意な上昇が認められた (Fig. 17B)。

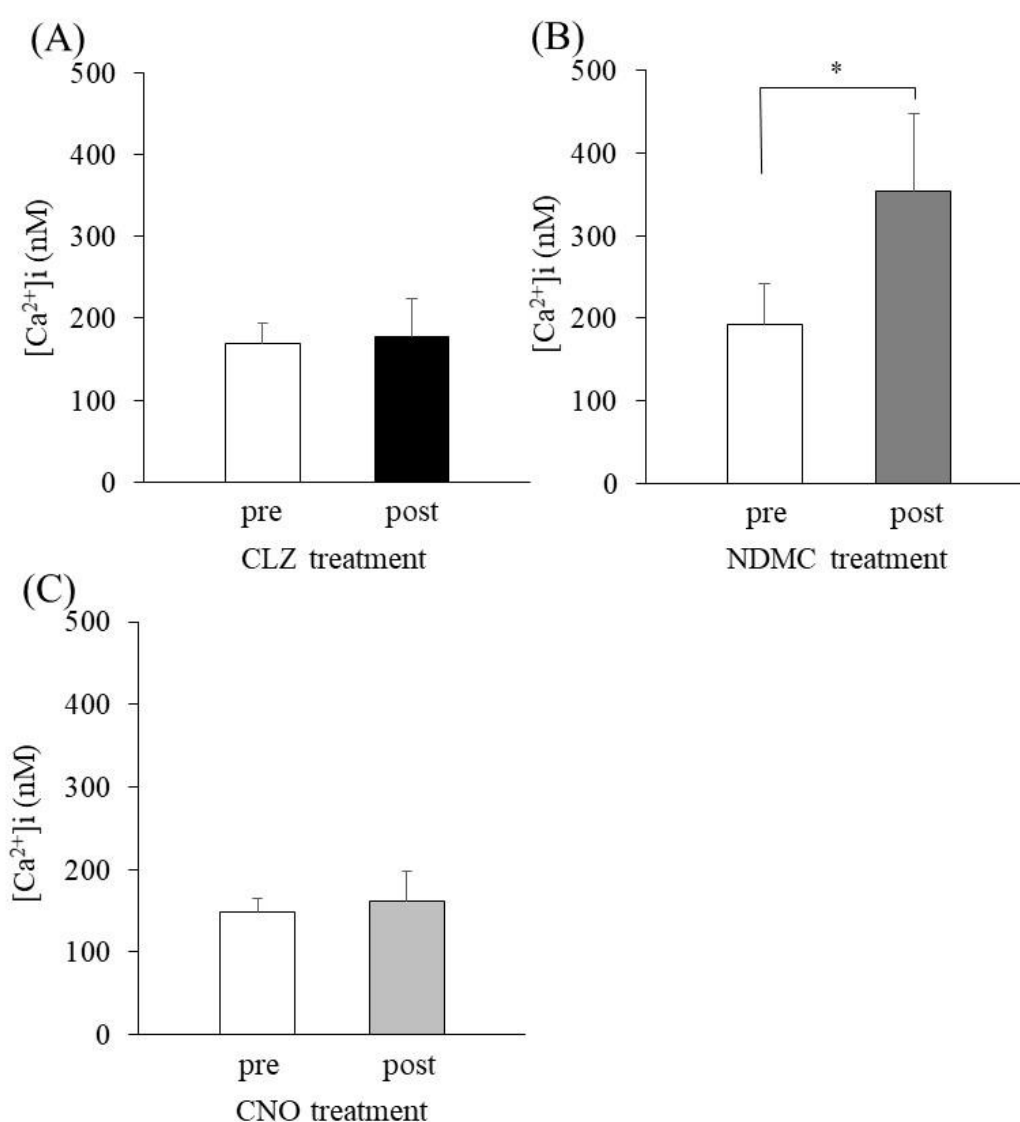


Fig. 17 Effects of clozapine and its metabolites on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HSY cells
(A) Clozapine ($100\ \mu\text{M}$), (B) N-desmethylozapine ($100\ \mu\text{M}$), (C) clozapine N-oxide ($100\ \mu\text{M}$) -induced Ca^{2+} response in HSY cells. Each column represents means with S.D. of 3 determinations. Significance was set at *; $p < 0.05$.

第3項 唾液腺細胞に対する N-デスメチルクロザピンの用量依存的な作用

先の検討で認められた N-デスメチルクロザピンによる細胞内 Ca^{2+} 応答の用量依存性を検証するため、HSY 細胞に N-デスメチルクロザピン 1, 10, 100 μM の処理を実施した。その結果、10, 100 μM 処理で認められた Ca^{2+} 濃度の上昇が、1 μM 処理では認められなかった (Fig. 18A-C)。

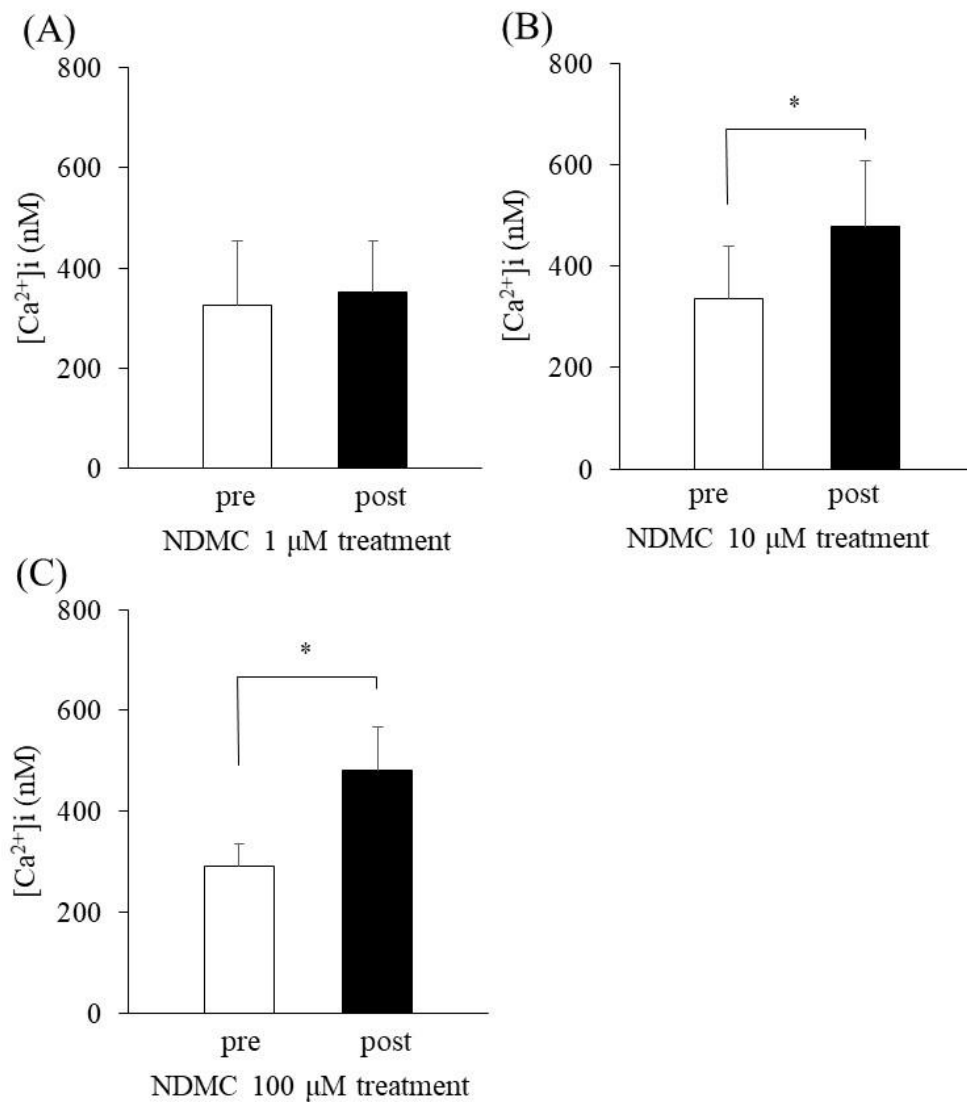


Fig. 18 Dose-dependent effect of N-desmethylozapine on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HSY cells
N-Desmethylozapine (A; 1 μM , B; 10 μM , C; 100 μM) -induced Ca^{2+} dose-dependent response in HSY cells. Each column represents means with S.D. of 3 determinations. Significance was set at *; $p < 0.05$.

第4項 N-デスメチルクロザピン誘発性 Ca^{2+} 応答に対するアトロピンの作用

先の検討によって示された、N-デスメチルクロザピンの唾液腺細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇作用に対するムスカリン受容体の関与を検証するため、ムスカリン受容体遮断薬であるアトロピンの影響を検討した。アトロピン $1\mu\text{M}$ の前処理を行った後に、N-デスメチルクロザピン $100\mu\text{M}$ の処理を実施したところ、N-デスメチルクロザピン処理による有意な Ca^{2+} 濃度の上昇反応 (Fig. 19A) は認められなかった (Fig. 19B)。

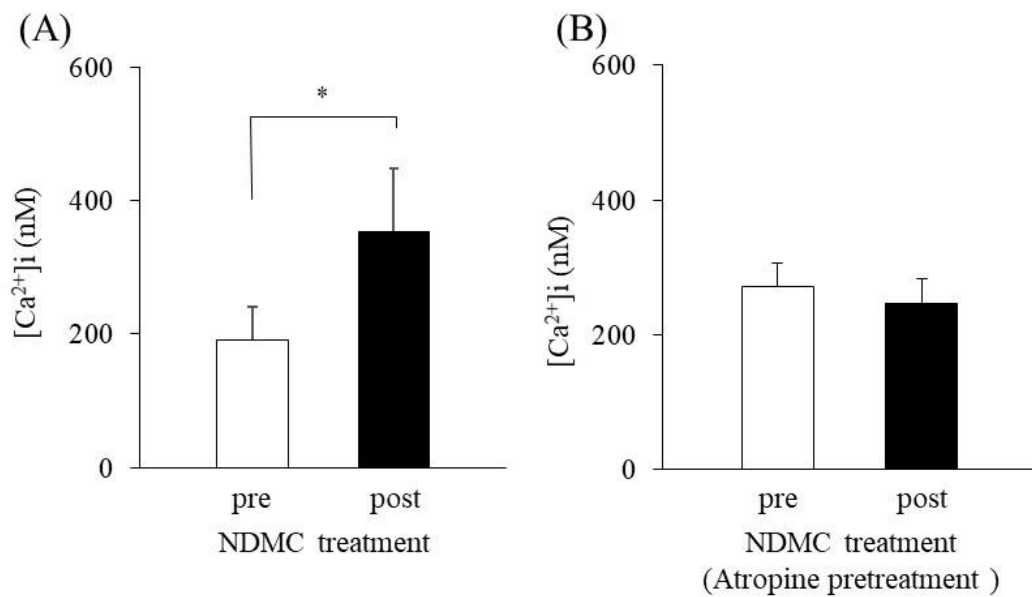


Fig. 19 Effects of N-desmethylozapine and atropine on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HSY cells
(A) N-Desmethylozapine ($100\mu\text{M}$) -induced Ca^{2+} response in HSY cells and
(B) the effect of pretreatment with atropine ($1\mu\text{M}$) on the NDMC-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Each column represents means with S.D. of 3 determinations. Significance was set at *; $p < 0.05$.

第4節 考察

臨床研究ならびに *in vivo* 基礎研究の結果から、CIS の原因物質として、N-デスメチルクロザピンが同定された。本章では、両研究で得られた知見の妥当性を評価するために *in vitro* の検討において、N-デスメチルクロザピンの唾液腺への作用を検証した。その結果、N-デスメチルクロザピンは唾液腺における唾液分泌の介在反応である細胞内 Ca^{2+} 応答を用量依存的に引き起こすことが明らかとなった (Fig. 17B, 18A-C)。また、N-デスメチルクロザピンによる唾液腺細胞内の Ca^{2+} 応答が抗コリン薬であるアトロピンで抑制されたことから、この反応がムスカリン受容体を介したものであることが示された (Fig. 19C)。

N-デスメチルクロザピンはクロザピンの代謝物であるため、クロザピンを経口投与した場合、血液および各臓器にはクロザピンと N-デスメチルクロザピンが混在した状態となる。抗コリン作用を有するクロザピンは N-デスメチルクロザピンによる唾液分泌作用を阻害する可能性が考えられるため、これらの濃度比は CIS の発現に影響を与える可能性が考えられる。*in vivo* の検討では、クロザピンの経口投与直後に一過性の唾液分泌の減少が認められ、その後は時間依存的に唾液分泌量が増加することが示されており、反復投与においては投与回数に依存した唾液分泌量の増加が認められる。これら一連の反応には、先述の通り、クロザピンおよび N-デスメチルクロザピンの薬物動態学的特性の差異による日内、日間の濃度比変動や薬理学的特性 (*in vitro* の検討で認められた唾液腺細胞への作用の違い) が寄与しているものと推察される。

臨床ではクロザピンと N-デスメチルクロザピンの血中濃度は近似しており、その濃度比は 1 に近い値を示す。一方、N-デスメチルクロザピンの非蛋白結合率はクロザピンの 2 倍程度高く⁴⁹⁾、実際に薬理作用を示す N-デスメチルクロザピンの遊離体濃度は高くなる可能性が考えられる。また、ヒトの唾液腺においても *in vivo* の検討で示された結果と同様に、クロザピンと N-デスメチルクロザピンの組織内濃度あるいは濃度比が血中とは異なる可能性が考えられる。しかしながら、*in vitro* の検討においては、N-デスメチルクロザピンによる Ca^{2+}

応答に対するクロザピンの阻害作用は検証しておらず、その用量依存性も含め、今後検討していく必要がある。

CIS の治療法を探索するため、イプラトロピウム⁵⁰⁾、グリコピロレート⁵¹⁾、ビペリデン⁵²⁾、ピレンゼピン⁵³⁾、ブチルスコポラミン⁵⁴⁾などの抗コリン薬を対象とした臨床研究が実施されているが、その有効性は限定的と評されている。また、親化合物であるクロザピンが強力な抗コリン作用を有するため、抗コリン薬の追加投与は便秘症などの抗コリン性の副作用を増悪させる可能性が考えられる。これらの問題を解決するため、ブチルスコポラミン軟膏⁵⁵⁾などの作用部位を限局させた治療も試みられているが、有効性は先述と同様である。したがって、これらの薬剤反応性の低さと CIS の重症度および発現頻度を踏まえると、CIS の発現は N-デスメチルクロザピンのムスカリン受容体への作用のみでは一元的に説明できない可能性も考えられる。しかしながら、唾液分泌反応亢進時において、N-デスメチルクロザピンの唾液腺内濃度が高値であり、N-デスメチルクロザピンによる唾液腺細胞内の Ca^{2+} 応答が抗コリン薬で抑制されたことから、唾液腺への集積性が高い抗コリン薬は既報で検証されている抗コリン薬の有効性を上回る可能性が考えられる。現に、唾液腺への移行性が高い抗コリン薬であるオキシブチニンを治療薬とした報告⁵⁶⁾では、CIS の対する有効性が示されている。CIS の発現が夜間に多いこと⁵⁷⁾を踏まえると、半減期が短いオキシブチニンの速放錠は、日中の抗コリン性の副作用を増悪させずに CIS の改善効果を期待できる可能性がある。

本検討にはいくつかの問題点が存在する。クロザピンおよび活性代謝物は中枢移行性を示すため、末梢系のみならず中枢系への影響が流涎症の発現に関与している可能性も考えられるが、本検討では末梢器官への作用のみを評価しており、中枢神経系を介した反応に関しては検証できていない。そのため、ヘキサメトニウムなどの自律神経節遮断薬を用いた検討も必要と思われる。また、CIS の原因物質であると考えられる N-デスメチルクロザピンがムスカリン受容体に対して作動性を示し、唾液分泌反応の介在反応の一つである Ca^{2+} 応答を引き起こすことを明らかにしたが、その下流のカスケードである輸送担体やイオ

ンおよび水チャネルの活性化を介した唾液分泌反応に関しては検証を行っていない。先述の通り、CISの重症度を考えると、N-デスメチルクロザピンのコリン作動作用による唾液分泌誘発反応に加えて、クロザピンあるいは活性代謝物の曝露によって、唾液分泌反応に関与する輸送担体やイオンおよび水チャネルの遺伝子・タンパク質発現の変化や機能の活性化が生じ、相加的に唾液分泌反応を増強させている可能性も考えられる。そのため、中枢神経系の影響に加え、末梢器官においてもさらなる検証が必要と考えられる。さらに、今回の検証ではムスカリン受容体の関与は確認できたものの、標的となる受容体のサブタイプは検証できていないため、新規治療法を確立するためには、ムスカリン受容体の各種サブタイプの選択的遮断薬を用いて、標的となるサブタイプを同定していく必要がある。このように、今回得られた結果を基に、CISの詳細な機序を解明していくことで、治療効果および忍容性の高いCIS新規治療法を探索していくことが可能になると考えられる。

第5節 まとめ

本章で実施した *in vitro* の検証により、先の臨床研究ならびに *in vivo* 研究で CIS の原因因子として同定された N-デスメチルクロザピンが唾液腺細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことが明らかとなった。また、この反応がアトロピンで抑制されたことから、N-デスメチルクロザピンの唾液腺細胞に対する作用はムスカリン受容体を介したものであることが明らかとなった。今後は、中枢神経系を介した唾液分泌反応への関与の有無に加え、唾液腺において、唾液分泌反応に影響を与える輸送担体やチャネルへの作用を検証していく必要がある。

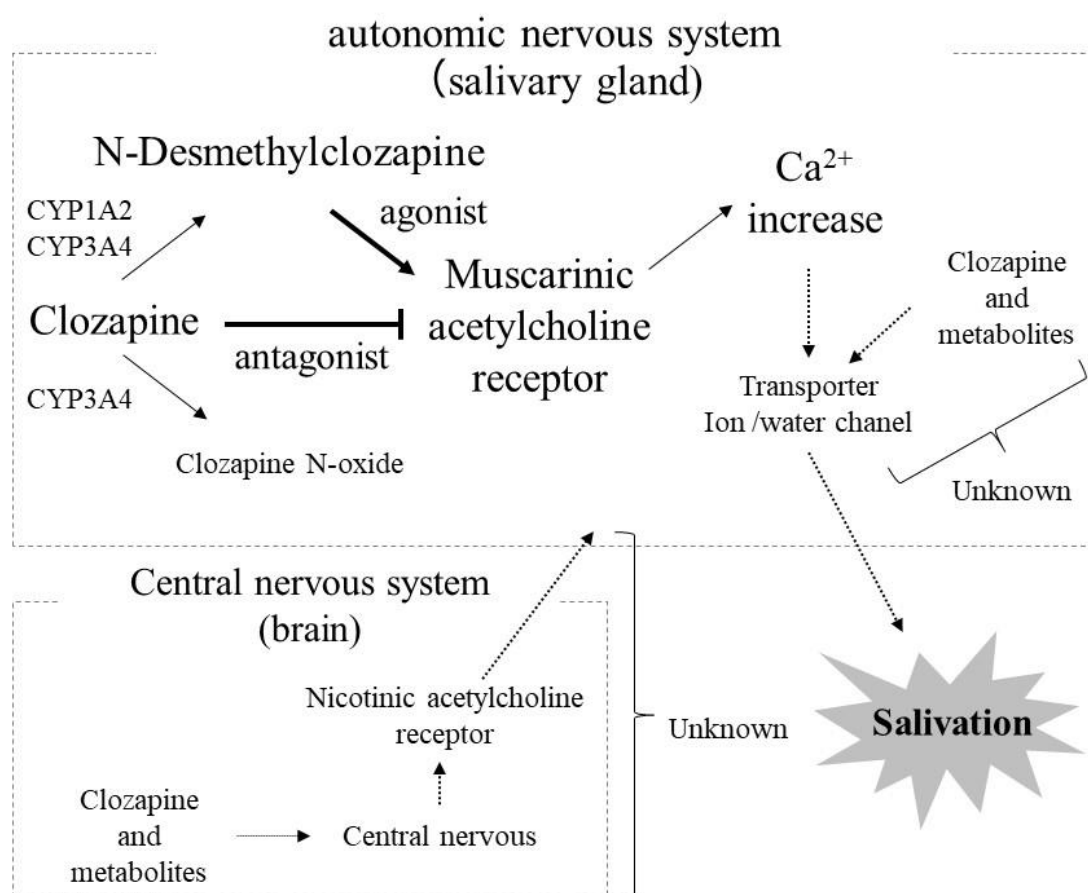


Fig. 21 Conclusion of the *in vitro* research and research limitation

総括

我が国においても近年、プラセボを対象とした抗精神病薬の治験が実施されるようになり、精神科医療が科学的根拠に基づいて提供される基盤が築かれつつある。一方で、精神科領域の薬物療法のエビデンスは未だに乏しく、個体差の大きさから治療反応性を予測できず、治療が難渋する場合も多い。先述の通り、統合失調症の治療は薬物療法と心理社会的療法を組み合わせることが治療の大前提であり、抗精神病薬による単独の治療効果は、副作用の発現リスクを考慮すると決して高くはない。一方で、抗精神病薬は統合失調症の陽性症状をはじめとする精神症状や再発予防に対しては一定の効果を示し、さらには、服薬継続の中止は再発リスクを5倍程度、上昇させるとの報告⁵⁸⁾もあることから、本邦および各国のガイドラインにおいて、抗精神病薬による治療の継続が強く推奨されている。しかしながら、その忍容性の低さから治療の継続は容易ではない。クロザピンは他薬に比して、高い治療効果を示すことから統合失調症の治療において注目される薬剤であるが、多種多様な副作用を呈することから、服薬継続が困難となるケースが散見される。今回、研究対象とした CIS は、発現頻度および重症度が高いことから、クロザピンの服薬中止理由の上位に位置する副作用である。そのため、本研究では高い治療効果を有する薬剤の服薬の負担を軽減する目的で、CIS のリスク因子の解明ならびに新規治療法の探索を目指した。

第1章では、クロザピンを服用している患者を対象とし、流涎症の重症度と関連性の高い因子を検証した。その結果、クロザピンの服用量、嚥下機能、錐体外路症状、クロザピンおよびクロザピン N-オキシドの血中・唾液中濃度は流涎症重症度とは相関せず、N-デスメチルクロザピンの血中・唾液中濃度のみが流涎症の重症度と関連性が強い因子として同定された。

第2章では、未だ報告のない CIS のモデル動物の作製を試みた後、作製されたモデル動物を用いて、臨床研究において同定された CIS のリスク因子の妥当性を評価した。その結果、クロザピン単回投与では、投与直後に唾液分泌の減少を認めた後、時間依存的に唾液分泌量が増加することが確認された。また、

クロザピン反復投与では、投与回数依存的に唾液分泌量の増加を認め、クロザピン 100 mg/kg 7 日間経口反復投与を実施した際に、対照群および他の投与群と比較して有意な唾液分泌量の増加が認められたことから、当投与方法が CIS モデル動物の作製方法となる可能性が示された。さらに、CIS モデル動物の血中、顎下腺内、脳内の N-デスメチルクロザピン濃度が高値であったことから、臨床研究と同様に N-デスメチルクロザピンが CIS の原因物質である可能性が示された。

第 3 章では、先述の検証結果から CIS の原因物質として同定された N-デスメチルクロザピンが唾液腺細胞に与える作用を検証した。その結果、クロザピンおよびクロザピン N-オキシドは唾液腺の細胞内 Ca^{2+} 応答を示さない一方で、N-デスメチルクロザピンは有意な Ca^{2+} 応答を示すこと、この反応が抗コリン薬であるアトロピンで抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、CIS は N-デスメチルクロザピンのムスカリン受容体に対する作動作用によって発現し、抗コリン薬が CIS の治療候補薬となり得る可能性が考えられる。また、CIS の発現ならびにその重症度は N-デスメチルクロザピンとムスカリン受容体遮断作用を有するクロザピンの血中あるいは唾液腺内の存在比に依存する可能性が高く、薬物動態学的な性質の違いによって生じる日内・日間の濃度比変動が唾液分泌量の変化をもたらしているものと推察される。したがって、CIS の重症度が高くなることが予想される N-デスメチルクロザピン/クロザピンの濃度比が高い時間帯に唾液腺の集積性が高い抗コリン薬を服用することで CIS の予防・軽減効果が認められる可能性が考えられる。

本研究で明らかとなった CIS のリスク因子あるいは発現機序は CIS の一機序を示していると考えられるが、臨床研究では流涎症の重症度が高い時間帯の血中濃度の評価や唾液分泌量の客観的評価が実施できておらず、基礎研究においても中枢神経系の影響や唾液分泌反応に寄与する輸送担体あるいはイオン・水チャネルに加え、N-デスメチルクロザピンの標的となる受容体のサブタイプなどに関する検証は実施していない。今後は、これらの研究限界を解決していくことで、治療効果の高い新規治療候補薬を探索できると考えられる。

参考文献

- [1] Salomon JA, Vos T, Hogan DR, *et al.* Common values in assessing health outcomes from disease and injury: disability weights measurement study for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 15, 2129-2143 (2012).
- [2] Hasan A, Falkai P, Wobrock T, *et al.* World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Schizophrenia, Part 1: Update 2012 on the acute treatment of schizophrenia and the management of treatment resistance. *World J. Biol. Psychiatry*, 13, 318-378 (2012).
- [3] Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Örey D, Richter F, Samara M, Barbui C, Engel RR, Geddes JR, Kissling W, Stapf MP, Lässig B, Salanti G, Davis JM. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*, 382, 951-962 (2013).
- [4] Kishi T, Fujita K, Furukawa O, Suzuki T, Moriwaki M, Nitta M, Hattori M, Tsunoka T, Chekuri M, Kane JM, Correll CU, Iwata N. Efficacy and tolerability of clozapine in Japanese patients with treatment-resistant schizophrenia: Results from a 12-week, flexible dose study using raters masked to antipsychotic choice. *Asian J. Psychiatr.*, 6, 200-207 (2013).
- [5] Gurrera RJ, Parlee AC, Perry NL. Aspiration Pneumonia: An Underappreciated Risk of Clozapine Treatment. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 36, 174-176 (2016).
- [6] Stoecker ZR, George WT, O'Brien JB, Jancik J, Colon E, Rasimas JJ. Clozapine usage increases the incidence of pneumonia compared with risperidone and the general population: a retrospective comparison of clozapine, risperidone, and the general population in a single hospital over 25 months. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 32, 155-160 (2017).

- [7] Kaplan J, Schwartz AC, Ward MC. Clozapine-Associated Aspiration Pneumonia: Case Series and Review of the Literature. *Psychosomatics*, 59, 199-203 (2018).
- [8] Legge SE, Hamshire M, Hayes RD, Downs J, O'Donovan MC, Owen MJ, Walters JTR, MacCabe JH. Reasons for discontinuing clozapine: A cohort study of patients commencing treatment. *Schizophr. Res.*, 174, 113-119 (2016).
- [9] Uçok A, Yağcıoğlu EA, Yıldız M, Kaymak SU, Saka MC, Taşdelen R, Danacı AE, Şenol ŞH. Reasons for clozapine discontinuation in patients with treatment-resistant schizophrenia. *Psychiatry Res.*, 275, 149-154 (2019).
- [10] Berardis DD, Rapini G, Olivieri L, Nicola DD, Tomasetti C, Valchera A, Fornaro M, Fabio FD, Perna G, Nicola MD, Serafini G, Carano A, Pompili M, Vellante F, Orsolini L, Martinotti G, Giannantonio MD. Safety of antipsychotics for the treatment of schizophrenia: a focus on the adverse effects of clozapine. *Ther. Adv. Drug Saf.*, 9, 237-256 (2018).
- [11] Syed R, Au K, Cahill C, Duggan L, He Y, Udu V, Xia J. Pharmacological interventions for clozapine-induced hypersalivation. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3, 1-70 (2008).
- [12] Bird M, Smith TL, Walton AE. Current treatment strategies for clozapine-induced sialorrhea. *Ann. Pharmacother.*, 45, 667-675 (2011).
- [13] Sockalingam S, Shammi C, Remington G. Clozapine-induced hypersalivation: A review of treatment strategies. *Can. J. Psychiatry*, 52, 377-384 (2007).

- [14] Chen SY, Ravindran G, Zhang Q, Kisely S, Siskind D. Treatment Strategies for Clozapine-Induced Sialorrhea: A Systematic Review and Meta-analysis. *CNS Drugs*, 33, 225-238 (2019).
- [15] Weiner DM, Meltzer HY, Veinbergs I, Donohue EM, Spalding TA, Smith TT, Mohell N, Harvey SC, Lameh J, Nash N, Vanover KE, Olsson R, Jayathilake K, Lee M, Levey AI, Hacksell U, Burstein ES, Davis RE, Brann MR. The role of M1 muscarinic receptor agonism of N-desmethylozapine in the unique clinical effects of clozapine. *Psychopharmacology*, 177, 207-216 (2004).
- [16] Baldessarini RJ, Centorrino F, Flood JG, Volpicelli SA, Huston-Lyons D, Cohen BM. Tissue concentrations of clozapine and its metabolites in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 9, 117-124 (1993).
- [17] Pollak PT, Shafer SL. Teaching application of clinical pharmacology skills using unusual observations from clozapine overdoses. *J. Clin. Pharmacol.*, 44, 141-149 (2004).
- [18] Lin SK, Chang WH, Chung MC, Lam YW, Jann MW. Disposition of clozapine and desmethylozapine in schizophrenic patients. *J. Clin. Pharmacol.*, 34, 318-324 (1994).

- [19] Eiermann B, Engel G, Johansson I, Zanger UM, Bertilsson L. The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 44, 439-446 (1997).
- [20] Thorn CF, Müller DJ, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: clozapine pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet. Genomics*, 28, 214-222 (2018).
- [21] 統合失調症薬物治療ガイドライン 2015 年版, 日本神経精神薬理学会, 2015 年 9 月
- [22] Chong MY, Tan CH, Fujii S, Yang SY, Ungvari GS, Si T, Chung EK, Sim K, Tsang HY, Shinfuku N. Antipsychotic drug prescription for schizophrenia in East Asia: rationale for change. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 58, 61-67 (2004)
- [23] Xiang YT, Wang CY, Si TM, et al. Clozapine use in schizophrenia: findings of the Research on Asia Psychotropic Prescription (REAP) studies from 2001 to 2009. *Aust. N.Z. J. Psychiatry*, 45, 968-975 (2011).
- [24] Kulkarni DP, Kamath VD, Stewart JT. Swallowing disorders in schizophrenia. *Dysphagia*, 32, 467-471 (2017).
- [25] Crysdale WS, White A. Submandibular duct relocation for drooling: a 10-year experience with 194 patients. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 101, 87-92 (1989).

- [26] Ferguson C. An effect size primer: A guide for clinicians and researchers. *Professional Psychology: Research and Practice*, 40, 532-538 (2009).
- [27] Haring C, Meise U, Humpel C, Saria A, Fleischhacker WW, Hinterhuber H. Dose-related plasma levels of clozapine: influence of smoking behaviour, sex and age. *Psychopharmacology*, 99, S38-40 (1989).
- [28] Perry PJ, Bever KA, Arndt S, Combs MD. Relationship between patient variables and plasma clozapine concentrations: a dosing nomogram. *Biol Psychiatry*, 15, 733-738 (1998).
- [29] Palego L, Biondi L, Giannaccini G, Sarno N, Elmi S, Ciapparelli A, Cassano GB, Lucacchini A, Martini C, Dell'Osso L. Clozapine, norclozapine plasma levels, their sum and ratio in 50 psychotic patients: influence of patient-related variables. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 26, 473-480 (2002).
- [30] Wohkittel C, Gerlach M, Taurines R, Wewetzer C, Unterecker S, Burger R, Schreck D, Mehler-Wex C, Romanos M, Egberts K. Relationship between clozapine dose, serum concentration, and clinical outcome in children and adolescents in clinical practice. *J. Neural. Transm.*, 123, 1021-1031 (2016).
- [31] Akihiro N, Takao M, Yosuke T, Takeharu N, Akihiko T. Partial agonistic effects of pilocarpine on Ca^{2+} responses and salivary secretion in the submandibular glands of live animals. *Exp. Physiol.*, 100, 640-651 (2015).

- [32] Reinstein MJ, Sirotovskaya LA, Chasanov MA, Jones LE, Mohan S. Comparative efficacy and tolerability of benztropine and terazosin in the treatment of hypersalivation secondary to clozapine. *Clin. Drug Invest.*, 17, 97-102 (1999).
- [33] Toshiko O. The paradoxical effects of the dibenzodiazepine derivative, clozapine, on autonomic stimulating drug-induced salivary responses in mice. *Jpn. J. Oral. Biol.*, 39, 284-296 (1997).
- [34] Ekström J, Godoy T, Riva A. Clozapine: Agonistic and antagonistic salivary secretory actions. *J. Dent. Res.*, 89, 276-280 (2010).
- [35] Ekström J, Godoy T, Riva A. N-Desmethylozapine exerts dual and opposite effects on salivary secretion in the rat. *Eur. J. Oral. Sci.*, 118, 1-8 (2010).
- [36] Godoy T, Riva A, Ekström J. Clozapine-induced salivation: interaction with N-desmethylozapine and amisulpride in an experimental rat model. *Eur. J. Oral. Sci.*, 119, 275-281 (2011).
- [37] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB. J.*, 22, 659-661 (2008).
- [38] Modi HR, A. Taha Y, Kim HW, Chang L, Rapoport S, Cheon Y. Chronic clozapine reduces rat brain arachidonic acid metabolism by reducing plasma arachidonic acid availability. *J. Neurochem.*, 124, 376-387 (2013).

- [39] Piwowarska J, Radziwoń-Zaleska M, Dmochowska M, Szepietowska E, Matsumoto H, Sygitowicz G, Pilc A, Łukaszkiwicz J. The usefulness of monitored therapy using Clozapine concentration in the blood serum for determining drug dose in Polish schizophrenic patients. *Pharmacol. Rep.*, 68, 1120-1125 (2016).
- [40] Couchman L, Morgan PE, Spencer EP, Flanagan RJ. Plasma clozapine, norclozapine, and the clozapine:norclozapine ratio in relation to prescribed dose and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 1993-2007. *Ther. Drug Monit.*, 32, 438-447 (2010).
- [41] Bowskill S, Couchman L, MacCabe JH, Flanagan RJ. Plasma clozapine and norclozapine in relation to prescribed dose and other factors in patients aged 65 years and over: data from a therapeutic drug monitoring service, 1996-2010. *Hum. Psychopharmacol.*, 27, 277-283 (2012).
- [42] Couchman L, Bowskill SV, Handley S, Patel MX, Flanagan RJ. Plasma clozapine and norclozapine in relation to prescribed dose and other factors in patients aged <18 years: data from a therapeutic drug monitoring service, 1994-2010. *Early Interv. Psychiatry*, 7, 122-130 (2013).
- [43] Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E, Park BK. Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272, 984-990 (1995).

- [44] Zhang WV, D'Esposito F, Edwards RJ, Ramzan I, Murray M. Interindividual variation in relative CYP1A2/3A4 phenotype influences susceptibility of clozapine oxidation to cytochrome P450-specific inhibition in human hepatic microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 36, 2547-2555 (2008).
- [45] Akamine Y, Sugawara-Kikuchi Y, Uno T3, Shimizu T, Miura M. Quantification of the steady-state plasma concentrations of clozapine and N-desmethylozapine in Japanese patients with schizophrenia using a novel HPLC method and the effects of CYPs and ABC transporters polymorphisms. *Ann. Clin. Biochem.*, 54, 677-685 (2017).
- [46] Dragovic S, Gunness P, Ingelman-Sundberg M, Vermeulen NP, Commandeur JN. Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine. *Drug Metab. Dispos.*, 41, 651-658 (2013).
- [47] 加藤 隆一. 薬物の代謝の種差 —動物からヒトへの展望—. *Exp. Anim.*, 30, 507-517 (1981).
- [48] Klaassen CD, Boles JW. Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB. J.*, 11, 404-418 (1997).

- [49] Schaber G, Stevens I, Gaertner HJ, Dietz K, Breyer-Pfaff U. Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 46, 453-459 (1998).
- [50] Sockalingam S, Shammi C, Remington G. Treatment of clozapine-induced hypersalivation with ipratropium bromide: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study. *J. Clin. Psychiatry*, 70, 1114-1119 (2009).
- [51] Blissit KT, Tillery E, Latham C, Pacheco-Perez J. Glycopyrrolate for treatment of clozapine-induced sialorrhea in adults. *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, 71, 1282-1287 (2014).
- [52] Liang CS, Ho PS, Shen LJ, Lee WK, Yang FW, Chiang KT. Comparison of the efficacy and impact on cognition of glycopyrrolate and biperiden for clozapine-induced sialorrhea in schizophrenic patients: a randomized, double-blind, crossover study. *Schizophr. Res.*, 119, 138-144 (2010).
- [53] Bai YM, Lin CC, Chen JY, Liu WC. Therapeutic effect of pirenzepine for clozapine-induced hypersalivation: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 21, 608-611 (2001).

- [54] Takeuchi I, Suzuki T, Kishi T, Kanamori D, Hanya M, Uno J, Fujita K, Kamei H. Effect of scopolamine butylbromide on clozapine-induced hypersalivation in schizophrenic patients: A case series. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, 30, 109-112 (2015).
- [55] Takeuchi I, Hanya M, Uno J, Fujita K, Kamei H. Effectiveness of the repeated administration of scopolamine ointment on clozapine-induced hypersalivation in patients with treatment-resistant schizophrenia: A preliminary study. *Asia. Pac. Psychiatry*, 9, 1-4 (2017).
- [56] Leung JG, Puri NV, Jacobson MJ. Immediate-release oxybutynin for the treatment of clozapine-induced sialorrhea. *Ann. Pharmacother.*, 45, e45, (2011).
- [57] Maher S, Cunningham A, O'Callaghan N, Byrne F, Mc Donald C, McInerney S, Hallahan B. Clozapine-induced hypersalivation: an estimate of prevalence, severity and impact on quality of life. *Ther. Adv. Psychopharmacol.*, 6, 178-184 (2016).
- [58] Robinson D, Woerner MG, Alvir JM, Bilder R, Goldman R, Geisler S, Koreen A, Sheitman B, Chakos M, Mayerhoff D, Lieberman JA. Predictors of relapse following response from a first episode of schizophrenia or schizoaffective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 56, 241-247 (1999).

謝辞

本研究の遂行ならびに学位論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 井関 健 教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の副査として、ご審査ならびにご指導を受け賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床病態解析学研究室 武田 宏司 教授、同大学大学院薬学研究院薬物動態解析学研究室 菅原 満 教授、ならびに同大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 小林 正紀 准教授に深く感謝致します。

本研究にあたり、多くの有益なご助言、ご指導をいただきました北海道科学大学薬学部薬学科臨床薬学部門薬物治療学分野 山田 武宏 教授、北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 鳴海 克哉 助教、ならびに古堅 彩子 助教、本研究において多大なご協力をいただきました三上 英明 学士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、研究手技をはじめ、多くの有益なご助言、ご指導をいただくとともに、HSY 細胞をご提供いただいた北海道医療大学歯学部薬理学教室 谷村 明彦 教授、根津 顕弘 准教授に深く感謝致します。

北海道医療大学大学院薬学研究科在籍時にご指導を賜り、現在の礎を作っていただきました富樫 廣子 氏、松本 真知子 氏、北海道医療大学薬学部薬理学講座 柳川 芳毅 教授に深く感謝致します。

臨床研究を遂行するにあたり多大なご指導、ご協力をいただきました北海道大学大学院医学研究院神経病態学分野精神医学教室 久住 一郎 教授、橋本直樹 講師、同教室のスタッフ皆様、ならびに本研究にご協力いただきました患者の皆様に厚く御礼申し上げます。

研究環境の維持など、本研究を遂行するにあたり多くの面でご助力いただきました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室の全ての方々に感謝致します。また、業務に従事しながら、研究を継続できるようにご配慮いただきました北海道医療大学薬学部薬学教育推進講座 笠師 久美子 教授をはじめとした北海道大学病院薬剤部のスタッフの方々に感謝致します。

本研究の計画、遂行ならびに論文作成など、本研究の全てにおいて有益なご助言、ご指導をいただくとともに、常に本研究を支えてくださいました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 小林 正紀 准教授に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究のみならず、全ての面において苦楽を共にし、多くの面で支えていただいた妻 石川 理更、子 石川 洸晟に心から感謝するとともに、長きにわたる学生生活において不断の精神的、経済的援助をいただいた両親 石川 清英、石川 順子、ならびに親族の皆様、そして多くの部分で支えていただいた友人の皆様に深く感謝申し上げます。

2019 年 9 月