

平成23年度 博士論文

代謝酵素遺伝子多型解析及び薬物動態解析に基づく  
イソニアジド適正使用に関する臨床薬学的研究

2012年

千葉大学大学院 医学薬学府 創薬生命科学専攻

高齢者薬物学講座 高齢者薬剤学研究室

曾束 貴代

## 目次

略語一覧	2
序章	4
第1章 結核患者における薬物血中濃度及び肝障害発現頻度に対する 代謝酵素遺伝子多型の影響	8
第1節 NAT2、CYP2E1 及び GST の遺伝子多型解析	11
結果	14
第2節 INH 及び代謝物血中濃度に対する代謝酵素遺伝子多型の影響の検討	24
結果	26
第3節 肝機能障害発現頻度に対する代謝酵素遺伝子多型の影響の検討	34
結果	34
考察	45
小括	52
第2章 結核患者における INH の母集団薬物動態解析	53
第1節 NONMEM を用いた INH の母集団薬物動態解析	56
結果	59
第2節 NAT2 遺伝子多型を考慮した INH の投与設計	74
結果	74
考察	77
小括	80
総括	81
試薬・機器一覧	82
参考文献	84
論文目録	93
謝辞	94
審査	95

## 略語一覽

AcHz:	Acetyl hydrazine
AcINH:	Acetyl isoniazid
AUC:	Area Under the Curve
CL:	Clearance
CWRES:	Conditional Weighted Residual
CYP:	Cytochrome
DOTS:	Directly Observed Treatment Short-course
EB:	Ethambutol
FO:	First Order
FOCE:	First Order Conditional Estimation
GST:	Glutathione- <i>S</i> -transferase
Hz:	Hydrazine
IA:	Intermediate Acetylator
INH:	Isoniazid
Ka:	absorption rate constant
LLD:	-2·Log Likelihood Difference
NAT2:	<i>N</i> -Acetyltransferase 2
NONMEM:	Nonlinear Mixed Effect Model
NPD:	Naive Pooled Data
OBJ:	Objective Function
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PD:	Pharmacodynamics
PK:	Pharmacokinetics
PZA:	Pyrazinamide
QOL:	Quality of Life
RA:	Rapid Acetylator
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RFP:	Rifampicin
SA:	Slow Acetylator
SM:	Streptomycin
SNPs:	Single nucleotide polymorphisms

STS: Standard Two Stage  
Vd: Distribution Volume  
WRES: Weighted Residual

## 序章

－221万6000人及び10万6000人－ これは、アメリカにおける1994年の1年間に医薬品の副作用による重篤副作用患者及び死亡患者の推計数であり、心臓病、がん、脳卒中に次いで死因の第4位を占めていると発表された[1]。この調査研究では、投薬ミスや過量投与などによる被害は含まれておらず、医薬品が適正に使用された患者において生じた副作用ということになる。すなわち、患者に利益をもたらすはずの薬物治療において、適正な薬物治療が行われたにもかかわらず、これだけ多くの被害を生んでいるということである。患者を副作用から守るという安全性の確保が現代の医療における最重要課題の一つと考えられる。薬物治療の目的は、医薬品の有効性と安全性を確保した上で、疾患の治癒または患者のQOLを改善することで患者に利益をもたらすことであり、そのために薬剤師を含め医療従事者には医薬品に関わる「安全管理」が強く求められている。

副作用の生じる大きな原因の一つとして、同一の疾患に対する薬物療法において、成人であればほぼ全ての患者に画一的に用法・用量が決定されている場合が多い点が挙げられる。なぜならば、ヒトそれぞれ薬剤応答性に個人差が存在するからである。例えば、ある疾患に対し薬剤を投与した際、患者の応答性には、著効を示すヒト(good-responder)、有効性の低いヒト(poor-responder)、全く効果を示さないヒト(non-responder)と大きく異なる場合がある。この薬剤応答性はPK(Pharmacokinetics: 薬物動態)、PD(Pharmacodynamics: 薬物作用)により決定される。そして個人間での薬物に対する反応性の違いには、PK、PDに関与する代謝酵素やトランスポーター及び薬物受容体といったタンパク質の遺伝子レベルでの個人差が関与していることが徐々に明らかとなってきている。よって、仮に薬剤投与前に患者の遺伝子情報などの患者背景因子に基づき薬剤応答性の個人差を予測し、適正な医薬品を適正量投与することができれば、患者を医薬品による副作用から守ることが可能となる。すなわちこの問題に対する解決策の構築は、個別化医療に直結するため、その重要性が高まってきている。実際に個別化医療実現に向け、すでに日本においても平成15年度より5ヵ年計画で「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」が開始された[2]。このプロジェクトではテーラーメイド医療実現基盤の構築を目的とし、バイオバンクへ収集した約30万人のDNA及び血清試料を用い、体系的・網羅的な遺伝子解析及びタンパク質解析により、SNPs(Single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型)と薬剤の効果、副作用あるいは悪性腫瘍、糖尿病、心筋梗塞など約40疾患との関連性を調査している。文部科学省はこの事

業に約 200 億円の予算を組み込み、平成 20 年度よりさらに 5 年間の期間延長となっており、その期待の大きさが伺える。

ここで、個別化医療を実現させる上で欠くことのできないものがファーマコゲノミクス(Pharmacogenomics,ゲノム薬理学)である。米国 FDA が 2005 年 3 月に公表したガイダンス[3]では、「薬物応答性の個人差の潜在的な原因を特定し、個々の治療の効果を最大限に、リスクを最小限にすることに資するもの」と位置づけられており、また ICH(日米 EU 医薬品規制調和国際会議)においても、関連する専門用語の定義を明らかにしたガイドライン案を策定[4]するなど、その基盤を整備する取り組みが進んでいる。そして各研究分野において、患者個人の持つ潜在的な副作用のリスクや薬効の差異に関する遺伝的要因を理解する上で重要な分野として、活発な研究が行われている。

薬剤の効果や副作用に影響を与える遺伝子多型の存在が知られている薬物代謝酵素としては、Alcohol dehydrogenase, Aldehyde dehydrogenase, Cytochrome P450, Dihydro-pyrimidine dehydrogenase, N-Acetyltransferases (NATs), Glutathione S-transferases (GSTs)などが挙げられる[5]。このうち NATs は、第 2 相薬物代謝反応を触媒する酵素として知られている。これは主に、アリルアミン化合物の N 末端にアセチル CoA からアセチル基を転移することにより代謝反応を行う酵素であり、ヒトは通常、機能を有する 2 種類の NATs 遺伝子(NAT1、NAT2)を保有している。NAT1 はあらゆる組織に発現しているのに対し、NAT2 は主に肝臓、腸管上皮などに発現が認められている[6]。また、それぞれ基質特異性が異なり、NAT1 は p-アミノ安息香酸、p-アミノサリチル酸などを基質とするのに対し、NAT2 はイソニアジド(INH)、スルファピリジン、プロカインアミドなどの薬物のアセチル化を触媒する。

NAT2 によって触媒されるこれら薬物の中で、INH は結核治療の第一選択薬として極めて重要な位置を占めている。WHO による第 9 次結核対策年次報告概要によれば、2003 年の推定新規結核罹患者数は 880 万人(10 万対 140)、そして結核患者のうち 140 万人(10 万対 28)が結核で死亡するなど[7]死因の第 8 位となっており[8]、世界最大級の感染症である。わが国においては、近年の医学・医療の進歩、国民生活の向上により、結核はもはや克服された「過去の病気」と考えられてきたが、現在「再興感染症」として注目を集めている。戦後、罹患率の顕著な減少を示したが、1997 年にはこれまで減少を続けてきた新規発生結核患者数が 38 年ぶりに、罹患率が 43 年ぶりに増加に転じ、1999 年 7 月 26 日には当時の厚生大臣から「結核緊急事態宣言」が発せられた[9]。最新の厚生労働省の発表によると、平成 22 年度の結

核新規登録患者数はここ数年減少傾向にあるものの2万3千人を超え、中でも結核新規登録患者に占める70歳以上の割合は51.2%と非常に高くかつ増加傾向にある[10]。さらには、多剤耐性結核菌の問題、急速な増加をみせるAIDSにおける結核発症の問題[11]、多発する学校・医療機関・老人関係施設等における結核集団感染の問題、抗結核薬による重篤な副作用の問題など重要な課題が多く残されているのが現状である。

ここで、厚生労働省が示した最新の結核化学療法の基準によると、初回治療の場合、INH, Rifampicin (RFP), Pyrazinamide (PZA)の3薬剤にEthambutol (EB)またはStreptomycin (SM)のいずれかを加えた4剤併用療法を2ヶ月間、その後INH, RFPの2剤併用療法を4ヶ月間行う6ヶ月療法を原則としている。重症の肝障害がある場合などでは肝障害を引き起こしやすいPZAの使用を避け、INH, RFPにEBまたはSMを加えた3剤併用療法を6ヶ月間行った後、INH, RFPの2剤併用療法を3ヶ月間継続する、全9ヶ月間の治療が推奨されている。

このように、INHはRFP同様結核の薬物治療において重要な位置づけにあることがわかるが、また同時に長期服用に伴うINHの副作用が臨床上問題となっているのも事実であり、有効な薬剤の使用を制限する原因となっている[12]。重篤な副作用としてインタビューフォームに記載されているものは、劇症肝炎等の重篤な肝障害、皮膚粘膜眼症候群(Stevens-Johnson症候群)、中毒性皮膚壊死症(Lyell症候群)、紅皮症(剥離性皮膚炎)などがあるが[13]、その中でも臨床上最も問題視されているのは肝障害である。現在ではINH服用患者に対して肝機能検査を実施し、症状によっては一時INHを休薬する措置もとられている。しかし、INH投与中止による結核治療の長期化は免れず、さらにはこれに伴う多剤耐性結核菌の出現の可能性も大いに考えられ、治療目標の達成が不完全となることが懸念されている。また、副作用を恐れるあまりに投与量を制限した場合には効果が不完全となることに加え、さらなる多剤耐性結核菌出現の助長にもつながる。前述の通り、新規結核発症数の大半が70歳以上の高齢者であることに加え、近い将来結核に対する化学予防投与の対象年齢が29歳以下から全年齢に拡大される予定であり[14]、高年齢はINHによる肝障害発現のリスクファクターであることを合わせて考えると[15]、高齢者におけるINHによる肝障害の防止は今後さらに大きな課題になってくると考えられる。さらに結核治療での副作用の生じた患者へのコストは年間100億円に及ぶとの推計もあり[16]、医療経済的にも大きな問題となっている。

前述の通り、INHはNAT2により主に代謝されることが知られており、INHのアセチル化能はNAT2遺伝子多型の影響を大きく受け、血中濃度に個人差が生じる

と考えられている[17-19]。さらにこの遺伝子多型の影響は、臨床上問題となる肝障害の発現頻度にも関与しているという報告が数多くなされ、アセチル化能の低いヒトでは高いヒトに比べ肝障害発現頻度が高くなることがわかってきた[18,20-24]。しかしながら、アセチル化能の高いヒトにおいても肝障害を引き起こすことがあり、一概に NAT2 遺伝子多型のみでは説明がつかず、これ以外の要因の関与も十分に考えられる。その手がかりの一つとして、近年 INH の代謝経路には CYP2E1 や GSTs など NAT2 以外の酵素の関与が報告され、NAT2 同様これら酵素の遺伝子多型が INH による肝障害の発症頻度に影響を及ぼすという報告がいくつかなされている[25-27]。

以上の背景より、本研究では、結核化学療法における INH による肝障害を防止するために、個別化医療の観点から INH の代謝酵素遺伝子多型を考慮した投与設計を新たに確立することを目的とし、163 名の結核患者を対象とした臨床試験を実施した。第 1 章では INH の代謝酵素遺伝子多型が INH やその代謝物ならびに肝機能障害発現にどのような影響を及ぼすか調べるため、結核患者における薬物血中濃度及び肝機能障害発現頻度に対する代謝酵素遺伝子多型の影響について検討を行った。第 2 章では、結核患者における INH の母集団薬物動態 (PPK) 解析を行い、INH の薬物動態に影響を及ぼす要因を考慮した PPK モデルを構築した。その結果を踏まえ、代謝酵素遺伝子多型を考慮した INH の投与設計を行った。

なお、本研究で取り扱う遺伝子情報は個人のプライバシーに深く関わる重要な情報であるため、その取り扱いには十分配慮することを前提に、本研究は国立病院機構千葉東病院倫理審査委員会、及び千葉大学大学院薬学研究院倫理審査委員会の承認を得て行った。

## 第1章 結核患者における薬物血中濃度及び肝障害発現頻度に対する代謝酵素遺伝子多型の影響

### 緒言

INHの代謝経路はFig.1-1に示したように、肝臓において主にNAT2によりアセチル化を受け、Acetyl isoniazid (AcINH)に代謝される。このAcINHの割合は代謝物の50~90%に達すると考えられている[28]。さらにAcINHの一部はAmidaseにより加水分解を受けて、Acetyl hydrazine (AcHz)へと代謝される。またこの代謝経路(INH→AcINH→AcHz)のほかに、INHが直接Amidaseにより加水分解を受け、Hydrazine (Hz)が生じる代謝経路も存在する。Hz、AcHzの一部は主にCYP2E1により代謝活性化を受け肝毒性活性代謝物となるが、GSTはグルタチオン抱合を介してこの活性代謝物の解毒を行う。臨床上問題となるINHの副作用は肝障害であり、以前はその発症にはAcHzの代謝活性化の結果、産生される肝毒性活性代謝物が主な原因(アセチルヒドラジン説)であると考えられてきた[25,26,29,30]が、近年ではHzの代謝活性化の結果、産生される肝毒性活性代謝物が肝障害の原因であるという報告が多くなされ[31-35]、肝障害の原因物質はHzであるとの考え方が主流となっている。この肝毒性活性代謝物の本体はヒドラジンラジカルやジイミドなどであり、これら活性代謝物が肝細胞内の高分子と共有結合するなどして肝細胞壊死を惹起させると考えられている[36]。

N-Acetyltransferases (NATs)は、遺伝子多型が最初に発見された薬物代謝酵素として有名であり、1990年代前半に全遺伝子配列が決定され[37]、野生型遺伝子NAT2\*4と35種類の変異型遺伝子が報告されている[38]。この変異型遺伝子のいくつかでアセチル化活性が低下していることが分かっており[39,40]、さらにこの遺伝子型の組み合わせによって、NAT2の表現型(Rapid Acetylator (RA)、Intermediate Acetylator (IA)、Slow Acetylator (SA))が決定される[41-44]。日本人においては、野生型遺伝子NAT2\*4のほかに3つの変異型遺伝子、NAT2\*5B、NAT2\*6A、NAT2\*7Bの存在が知られており、この3つの変異型遺伝子ではいずれもアセチル化能が低下している[44,45]。そしてNAT2\*4とこれら3つの変異型遺伝子を判別することにより日本人では97%以上、欧米人でもほぼ95%の表現型を決定できるとされている。具体的には、変異型遺伝子を持たないヒトはRA、heteroで持つヒトはIA、homoで持つヒトはSAとなる。

前述の通り、NAT2遺伝子多型は臨床上問題となるINHによる肝障害の発症頻

度に関与しているという報告が数多くなされ、アセチル化能の低いヒト(SA)では高いヒト(RA、IA)に比べ肝障害発現頻度が高くなるということが知られている。そして、薬物動態学的観点では、NAT2 遺伝子多型の INH やその主な代謝物である AcINH の薬物動態に対する影響については報告がなされているが[17,19]、現在肝障害の原因物質と考えられている Hz や以前そのように考えられていた AcHz に対してはほとんど報告がなされていない。そのためこれらを含めた代謝物への NAT2 遺伝子多型の影響を検討することは、薬物動態学的側面から INH の肝障害発現に対する影響を考える上でも、有意義なものであると考えられる。

CYP2E1 はヒト肝で発現している Cytochrome P450 の中で 4 番目に含有量が多く、アルコール、麻酔薬、有機溶媒などの医薬品や化学物質の代謝のみならず、糖尿病、肥満などの病態時における薬物代謝に非常に重要な役割を果たしていることが明らかとされてきており[46]、さらには発癌との関わりについても議論されている。CYP2E1 には野生型と 12 種類の変異型遺伝子が知られているが[47]、中でも 5'-末端隣接領域に存在し制限酵素 Rsa I 及び Pst I により切断・判別される遺伝子多型 c2 や、イントロン 6 に存在し Dra I により判別される遺伝子多型 C の研究が盛んに行われている[48-53]が、遺伝子型と表現型の関連は明らかになっていない[46]。INH による肝障害とこれら遺伝子多型との関連性については、CYP2E1 の c1c1 が肝障害発現頻度に影響するという報告[25,26]は若干あるものの、INH 及びその代謝物血中濃度との関連性については報告がなされていない。

Glutathione-S-transferases (GSTs)は、ヒト肝細胞をはじめ多くの組織、細胞に分布し、第 1 相薬物代謝反応で CYP により活性化された物質をグルタチオン抱合させる第 2 相薬物代謝酵素であり、有機過酸化物の還元にも関与するなど、生体の解毒機構に関与する多機能酵素として知られる。また GSTs は 8 個のファミリーに分類されるが、この中でも特に研究が進んでいるものとして mu ファミリーに属する GST M1, GST T1 が挙げられる[54]。GST M1 は 1p13.3 染色体上に位置しており、対立遺伝子は M1a, M1b, M1 null の 3 種類であるが、M1a, M1b は酵素活性がほぼ等しいため、通常 M1 null が問題となる。M1 null のホモ型では GST M1 遺伝子が欠失しているためタンパク質の発現が認められず、94%以上に GST M1 活性の欠如が認められる。一方、22q11.2 染色体上に位置する GST T1 には T1, T1 null の 2 種類の対立遺伝子が知られており、T1 null のホモ型では 95%以上に GSTT1 活性の欠如が認められる[55]。INH による肝障害とこれら遺伝子多型との関連性については、GST M1 遺伝子多型が肝障害発現頻度に影響するという報告[27]は若干あるものの、CYP2E1 遺伝子多型同様、INH 及びその代謝物血中濃度との関連性

については報告がなされていない。

またこれら INH 代謝酵素以外にも、INH の薬物動態や副作用に影響を及ぼす要因として併用薬による薬物相互作用が考えられる。INH と共に結核の化学療法において重要な役割を占める RFP は、INH との併用により、Amidase を誘導し Hz 濃度を上昇させることにより INH による肝障害発現のリスクを上昇させるという報告[56-58]があるが、その臨床での投与量における Amidase 誘導の強さは明らかではない。

そこで本章では、INH 代謝酵素(NAT2、CYP2E1 及び GST M1・T1)の遺伝子多型解析を行い、INH 及びその代謝物血中濃度ならびに肝機能障害発現頻度に与える影響を検討した。

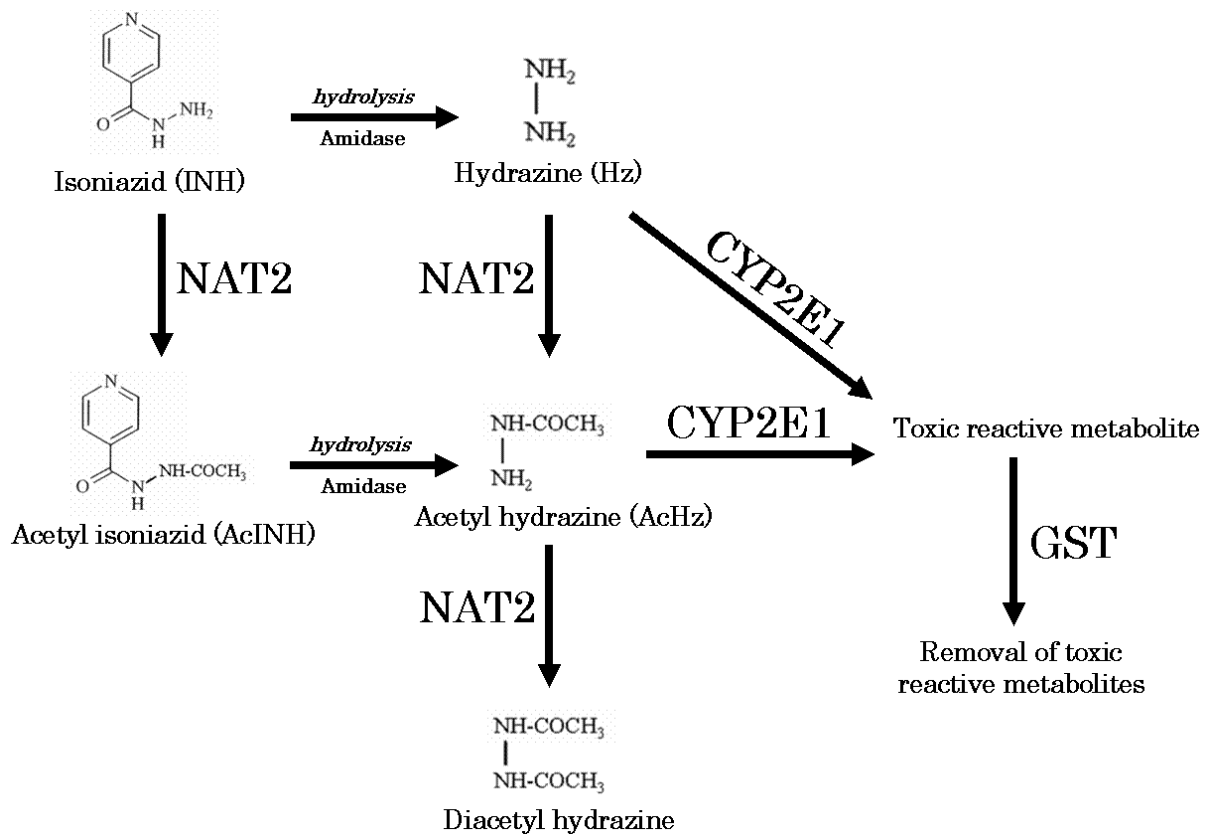


Fig.1-1 Metabolic pathways of INH in human.

## 第 1 節 NAT2、CYP2E1 及び GST の遺伝子多型解析

本節では、文書にて同意の得られた対象患者から供与された血液サンプルを用いて、NAT2、CYP2E1、GST M1 及び GST T1 の遺伝子多型解析を行った。また、NAT2 遺伝子多型と CYP2E1 及び GST 遺伝子多型との関連性について検討した。

### 1. 方法

#### 【対象患者】

国立病院機構千葉東病院にて入院治療中の結核患者 163 名(男性: 130 名、女性: 33 名、平均年齢は  $53.7 \pm 18.1$  歳)を対象とした。

#### 【遺伝子多型解析】

対象患者から得た血液サンプルを用い、以下の方法に従い NAT2 遺伝子、CYP2E1 遺伝子及び GST M1・T1 遺伝子の多型解析を行った。

#### ① DNA 抽出

QIAamp® DNA Blood MiniKit を用い、そのプロトコールに従い、末梢血 200  $\mu$ L から DNA を抽出した。

#### ② PCR 反応

##### <NAT2>

puRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads に抽出した DNA を 100~150 ng、NAT2 N5 primer (5'-TCAGCCTCAGGTGCCTTGCA-3') 及び N4 primer (5'-AGCATGAATCACTC TGCTTC-3') 0.8  $\mu$ M、dNTP 200  $\mu$ M、Tris-HCl 10 mM、KCl 50 mM、MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM、pure Taq DNA polymerase 2.5 U/tube となるよう MilliQ を加え全量 25  $\mu$ L に調製した。これを Thermal Cycler (TaKaRa PCR Thermal Cycler) を用い、95°C で 10 分のインキュベーションの後、95°C で 30 秒、61°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 1 cycle として 35 cycle の PCR を行い、72°C で 10 分のインキュベーションを行った。

##### <CYP2E1 RsaI 処理>

puRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads に抽出した DNA を 100~150 ng、CYP2E1 R S1 primer (5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3') 及び R A1 primer (5'-TTCATTCTGTCT TCTAACTGG-3') 0.2  $\mu$ M、dNTP 200  $\mu$ M、Tris-HCL 10 mM、KCl 50 mM、MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM、pure Taq DNA polymerase 2.5 U/tube となるよう MilliQ を加え全量 25  $\mu$ L に調製した。これを Thermal Cycler (TaKaRa PCR

Thermal Cycler) を用い、94℃で 10 分のインキュベーションの後、94℃で 30 秒、53℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 1 cycle として 35 cycle の PCR を行い、72℃で 10 分のインキュベーションを行った。

<CYP2E1 DraI 処理>

puRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads に抽出した DNA を 100~150 ng、CYP2E1 D S1 primer (5'-AGTCGACATGTGATGGATCCA-3') 及び D A1 primer (5'-GACAGGGTTTC ATCATGTTGG-3') 0.2 μM、dNTP 200 μM、Tris-HCl 1 mM、KCl 50 mM、MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM、pure Taq DNA polymerase 2.5 U/tube となるよう MilliQ を加え全量 25 μL に調製した。これを Thermal Cycler (TaKaRa PCR Thermal Cycler) を用い、94℃で 10 分のインキュベーションの後、94℃で 30 秒、64℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 1 cycle として 35 cycle の PCR を行い、72℃で 10 分のインキュベーションを行った。

<GST M1>

puRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads に抽出した DNA を 100~150 ng、GSTM1 S1 primer (5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3') 及び A1 primer (5'-GTTGGGCTCAAAA TATACGGTGG-3') 0.2 μM、β-globin S1 及び A1 primer 0.2 μM、dNTP 200 μM、Tris-HCl 10 mM、KCl 50 mM、MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM、pure Taq DNA polymerase 2.5 U/tube となるよう MilliQ を加え全量 25 μL に調製した。これを Thermal Cycler (TaKaRa PCR Thermal Cycler) を用い、94℃で 15 分のインキュベーションの後、94℃で 30 秒、58℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 1 cycle として 35 cycle 行い、72℃で 10 分のインキュベーションを行った。

<GST T1>

puRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads に抽出した DNA を 100~150 ng、GSTT1 S1 primer (5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3') 及び A1 primer (5'-TCACCGGATCAT GGCCAGCA-3') 0.2 μM、β-globin S1 及び A1 primer 0.2 μM、dNTP 200 μM、Tris-HCl 10 mM、KCl 50 mM、MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM、pure Taq DNA polymerase 2.5 U/tube となるよう MilliQ を加え全量 25 μL に調製した。これを Thermal Cycler (TaKaRa PCR Thermal Cycler) を用い、94℃で 15 分のインキュベーションの後、94℃で 30 秒、64℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 1 cycle として 35 cycle 行い、72℃で 10 分のインキュベーションを行った。

③ PCR 産物の精製

QIAquick® PCR Purification Kit を用い、そのプロトコールに従い PCR 産物を精製した。

#### ④ 確認泳動(NAT2, CYP2E1)

精製後の PCR 産物 10  $\mu$ L に 6×Loading buffer 2  $\mu$ L を加え、混合した後、3%アガロースゲルで 100V、30 分間泳動した。泳動終了後、エチジウムブロマイド液にて 30 分間染色し、紫外線下で観察、撮影した。

#### ⑤ 制限酵素処理(NAT2, CYP2E1)

##### <NAT2>

精製後の PCR 産物 5  $\mu$ L に、各制限酵素(Kpn I、Taq I、BamH I)または滅菌超純水 0.5  $\mu$ L、10×buffer 1  $\mu$ L、Taq I のみに 0.1% BSA 1  $\mu$ L を添加し、MilliQ を加え全量 10  $\mu$ L に調製した。反応液作成後、Taq I は 65°C、BamH I 及び Kpn I は 35°C で 3 時間インキュベートした。なお\*5B の解析には Kpn I、\*6A には Taq I、\*7B には BamH I を用いた。

##### <CYP2E1 RsaI 処理>

精製後の PCR 産物 5  $\mu$ L に、Rsa I または滅菌超純水 0.5  $\mu$ L、10×buffer 1  $\mu$ L、0.1% BSA 1  $\mu$ L を添加し、MilliQ を加え全量 10  $\mu$ L に調製した。反応液作成後、37°C で 2 時間インキュベートした。

##### <CYP2E1 DraI 処理>

精製後の PCR 産物 5  $\mu$ L に、Dra I または滅菌超純水 0.5  $\mu$ L、10×buffer 1  $\mu$ L を添加し、MilliQ を加え全量 10  $\mu$ L に調製した。反応液作成後、37°C で 2 時間インキュベートした。

#### ⑥ 電気泳動

精製後の PCR 産物 10  $\mu$ L に 6×Loading buffer 2  $\mu$ L を加え、混合した後 3%アガロースゲルで 100V、30 分間泳動した。泳動終了後、エチジウムブロマイド液にて 20 分間染色し、紫外線下で観察、撮影した。

##### <NAT2>

Kpn I による制限酵素処理では、酵素添加(+)により 655 bp のバンドが確認できるものを野生型アレル(\*4)、710 bp のバンドが確認できるものを変異型アレル(\*5B)と判断した(Fig.1-2)。

Taq I による制限酵素処理では、酵素添加(+)により 377 bp のバンドと 170 bp と 163 bp とが重なったバンドが確認できるものを野生型アレル(\*4)、377 bp のバンドと 333 bp のバンドが確認できるものを変異型アレル(\*6A)と判断した(Fig.1-3)。

BamHI による制限酵素処理では、酵素添加(+)により 431 bp と 279 bp のバンドが確認できるものを野生型アレル(\*4)、710 bp のバンドが確認できるものを変異型アレル(\*7B)と判断した(Fig.1-4)。

上記 3 ヶ所の変異の組み合わせにより、NAT2 表現型を判定した。

#### <CYP2E1 RsaI 処理>

Rsa I による制限酵素処理では、酵素添加(+)により 352 bp のバンドが確認できるものを野生型アレル(c1)、413 bp のバンドが確認できるものを変異型アレル(c2)と判断した(Fig.1-5)。

#### <CYP2E1 DraI 処理>

Dra I による制限酵素処理では、酵素添加(+)により 251 bp と 125 bp のバンドが確認できるものを野生型アレル(D)、376 bp のバンドが確認できるものを変異型アレル(C)と判断した(Fig.1-6)。

#### <GST M1>

精製後、電気泳動により 219 bp のバンドが確認できるものを野生型(wild)、確認できないものを欠損型(null)と判断した(Fig.1-7)。

#### <GST T1>

精製後、電気泳動により 459 bp のバンドが確認できるものを野生型(wild)、確認できないものを欠損型(null)と判断した(Fig.1-8)。

### 【統計処理】

比率については  $\chi^2$ -test を用いて、差の検討を行った。なお統計解析には SAS version 8.1 (SAS Institute Japan Inc.) を用い、有意水準は危険率 5%とした。Hardy-Weinberg 平衡の検討については R (version 2.13.1)を用いた。

## 2. 結果

NAT2 遺伝子多型解析の結果を Table 1-1 に示した。RA は 75 名(46.0%)、IA は 73 名(44.8%)、SA は 15 名(9.2%)であった(Table 1-1(A))。NAT2 の allele 頻度は、野生型の NAT2\*4 では 0.684、変異型の NAT2\*5B では 0.006、NAT2\*6A では 0.193、NAT2\*7B では 0.117 であった(Table 1-1(B))。CYP2E1 遺伝子多型解析の結果を Table 1-2 に示した。RsaI 処理では c1/c1 は 103 名(63.2%)、c1/c2 は 48 名(29.4%)、c2/c2 は 12 名(7.4%)であり、DraI 処理では D/D は 78 名(47.9%)、D/C は 70 名(42.9%)、C/C は 15 名(9.2%)であった(Table 1-2(A))。また、CYP2E1 の allele 頻度は、RsaI 処理では野生型の c1 では 0.779、変異型の c2 では 0.221 であり、DraI 処理では野生型の D では 0.693、変異型の C では 0.307 であった(Table 1-2(B))。GST 遺伝子多型解析の結果を Table 1-3 に示した。GST M1 では wild が 75 名(46.0%)、null が 88 名(54.0%)であり、GST T1 では wild が 97 名(59.5%)、null が 66 名(40.5%)

であった(Table 1-3)。

NAT2 及び CYP2E1 の genotype 頻度は全て Hardy-Weinberg 平衡に従うことが確認された。

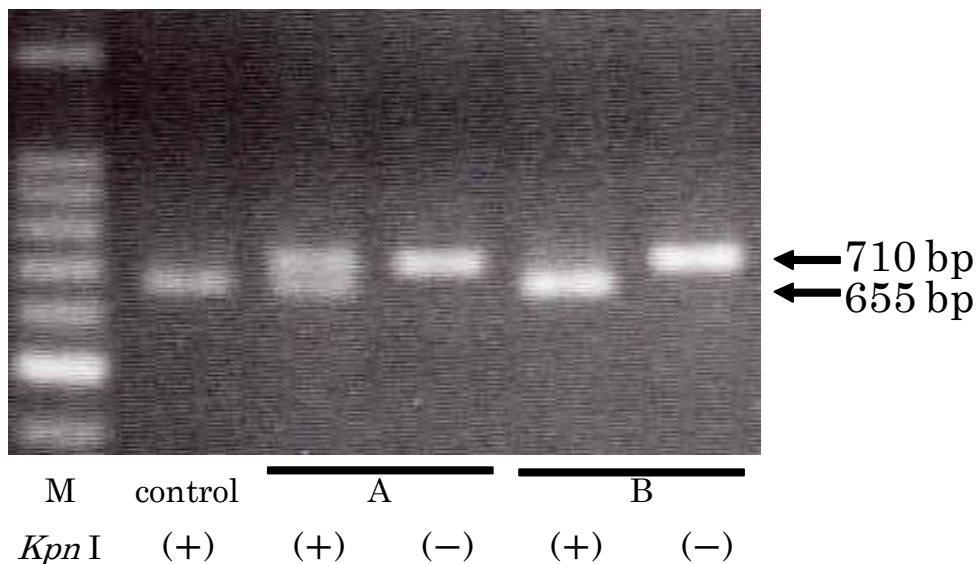
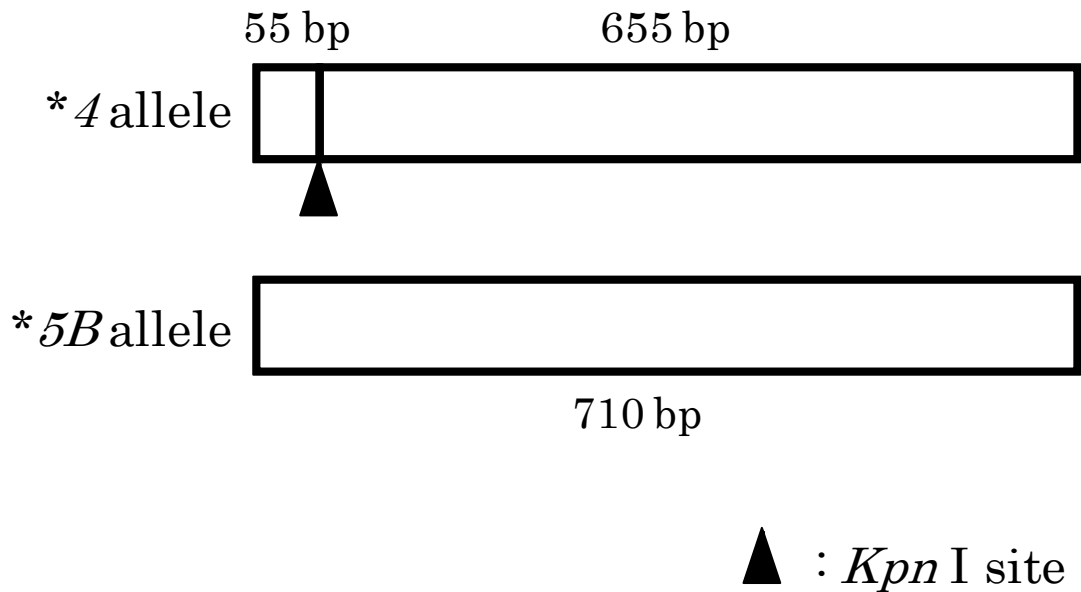


Fig.1-2 The electrophoretic profiles of NAT2 genotypes by PCR-RFLP. Identification of NAT2\*5B by *Kpn* I. The panel shows the amplified PCR fragment that were digested with (+) or without (-) a restriction enzyme. M: DNA size marker (100 bp DNA Ladder), A: wild type allele + mutant type allele, B: wild type allele + wild type allele

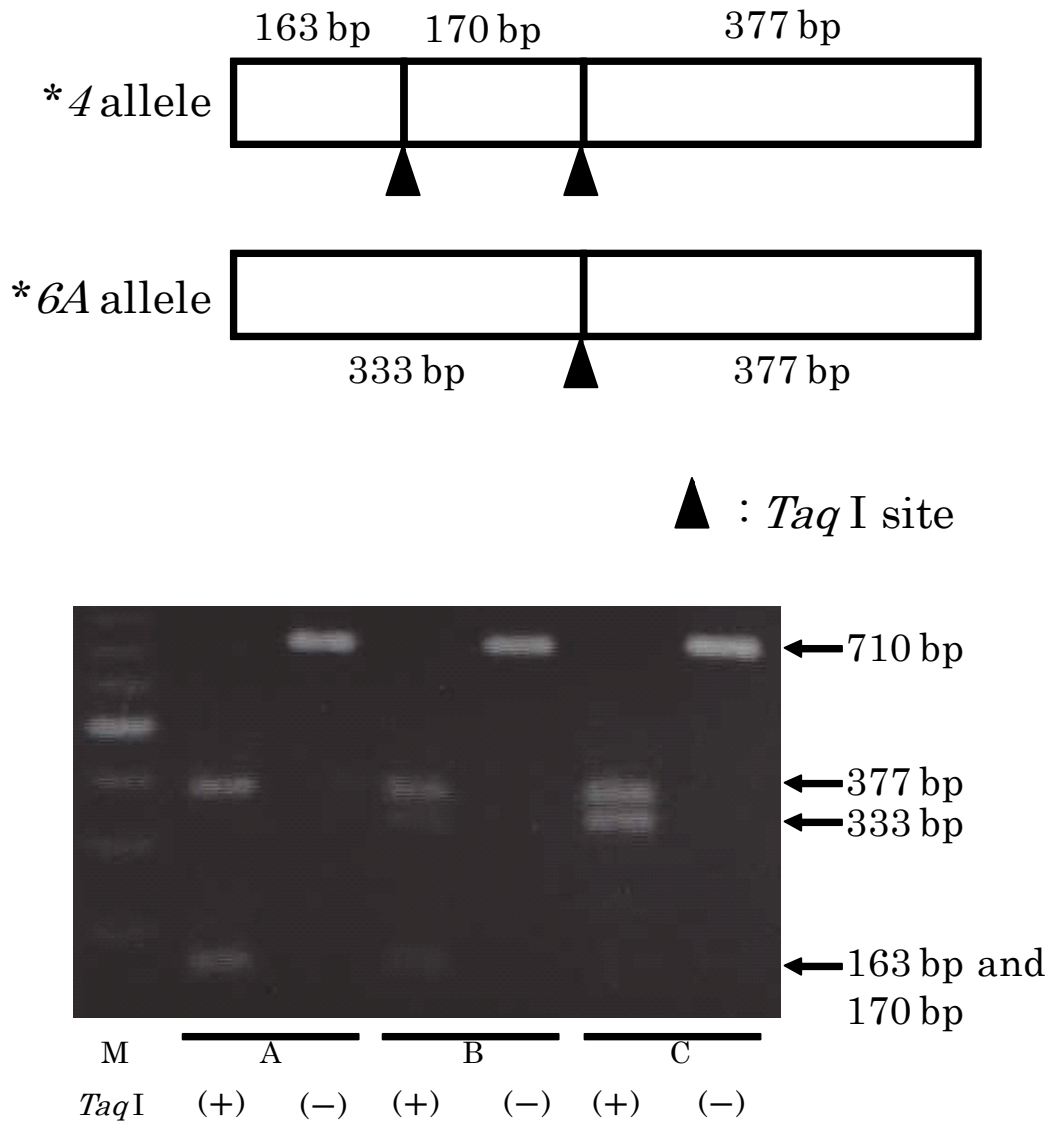


Fig.1-3 The electrophoretic profiles of NAT2 genotypes by PCR-RFLP. Identification of NAT2\*6A by Taq I. The panel shows the amplified PCR fragment that were digested with (+) or without (-) a restriction enzyme. M: DNA size marker (100 bp DNA Ladder), A: wild type allele + wild type allele, B: wild type allele + mutant type allele, C: mutant type allele + mutant type allele

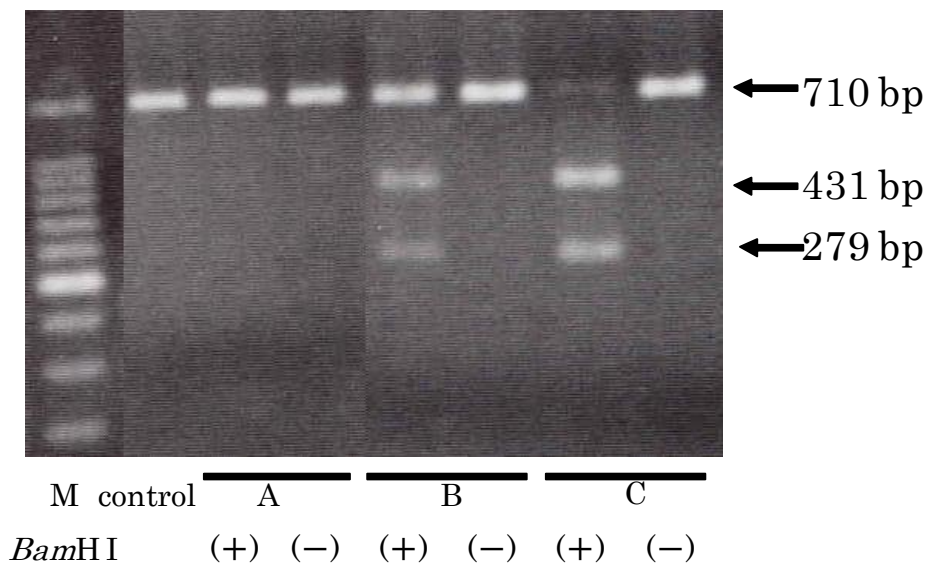
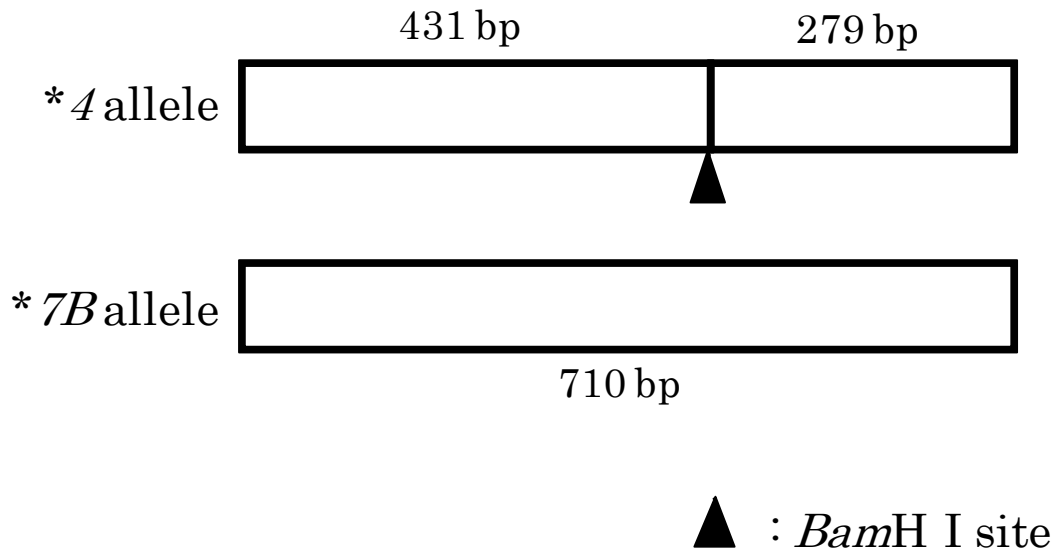


Fig.1-4 The electrophoretic profiles of NAT2 genotypes by PCR-RFLP. Identification of NAT2\*7B by *Bam*HI. The panel shows the amplified PCR fragment that were digested with (+) or without (-) a restriction enzyme. M: DNA size marker (100 bp DNA Ladder), A: mutant type allele + mutant type allele, B: wild type allele + mutant type allele, C: wild type allele + wild type allele

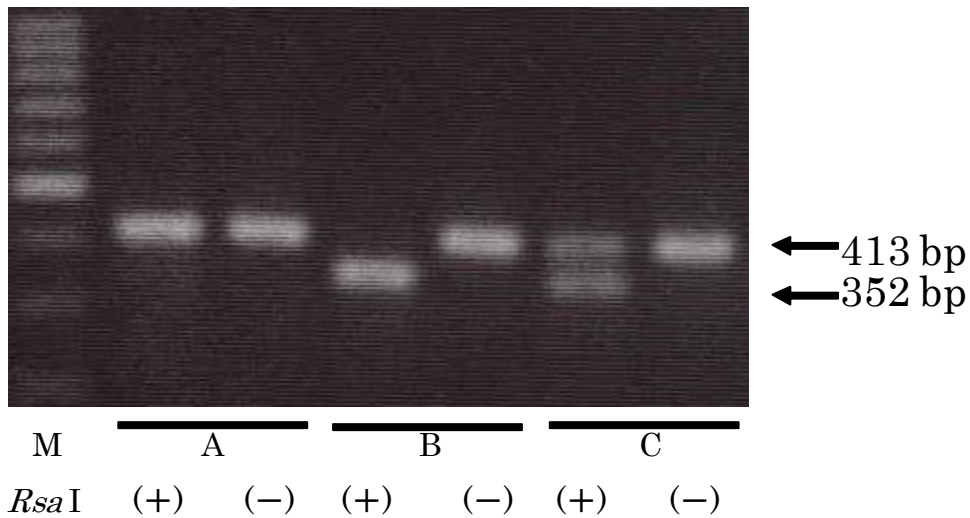
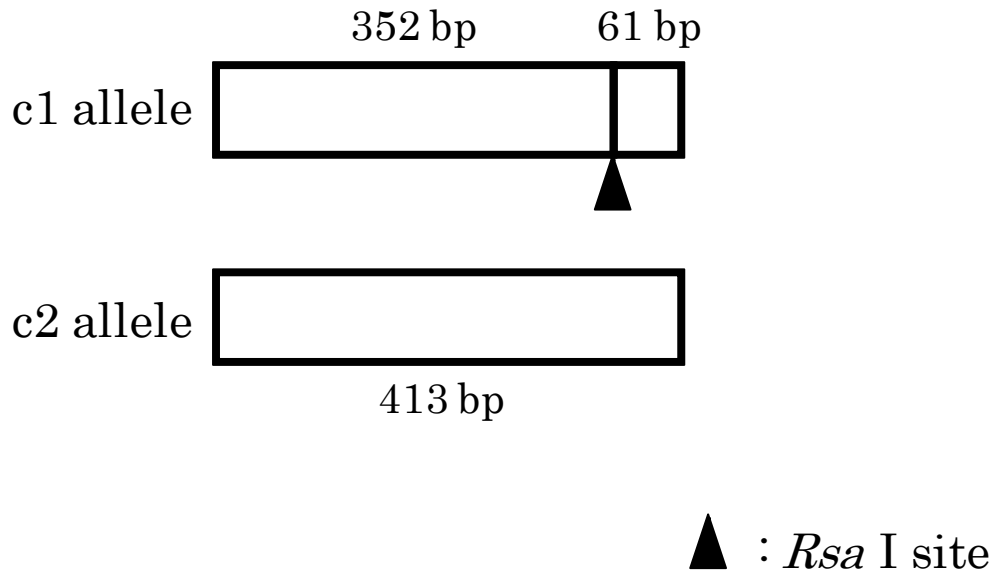
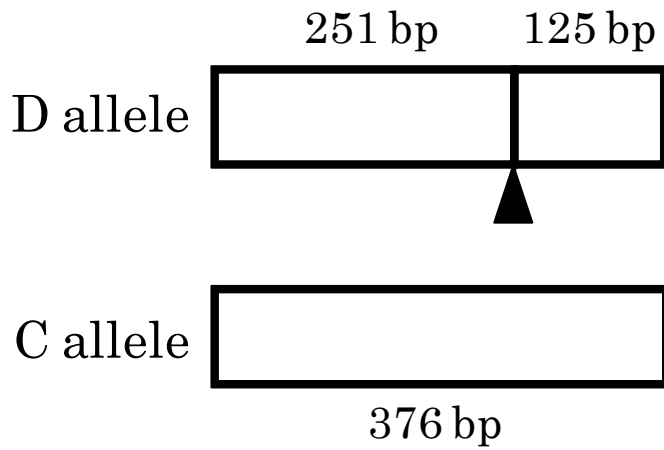


Fig.1-5 The electrophoretic profiles of CYP2E1 genotypes by PCR-RFLP. Identification of c2 by *Rsa* I. The panel shows the amplified PCR fragment that were digested with (+) or without (-) a restriction enzyme. M: DNA size marker (100 bp DNA Ladder), A: mutant type allele + mutant type allele, B: wild type allele + wild type allele, C: wild type allele + mutant type allele



▲ : *Dra* I site

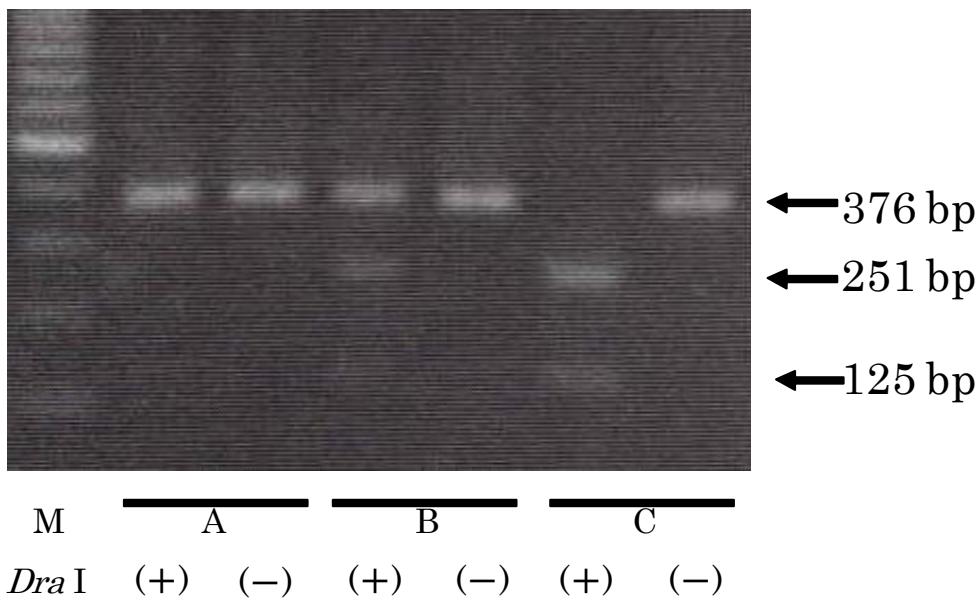


Fig.1-6 The electrophoretic profiles of CYP2E1 genotypes by PCR-RFLP. Identification of C by *Dra* I. The panel shows the amplified PCR fragment that were digested with (+) or without (-) a restriction enzyme. M: DNA size marker (100 bp DNA Ladder), A: mutant type allele + mutant type allele, B: wild type allele + mutant type allele, C: wild type allele + wild type allele

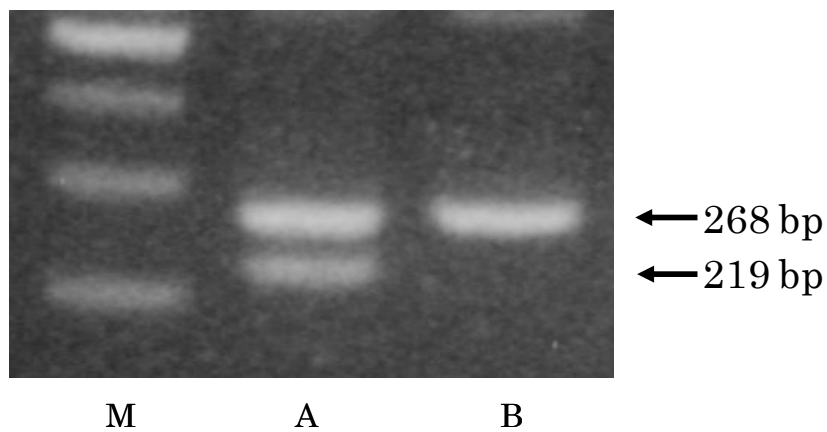
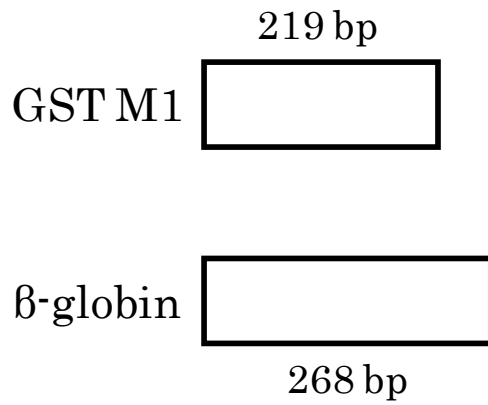


Fig.1-7 The electrophoretic profiles of GST M1 genotypes by PCR. M: DNA size marker (100bp DNA Ladder), A: GST M1 wild, B: GST M1 null, 268 bp: β-globin, 219 bp: GST M1

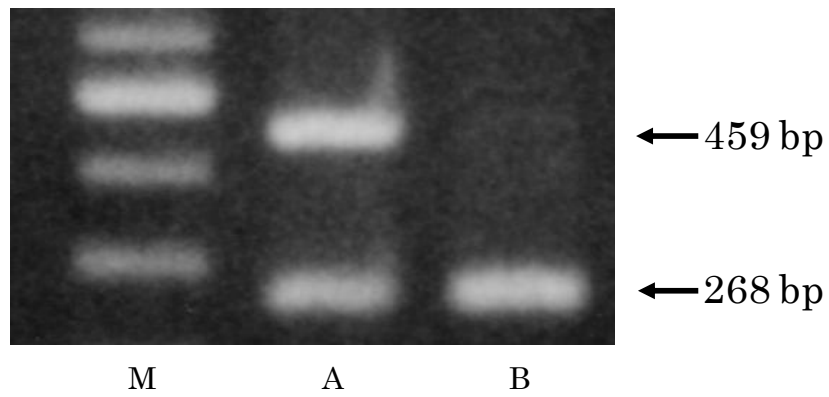
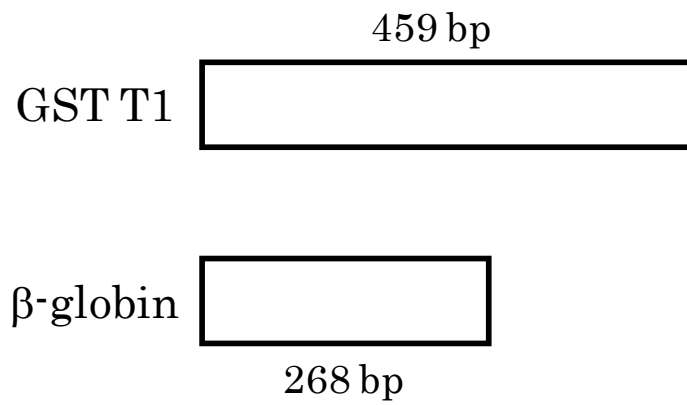


Fig.1-8 The electrophoretic profiles of GST T1 genotypes by PCR. M: DNA size marker (100bp DNA Ladder), A: GSTT1 wild, B: GSTT1 null, 459 bp: GST T1, 219 bp: β-globin

Table 1-1 NAT2 genotype and allele frequencies in 163 patients with tuberculosis.

A: Distribution of the genotypes

Acetylator status	Genotype	n	Frequency (%)
RA	<i>NAT2</i> *4/*4	75	46.0
IA	<i>NAT2</i> *4/*5B	2	1.2
	<i>NAT2</i> *4/*6A	44	27.0
	<i>NAT2</i> *4/*7B	27	16.6
	IA Subtotal	73	44.8
SA	<i>NAT2</i> *5B/*5B	-	0.0
	<i>NAT2</i> *5B/*6A	-	0.0
	<i>NAT2</i> *5B/*7B	-	0.0
	<i>NAT2</i> *6A/*6A	5	3.1
	<i>NAT2</i> *6A/*7B	9	5.5
	<i>NAT2</i> *7B/*7B	1	0.6
	SA Subtotal	15	9.2
	Total	163	100.0

B: Allele frequencies

NAT2 allele	n	Frequency
<i>NAT2</i> *4	223	0.684
<i>NAT2</i> *5B	2	0.006
<i>NAT2</i> *6A	63	0.193
<i>NAT2</i> *7B	38	0.117
Total	326	1.000

Table 1-2 CYP2E1 genotype and allele frequencies in 163 patients with tuberculosis.

A: Distribution of the genotypes

	Genotype	n	Frequency (%)
<i>CYP2E1</i> <i>RsaI</i> digestion	c1/c1	103	63.2
	c1/c2	48	29.4
	c2/c2	12	7.4
	Total	163	100.0
<i>CYP2E1</i> <i>DraI</i> digestion	D/D	78	47.9
	D/C	70	42.9
	C/C	15	9.2
	Total	163	100.0

B: Allele frequencies

	allele	n	Frequency
<i>CYP2E1</i> <i>RsaI</i> digestion	c1	254	0.779
	c2	72	0.221
	Total	326	1.000
<i>CYP2E1</i> <i>DraI</i> digestion	D	226	0.693
	C	100	0.307
	Total	326	1.000

Table 1-3 GST genotype frequencies in 163 patients with tuberculosis.

	Genotype	n	Frequency (%)
GST M1	wild	75	46.0
	null	88	54.0
	Total	163	100.0
GST T1	wild	97	59.5
	null	66	40.5
	Total	163	100.0

## 第2節 INH 及び代謝物血中濃度に対する代謝酵素遺伝子多型の影響の検討

本節では、文書にて同意の得られた対象患者から供与された血液サンプルを用いて、INH、AcINH、Hz 及び AcHz 血中濃度測定を行った。そして前節にて得られた結果を用いて、INH 代謝酵素遺伝子多型と INH 及びその代謝物血中濃度との関連性について検討を行った。

### 1. 方法

#### 【対象患者】

前節で遺伝子多型解析を行った結核患者のうち、INH を含めた標準結核化学療法を受けている 152 名(男性: 120 名、女性: 32 名、平均年齢は 53.0 ± 17.9 歳)を対象とした。

#### 【血中薬物濃度測定】

INH (5 mg/kg) 及び RFP (450 mg) を含む結核標準治療薬を服用 2 時間後(一部の対象者については 2 時間後に加え、1、4、6 及び 8 時間後)に採血を行い、血清を分離した。INH、AcINH、Hz 及び AcHz の測定は Seifart らの方法[59]を参考に行った。HPLC にて検出限界以下の場合は、0 として解析を行った。

#### A) INH

血清 200 µL にトリクロロ酢酸 200 µL を加え、攪拌した。13,000×g で 5 分間遠心し、その上清 100 µL に H<sub>2</sub>O 10 µL、1% trans-cinnamaldehyde メタノール溶液 20 µL を加え 10 分間室温でインキュベートした。この溶液のうち 20 µL を HPLC で解析した。

#### 〈HPLC conditions〉

- System                      NANOSPACE SI-1                      (SHISEIDO)
  - Column                      CAPCELL PAK C18 UG120  
(1.5 mm I.D.×250 mm,5 µm)                      (SHISEIDO)
  - Guard cartridge          CAPCELL MF Ph-1 (4.0×10 mm)          (SHISEIDO)
  - Column temperature      50°C
  - Wave length              340 nm
  - Mobile phase              A:B = 65 : 35
- A; 50 mM phosphate buffer

B; acetonitrile : 2-propanol = 4 : 1

• Flow rate 100  $\mu\text{L}/\text{min}$

#### B) AcINH

血清 200  $\mu\text{L}$  にトリクロロ酢酸 200  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌した。13,000 $\times\text{g}$  で 5 分間遠心し、その上清 100  $\mu\text{L}$  に 6 M HCl 10  $\mu\text{L}$  を加え 80 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。1% trans-cinnamaldehyde メタノール溶液 20  $\mu\text{L}$  を加え 10 分間室温でインキュベートした。この溶液のうち 20  $\mu\text{L}$  を HPLC で解析した。HPLC 条件は A) の INH と同条件で行った。

血中濃度は、検量線及び以下の式より求めた。ただし、 $S_a$  は INH 検量線の傾き、 $S_b$  は加水分解後の INH の検量線の傾き、 $S_c$  は加水分解後の AcINH の傾きを表す。また、 $A_a$  は、同サンプル中の INH のピーク面積、 $A_b$  は加水分解後の INH のピーク面積を表す。1.3065 は、AcINH と INH の分子量の比である。

$$[\text{AcINH}] = [A_b - A_a(S_b/S_a)](1.3065/S_c)$$

#### C) Hz

血清 200  $\mu\text{L}$  に、トリクロロ酢酸 200  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌した。13,000 $\times\text{g}$  で 5 分間遠心し、その上清 100  $\mu\text{L}$  に  $\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{L}$ 、1% trans-cinnamaldehyde メタノール溶液 20  $\mu\text{L}$  を加え 10 分間室温でインキュベートした。この溶液のうち 100  $\mu\text{L}$  を HPLC で解析した。

〈HPLC conditions〉

- System NANOSPACE SI-1 (SHISEIDO)
- Column Discovery® HS PEG (4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (SPELCO)
- Guard cartridge CAPCELL MF Ph-1 (4.0 $\times$ 10 mm) (SHISEIDO)
- Column temperature 50 $^{\circ}\text{C}$
- Wave length 340 nm
- Mobile phase 35% acetonitril in water
- Flow rate 800  $\mu\text{L}/\text{min}$

#### D) AcHz

血清 500  $\mu\text{L}$  に 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  phenacetin 溶液 200  $\mu\text{L}$ 、10%酢酸 100  $\mu\text{L}$  及び n-ヘキサ

ン 5 mL を加えて攪拌後、2000×g で 5 分間し遠心分離し、有機溶媒相を吸引除去した。残った水層に 0.1% salicylaldehyde 300 μL 及び 10%酢酸 400 μL を加えて攪拌後、60°C水浴中で 30 分間振とうした。室温まで冷却した後、1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mL を加えて攪拌し、さらに diethylether 6 mL を加えて攪拌後、2000×g で 5 分間遠心分離した。次に有機溶媒層 5 mL を別のチューブに移し、遠心エバポレーターを用い、40°Cで有機溶媒を蒸発乾固した。これに H<sub>2</sub>O 200 μL を加え十分に攪拌後、20 μL を HPLC で解析した。

〈HPLC conditions〉

- System                               NANOSPACE SI-1                               (SHISEIDO)
- Column                                CAPCELL PAK C18 UG120  
(1.5 mm I.D.×250 mm,5 μm)               (SHISEIDO)
- Guard cartridge    CAPCELL MF Ph-1 (4.0×10 mm)   (SHISEIDO)
- Column temperature               35°C
- Wave length                        280 nm
- Mobile phase                        H<sub>2</sub>O : acetonitril : triethylamine = 750 : 250 : 4  
   (酢酸で pH6.0 に調製)
- Flow rate                            100 μL/min(initial) → 0.13mL/min (2 分後)

【統計処理】

2 群の比較は F-test にて等分散性を確認し、等分散の場合は unpaired t-test にて検定を行い、非等分散の場合は Welch's t-test にて検定を行った。3 群の比較は Bartlett test にて等分散性を確認し、等分散の場合は Tukey-Kramer test にて多重比較を行った。群間に差が認められた場合、Steel-Dwass test にて多重比較を行った。また明らかな外れ値については、Smirnov-Graubbs test を行い、有意な差が認められた値については棄却した。なお、有意水準は危険率 5%とした。

## 2. 結果

### ① INH 及びその代謝物血中濃度に対する NAT2 遺伝子多型の影響

結核患者 152 名について NAT2 の表現型別に INH 及びその代謝物血中濃度を解析した結果、INH 血中濃度の平均値は SA で最も高値を示し、RA では最も低値を示した(Fig.1-9(A))。逆に AcINH 血中濃度の平均値は RA で最も高値を、SA で最も低値を示し(Fig.1-9(B))、共に各表現型間で有意な差が認められた。また Hz 血中

濃度の平均値は SA で最も高値を(Fig.1-9(C))、逆に AcHz 血中濃度の平均値は SA で最も低値を示し(Fig.1-9(D))、共に RA と SA、IA と SA の間でそれぞれ有意な差が認められた。

次に NAT2 表現型別に INH 及びその代謝物血中濃度の比について解析した結果、アセチル化能の指標となる AcINH/INH 比の平均値は RA で最も高値を、SA で最も低値を示し、各表現型間で有意な差が認められた(Fig.1-10(A))。AcHz/Hz 比についても同様の傾向が見られ、各表現型間で有意な差が認められた(Fig.1-10(B))。同様に、Hz/INH 比の平均値は RA で最も高値を、SA で最も低値を示し、RA と IA、RA と SA の間でそれぞれ有意な差が認められた(Fig.1-10(C))。またアセチル化経路に対する加水分解経路の割合を示す Hz/AcINH 比の平均値は SA で最も高値を、RA で最も低値を示し、各表現型間で有意な差が認められた(Fig.1-10(D))。

### ② INH 及び Hz 血中濃度に対する CYP2E1 遺伝子多型の影響

INH 及び Hz 血中濃度に対する NAT2 遺伝子多型の影響を除くため、NAT2 表現型ごとに CYP2E1 の遺伝子型で再分類して解析を行った。その結果、CYP2E1 の RsaI 処理については、IA において c1/c1 及び c1/c2 に比べ c2/c2 で INH 血中濃度が有意に高くなり、また Hz 血中濃度も有意差は認められないものの同様の傾向が見られた(Fig.1-11(A)、Fig.1-12(A))。CYP2E1 の DraI 処理については、NAT2 IA において D/C に比べ D/D 及び C/C で INH 及び Hz 血中濃度が高値を示した(Fig.1-11(B)、Fig.1-12(B))。

### ③ INH 及び Hz 血中濃度に対する GST 遺伝子多型の影響

②の CYP2E1 遺伝子多型同様、INH 及び Hz 血中濃度に対する NAT2 遺伝子多型の影響を除くため、NAT2 表現型ごとに GST M1 及び T1 の表現型で再分類して解析を行った。その結果、GST M1 については、IA において INH 及び Hz 血中濃度が wild に比べ null で有意に高くなり、SA においても有意差は認められないものの Hz 血中濃度について同様の傾向が見られた(Fig.1-13(A)、Fig.1-14(A))。GST T1 については、wild と null 間で特筆すべき差は見られなかった (Fig. 1-13(B)、Fig.1-14(B))。

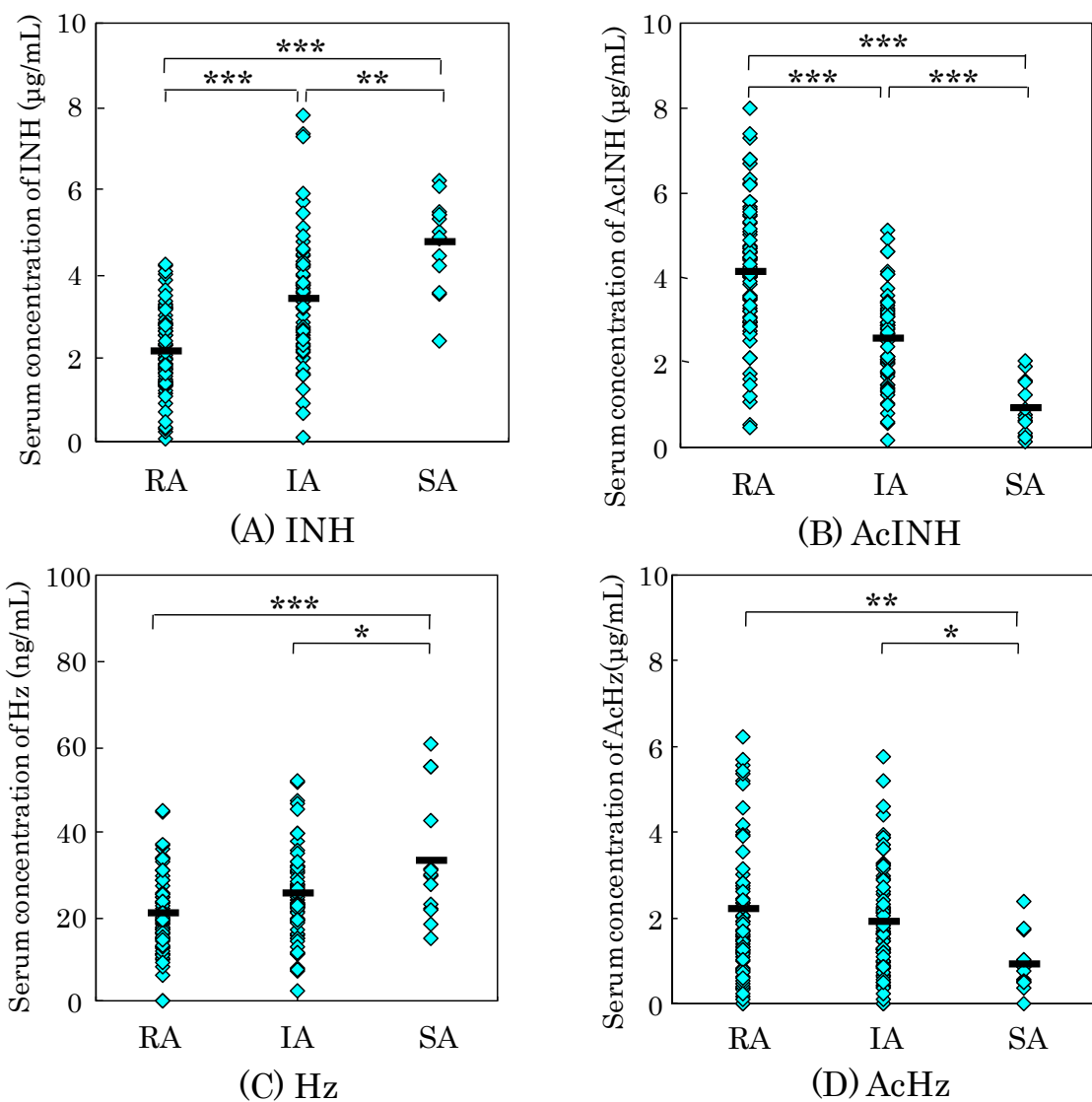


Fig.1-9 Serum concentration of INH (a), Hz (b), AcINH (c) and AcHz (d) 2 hr after administration in tuberculous patients. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*:  $p < 0.05$  Dots show individual values, short bars show mean values.

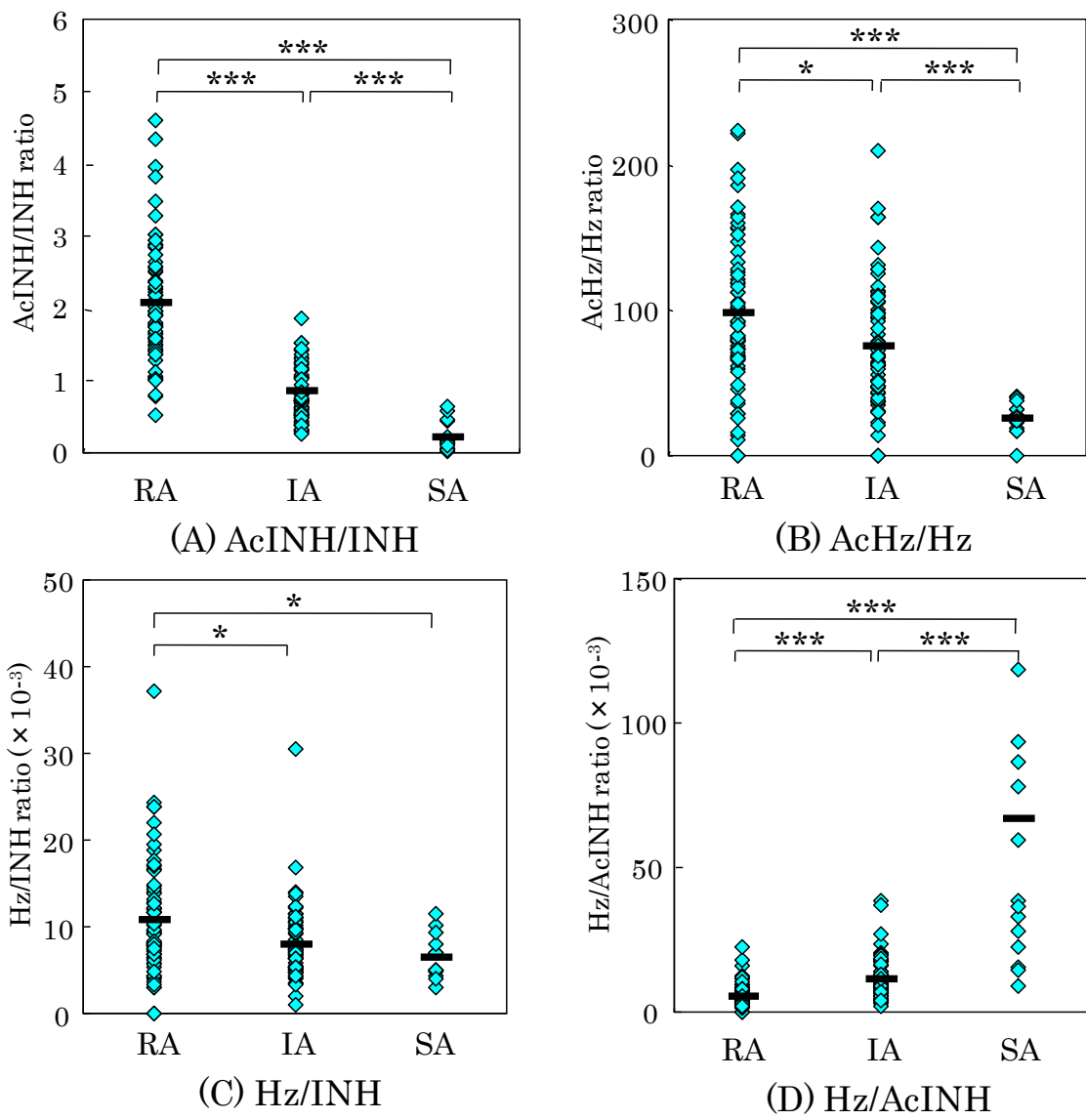
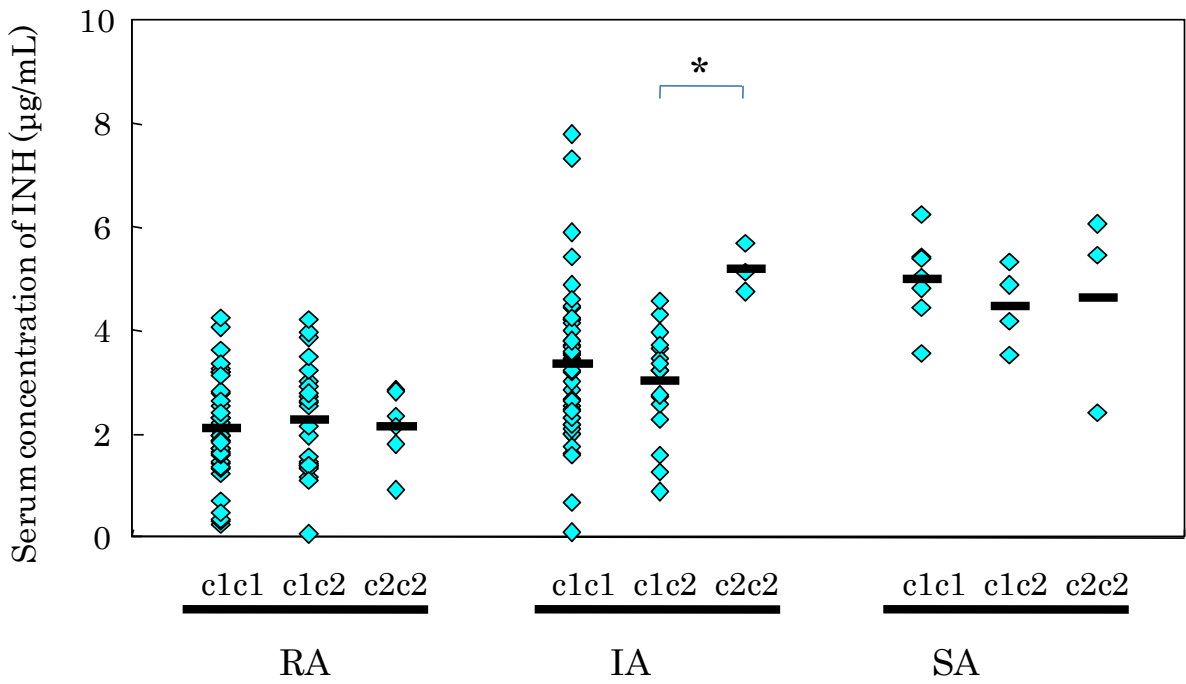
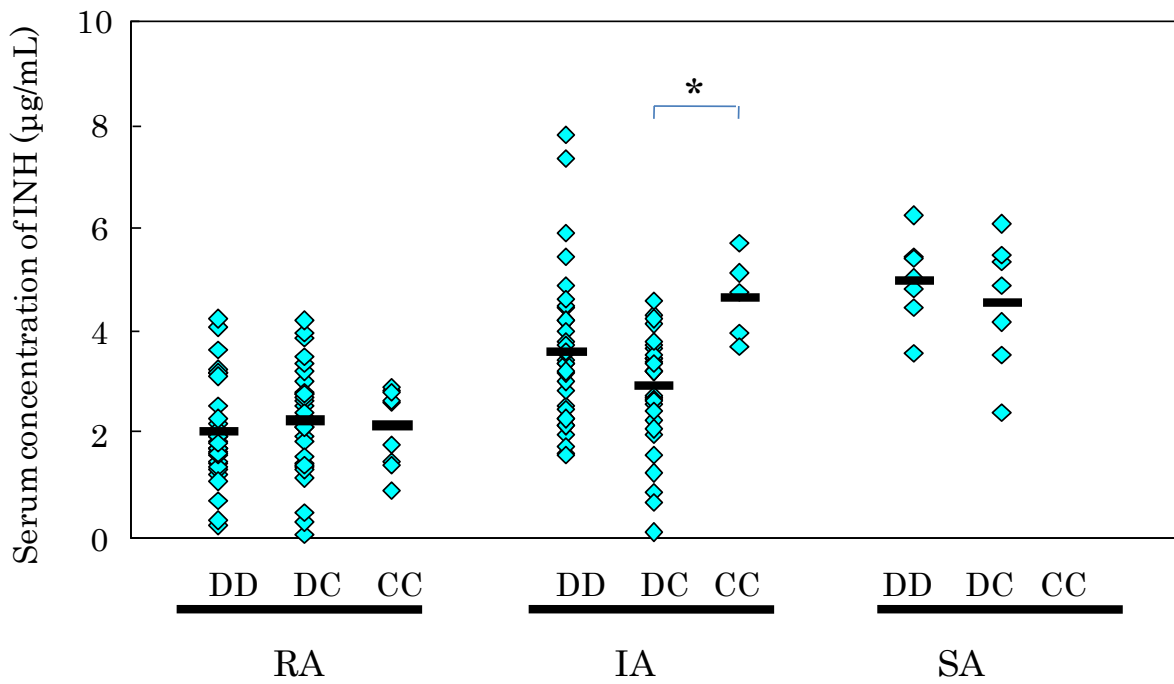


Fig.1-10 AcINH/INH (a), AcHz/Hz (b), Hz/INH (c) and Hz/AcINH ratio (d) 2 hr after administration in tuberculous patients. \*\*\*:  $p < 0.001$  and \*:  $p < 0.05$ . Dots show individual values, short bars show mean values.



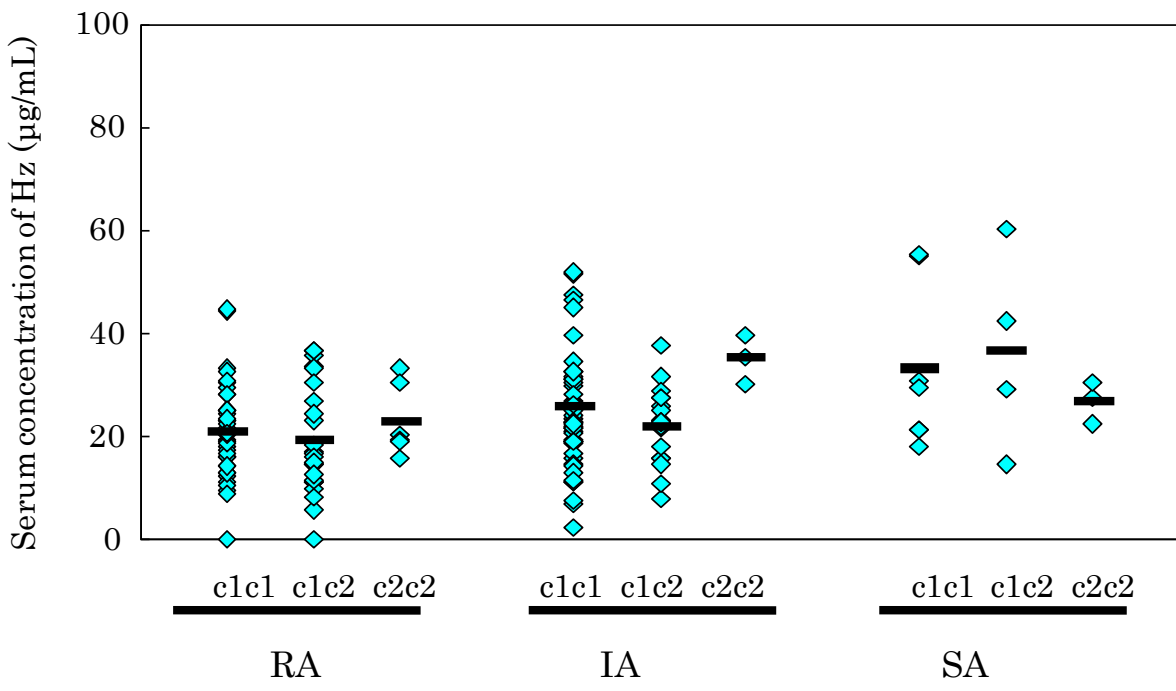
(A) *CYP2E1 RsaI* detection



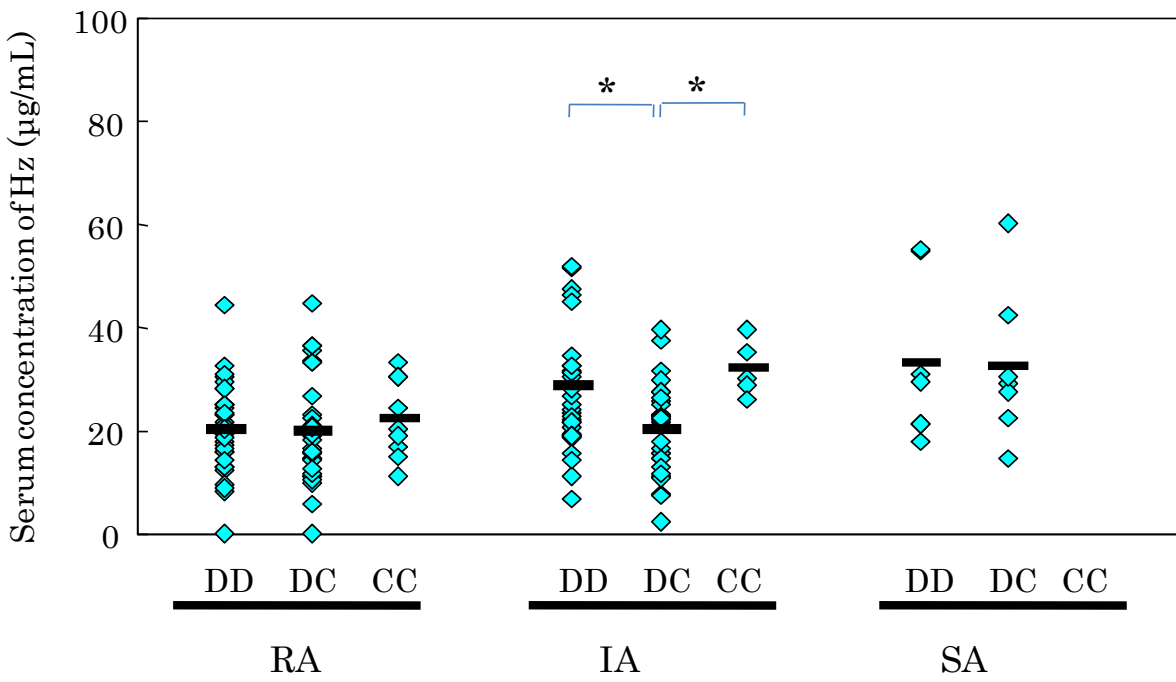
(B) *CYP2E1 DraI* detection

Fig.1-11 Serum concentration of INH 2 hr after administration in tuberculous patients. \*: p<0.05

Dots show individual values, short bars show mean values.



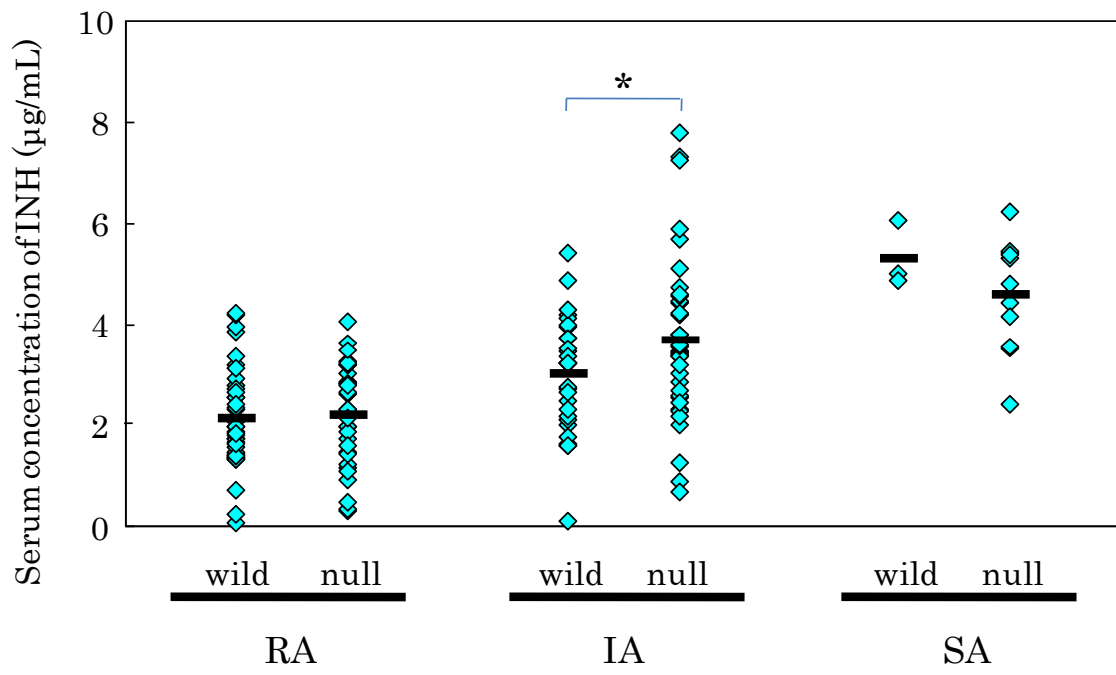
(A) *CYP2E1 RsaI* detection



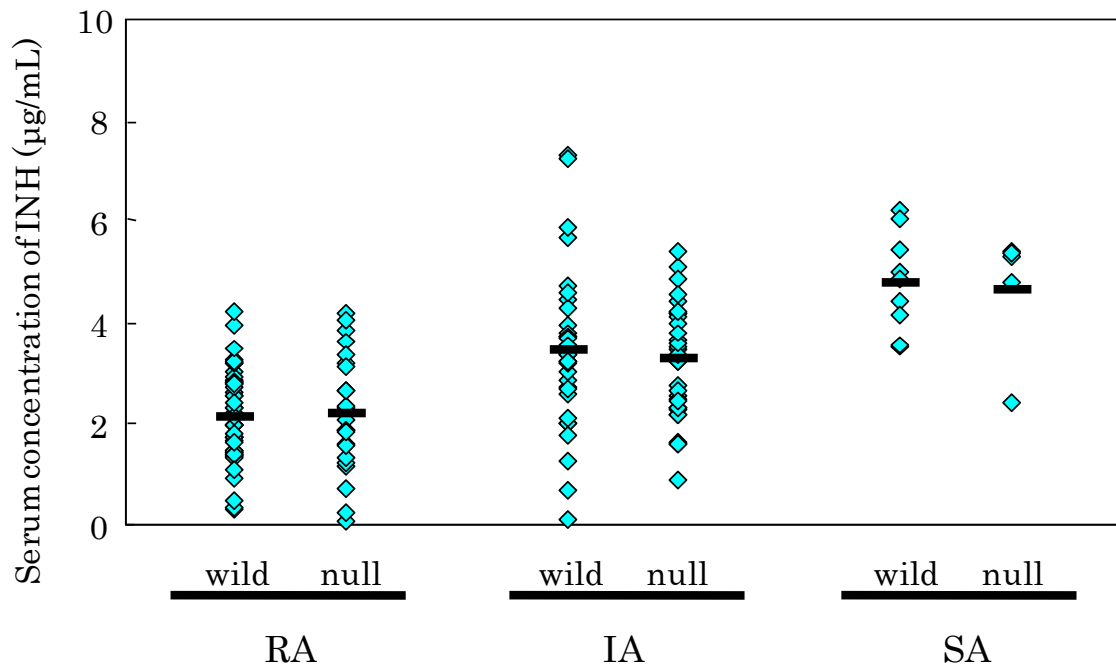
(B) *CYP2E1 DraI* detection

Fig.1-12 Serum concentration of Hz 2 hr after administration in tuberculous patients. \*:  $p < 0.05$

Dots show individual values, short bars show mean values.



(A) GST M1



(B) GST T1

Fig.1-13 Serum concentration of INH 2 hr after administration in tuberculous patients. \*:  $p < 0.05$

Dots show individual values, short bars show mean values.

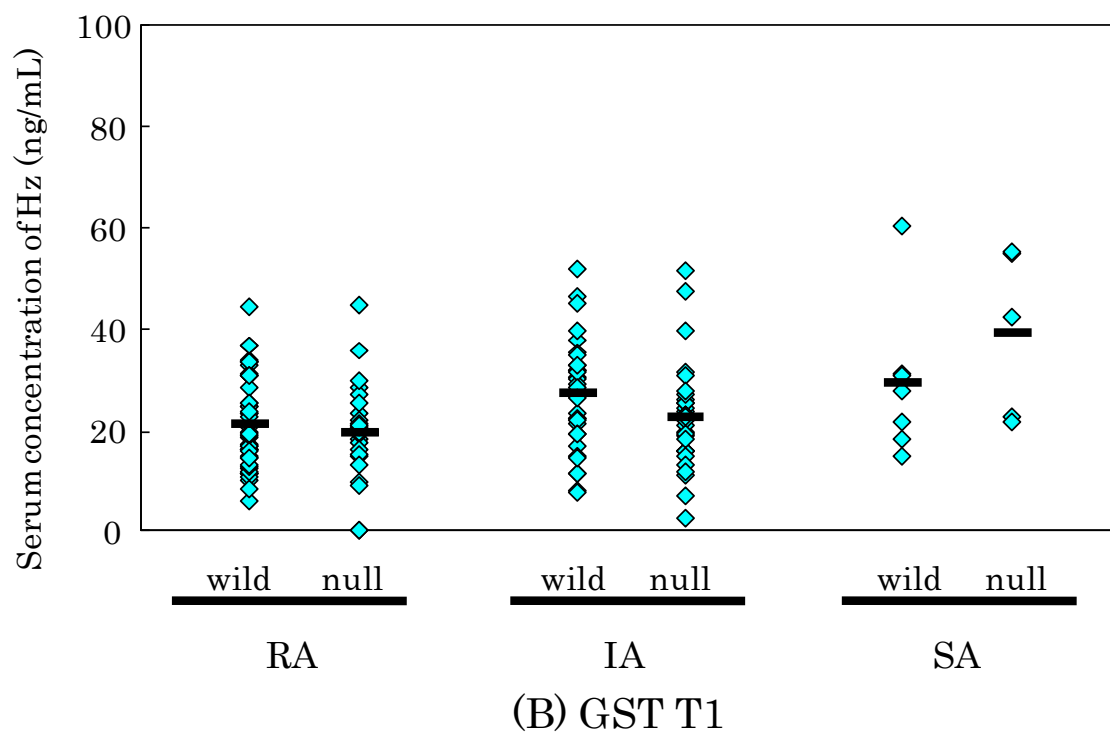
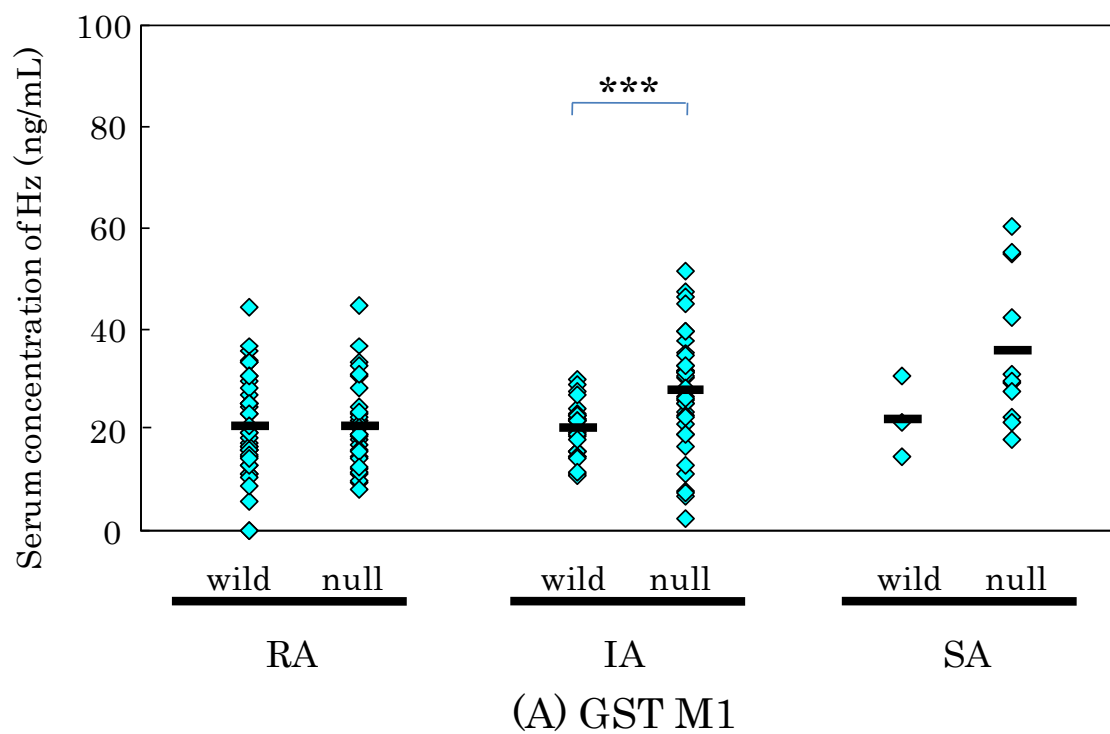


Fig.1-14 Serum concentration of Hz 2 hr after administration in tuberculous patients. \*\*\*:  $p < 0.001$

Dots show individual values, short bars show mean values.

### 第3節 肝機能障害発現頻度に対する代謝酵素遺伝子多型の影響の検討

結核治療において臨床上問題となる肝機能障害の発現頻度に対する代謝酵素遺伝子多型及びその他患者要因の影響を検討した。

#### 1. 方法

##### 【対象患者】

国立病院機構千葉東病院にて入院治療した活動性肺結核患者のうち、標準結核化学療法(前半2ヶ月:INH、RFP及びPZAに加えEBまたはSM)、後半4ヶ月:INH及びRFPに加えEBまたはSM)を受け治療経過が3ヶ月以上追跡可能であった144名の患者を対象とした。

##### 【検討要因】

代謝酵素遺伝子多型(NAT2、CYP2E1、GST M1・T1)、年齢、性別、RFP併用の有無、アルコール多量摂取(1日あたり日本酒換算3合以上)の有無及びBまたはC型肝炎ウイルス(HBV or HCV)感染の有無

##### 【肝機能障害発現頻度に影響を及ぼす要因の検討】

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 及びアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の正常値上限はそれぞれ 33U/l 及び 42U/l であり、AST 及び ALT のいずれかが正常値上限から正常値上限の2倍以内に上昇したものをA、正常値上限の2倍を超え3倍以内に上昇したものをB、正常値上限の3倍を超え4倍以内に上昇したものをC、正常値上限の4倍を超えて上昇したものをDと分類した。C及びDを中程度肝機能障害あり、A及びBを軽度肝機能障害ありと定義し、上記要因の肝機能障害発現頻度を与える影響を検討した。

##### 【統計処理】

肝機能障害の各基準における割合の比較は、 $\chi^2$ -testにて検定を行った。なお統計解析にはSAS version 8.1 (SAS Institute Japan Inc.)を用い、有意水準は危険率5%とした。

#### 2. 結果

Table 1-4 に患者情報を示した。対象患者 144 例のうち、男性は 116 例 (80.6%)、

女性は 28 例 (19.4%) で、本邦における結核患者の性別統計 (男性 62.1%、女性 37.9%) と大きな差はなかった。平均年齢は  $52.1 \pm 18.0$  歳、平均体重は  $55.0 \pm 10.6$  kg であった。体重当たりの抗結核薬投与量は、INH で  $4.83 \pm 0.62$  mg/kg、RFP で  $8.59 \pm 1.46$  mg/kg、PZA で  $22.25 \pm 4.06$  mg/kg であり、標準投与量 (INH 5mg/kg, RFP 10mg/kg, PZA 25mg/kg) に比べて若干低かった (Table 1-4)。方法に記したように、肝機能障害の程度を 4 群に分け、A+B 群を軽度肝機能障害群、C+D 群を中程度肝機能障害群とした。患者全体における軽度肝機能障害群 (A+B) 及び中程度肝機能障害群 (C+D) の割合はそれぞれ 18.8% 及び 13.9% であった (data not shown)。なお、C 群までは治療中抗結核薬の中止はなく治療継続中に AST、ALT は低下し、D 群では全例抗結核薬が中止されていた。

NAT2 遺伝子多型と CYP2E1 及び GST の遺伝子多型の関連を検討するため、NAT2 遺伝子多型別の CYP2E1、GSTM1 及び GSTT1 遺伝子多型の頻度を Table 1-5 に示した。NAT2 遺伝子多型別にみると、CYP2E1 の RsaI 処理では IA で c1/c1 の頻度が RA 及び SA と比較し高率であったが、有意差は認められなかった。CYP2E1 の DraI 処理では、SA で他群と比較し D/D の頻度が高率で、さらに C/C が認められなかったが、有意差はなかった。GSTM1 では、M1null の頻度は RA で最も低く、SA で最も高かったが有意差は認められなかった。T1null の頻度も各群で有意差を認めなかった。

NAT2 遺伝子多型別肝障害の頻度を Table 1-6 に示した。NAT2 遺伝子多型別解析において、経過中何らかの肝機能障害が生じた症例は、RA で 65 例中 21 例 (32.3%)、IA で 66 例中 23 例 (34.8%)、SA で 13 例中 8 例 (61.5%) と、SA が最も高率であった。しかし、中程度肝機能障害群を検討した場合、RA では 10 例 (15.4%)、IA では 7 例 (10.6%)、SA では 2 例 (15.4%) で、各群に有意差を認めず、特に抗結核薬を中止した D 群は RA で 6 例 (9.2%)、IA で 8 例 (12.1%)、SA で 1 例 (7.7%) であった (Table 1-6)。

中程度肝機能障害群、軽度肝機能障害群及び肝機能障害なし群における患者背景、抗結核薬の投与量、抗結核薬服用 2 時間後の INH 及び INH 代謝産物の血中濃度を Table 1-7 に示した。中程度肝機能障害群、軽度肝機能障害群及び肝機能障害なし群に分けて集計を行ったところ、各群の年齢、体重、INH、RFP、PZA の体重当たり投与量に有意差は認められなかった。RA、IA 及び SA の比率は中程度肝機能障害群でそれぞれ 50.0%、40.0% 及び 10.0%、軽度肝機能障害群でそれぞれ 34.4%、46.9% 及び 18.8%、肝機能障害なし群でそれぞれ 47.8%、46.7% 及び 5.4% であり、中程度肝機能障害群及び軽度肝機能障害群は肝機能障害なし群と比較し、SA の頻

度が高率であった。また INH、AcINH、Hz 及び AcHz 血中濃度に 3 群間で有意差は認められなかった (Table 1-7)。

肝機能障害別の CYP2E1、GSTM1 及び GSTT1 遺伝子多型の頻度を Table 1-8 に示した。肝機能障害別の CYP2E1 遺伝子多型及び GSTM1、GSTT1 表現型における頻度について、明らかな傾向 (関連性) は認められなかった (Table 1-8)。

代謝酵素遺伝子多型、年齢 (65 歳未満及び 65 歳以上)、性別、RFP 併用の有無、アルコール多量摂取の有無、HBV 及び HCV 感染の有無においてそれぞれの肝機能障害の患者がどのくらいの割合を占めるかを Fig.1-15~ Fig.1-24 に示した。NAT2 遺伝子多型については、Table 1-6 にも示した通り、SA で何らかの肝機能障害が発現した患者の割合が最も高値を示した。年齢別解析では、特に中程度肝機能障害発現患者について、高齢群 (65 歳以上) で肝機能障害発現頻度が上昇する傾向が認められた (Fig.1-20)。また、その他の要因の肝機能障害発現頻度に対する影響については、性別において女性に比べ男性で高く (Fig.1-21)、HBV or HCV において非感染群に比べ感染群で高くなる傾向が認められた (Fig.1-24)。その他の要因については明確な傾向は認められなかった。

Table 1-4 Characteristics of tuberculous patients.

	Tuberculous patients (n=144)
Sex (male/ female)	116/ 28
Age (years)*	52.1 ± 18.0
Height (meters)*	1.65 ± 0.08
Body weight (kg)*	55.0 ± 10.6
Heavy alcoholism (+/-)**	29/ 115
Hepatitis virus B or C infection (+/-)	12/ 132
INH dosage (mg/kg/day)*	4.83 ± 0.62
RFP dosage (mg/kg/day)*	8.59 ± 1.46
PZA dosage (mg/kg/day)*	22.25 ± 4.06
NAT2 (RA/ IA/ SA)	65/ 66/ 13
CYP2E1 RsaI detection (c1c1/ c1c2/ c2c2)	89/ 43/ 12
CYP2E1 DraI detection (DD/ DC/ CC)	68/ 62/ 14
GSTM1 (wild/ null)	67/ 77
GSTT1 (wild/ null)	88/ 56

\* Data are expressed as the mean±standard deviation.

\*\* Heavy alcoholism means above 540 mL in terms of rice wine.

Table 1-5 Prevalence of CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms according to NAT2 phenotype group.

Gene	Genotype	NAT2 phenotype			Total
		RA	IA	SA	
		65	66	13	144
CYP2E1 (RsaI detection)	c1/c1	37 (56.9%)	45 (68.2%)	7 (53.8%)	89 (61.8%)
	c1/c2	22 (33.8%)	17 (25.8%)	4 (30.8%)	43 (29.9%)
	c2/c2	6 (9.2%)	4 (6.1%)	2 (15.4%)	12 (8.3%)
CYP2E1 (DraI detection)	D/D	30 (46.2%)	31 (47.0%)	7 (53.8%)	68 (47.2%)
	D/C	26 (40.0%)	30 (45.5%)	6 (46.2%)	62 (43.1%)
	C/C	9 (13.8%)	5 (7.6%)	0 (0%)	14 (9.7%)
GSTM1	Wild-type	36 (55.4%)	28 (42.4%)	3 (23.1%)	67 (46.5%)
	Null	29 (44.6%)	38 (57.6%)	10 (76.9%)	77 (53.5%)
GSTT1	Wild-type	45 (69.2%)	34 (51.5%)	9 (69.2%)	88 (61.1%)
	Null	20 (30.8%)	32 (48.5%)	4 (30.8%)	56 (38.9%)

The percentage of genotypes for the corresponding genes in each NAT2 phenotype group is shown in brackets.

Table 1-6 Prevalence of hepatotoxicity by NAT2 phenotype group.

	NAT2 phenotype			Total
	RA	IA	SA	
	65	66	13	
Hepatotoxicity A	9	10	5	24
Hepatotoxicity B	2	5	1	8
Hepatotoxicity C	4	0	1	5
Hepatotoxicity D	6	8	1	15
Total	21 (32.3%)	23 (34.8%)	8 (61.5%)	52 (36.1%)
A+B	11 (16.9%)	14 (21.2%)	6 (46.2%)	32 (22.2%)
C+D	10 (15.4%)	7 (10.6%)	2 (15.4%)	21 (14.6%)

The percentage of hepatotoxicity with different levels of severity by NAT2 phenotype group is shown in brackets.

Table 1-7 Comparison of patient characteristics among the three hepatotoxicity groups.

Characteristic	Hepatotoxicity					
	A+B (mean±sd)	Number of patients	C+D (mean±sd)	Number of patients	None (mean±sd)	Number of patients
Male:female	30:2	32	18:2	20	68:24	92
Age (years)	51.8 ± 17.5	32	59.9 ± 20.2	20	50.4 ± 17.3	92
NAT2 (RA:IA:SA)	11:15:6	32	10:8:2	20	44:43:5	92
Body weight (kg)	57.1 ± 12.0	32	56.2 ± 10.2	20	53.9 ± 10.1	92
INH dose (g/body/day)	0.27 ± 0.04	32	0.26 ± 0.05	20	0.26 ± 0.04	92
RFP dose (g/body/day)	0.48 ± 0.07	32	0.48 ± 0.06	18	0.45 ± 0.07	91
PZA dose (g/body/day)	1.26 ± 0.19	30	1.23 ± 0.20	16	1.19 ± 0.17	87
INH dose (mg/kg/day)	4.78 ± 0.64	32	4.65 ± 0.48	20	4.88 ± 0.63	92
RFP dose (mg/kg/day)	8.63 ± 1.4	32	8.45 ± 1.27	18	8.61 ± 1.52	91
PZA dose (mg/kg/day)	22.28 ± 3.29	30	22.2 ± 4.79	16	22.51 ± 3.46	87
INH concentration (µg/ml)	3.24 ± 1.31	32	3.02 ± 1.39	20	2.91 ± 1.50	92
AcINH concentration (µg/ml)	2.75 ± 1.61	32	3.61 ± 2.35	20	3.11 ± 3.72	92
Hz concentration (µg/ml)	25.23 ± 11.13	32	22.58 ± 12.31	20	22.49 ± 11.21	92
AcHz concentration (µg/ml)	2.01 ± 1.41	32	1.65 ± 1.48	20	2.02 ± 1.43	92

Table 1-8 Prevalence of CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphism by hepatotoxicity group.

Gene	Genotype	Hepatotoxicity		
		None	A+B	C+D
		92	32	20
<i>CYP2E1</i> ( <i>RsaI</i> detection)	c1/c1	60 (65.2%)	18 (56.3%)	11 (55%)
	c1/c2	23 (25%)	13 (40.6%)	7 (35%)
	c2/c2	9 (9.8%)	1 (3.1%)	2 (10%)
<i>CYP2E1</i> ( <i>DraI</i> detection)	D/D	45 (48.9%)	14 (43.8%)	9 (45%)
	D/C	37 (40.2%)	15 (46.9%)	10 (50%)
	C/C	10 (10.9%)	3 (9.4%)	1 (5%)
<i>GSTM1</i>	Wild-type	42 (45.7%)	7 (21.9%)	8 (40%)
	Null	50 (54.3%)	25 (78.1%)	12 (60%)
<i>GSTT1</i>	Wild-type	52 (56.5%)	23 (71.9%)	13 (65%)
	Null	40 (43.5%)	9 (28.1%)	7 (35%)

The percentage of each genotype of INH-metabolizing enzymes according to hepatotoxicity group is shown in brackets.

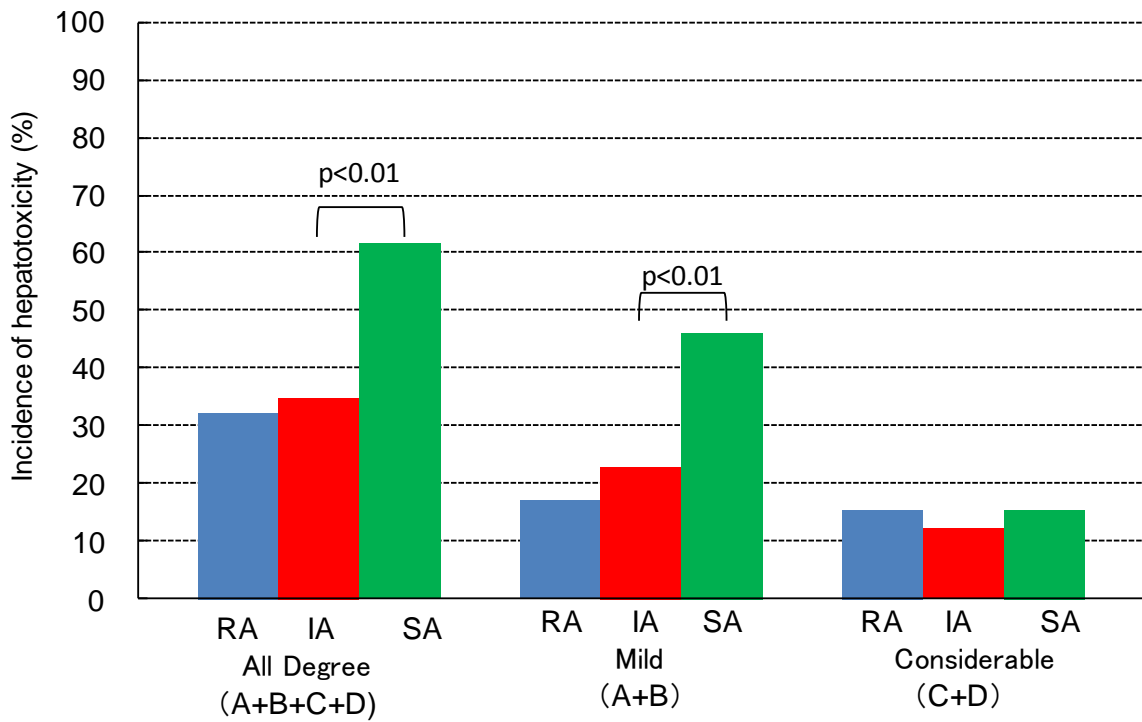


Fig.1-15 The relation between NAT2 phenotype and the incidence of hepatotoxicity. RA: n=65, IA: n=66 and SA: n=13

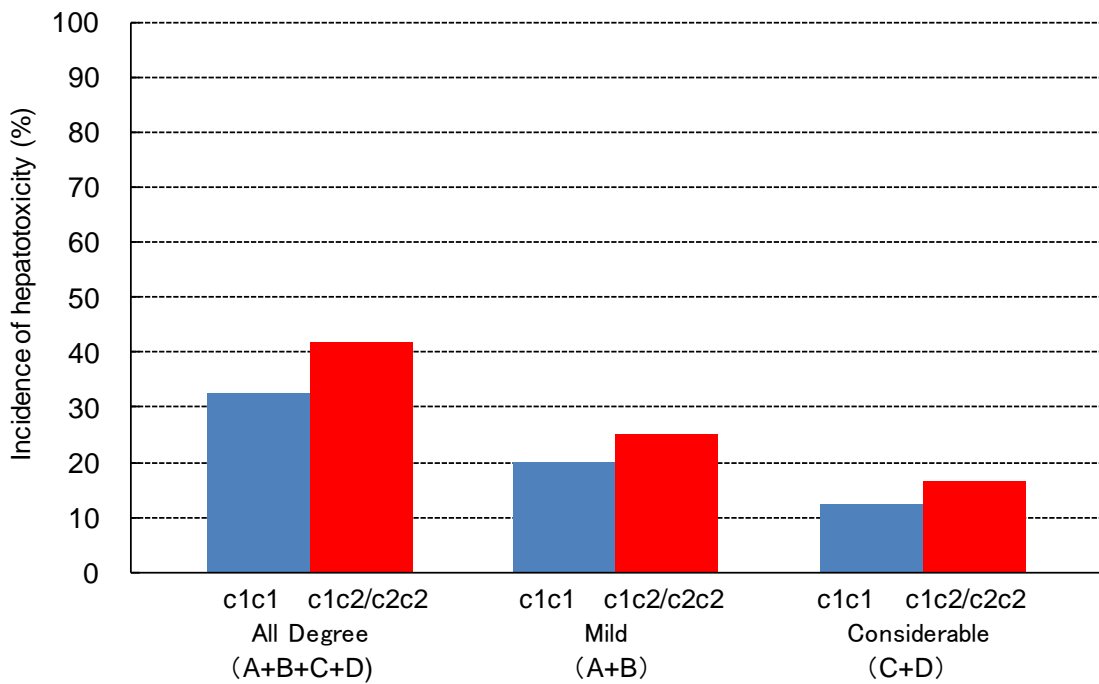


Fig.1-16 The relation between CYP2E1 (c1c1/c1c2 and c2c2) and the incidence of hepatotoxicity. c1c1: n=89, c1c2 and c2c2: n=55

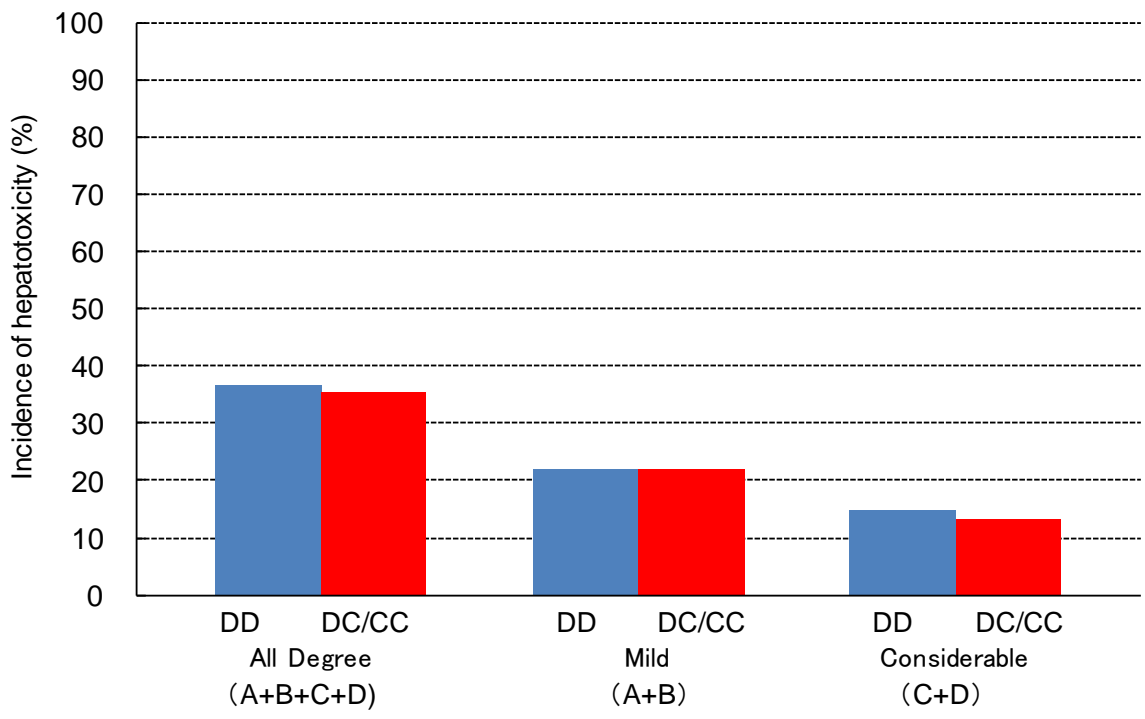


Fig.1-17 The relation between CYP2E1 (DD/DC and CC) and the incidence of hepatotoxicity. DD: n=68, DC and CC: n=76

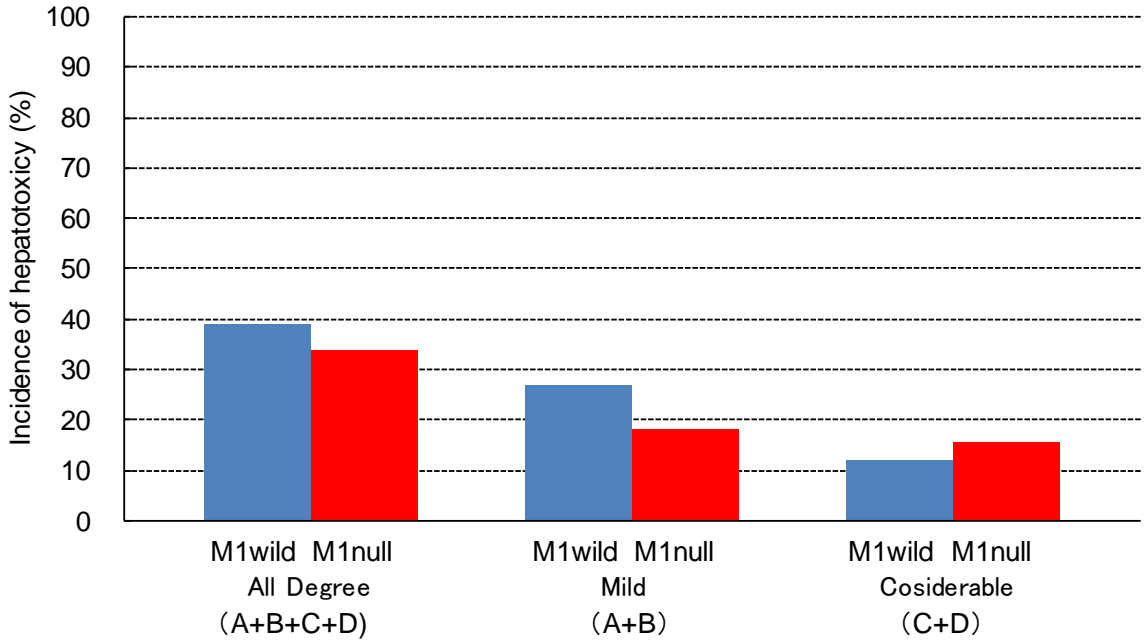


Fig.1-18 The relation between GSTM1 (wild/null) and the incidence of hepatotoxicity. M1 wild: n=67, M1 null: n=77

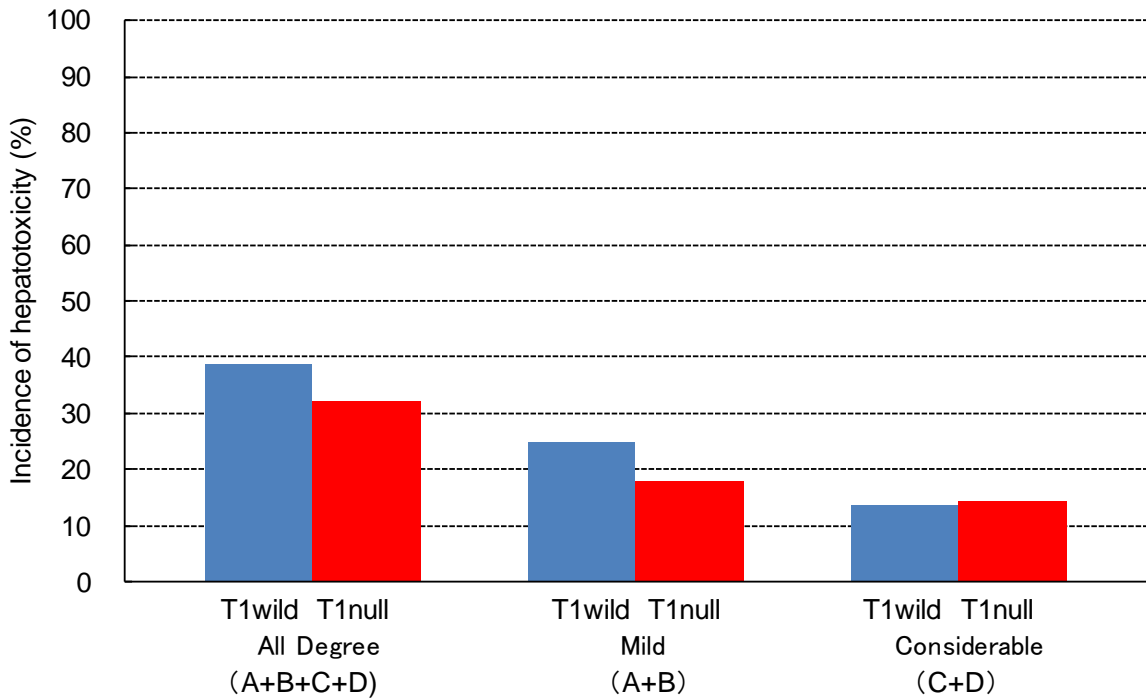


Fig.1-19 The relation between GSTT1 (wild/null) and the incidence of hepatotoxicity. T1 wild: n=88, T1 null: n=56

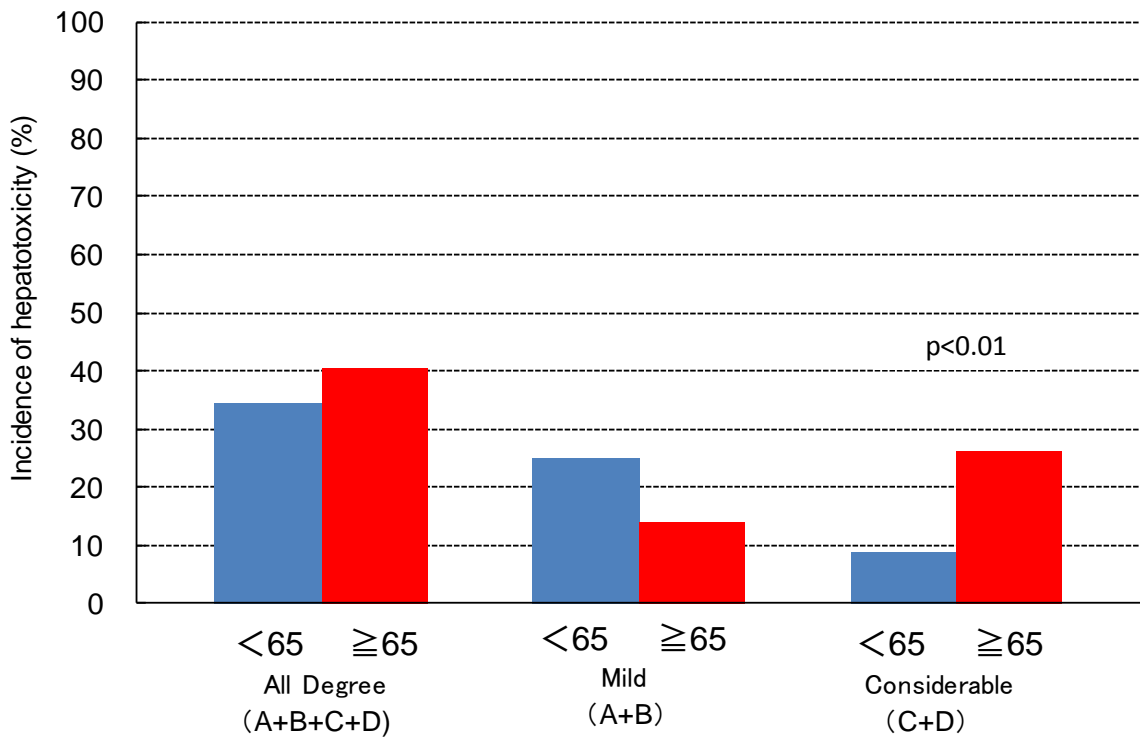


Fig.1-20 The relation between age (< 65/ ≥ 65) and the incidence of hepatotoxicity. < 65: n=102, ≥ 65: n=42

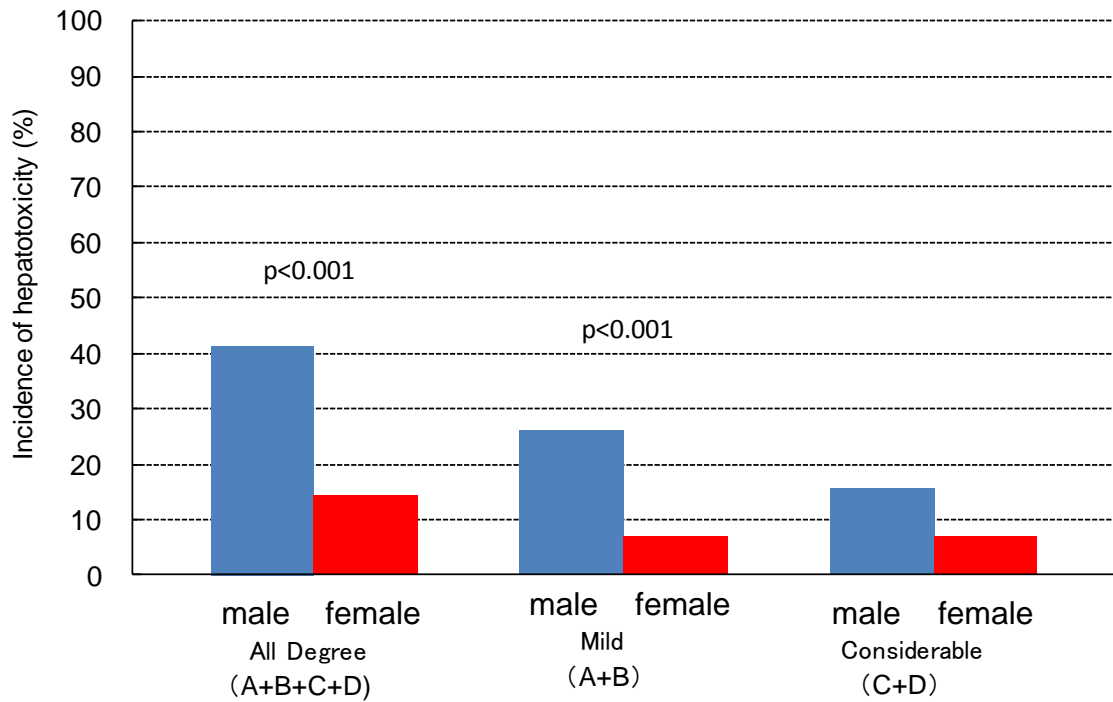


Fig.1-21 The relation between gender (male/female) and the incidence of hepatotoxicity. male: n=116, female: n=28

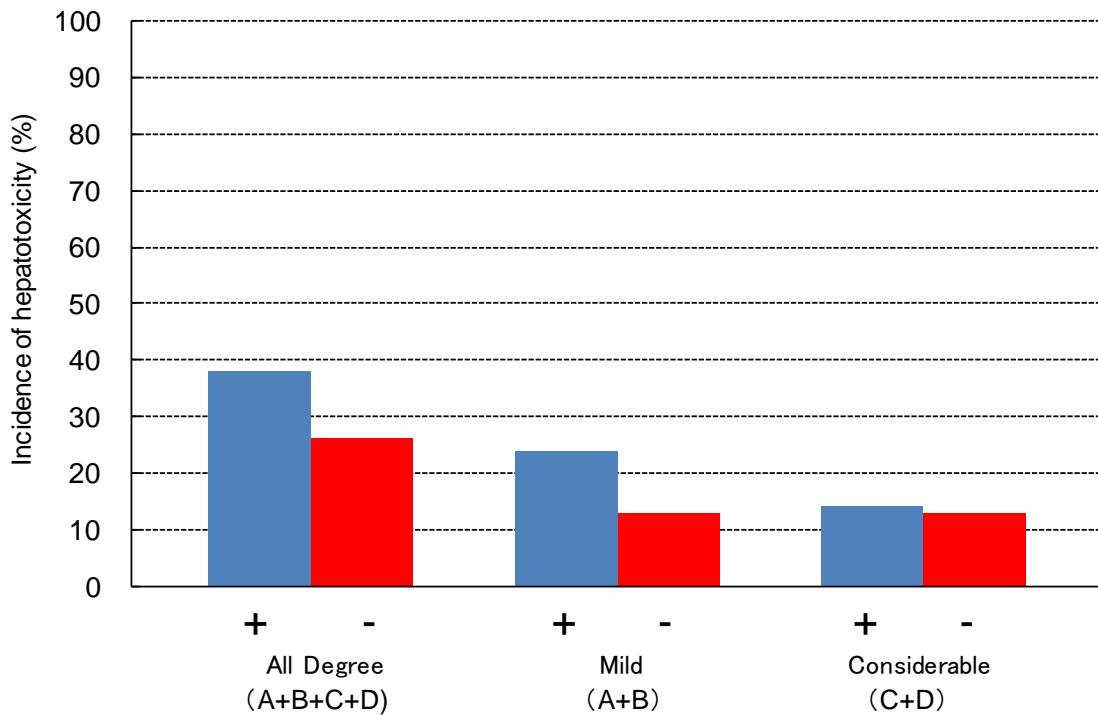


Fig.1-22 The relation between RFP administration (positive/negative) and the incidence of hepatotoxicity. positive: n=121 negative: n=23.

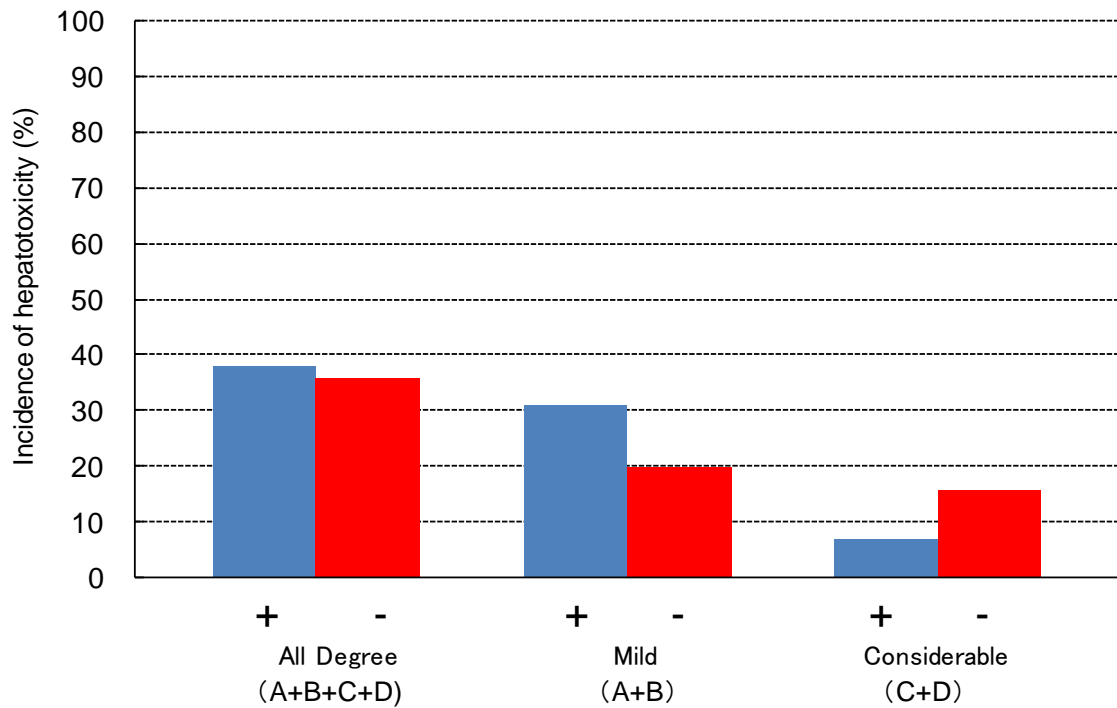


Fig.1-23 The relation between heavy alcoholism (positive/negative) and the incidence of hepatotoxicity. positive: n=29, negative: n=115

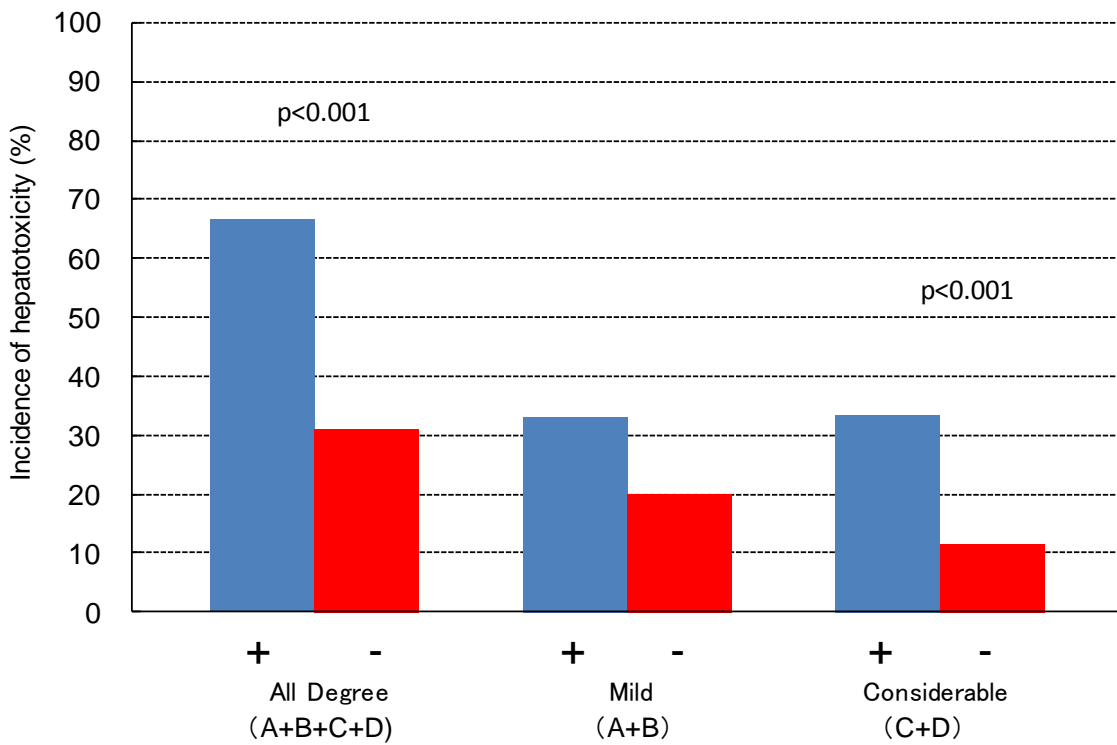


Fig.1-24 The relation between hepatitis virus B/C infection (positive/negative) and the incidence of hepatotoxicity. positive: n=12 negative: n=132

## 考察

結核の化学療法において重要な位置を占める INH は主に NAT2 により代謝を受けるため、その薬物動態や副作用は NAT2 遺伝子多型の影響を強く受けることが知られている。特に臨床上問題となる副作用である肝障害については、RA においてアセチル化が速やかに進行し AcHz が高濃度となり高率に肝障害が生じる可能性が報告されたが[29, 60]、AcHz は RA では速やかにジアセチルヒドラジンとなり代謝されるため SA で高値を示し[61]、AST、ALT の正常値上限 3 倍以上を示す確率は RA11%、SA26%と SA で有意に高率であったという報告がなされ[22]、SA において肝障害が生じやすいことが本邦においても報告された[23]。しかし、NAT2 遺伝子多型と肝障害について関連がなかったという報告もあり[62, 63]、明確ではない。また、近年 INH が加水分解された Hz が肝障害の原因物質になり得ることが実験的に確認され[35, 64]、とくに Hz の肝毒性は AcHz より強いと報告されたため[64]、Hz、AcHz の代謝に関わる CYP2E1、GST が肝障害に影響する可能性が報告された[25, 26, 27]。CYP2E1 は薬物代謝の第 I 相で酸化反応を触媒する酵素で、さまざまな薬剤性肝障害に関連がある。INH 代謝においては、CYP2E1 遺伝子多型にて c1/c1 患者では肝障害の頻度が高い[26]、潜在性結核感染治療に INH を用いた場合 NAT2 遺伝子多型は肝障害の発生頻度に差は認めなかったが、c1/c1 を有する患者では有意に肝障害が高率であった[25]、と報告されており、肝障害への関与が示唆されている。また、GST は、薬物代謝の第 II 相でグルクロン酸抱合を触媒し、グルクロン酸抱合体を生成し、薬理活性を消失させる。GST の多型について薬剤性の肝障害が報告されているが、GSTM1 欠損型では肝障害が高率であったが、NAT2、GSTT1 の遺伝子多型では肝障害発現に有意差を認めなかった[27]、GSTM1 欠損型で抗結核薬による肝障害は有意に高率であった[65]、GSTT1 欠損型で肝障害は有意に高率であったが GSTM1 欠損型では有意差を認めなかった[66]、と様々な報告がされている。また、併用薬による INH の薬物動態や副作用に対する影響も報告されており、その中でも INH と共に用いられる抗結核薬の RFP が挙げられる[67-69]。RFP については INH から Hz への加水分解を触媒する Amidase を誘導することで Hz の濃度が高くなること[69]、さらに RFP 併用により INH の肝毒性を誘発することが知られている[67, 68]。

そこで本章では NAT2、CYP2E1 及び GST の遺伝子多型解析を行った上で、INH 及びその代謝物血中濃度に対するこれら代謝酵素遺伝子多型、ならびに肝機能障害発現頻度に対する代謝酵素遺伝子多型や併用薬を含めた患者背景因子の影響につ

いて検討を行った。

第1節では NAT2、CYP2E1 及び GST 遺伝子多型解析を行った。CYP2E1 の 5'-末端隣接領域に存在する CYP2E1 の遺伝子多型は 2 つの SNPs からなり、制限酵素 Rsa I 及び Pst I により判別されるのが一般的であるが、2 つの SNPs は完全に連鎖不均衡の状態にあること [70]、また RsaI で認識する SNPs は肝特異的転写酵素の HNF1 が結合する部位であること [71] から、今回の判別には Rsa I のみを用いた。

結核患者における遺伝子多型解析の結果、RA、IA 及び SA の比率はそれぞれ 46.0、44.8 及び 9.2% であった。また当研究室の以前の研究において、日本人関節リウマチ患者 87 名における NAT2 遺伝子多型解析の結果、表現型はそれぞれ 50.6、39.1 及び 10.3% であったと報告している [72]。さらに Kumagai らは、日本人健康成人における NAT2 表現型の比率は、それぞれ 48.3、45.5 及び 6.2% であったと報告しており [73]、今回得られた結核患者における遺伝子多型解析に基づいた NAT2 表現型の割合は、過去に報告された日本人における NAT2 表現型の割合とほぼ同様であった。一般に、日本人の NAT2 表現型の比は RA:IA:SA=40:50:10 とされており、今回の解析から健康成人と結核患者との間に NAT2 遺伝子多型の表現型分布の違いは認められず、予想した結果が得られた。CYP2E1 RsaI 処理については c1/c1、c1/c2、c2/c2 の順に 63.2%、29.4% 及び 7.4% であり、CYP2E1 DraI 処理については D/D、D/C、C/C の順に 47.9%、42.9% 及び 7.4% であった。Bolt らの健康なアジア人における CYP2E1 遺伝子多型解析の報告では、c1/c1、c1/c2 及び c2/c2 はそれぞれ 59.5、35.9 及び 4.6%、D/D、D/C 及び C/C はそれぞれ 48.3、42.3 及び 9.4% とあり [48]、今回の CYP2E1 遺伝子多型解析の結果と同程度であった。GST M1 については、wild 及び null はそれぞれ 46.0 及び 54.0% であり、GST T1 については、wild、null はそれぞれ 59.5 及び 40.5% であった。Komiya らの日本人健康成人における GST 遺伝子多型解析の報告では、GST M1 については wild 及び null はそれぞれ 45.5 及び 54.5%、GST T1 についてはそれぞれ 51.7 及び 48.3% とあり [74]、今回の GST 遺伝子多型解析の結果とほぼ一致した。以上より、CYP2E1 及び GST についても健康成人と結核患者との間に遺伝子多型の分布に大きな差はなく、同様に予想した結果が得られた。

第2節の薬物血中濃度測定については、INH の T<sub>max</sub> は 1~2 時間であることから [13]、今回の検討ではそのピーク付近の値を採用した。なお、今回は INH だけでなくその代謝物である AcINH、Hz 及び AcHz も投与 2 時間後に測定したが、当研究室で以前実施した検討より 2 時間値を用いることで INH 及びその代謝物の血中

濃度が十分に検出できることを確認している[75]。

NAT2 表現型ごとに薬物血中濃度を解析した結果、INH 血中濃度が RA、IA、SA の順に高くなった (RA<IA<SA) 一方で(Fig.1-9(A))、その主要代謝物である AcINH 血中濃度及び AcINH の加水分解産物である AcHz 血中濃度が RA、IA、SA の順に低くなった (RA>IA>SA) (Fig.1-9 (B),(D))。従って、INH の代謝は NAT2 遺伝子多型の影響を強く受け、アセチル化能が低くなるにつれ INH が蓄積し、INH 代謝経路の下流にある代謝物血中濃度が低くなることが示唆された。ここで、NAT2 表現型間で AcINH に比べ AcHz 血中濃度の差があまり見られなかった理由として、INH→AcINH へのアセチル化経路に比べ AcINH→AcHz への加水分解経路の進行が遅いこと、そして AcHz→Diacetylhydrazine へのアセチル化経路の進行が、INH→AcINH へのアセチル化経路同様速いことが考えられる。次に、現在 INH による肝障害の原因物質と考えられている Hz に注目してみると、Hz 血中濃度は RA、IA、SA の順に高くなり (RA<IA<SA) (Fig.1-9 (C))、その平均値が SA では RA に比べ 1.6 倍、IA に比べ 1.3 倍高くなっていたという結果から、SA では INH による肝障害発現リスクが高まる[18,20-24]という見解と一致すると共に、Hz が肝障害の原因物質であるという考えを支持する結果が得られた。また、Hz 血中濃度がこのような結果を示した理由として主に次の 2 点が考えられる。まず一つめとして、アセチル化経路に対する加水分解経路の割合を示す Hz/AcINH 比が RA、IA、SA の順に大きくなった (RA<IA<SA) ことから(Fig.1-10(D))、アセチル化能の低下に伴い加水分解経路の進む割合が大きくなることが示唆され、IA や SA では AcINH に代謝される速度が遅いため INH が高濃度になることで Hz への加水分解経路の割合が増え、結果的に Hz 濃度が高くなった可能性が考えられる。また別の可能性として、Hz は INH 同様 NAT2 による代謝を受けるため AcINH/INH 比は Hz の代謝も反映すると考えられており[17]、アセチル化能の低下する IA や SA において Hz→AcHz の経路が進行しにくくなり、結果として Hz が蓄積したことが考えられる。すなわち、Hz の産生の増加と消失の減少により SA では他の表現型に比べ、Hz 血中濃度が高くなった可能性が考えられる。また、Hz/INH 比は Amidase 活性の指標となることを期待し、当初 RA<IA<SA となると予想したが、逆に RA>IA>SA となった (Fig.1-10(C))。これは、INH から Hz への加水分解が IA や SA より RA で進んでいると考えるより、INH 及び Hz 血中濃度の結果から、「アセチル化能低下による Hz の相対的増大」に比べ「アセチル化能低下による INH の相対的増大」に因るところが大きく、Amidase 以外の影響が大きいと考えられる。したがって、Hz/INH 比は Amidase 活性の指標としては不適切であると考えられ、今回の解析では適切な

Amidase 活性の指標を見いだすことができなかった。

INH 及び Hz 血中濃度に対する CYP2E1 及び GST 遺伝子多型の影響について検討する際、NAT2 遺伝子多型の影響を除くために NAT2 表現型ごとに分けて解析を行った。その結果、INH 及び Hz 血中濃度に対して CYP2E1 及び GST 遺伝子多型の有意な影響が認められたのは、IA においてのみであった。IA でのみ差が検出された理由として、SA においては十分なサンプル数を確保できなかったため、適切な評価を行うことができなかった可能性が考えられた。また RA においては NAT2 の酵素活性が非常に大きく、その他の要因の影響が相殺されてしまった可能性が考えられた (Fig.1-11~Fig.1-14)。CYP2E1 の RsaI 処理については、IA の c1/c1 において INH 及び Hz 濃度が高値を示した。以前の研究では c2 を有するヒトではもたないヒトに比べ 10 倍程転写活性が上昇しているという報告[71]がなされたが、近年の研究報告では INH 投与下において c1/c1 で酵素活性がそれ以外の遺伝子型と比較して上昇することが報告された[26]。その報告を考慮すると c1/c1 では CYP2E1 による代謝が亢進していると考えられ、過去の知見を反映する結果が得られた。DraI 処理については、IA における C/C の患者数が少ないため D/D と D/C に注目して考えると、Hz 血中濃度が D/C に比べ D/D で有意に高くなるという結果が得られた (Fig.1-11、 Fig.1-12)。C アレルを持つヒトではこれを持たないヒトに比べ CYP2E1 の mRNA 発現が上昇するという報告[76]を基に考えると、C/C や D/C のヒトでは D/D のヒトに比べ CYP2E1 の活性が高まり Hz の代謝が促進されるために Hz 血中濃度がより低くなる可能性が考えられ、D/C 及び D/D に着目した場合にはこの報告との一貫性が見られた。しかしながら CYP2E1 はアルコールや薬物を含め、さまざまな要因によりその発現が誘導または抑制されるため、その遺伝子多型と表現型の間には相関が認められにくいことが一般的に知られている。また本研究では CYP2E1 遺伝子多型が INH や Hz 血中濃度に影響すると言うには患者数が少ないとも考えられるため、より例数を増やして検討する必要があると考えられた。GST M1 については IA において wild に比べ null で INH 及び Hz 血中濃度が有意に高くなり、SA においても Hz 血中濃度について同様の傾向が見られた (Fig.1-13(A)、 Fig.1-14(A))。null では Hz の代謝物である肝毒性活性代謝物の GST M1 によるグルタチオン抱合が行われなため、この代謝物が蓄積することにより Hz からの活性化が抑えられ、このような結果が得られたと考えられた。さらに、Hz は肝障害の原因物質と考えられていること、そして肝毒性活性代謝物の蓄積が考えられることなどから、この結果は抗結核薬による肝障害の発症リスクが GST M1 null で上昇するという報告[27]を支持するものであった。また同じ GST ファミ

リーの抱合酵素である GST T1 でも同様の結果が得られると予想したが、GST T1 null では INH 及び Hz 血中濃度について wild と比べ有意な差は認められなかった (Fig.1-13(B)、Fig.1-14(B))。Roy らは抗結核薬による肝障害の発症リスクとして GST M1 と共に GST T1 についても解析を行ったが、GST T1 については肝障害の発症リスクに差が認められなかったと報告している [27] ことから、INH の代謝には GST T1 の関与は極めて小さいと考えられる。

第 3 節では、抗結核薬による肝障害との関連性が強く示唆されている NAT2 遺伝子多型に加え、近年肝障害のリスクファクターとして報告のある CYP2E1 及び GST 遺伝子多型、年齢、性別、RFP 併用の有無、アルコール多量摂取の有無及び HBV・HCV 感染の有無を対象に肝機能障害との関連性の検討を行った。NAT2 遺伝子多型については、AST 及び ALT のいずれかが基準以上 (A+B+C+D) の頻度は SA で約 60% と RA 及び IA に比べそれぞれ 1.9 倍及び 1.8 倍と高値となったが、中程度肝機能障害 (C+D) では NAT2 遺伝子多型の大きな影響は認められなかった (Fig.1-15)。INH による肝障害との関連性が強く示唆されている NAT2 遺伝子多型において、中程度肝機能障害の発現頻度に大きな違いが認められなかった理由として、本検討は米国呼吸器学会の指針に従い、副作用防止の観点から INH、RFP 及び PZA 投与量を患者個々の体重あたりで厳格に設定していることが挙げられ、この点で明らかに過去の検討と異なる。さらに、中程度肝機能障害発現患者の数が 20 例程度と少数であったことに加え、SA も 13 例と少数であったことから検出に至らなかった可能性が考えられた。しかしながら、AST 及び ALT のいずれかが基準以上の頻度は RA や IA に比べ SA で高くなったことから (Fig.1-15)、NAT2 活性の違いによる INH や Hz 血中濃度の違いが肝機能障害発現に影響を及ぼしている可能性が考えられた。従って、抗結核薬の投与量を体重あたりで設定することで、高頻度の肝機能障害発現が問題とされてきた SA におけるリスク軽減につながることを示唆されたが、NAT2 活性の違いは少なからず肝機能障害発現に影響を与えることが示唆された。年齢については、65 歳以上の高齢者において肝機能障害発現リスクが高まることが示唆された (Fig. 1-20)。これまで年齢と肝機能障害との関連性については多く報告がなされ、高年齢がリスクファクターの一つと考えられており [15,77]、本検討においてもこれらの報告を支持する結果が得られた。結核患者の大半は高齢者であり、かつ結核に対する化学予防投与の対象年齢が今後 29 歳以下から全年齢に拡大されることを合わせて考えると、高齢者における肝障害の防止は重要課題の 1 つであり、NAT2 遺伝子多型に加え年齢も考慮した抗結核薬投与が望まれる。性別については男性でより肝機能障害の発現が認められ (Fig. 1-21)、HBV 及び HCV

感染者で肝機能障害が発現しやすいことが示唆された(Fig. 1-24)。その他の要因については、有意差は認められなかった。現在までに肝障害のリスクファクターとして報告されているものは、CYP2E1 の c1c1[25,26]、GST M1 null[27]、女性[15,78]、RFP 併用[67, 68]、アルコールの多量摂取[77,78]及び HBV・HCV 感染[77]が挙げられ、HBV・HCV 感染がリスクファクターであるという点については同様の結果が得られた。しかしながら、CYP2E1 の c1/c1、性別及びアルコール多量摂取については予想と正反対の結果が得られた。CYP2E1 の c1c1 については、近年リスクファクターとして議論がなされている代謝酵素遺伝子多型の 1 つであり、c1/c2 及び c2/c2 に比べ c1/c1 では CYP2E1 活性が高く Hz から肝毒性活性代謝物の生成が促進するため肝障害が生じやすくなることが考えられる。しかし、酵素活性に対しこの多型は影響しないという報告もあること[79, 80]、またアルコールや薬物を含め、その発現の誘導または抑制はさまざまな要因により影響を受けることを考えると、結論づけるにはさらに今後の検討が望まれる。性別については、女性の方が男性に比べ肝障害が生じやすいとする報告はあるが、明確な理由は知られていない。また一般的にアルコールの多量摂取は肝細胞を障害することが知られ、同様に抗結核薬による肝障害のリスクファクターとして報告されている。本検討では男性及びアルコールの非多量摂取群での肝機能障害発現頻度が高くなったが、一日あたり日本酒換算 3 合以上の摂取群で中程度肝機能障害の発症頻度が低下するということは考えにくく、性別及びアルコール摂取の点についてもさらなる検討が必要である。RFP については INH から Hz への加水分解を触媒する Amidase を誘導することから[58]、RFP 併用により INH の肝毒性を誘発することが知られている[67, 68]。RFP 併用の肝毒性誘発の原因として本研究で対象とした Amidase 誘導の他にも、RFP の CYP2E1 等の CYP に対する誘導作用[81]や RFP 自体の肝毒性も十分に考えられる。本検討では有意差は認められなかったものの RFP 併用群で肝機能障害発現頻度の増加が認められた。有意差が認められなかったのは Amidase による加水分解経路は NAT2 によるアセチル化経路に比べ僅かであることから、その影響が大きく現れなかったためであることが考えられた。

さらに、SA が 144 例中 13 例と少数であったことを考慮し、肝機能障害を呈した症例を肝機能障害の程度で 2 群に分け、肝機能障害を生じなかった群を加えた 3 群で INH 及び INH 代謝産物の血中濃度を比較したが 3 群間でほとんど差を認めなかった。また、CYP2E1、GST 遺伝子多型の NAT2 表現型別比率、肝機能障害別比率を比較したが、肝機能障害の発症において明確な結果は得られなかった。肝機能障害の程度別の検討で INH 及びその代謝産物の血中濃度について差が認められな

かったのは、内服後 2 時間値のみを用いた検討であり、薬物に対する曝露量を示す Area under the blood concentration time curve (AUC) の比較でないことも考えられた。そこで経時的な血清中 INH 濃度が得られた患者 36 例の AUC を肝機能障害の程度別に集計したところ、中程度肝機能障害群、軽度肝機能障害群及び肝機能障害なし群における平均 AUC はそれぞれ 15.83、12.57 及び 11.25 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  であり、統計学的な差は認められなかったものの、肝機能障害あり群で最も高値を示した。このことから、INH の曝露量と肝機能障害との間に関連性があることが示唆された。

以上を総合して、INH 及び肝障害の原因物質の一つと考えられている Hz と共に、NAT2 SA で肝障害のリスクが高まるメカニズムを考えてみると、SA では NAT2 によるアセチル化能が低く INH $\rightarrow$ AcINH への主要代謝経路が進みにくくなるため INH が蓄積し、その結果加水分解経路が進む割合が大きくなり Hz の生成が増加する一方で、Hz $\rightarrow$ AcHz のアセチル化経路も進みにくいため Hz が代謝されにくく、結果として Hz が蓄積すると考えられる。Hz は CYP2E1 などにより酸化を受け、ヒドラジンラジカルやジイミドなどの肝毒性活性代謝物となり肝細胞を傷害し肝障害を引き起こすため、他の表現型に比べ Hz の蓄積が起こる SA では肝障害の発症頻度が高くなると考えられた。

## 小括

対象とした患者群における NAT2、CYP2E1 及び GST 遺伝子多型の頻度分布は、報告されている分布と同程度であった。

NAT2 遺伝子多型により変異アレルが多いほど INH から AcINH へのアセチル化が抑制され、それに伴い Hz への加水分解経路に移行するのに加え、Hz から AcHz へのアセチル化が抑制されるため、結果として Hz が高値を示すことが示唆された。本患者群でも NAT2 SA を肝障害のリスクファクターとするこれまでの報告を支持する結果が得られた。

INH および Hz 血中濃度に対する CYP2E1 および GST 遺伝子多型の有意な影響は NAT2 の表現型が IA の場合に見られ、GST M1 null では wild に比べ INH 及び Hz が高値を示した。

肝機能障害発現と代謝酵素遺伝子多型の関係を検討したところ、NAT2 SA で AST/ALT 上昇が高率で起こることが確認された。

## 第2章 結核患者における INH の母集団薬物動態解析

### 緒言

現在の薬物治療では、同一の疾患に対して成人であればほぼ全ての患者に画一的な用法・用量が決定されている場合が多い。しかしながら、同一の処方薬治療を行った場合でも、薬剤によっては患者間で薬効や副作用発現が大きく異なることがあり、このような薬剤においては個人差を考慮した投与設計が必要となってくる[82]。薬効や副作用に個人差が大きく反映される薬剤の代表例として、抗結核薬の中でも重要な位置を占めている INH が挙げられる。本研究でも第1章にて、INH 及び INH 代謝物血中濃度に対する INH の主要代謝酵素である NAT2 遺伝子多型の顕著な影響が示唆されたが、血中濃度だけでなく CL (Clearance: クリアランス)、T<sub>1/2</sub> (半減期) 及び AUC (Area Under the Curve: 濃度曲線下面積) などの薬物動態パラメータ[42,83-85]や臨床上問題となる肝障害発現頻度[18,20-24]などにも大きな影響を及ぼすことが数多く報告されている。特にアセチル化能の低い NAT2 SA では INH の代謝が低下しており、INH 及びその代謝物が蓄積し、結果として肝障害発現頻度が高まることが知られている。結核治療において肝障害が生じた場合、抗結核薬の減量または中止に伴う治療の長期化や耐性結核菌出現が懸念されるため、副作用発現リスクの軽減を目的として SA では投与量の減量が望まれている。一方で NAT2 RA では INH の代謝が亢進しているため十分な治療効果が得られない可能性があり[86]、RA についても投与量調節の必要性が示唆されている。

臨床現場においては、日本結核病学会の指針に従い、INH が全ての患者に対し画一的に 5 mg/kg/day の投与量で投与されており[87]、その適正使用を考える上では NAT2 遺伝子多型を考慮した INH の投与設計の再構築が望まれる。しかしながら現在までに、NAT2 遺伝子多型を考慮した場合の INH の投与量については海外結核患者や少数の健康成人を対象とした報告はなされているものの[86,88,89]、日本人結核患者を対象とした報告はほとんどなく、NAT2 遺伝子多型を考慮した場合の INH の投与量は未だ確立されていない。さらに結核治療において、日本においても DOTS (Directly Observed Treatment Short-course: 直接監視下短期化学療法) という方針のもと結核対策に力を入れており、ここで重要となってくるのが直接対面による服薬確認である。しかし現在のところマンパワーやインフラ、経済的な問題から現実には非常に困難であり、欧米で行われている抗結核薬間欠投与(前半 2 ヶ月の抗結核薬治療終了後、INH については 1 回分の投与量を 15 mg/kg/day と増やし、

18 週間、週 2~3 回の INH 及び RFP 隔日投与)にならない結核治療の後半 4 ヶ月において、抗結核薬の毎日投与を週 2~3 回の隔日投与に変更することで、確実な対面服薬が可能となり結核治癒率が改善されるか検討がなされている[87, 90, 91]。しかしながら、INH の薬物動態や有効性、副作用発現頻度は NAT2 遺伝子多型の影響を大きく受けるため、その投与量及び投与間隔の設定には NAT2 遺伝子多型の考慮が必須であると考えられ、今後結核治療におけるこの臨床的意義がより高まると予想される。

安全性と有効性のバランスのとれた治療ために必要な投与量や投与間隔は、吸収、分布、代謝及び排泄といった薬物体内動態かつ、作用部位における薬物濃度と反応の関係により決まると考えられる。薬物体内動態は薬物動態パラメータを用いて予測が可能であり、臨床現場では推定されたパラメータ値から血中濃度の予測や投与設計を行う場合が少なくない[92]。各種薬物動態パラメータを推定する場合、以下のような方法が知られている。

- 標準 2 段階法 (standard two-stage method : STS 法)
  - 第 1 段階は、各被験者の血中薬物濃度データから各被験者の薬物動態パラメータを推定し、第 2 段階として、各被験者から得られたパラメータの平均とその分散という統計パラメータを推定する。
- NPD 法 (naive pooled data method)
  - 各被験者から得られた血中薬物濃度データをプールし、あたかも同一被験者から得られたデータであるかのように捉えて解析する。平均値としての薬物動態パラメータは推定できるが被験者間の変動は推定できない。
- 混合効果モデル (mixed effect model) を用いた解析法
  - 対象とする被験者群の平均薬物動態パラメータとその変動 (統計パラメータ) をモデルに組み込み、同時に平均薬物動態と統計パラメータを推定する。薬物動態パラメータと患者背景との関連性の検討によって、薬物動態への影響因子の探索を同時に行うことができる。

STS 法は被験者ごとに薬物動態パラメータを推定できるだけの血中薬物濃度が得られていることが条件となるため、同一被験者から頻回採血が必要となる。一方、NPD 法及び混合効果モデルを用いた方法は同一被験者からの採血回数は少なくても解析可能である。また、混合効果モデルを用いた解析では薬物動態パラメータと共に個体間変動及び個体内変動も同時に推定でき、患者背景因子の薬物動態への影響も統計学的に評価できる。医薬品開発の現場では用法用量設定根拠の構築に有力な手法として多用されている。

第1章において、INH濃度にはNAT2遺伝子多型が顕著な影響を与え、SAにおいて有意に高値を示し、RAにおいては有意に低値を示すこと、中程度肝機能障害発現においては、NAT2表現型の有意な影響は認められなかったが、全ての肝機能障害レベルを考慮したALT/AST上昇はSAにおいて高率に起こることが確認された。従って安全性リスク及び不要な血中濃度上昇回避の観点から、NAT2表現型ごとの投与設計の必要性が示唆された。これを踏まえ、本章ではINHの最適な投与設計を目的とし、日本人結核患者を対象にして、第1節でNon-linear mixed effect model (NONMEM)を用いたINHの母集団薬物動態解析を行った。第2節では、第1節で得られた薬物動態パラメータを基にし、INHの薬物動態や副作用に影響を及ぼすことが知られるNAT2遺伝子多型を考慮したINHの投与設計について検討を行った。

## 第 1 節 NONMEM を用いた INH の母集団薬物動態解析

本節では、Non-linear mixed effect model (NONMEM) を用いて結核患者における INH の母集団薬物動態解析を行った。

### 1. 方法

#### 【対象患者】

第 1 章 第 2 節における対象患者 152 名のうち、解析に必要な基礎データの得られなかった患者及び INH の CL に影響すると考えられる要因(脂肪肝、肝硬変、HBV 及び HCV)を持つ患者を除外した 137 名(257 点)を対象とした。

#### 【NAT2 遺伝子多型解析】

第 1 章 第 1 節に従った。

#### 【INH 血中濃度測定】

第 1 章 第 2 節に従った。

#### 【INH の母集団薬物動態解析】

母集団薬物動態解析には NONMEM[93, 94, 95]、INH 血中濃度推移のグラフ作成には R、データハンドリングには SAS を用いて解析を行った。

使用ソフト：NONMEM (version VI, Icon Development Solutions), R (version 2.13.1), SAS version8.1 (SAS Institute Japan Inc.)

推定方法：薬物動態パラメータは First-order conditional estimation(FOCE)法を用いて推定した。拡張最小二乗法の計算には正規方程式を作るのにテーラー展開による近似が必要で、一次の項まで近似している方法を First Order 法 (FO 法) と言い、モデルを個体間変動パラメータ  $\eta$  の平均値 0 の周りで展開している。一方、テーラー展開するときにある特定の推定値の周りで展開する方法が First Order Conditional Estimation 法 (FOCE 法) であり、FO 法の近似精度をより高めた計算方法として知られている。

### **BaseModel の構築**

薬物動態モデルの検討をした後、個体間変動及び個体内変動の検討を行った。個体間変動については、以下の指数誤差モデルを仮定した。

$$P_i = \theta \times \exp(\eta_i)$$

ここで  $P_i$  は被験者  $i$  のパラメータ値、 $\theta$  は母集団の平均パラメータ値、 $\eta_i$  は平均が 0 で分散が  $\omega^2$  の正規分布に従うものとする。個体内変動については、以下の誤差モデル (Residual error model) を検討した。

$$\text{付加誤差モデル } C_{ij} = \tilde{C}_{ij} + \varepsilon_{ij1}$$

$$\text{比例誤差モデル } C_{ij} = \tilde{C}_{ij} \times (1 + \varepsilon_{ij1})$$

$$\text{混合誤差モデル } C_{ij} = \tilde{C}_{ij} \times (1 + \varepsilon_{ij1}) + \varepsilon_{ij2}$$

ここで  $C_{ij}$  は被験者  $i$  の  $j$  時点の INH 濃度の実測値を、 $\tilde{C}_{ij}$  は推定値を示す。 $\varepsilon_{ij}$  は平均が 0 で  $\sigma^2$  の正規分布に従い、測定誤差や個体内変動、また想定したコンパートメントモデルからのずれによる誤差を表す。

### Final Model の構築

モデル選択の統計的基準の一つとして、最尤法を基礎とする Objective function value (OBJ 値) が挙げられる。NONMEM では全被験者データを薬物動態モデル及び個体間と個体内の誤差モデルをあらかじめ想定したモデル式に当てはめ、OBJ 値が最小になるような、薬物動態パラメータの母集団平均値、個体間及び個体内変動の分散を同時に推定する。NONMEM では分散も未知として取り扱い、拡張最小 2 乗法の目的関数値、 $OBJ(\theta, y)$  を最小とするパラメータ  $\theta$  と  $\xi$  を推定する。

$$OBJ(\theta, y) = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{(y_i - f(\theta, x_i))^2}{v(\theta, \xi, x_i)} + \ln(v(\theta, \xi, x_i)) \right]$$

$OBJ(\theta, y)$  : 目的関数 (重み付き残差平方和)

$x_i$  : 独立変数 (時間、投与量、etc.)

$y_i$  : 観測された測定値 (血中濃度、薬剤による反応、etc.)

$f$  : モデル (血中濃度モデル、薬理反応モデル、etc.)

$\theta$  : 求めるパラメータ

$N$  : 測定点数

$\xi$  :  $\theta$  以外のパラメータ (個体間、個体内変動)

$v(\theta, \xi, x_i)$  :  $y_i$  の分散の推定値

仮定した分散モデルのもとに、誤差が正規分布すると仮定し、尤度関数  $L$  を得る。

$$L = \prod_{i=1}^N \left( \frac{1}{2\pi v(\theta, \xi, x_i)} \right)^{1/2} \exp \left[ -\frac{(y_i - f(\theta, x_i))^2}{2v(\theta, \xi, x_i)} \right]$$

異なるモデルに当てはめたとき、二つのモデルの  $-2\log(L)$  の比は近似的に二つのモデルのパラメータ数の差を自由度とした  $\chi^2$  分布に従う [96]。すなわち二つのモデルの OBJ 値を相対比較することで  $\chi^2$  検定を行うことになる。例えば、二つのモデル

のパラメータ数が 1 であれば、自由度が 1 となり、新たなモデルの目的関数が 3.84 以上減少していれば、 $p < 0.05$  で有意に変化（改善）したとみなす。組み込まれる共変量の探索では Base model に対し、薬物動態に影響する可能性のある要因を一つずつ組み込んでいき、尤度比検定（有意水準 5%）により影響の有無を判定した（forward addition: 前進法）。共変量の組み込み終了後（Full Model）、一つ一つの共変量の影響を抜いて各共変量に統計的意義があることを尤度比検定（有意水準 1%）により確認した（backward deletion: 後退法）。本解析で検討した共変量を表にまとめた（Table 2-1）。

Table 2-1 Covariate - PK Parameter Relationships to be Evaluated

Covariate	Clearance (CL/F)	Volume of central compartment (Vd/F)
NAT2 (RA/IA/SA)	√	
Age (65> / 65≤)	√	
Gender (Male/Female)	√	
Body weight (continuous)	√	√
Coadministration of RFP (Yes/No)	√	
Heavy alcoholism* (Yes/No)	√	

\*Heavy alcoholism means above 540 mL in terms of rice wine.

### モデル評価

Final model の妥当性を評価するため、以下の方法に従った。

#### (1) 予測値の視覚化及び診断プロット

モデル適合性については、診断プロット（実測値 VS 予測値、実測値と予測値との差（重み付き残差） VS 予測値あるいは投与後時間）により確認した。ここで、重み付き残差は実測値から予測値を引いた差 RES ベクトルをその標準偏差に該当する分散共分散行列の平方根で標準化して算出される。重みつき算差（Weighted residual, WRES）を算出する時には  $\eta = 0$  の周りでテーラー展開され、FO 法ではモデルの妥当性を WRES の値が標準正規分布に従うか否かで判断することが可能である。Hooker らは FOCE 法に対応した条件付重み付き残差（conditional weighted residual, CWRES）を提案した[97]。シミュレーションによって FOCE 法による解

析で CWRES の分布は標準正規分布に従うが、WRES は従わないことを示しており、EMEA の PPK ガイドライン（ドラフト）でもモデル適合性診断において CWRES の使用が推奨されている。これを踏まえ、本解析においてもモデル選択の際に CWRES を用いた。

## (2)bootstrap 法

Final model の信頼区間を検討するため bootstrap 法を用いた[98]。ランダムな re-sampling により、オリジナルデータからそのデータ(137 名)と同サイズの bootstrap 用サンプルデータを作成し解析を行った。この操作を繰り返し、解析が成功した 200 回分の解析結果について、各パラメータの平均値(Mean)、標準誤差(S.E.)及び 95%信頼区間を求めた。なお、95%信頼区間の算出は以下の方法に従った。

$$[\text{Mean} - Z_{\alpha/2} \times \text{S.E.}, \text{Mean} + Z_{\alpha/2} \times \text{S.E.}]$$

$$\alpha=0.05, Z_{0.025}=1.96$$

## 2. 結果

解析に用いた患者の背景因子を Table 2-1 にまとめた。NAT2 表現型間でデータの偏りは認められなかった (Table 2-1)。各採血時間における INH 血中濃度測定結果を示した (Fig.2-1)。実際の投与量は 250mg 及び 300mg が最も多く、最小投与量は 100mg であった (Fig.2-2)。共変量 (連続変数) のヒストグラムより年齢は 20 歳代~80 歳代まで幅広く一様分布に近い形で分布し、体重については対数線形分布に近い分布が得られた (Fig.2-3)。実測値のプロットより、まず吸収過程のある 1 コンパートメントモデルを用いて検討することとしたが、大部分の被験者で最初の採血ポイントである 1 時間値が最も高値を示したことから、吸収速度定数 (Ka) を考慮しない静脈内注射近似 (i.v.近似) でも検討することとした。診断プロットを比較した結果、CWRES と時間及び予測値の関係図において、吸収過程のある 1 コンパートメントモデルの方が狭い範囲でより均一に分布することが分かった (Fig.2-4)。さらに各薬物動態パラメータに個体間変動を考慮するべきかを検討したところ、OBJ 値の比較より、全ての薬物動態パラメータについて個体間変動が組み込まれた (Table 2-2)。Residual error model については、診断プロット及び OBJ 値に基づき Proportional error model を選択した (Table 2-3)。従って、個体間変動を全ての PK パラメータに仮定した 1 次吸収過程のある 1 コンパートメントモデルで Residual error model としては Proportional error model のものが Base Model として採用された。Base Model で推定された各パラメータを Table 2-4 に

示した。Base Model について各 PK パラメータの inter-individual variability と各共変量との関係を検討したところ、クリアランス (CL/F) の ETA に対して NAT2 表現型、RFP 併用の有無及び体重の有意な影響が確認された (Fig.2-5)。

次のステップとして予め規定した共変量の各パラメータへの影響を検討した。第 1 節においても確認されたように CL における NAT2 表現型の影響は大きく、OBJ 値が有意に低下した ( $p<0.05$ 、Table 2-5)。さらに年齢、性別、体重、RFP 併用の有無及びアルコール多量摂取の影響を検討したところ、体重、年齢、RFP 併用の有無、性別、アルコール多量摂取のいずれの背景因子においても有意な OBJ 値の減少が認められた。特に CL に NAT2 及び体重の効果をのせたモデルで OBJ 値は大きく低下した (Run006→Run025、 $\Delta$  OBJ=68.84)。さらに年齢を加えたモデルでは OBJ 値の有意な低下は認められなかった (Run25→Run13、 $\Delta$  OBJ=2.277)。また、CL/F 及び分布容積 (Vd/F) における体重の効果を検討したところ、有意な OBJ 値の低下はみられたが ( $p<0.05$ )、体重単独では NAT2 程の影響は認められなかった (Table 2-5)。従って Run25 を Full Model として採択し、後退法により共変量の影響について確認した上で、Run25 を Final Model とした。以下が Final Model である。

$$ICL = \Theta 1 **RA * \Theta 4 **IA * \Theta 5 **SA$$

$$CL = ICL * (BW/54) ** \Theta 6 * EXP(ETA(1))$$

$$V = \Theta 2 * EXP(ETA(2))$$

$$KA = \Theta 3 * EXP(ETA(3))$$

Final Model の診断プロットを確認したところ、時間や推測値に対する CWRES は Base Model と比較してより 0 付近でより均一に分布しており、共変量を考慮することでモデルへの適合性が改善されたことを示すことができた (Fig.2-4、Fig.2-6)。また、Final Model について inter-individual variability と各共変量との相関を検討したところ、Base Model で確認されたような CL/F への共変量の有意な影響は認められなかった (Fig.2-5、Fig.2-7)。また、Final Model から得られた母集団パラメータ、個別パラメータより推定される濃度曲線と観測値のプロットより、構築した Model は観測値を十分に表現できるものであることが示された (Fig.2-8)。Final Model における各パラメータ及び Bootstrap 法を用いて推定した各パラメータの 95%信頼区間を Table 2-6 に示した。NAT2 の RA、IA 及び SA における CL の母集団推定値はそれぞれ 29.6、20.4 及び 13.0L/h であり、アセチル化能低下に従い CL が小さくなることが確認された (Table 2-6)。また、推定された個別 CL 及び CL より算出される AUC を平均値と共にプロットした (Fig.2-9)。その結果、NAT2 の RA、IA 及

び SA における CL の平均値は 0.56、0.38 及び 0.23L/h/kg であり、AUC についてはそれぞれ 9.16、13.48 及び 22.61 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  であった。

また、得られた母集団薬物動態パラメータを用いて、INH (5 mg/kg)を投与した場合の NAT2 表現型ごとの予測濃度推移を Fig.2-10 に示した。投与後 2 時間の予測濃度は RA、IA 及び SA でそれぞれ 2.1、3.2 及び 5.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、第 1 章で確認した投与後 2 時間後の実測値 2.2、3.4 及び 4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$  をほぼ反映するものであった。

Table 2-1 Summary of Covariates

	RA (n=64)	IA (n=61)	SA (n=12)	TOTAL (n=137)
Body weight (kg)	54.7±10.0	55.4±10.9	51.3±8.3	54.7±10.3
Age (year)	54.9±17.7	49.2±17.9	51.8±17.8	52.1±17.9
Age (<65/65≤)	42/22	47/14	11/1	100/37
Gender (M/ F)	52/12	50/11	9/3	111/ 26
Dose of INH (mg/kg)	4.9±0.7	4.8±0.6	5.1±0.5	4.9±0.6
RFP (Yes/ No)	62/ 11	61/ 4	12/ 0	122/ 15
Heavy alcoholism* (Yes/ No)	10/ 54	14/ 47	3/ 9	27/110

\*Heavy alcoholism means above 540 mL in terms of rice wine.

Table 2-2 Summary of Inter-individual variability models

Run No.	Description	MIN <sup>a</sup>	COV <sup>b</sup>	OBJ	ΔOBJ <sup>c</sup>
001	CL, Vd, Ka	Successful	aborted	72.270	0 (REF)
002	CL, Vd	Successful	Ok	80.242	7.972
014	CL, Ka	Successful	Ok	99.649	27.379

<sup>a</sup> Minimization status

<sup>b</sup> Covariance step status (aborted, N/A=not applicable, Ok=successful)

<sup>c</sup> Difference between OBJ of model and OBJ of reference model (REF)

Table 2-3 Summary of Residual error models

Run No.	Description	MIN <sup>a</sup>	COV <sup>b</sup>	OBJ	$\Delta$ OBJ <sup>c</sup>
001	Proportional	Successful	Aborted	72.270	0 (REF)
003	Additive	Terminated	N/A	179.009	106.739
005	Combined	Successful	Ok	68.621	3.649

<sup>a</sup> Minimization status

<sup>b</sup> Covariance step status (aborted, N/A=not applicable, Ok=successful)

<sup>c</sup> Difference between OBJ of model and OBJ of reference model (REF)

Table 2-4 Parameter Estimates for the Base Model

Parameter		Estimate <sup>a</sup>
<b>Fixed Effects</b>		
CL (L/h)	$\theta_1$	20.8
Vd (L)	$\theta_2$	42.4
Ka (1/h)	$\theta_3$	0.158
<b>Random Effects</b>		
ZCL (-)	$\omega_{1,1}$	0.297(54.5%)
ZVd (-)	$\omega_{2,2}$	0.0934 (30.6%)
ZKa (-)	$\omega_{3,3}$	0.891 (94.4%)
<b>Residual error</b>		
Proportional	$\sigma_1$	0.0496 (22.3%)

<sup>a</sup> Random Effects parameter estimates are shown as Variance (Standard Deviation) for diagonal elements (ZP).

Table 2-5 Summary of Models with Covariate effects

Run No.	Description	MIN <sup>a</sup>	COV <sup>b</sup>	OBJ	$\Delta$ OBJ <sup>c</sup>
001	Base Model	Successful	Aborted	72.270	0 (REF)
006	NAT2 genotype on CL	Successful	Ok	17.854	-54.416
007	NAT2 genotype and age on CL	Successful	Ok	-22.905	-95.175
008	NAT2 genotype and gen on CL	Successful	Ok	-16.718	-88.988
009	NAT2 genotype and RFP on CL	Successful	Ok	-17.85	-90.12
010	NAT2 genotype and ALC on CL	Successful	Ok	-16.62	-88.89
025	NAT2 genotype and BW on CL	Successful	Ok	-50.986	-123.256
013	NAT2 genotype and BW and age on CL	Successful	Ok	-53.263	-125.533
016	BW on CL	Successful	Aborted	60.245	-12.025
017	BW on V	Successful	Ok	69.679	-2.591

<sup>a</sup> Minimization status

<sup>b</sup> Covariance step status (aborted, N/A=not applicable, Ok=successful)

<sup>c</sup> Difference between OBJ of model and OBJ of reference model (REF)

Table 2-6 Parameter Estimates and 95% Confidence Intervals for the Final PK Model

Parameter		Point estimate from	Bootstrap 95% CI <sup>b</sup>	
		Final Model <sup>a</sup>	Lower	Upper
<b>Fixed Effects</b>				
CL (L/h) on RA	$\theta_1$	29.6	26.6	33.3
Vd (L)	$\theta_2$	9.86	5.32	14.1
Ka (1/h)	$\theta_3$	0.525	0.492	0.564
CL (L/h) on IA	$\theta_4$	20.4	17.9	22.7
CL (L/h) on SA	$\theta_5$	13.0	10.8	15.4
Effect of BW on CL	$\theta_6$	0.964	0.649	1.26
<b>Random Effects</b>				
ZCL	$\omega_{1,1}$	0.0895 (29.9%)	0.0491	0.123
ZVd	$\omega_{2,2}$	0.674 (82.1%)	0.129	1.4
ZKa	$\omega_{3,3}$	0.0241 (15.5%)	0.00242	0.0413
<b>Residual error</b>				
Proportional	$\sigma_1$	0.0634 (25.2%)	0.0443	0.0886

<sup>a</sup> Random Effects and Residual Error are expressed as  $\omega^2$  or  $\sigma^2$  with SEM as % of variance

<sup>b</sup> 95 percentile of bootstrapped parameter estimates

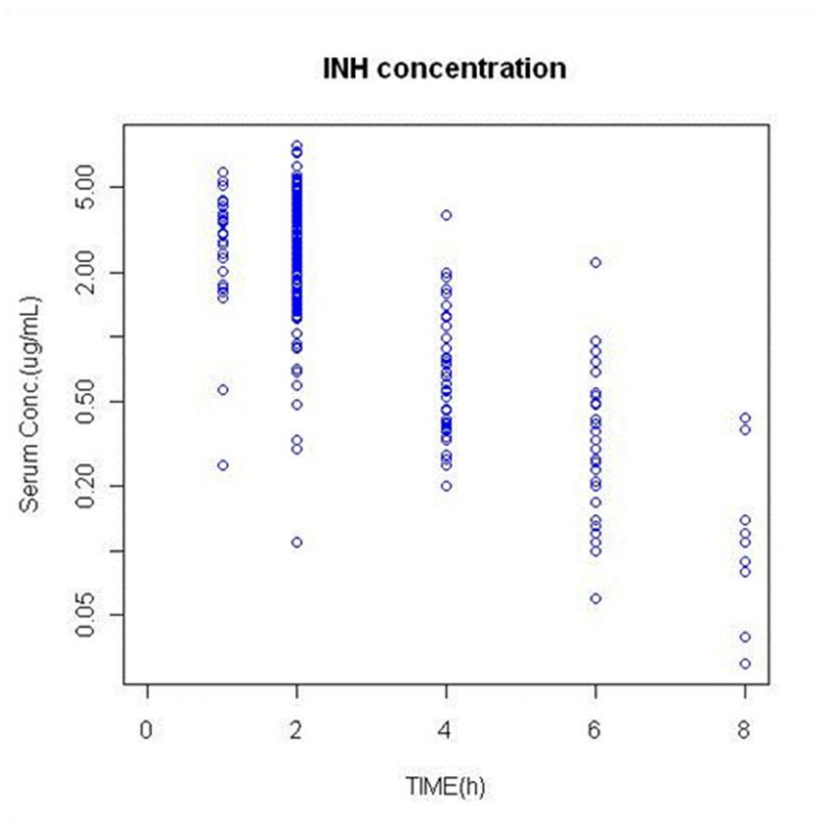


Fig.2-1 Observed Serum Concentrations after INH administration

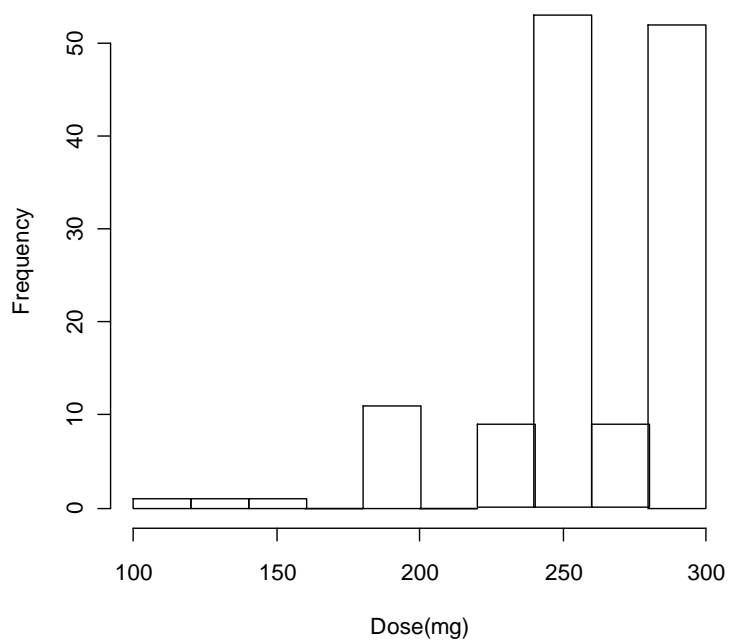


Fig.2-2 Histogram of Administrated Dose

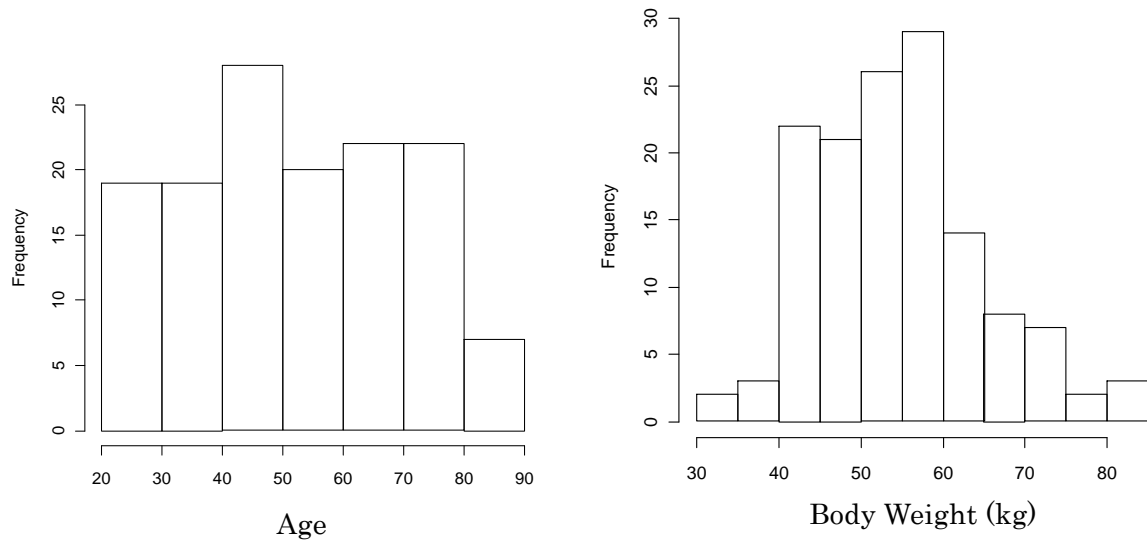


Fig.2-3 Histogram of Conteneous Covariates (left: age, right: body weight)

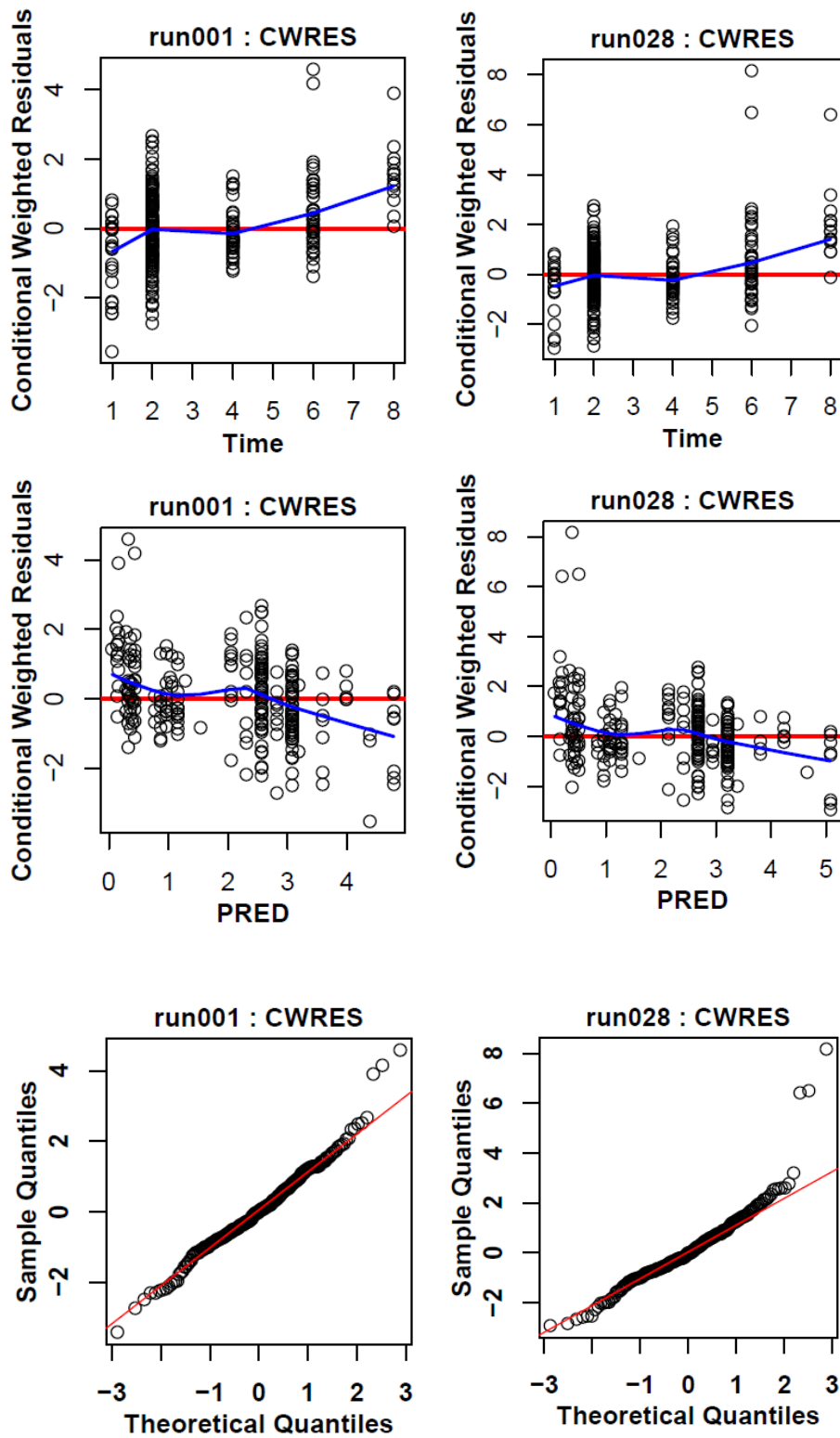
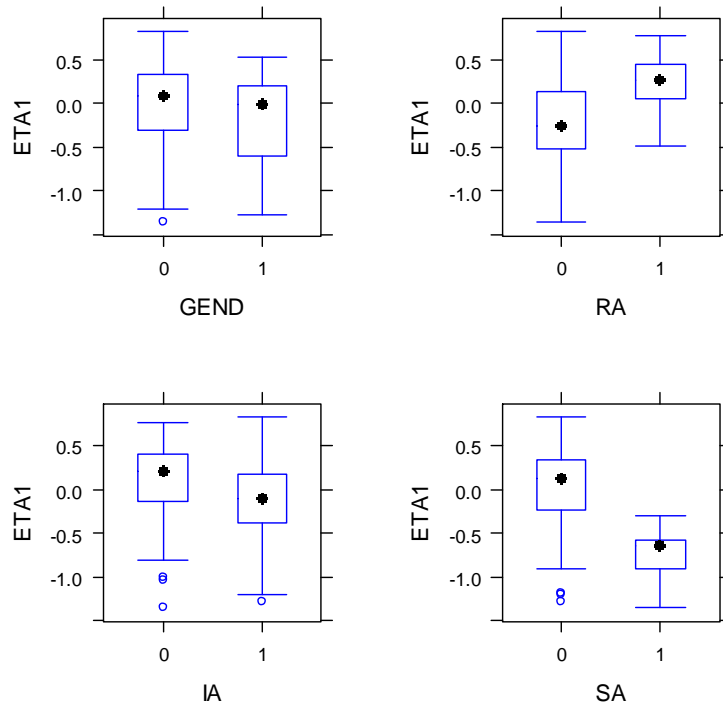


Fig.2-4 Goodness-of-fit plots

Left figures are conditional weighted residuals versus time and PRED on 1-compartment model with first order absorption (RUN001). Right figures are conditional weighted residuals versus time and PRED on 1-compartment model with i.v. approximation (RUN028).

Parameters vs. covariates (Run 001) page 8 of 14



Parameters vs. covariates (Run 001) page 9 of 14

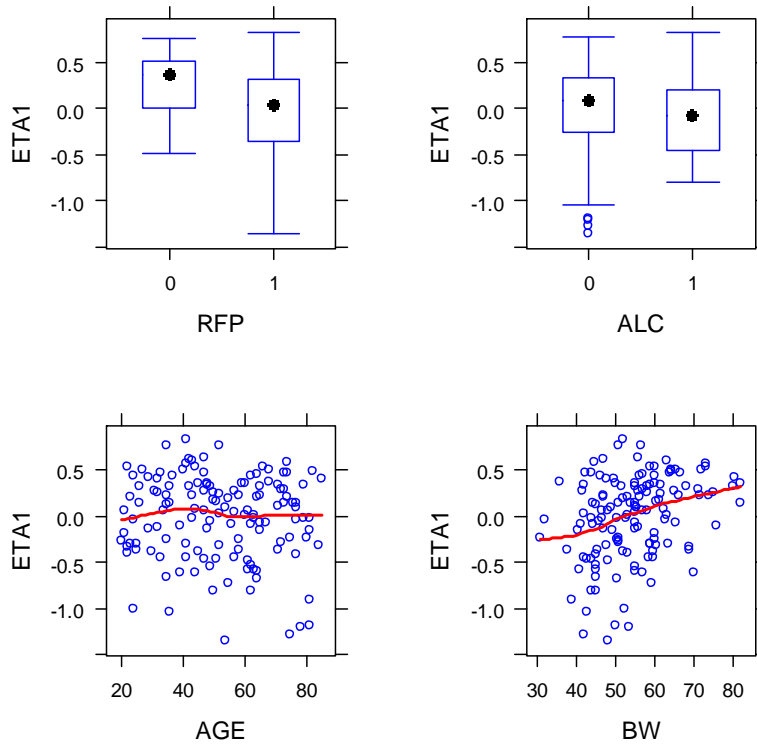


Fig.2-5 Plots of inter-individual variability on CL versus Covariates (Base Model: RUN001)

RA:  $p < 0.001$ , IA:  $p < 0.01$ , SA:  $p < 0.001$ , BW:  $p < 0.001$ , RFP:  $p < 0.05$

**Basic goodness-of-fit plots (Run 025)**

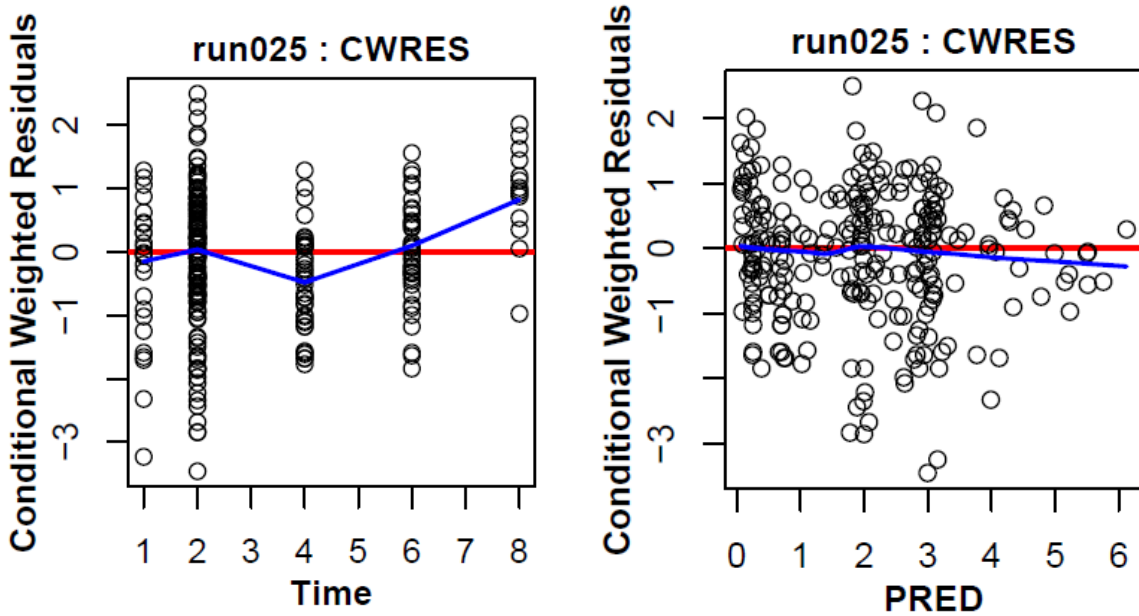
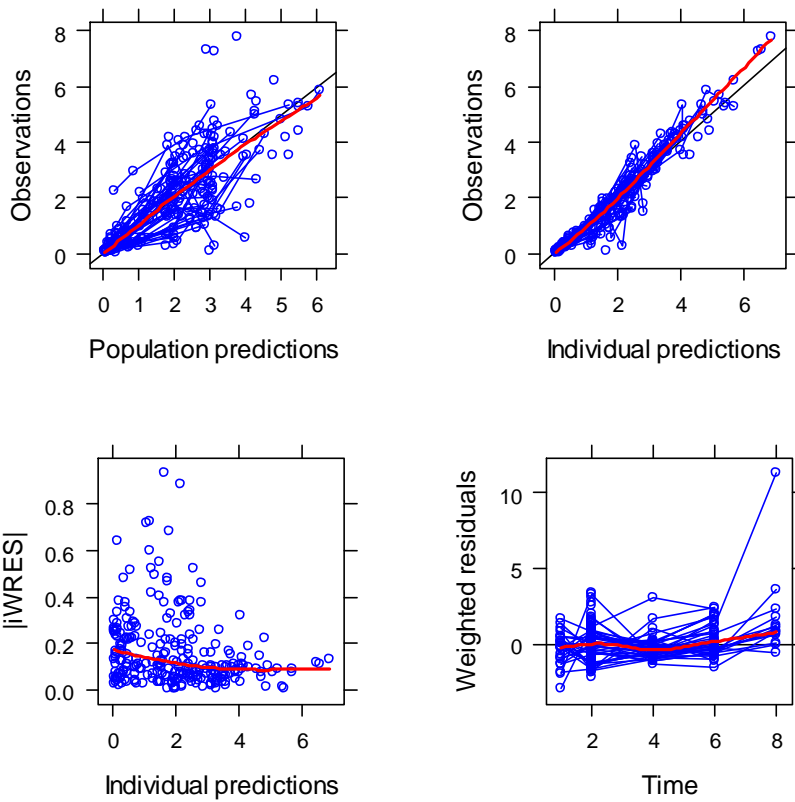


Fig.2-6 Goodness-of-fit plots of Final Model (Run025)

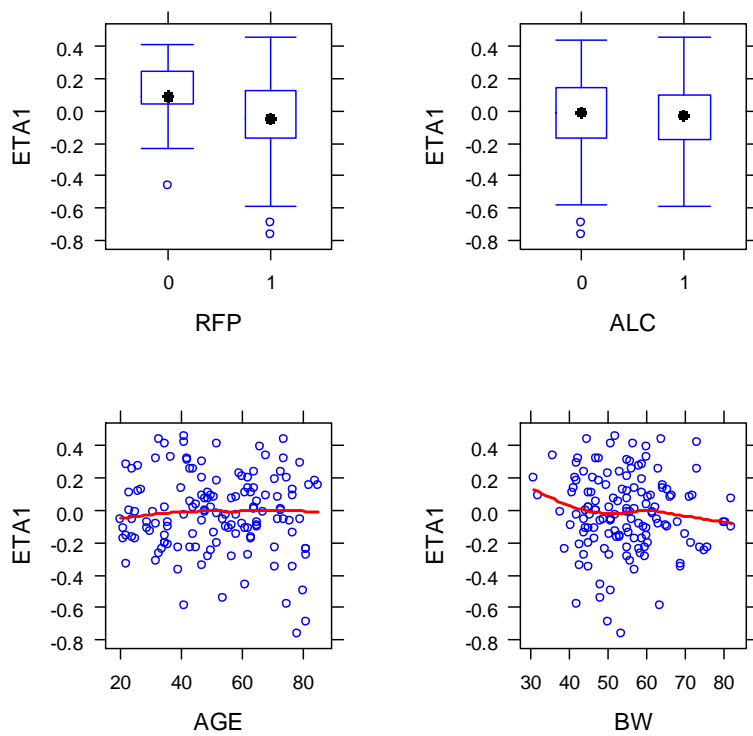
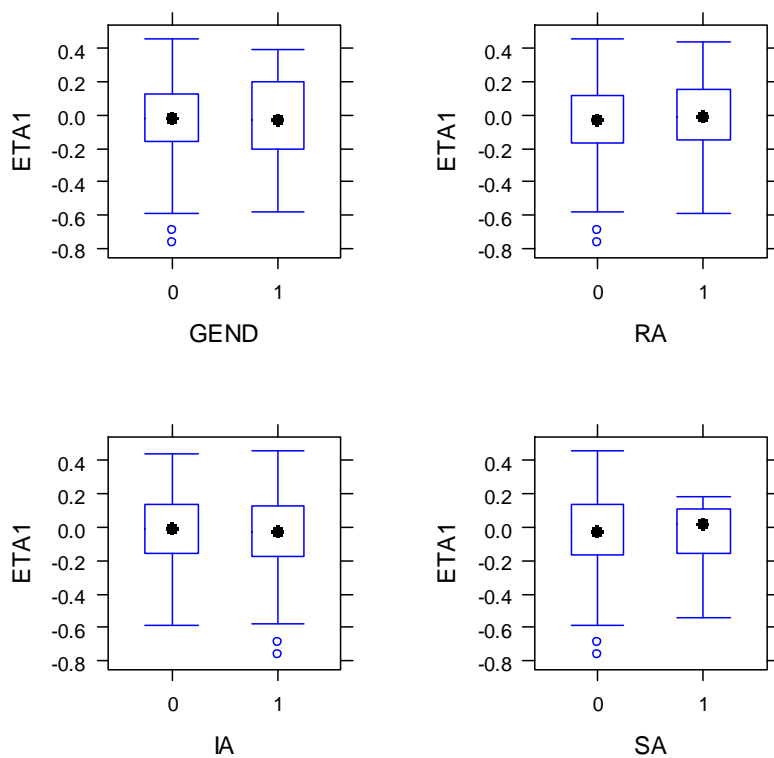


Fig.2-7 Plots of inter-individual variability on CL (ETA1) versus Covariates (Final Model: RUN025)

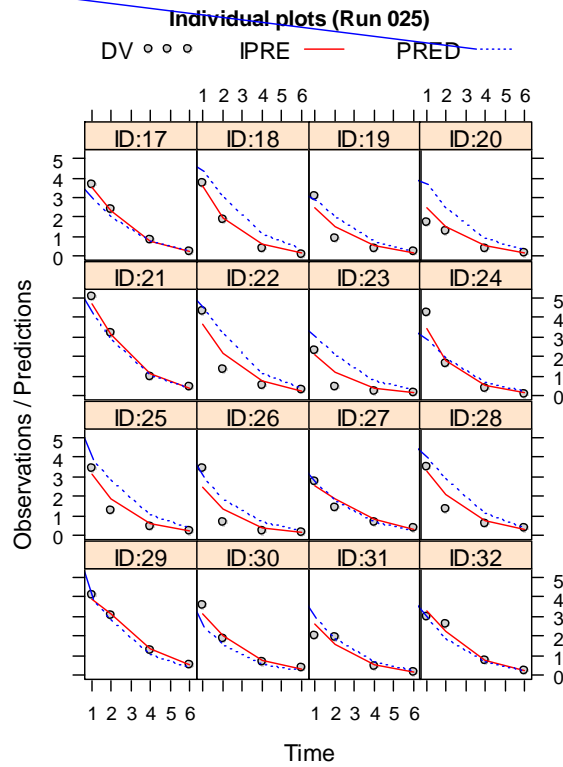
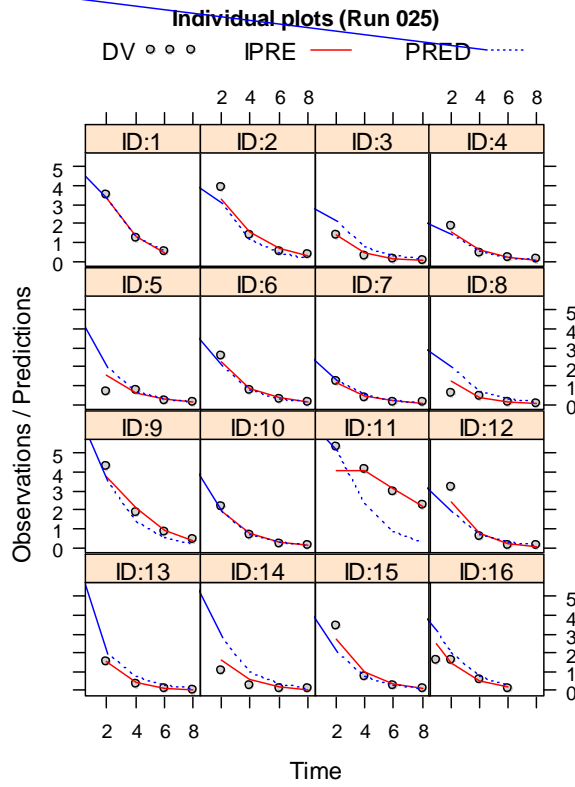


Fig.2-8 Individual Plots of Final Model (RUN025)

DV is dependent variable, IPRE is individual prediction and PRED is population prediction.

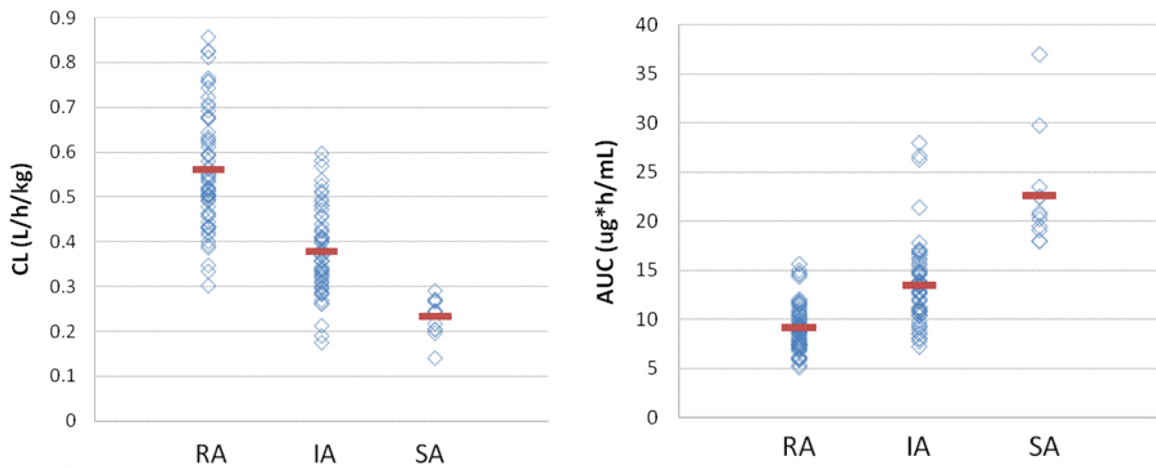


Fig.2-9 Individual parameters (CL and AUC) predicted by Final Model (RUN025)

Bars show mean values in each group.

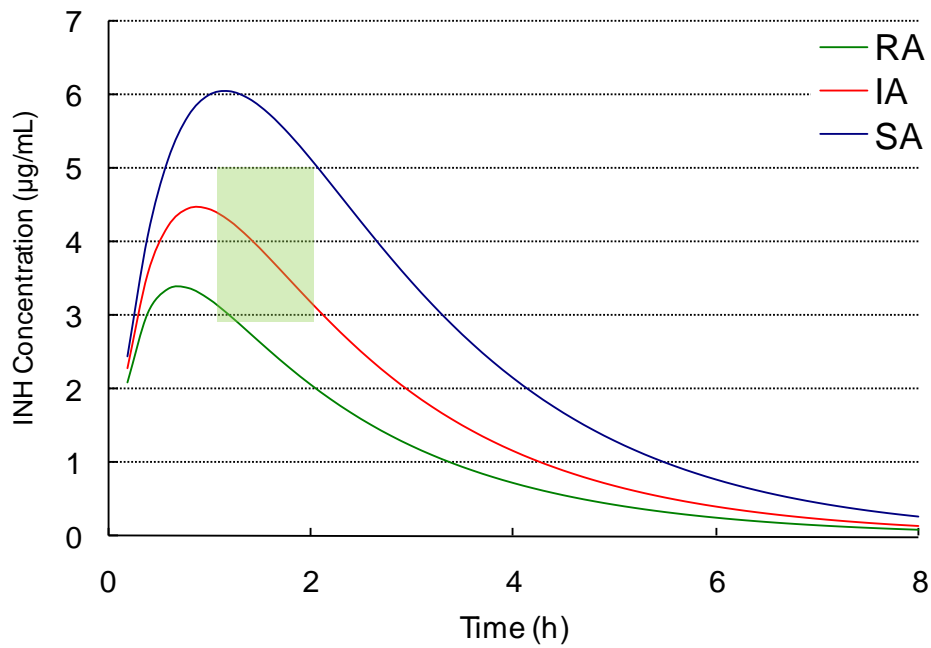


Fig.2-10 Serum INH concentration-time curve predicted by Final Model (RUN025)

## 第2節 NAT2 遺伝子多型を考慮した INH の投与設計

本節では、本章 第1節の結果を用いて NAT2 遺伝子多型を考慮した INH の投与設計について検討を行った。

### 1. 方法

#### 【NAT2 遺伝子多型を考慮した INH の投与設計】

NAT2 遺伝子多型を考慮した INH の投与設計については、①INH の治療域(C<sub>max</sub> 近傍と考えられる INH 投与 1~2 時間後の血中濃度が 3~5 µg/mL [99, 100])及び② Intermediate acetylator (IA)において 5 mg/kg/day を投与した場合の INH の推定 AUC を指標とした。

①NAT2 表現型ごとに投与量を変更したときの血中濃度データをそれぞれの投与量に対して 1000 回 Simulation し、その平均血清中 INH 濃度が治療域を満たすような投与量を探索した。Simulation データセット作成にあたっては SAS version 8.1 を、Simulation については NONMEM versionVI を用いた。

②PPK 解析にて得られた個別の CL/F 値を用いて IA に 5 mg/kg/day を投与した場合に推測される AUC 値と同等の値が得られる投与量を探索した。以下の(i)式より AUC は CL の逆数に比例することを利用し、(ii)式より RA 及び SA における IA と同等の AUC が得られる投与量を求めた。Data handling 及び調整投与量の算出には SAS version 8.1 を用いた。

$$\text{AUC} = D(\text{投与量})/CL/F \cdots (i)$$

adjD(IA と同等の AUC が得られる投与量)=

$$5 \text{ (mg/kg/day)} \times (CL_{RA} \text{ or } CL_{SA})/CL_{IA} \cdots (ii)$$

### 2. 結果

本章 第1節における母集団薬物動態解析の結果を用いて各 NAT2 表現型における投与量を変更したときの血清中 INH 濃度を推定し、投与後 1~2 時間における平均濃度が治療域を満たす用量を探索した。その結果、至適投与量は RA において 7.5 mg/kg、SA では 3.3 mg/kg と推定された。推定された血清中濃度推移について 1~2 時間値は治療域に納まることが確認された (Fig.2-11)。また②の方法では RA に 7.3 mg/kg、SA に 2.8 mg/kg 投与した際に、IA に 5 mg/kg を投与したときに得られる AUC と同等の AUC が得られると推定された。また、その投与量で各集団

に投与したときの推定濃度推移を Fig.2-12 に示した。その結果、SA における投与後 2 時間の濃度は 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  にわずかに達しなかった。

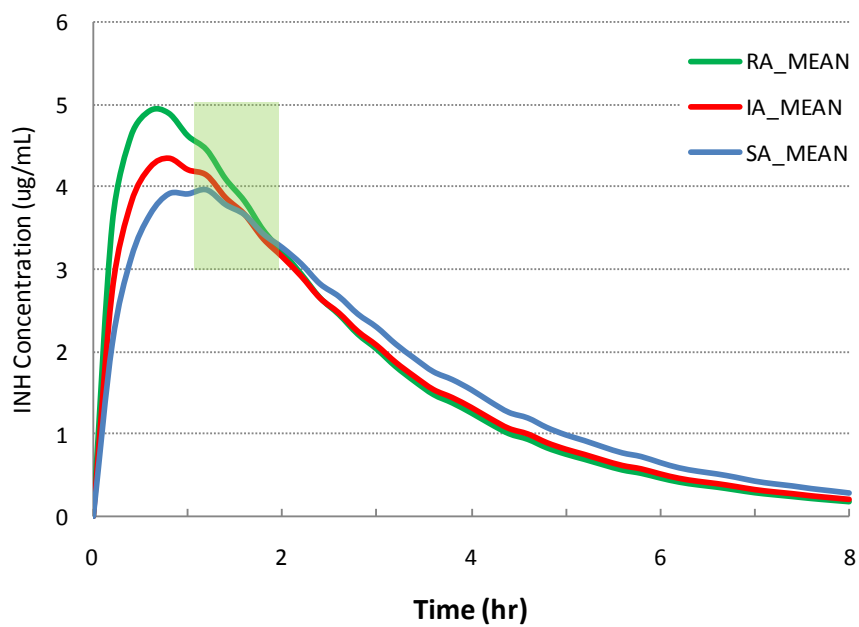


Fig.2-11 Estimated Serum INH concentration versus time curves in RA (7.5 mg/kg), IA (5 mg/kg) and SA (3.3 mg/kg).

Green area shows therapeutic area.

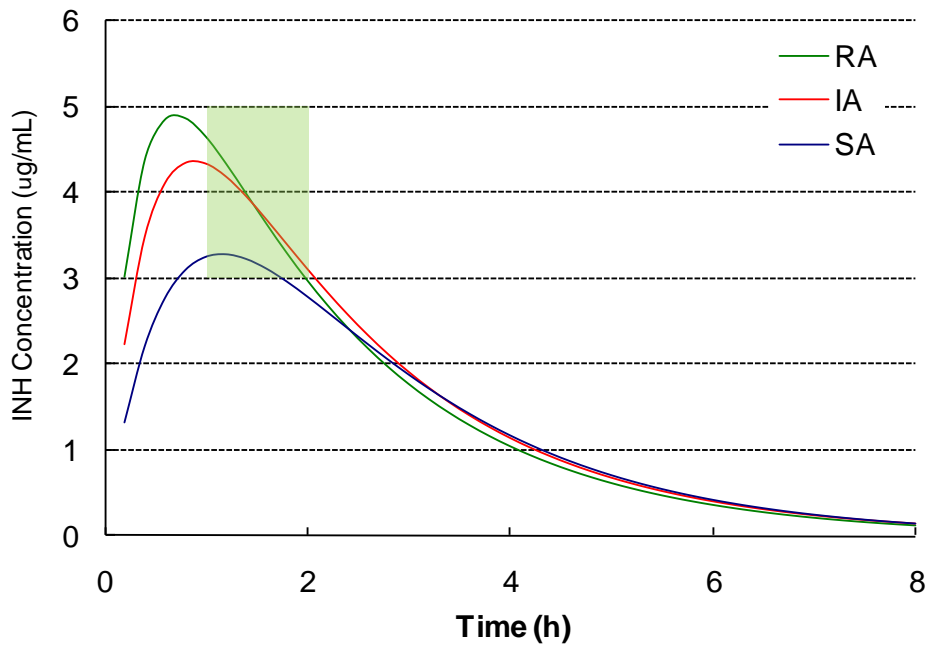


Fig.2-12 Estimated Serum INH concentration versus time curves in RA (7.3 mg/kg), IA (5 mg/kg) and SA (2.8 mg/kg).

Green area shows therapeutic area.

## 考察

抗結核薬において重要な役割を占める INH は、日本結核病学会の指針に従い、全ての患者に対し画一的に 5 mg/kg/day の投与量で投与されている。しかし、NAT2 SA においては INH の代謝が低下しており肝障害発現頻度が高まるため[18,20-24]、副作用発現リスク軽減を目的として投与量の減量が望まれている[86, 88]。また NAT2 RA においては INH の代謝が亢進しているため十分な治療効果が得られない可能性が示唆されており[86]、RA についても投与量を変更する必要性が考えられる。現在までに、NAT2 遺伝子多型を考慮した INH の投与量については、海外結核患者や少数健常人を対象とした報告はなされているが[86, 88, 89]、日本人結核患者を対象とした報告はほとんどないのが現状であり、NAT2 遺伝子多型を考慮した場合の INH の投与量は未だ確立されていない。そこで本章では、Non-linear Mixed Effect Model を用いて患者背景因子の INH 薬物動態に及ぼす影響の検討、ならびに NAT2 遺伝子多型を考慮した INH 至適投与量の探索を行った。

本章 第 1 節での NONMEM による INH の母集団薬物動態モデルを構築するにあたり、NAT2 表現型及び体重の要因を CL に組み込むことで、Base model に比べて CL の個体間変動が 54.5%から 29.9%に減少し、仮説検定において有意差が認められたこと(Table 2-4、2-6)、診断プロットより CWRES の分布幅が共変量の組み込みにより狭まり、より均一に分布したこと(Fig.2-4、2-6)、さらに bootstrap 法より得られた各パラメータの 95%信頼区間(Table 2-6)から安定したモデルであることを踏まえ、今回得られた INH の母集団薬物動態モデルの正当性が示唆された。Final Model について inter-individual variability と各共変量との相関を検討したところ、Base Model で確認されたような CL/F への共変量の有意な影響は認められなかった (Fig.2-5、Fig.2-7)。Final Model におけるリファンピシン併用の有無の影響が視覚的に確認されたが、統計学的には有意でないこと、また薬物動態学的側面から言えば、Amidase 誘導能を有する[67-69]リファンピシン併用群では CL/F は増加すると予想されたが、逆の傾向が認められたことからモデルへの組み込みは行わなかった。

年齢については、高齢者では個人差は大きいものの肝血流量が 20~50%低下することや代謝酵素の活性が低下することなどが報告されており[101]、高齢者における CL の低下が予想されたが、INH 薬物動態への影響は有意ではなかった。性差については、代謝過程において CYP 分子種である CYP2D6、2C19 および 3A4 などの活性に性差が影響することが報告されているが[102, 103]、現在までに NAT2 活性

と性差に関する報告はされておらず、本検討では若干男性の方が CL が高くなる傾向が認められたが、INH 薬物動態への有意な影響は認められなかった。

第 2 節にて INH の薬物動態学的観点から NAT2 遺伝子多型を考慮した INH の投与量の検討を行うにあたり、ヒトでの治療初期における結核菌に対する INH 活性の指標の一つである EBA (Early Bactericidal Activity) は AUC 及び投与 2 時間後の INH 血中濃度 (INH の Cmax は投与 1~2 時間後と言われており、すなわちこの報告では Cmax 近傍と考えられる) とよい相関を示すとする報告や [89, 104]、マウスでの結核菌に対する INH 殺菌活性は AUC 及び Cmax/MIC とよい相関を示すという報告から [105]、本検討では Cmax 及び AUC を指標として至適用量の探索を行った。① Cmax を参考にする場合には、Cmax 付近である投与 1~2 時間後における INH 血中濃度が 3~5 µg/mL を治療域とする報告に基づき [88, 89]、「治療域に平均予測血中濃度推移が入ると推定される投与量」を求めた。② AUC を参考にする場合には、現在汎用されている 5 mg/kg は IA に対して最適な投与量と考えられていることに加え [86, 88]、第 1 節で構築した PPK モデルにおいても、IA に 5 mg/kg を投与した場合の投与 1~2 時間後の予測血中濃度が INH の治療域 (3~5 µg/mL) に収まることが確認されたことから、「IA に 5 mg/kg を投与した場合に推測される AUC 値と同等の値が得られる投与量」を求めた。

RA においては、現在汎用されている 5 mg/kg では AUC や EBA の観点から投与量が不十分であるとする報告や [86, 88, 89]、同様に本検討においてもこの投与量では投与 2 時間後の濃度が治療域を下回ることが示唆されたことから、5 mg/kg では十分な治療効果が得られない可能性が考えられた。結核治療において十分な治療効果が得られない場合、治療期間の長期化や耐性結核菌出現が懸念されるため、有用な薬剤が限られている結核治療に大きな支障をきたすことが予想される。本検討より RA における INH の最適な投与量を①の手法で検討した結果、7.5 mg/kg を投与することで平均予測血中濃度推移が治療域内に収まると推定された。さらに、②の手法では、IA と同等の AUC を得るためには 7.3 mg/kg が妥当であると考えられた。一方で、SA においては本検討より、現在汎用されている 5 mg/kg/day では AUC が IA と比べ 168% の増加を示し、かつ治療域を上回ることが考えられ、現在の投与量では過量投与となり肝障害発現リスクが高まる可能性が示唆された。また他の報告においても、日本人結核患者における肝障害の相対危険度が SA では IA と比べ 7.0 (95%信頼区間 1.9-6.1)、RA と比べ 28.0 (95%信頼区間 26.0-30.0) となり、筆者らは、SA での肝障害発現リスク軽減の観点から INH 投与前の NAT2 遺伝子多型解析が臨床上重要であると結論づけている [23]。結核治療において肝障害が生じた

場合、それに対する有効な薬剤が存在せず、その重症度に応じ抗結核薬が減量または中止となるため、上記の RA 同様、治療期間の長期化や耐性結核菌出現が懸念され、SA では有効性を損なわない範囲で投与量を減量し肝障害発現リスクを軽減させることが今後の結核対策を考える上で重要である。①による手法による検討では、3.3 mg/kg を投与することで平均予測血中濃度推移が治療域内に収まると推定された。さらに、②の手法では、IA と同等の AUC を得るためには 2.8 mg/kg が妥当であると考えられた。SA に 2.8 mg/kg を投与したときの濃度推移を推定したところ、投与後 2 時間値は 3 µg/mL をわずかに下回ったが、SA では消失が遅いために AUC に対する投与後 2 時間以降の寄与が大きいため、SA の AUC を IA と合わせるために投与後 2 時間値が低くなったと考えられた。また、現在までに南アフリカ人及び Caucasian における NAT2 遺伝子多型を考慮した SA の投与量の報告では、EBA または AUC を基準に解析を行った結果、それぞれ 3.0 および 2.5 mg/kg が最適な投与量と結論づけており、本研究の結果と一致している[88, 89]。我々の結論は日本人結核患者における INH 投与設計のための指標として役立つことを期待する。

最後に、結核対策の要は、確実な 6 ヶ月間の抗結核薬（前半 2 ヶ月：INH、RFP 及び PZA に加え EB または SM、後半 4 ヶ月：INH、RFP に加え EB または SM）の内服継続にあり、WHO でも「治療こそが最善の予防」と述べており、我が国においても DOTS という方針のもと結核対策に力を入れている。さらに我が国では、2002 年厚生労働省が治療中断リスクの高い患者の服薬確認は原則毎日、服薬支援が必要な患者では服薬確認を週 1~2 回以上、それ以外の場合は服薬確認を月 1~2 回とし、地域 DOTS の実施を推進するように提言している。しかしながら、マンパワーやインフラ及び経済的な問題から、服薬確認を対面で行うことは現実には非常に困難である。そのため、欧米で広く行われている抗結核薬間欠投与にならない抗結核薬の隔日投与を行うことで、確実な対面服薬が可能となり、結核治癒率に改善が認められるか検討がなされている[87, 90, 91]。しかし、INH の薬物動態や有効性、副作用発現頻度は NAT2 遺伝子多型の影響を大きく受けるため、その投与量および投与間隔の設定には NAT2 遺伝子多型の考慮が必須であると考えられる。今回の大規模かつ日本人結核患者群より得られたデータで構築された母集団薬物動態モデルは間欠投与の設計にも有効であり、本研究が従来の用法・用量の最適化の指標となると共に、DOTS の効率を上げ治療成績の改善につながることを期待される間欠投与計画においても有益な情報を提供することができると期待している。

## 小括

NAT2 Phenotype 及び体重が有意な共変量として PPK モデルに組み込まれた。

PPK モデルより個別推定されたクリアランスの平均値は RA、IA 及び SA でそれぞれ 0.56、0.38 及び 0.23 L/h/kg であり、SA では RA の半分以下の値であった。

得られた個別 CL より推定された平均 AUC は RA、IA 及び SA でそれぞれ 9.16、13.48 及び 22.61  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$  であり、SA で高値を示した。

INH の治療域及び PPK モデルから推定された AUC を用いて至適投与量の探索を行ったところ、SA では 2.8~3.3 mg/kg、RA では 7.3~7.5 mg/kg の投与量が適切であることが示唆された。

## 総括

NAT2 遺伝子多型の INH 薬物動態への強い影響が認められた。

NAT2 の SA 群では ALT/AST 上昇の発現が高率となる傾向が認められた。

INH 治療域及び AUC を指標として至適用量の探索を行ったところ、SA では 3.0(2.8 ~ 3.3)mg/kg への減量、RA では 7.5(7.3 ~ 7.5) mg/kg への増量の必要性が示唆された。なお、IA については従来 of 投与量(5 mg/kg)により C<sub>max</sub> 付近の濃度が治療域に納まることが予測濃度推移より確認された。

## 試薬・機器一覧

### 試薬

- ・ QIAamp® DNA Blood MiniKit (QIAGEN)
  - ・ Ethanol (Wako)
  - ・ puRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham Biosciences)
  - ・ Primer (SIGMA Genosys Japan)
- |             |                                      |           |
|-------------|--------------------------------------|-----------|
| NAT2 N5     | 5'-TCA GCC TCA GGT GCC TTG CA-3'     | Tm=71.8°C |
| NAT2 N4     | 5'-AGC ATG AAT CAC TCT GCT TC-3'     | Tm=59.6°C |
| CYP2E1 R S1 | 5'-CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA-3'    | Tm=60.3°C |
| CYP2E1 R A1 | 5'-TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG-3'    | Tm=56.0°C |
| CYP2E1 D S1 | 5'-AGT CGA CAT GTG ATG GAT CCA-3'    | Tm=65.4°C |
| CYP2E1 D A1 | 5'-GAC AGG GTT TCA TCA TGT TGG-3'    | Tm=64.1°C |
| GSTM1 S1    | 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'  | Tm=62.1°C |
| GSTM1 A1    | 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'  | Tm=66.0°C |
| GSTT1 S1    | 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3' | Tm=63.2°C |
| GSTT1 A1    | 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'     | Tm=74.5°C |
| β-globin S1 | 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'     | Tm=63.0°C |
| β-globin A1 | 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'     | Tm=60.3°C |
- ・ QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN)
  - ・ Kpn I (TakaRa)
  - ・ Taq I (TakaRa)
  - ・ BamH I (TakaRa)
  - ・ Rsa I (TakaRa)
  - ・ Dra I (TakaRa)
  - ・ 6×Loading buffer (TakaRa)
  - ・ AGAROSE D-1 LOW EEO (CONDA)
  - ・ Trizma® base (SIGMA)
  - ・ Acetic acid (Wako)
  - ・ 2NA(EDTA·2NA) (Dojindo)
  - ・ 100 bp DNA Ladder (TakaRa)
  - ・ Ethidium bromide (Wako)
  - ・ Isonicotinohydrazine (Wako)

- Acetylisoniazid (本研究室にて合成)
- Hydrazinium Sulfate (Wako)
- Rifampicin (Wako)
- Trichloroacetic acid (SIGMA)
- Trans-cinnamaldehyde (東京化成)
- Methanol (Wako)
- Hydrochloric acid (Wako)
- Acetonitrile (Wako)
- 2-Propanol (Wako)
- Potassium Phosphate, Monobasic (Wako)
- Sodium acetate trihydrate (SIGMA)

#### 機器

- MX-300 (TOMY)
- PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa)
- ZYMOREACTOR II AB-1820 (ATTO)
- Mupid® α (ADVANCE)
- NANOSPACE SI-1 (SHISEIDO)
- NANOSPACE SI-2 (SHISEIDO)
- CAPCELL PAK C18 UG120 (1.5 mm I.D.×250 mm, 5 μm) (SHISEIDO)
- CAPCELL MF Ph-1 (4.0×10 mm) (SHISEIDO)
- Discovery® HS PEG (4.6 mm I.D.×150 mm, 5 μm) (SPELCO)

## 参考文献

- [1] Lazarou, J., Pomeranz, B.H., Corey, P.N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*. 279: 1200-1205, 1998.
- [2] オーダーメイド医療実現化プロジェクト <http://biobankjp.org>
- [3] Guidance for Industry -Pharmacogenomic Data Submissions-
- [4] 「ICH E15: ゲノム薬理学における用語集(案)」に関するご意見・情報の募集について. 2007.
- [5] Evans, W.E., Relling, M.V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 286: 487-491, 1999.
- [6] Upton, A., Johnson, N., Sandy, J., Sim, E. Arylamine N-acetyltransferases of mice, men and microorganisms. *Trends Pharmacol.Sci.* 22: 140-146, 2001.
- [7] 結核の統計 2006 を読む [jata.or.jp/rit/rj/data\\_tp.html](http://jata.or.jp/rit/rj/data_tp.html)
- [8] 第 9 回 WHO 結核対策年次報告概要 [jata.or.jp/rit/rj/2005whotbc.odf](http://jata.or.jp/rit/rj/2005whotbc.odf)
- [9] [http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1107/h0726-2\\_11.html](http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1107/h0726-2_11.html)
- [10] 厚生労働省: 平成 22 年結核登録者情報調査年報集計結果 (概況) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou03/10.html>
- [11] Dye, C., Espinal, M.A., Watt, C.J., Mbiaga, C., Williams, B.G. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 185: 1197-1202, 2002.
- [12] Shimizu, Y., Dobashi, K., Mita, Y., Endou, K. DNA microarray genotyping of N-acetyltransferase 2 polymorphism using carbodiimide as the linker for assessment of isoniazid hepatotoxicity. *Tuberculosis (Edinb)*. 86: 374-381, 2006.
- [13] イスコチン<sup>®</sup>錠インタビューフォーム 2007 年 4 月改訂(第 6 版)
- [14] 厚生労働省: 第 3 回結核医療に関する検討小委員会資料
- [15] Schaberg, T., Rebhan, K., Lode, H. Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. *Eur.Respir.J.* 9: 2026-2030, 1996.
- [16] <http://biotech.nikkeibp.co.jp/kiji.jsp?kiji=33>
- [17] Chen, B., Li, J.H., Xu, Y.M., Wang, J., Cao, X.M. The influence of NAT2

- genotypes on the plasma concentration of isoniazid and acetylisoniazid in Chinese pulmonary tuberculosis patients. *Clin.Chim.Acta.* 365: 104-108, 2006.
- [18] Hiratsuka, M., Kishikawa, Y., Takekuma, Y., Matsuura, M. Genotyping of the N-acetyltransferase2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients. *Drug Metab.Pharmacokinet.* 17: 357-362, 2002.
- [19] Kita, T., Tanigawara, Y., Chikazawa, S., Hatanaka, H. N-Acetyltransferase2 genotype correlated with isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients. *Biol.Pharm.Bull.* 24: 544-549, 2001.
- [20] Possuelo, L.G., Castelan, J.A., de Brito, T.C., Ribeiro, A.W. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 64: 673-681, 2008.
- [21] Cho, H.J., Koh, W.J., Ryu, Y.J., Ki, C.S. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 87: 551-556, 2007.
- [22] Huang, Y.S., Chern, H.D., Su, W.J., Wu, J.C. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology.* 35: 883-889, 2002.
- [23] Ohno, M., Yamaguchi, I., Yamamoto, I., Fukuda, T. Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* 4: 256-261, 2000.
- [24] Pande, J.N., Singh, S.P., Khilnani, G.C., Khilnani, S., Tandon, R.K. Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. *Thorax.* 51: 132-136, 1996.
- [25] Vuilleumier, N., Rossier, M.F., Chiappe, A., Degoumois, F. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 62: 423-429, 2006.
- [26] Huang, Y.S., Chern, H.D., Su, W.J., Wu, J.C. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology.* 37: 924-930, 2003.
- [27] Roy, B., Chowdhury, A., Kundu, S., Santra, A., et al. Increased risk of

- antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 'null' mutation. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 16: 1033-1037, 2001.
- [28] HUGHES, H.B. On the metabolic fate of isoniazid. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 109: 444-452, 1953.
- [29] Timbrell, J.A., Mitchell, J.R., Snodgrass, W.R., Nelson, S.D. Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism in vivo. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 213: 364-369, 1980.
- [30] Mitchell, J.R., Zimmerman, H.J., Ishak, K.G., Thorgeirsson, U.P. Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Ann.Intern.Med.* 84: 181-192, 1976.
- [31] Tafazoli, S., Mashregi, M., O'Brien, P.J. Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte inflammation model. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 229: 94-101, 2008.
- [32] Richards, V.E., Chau, B., White, M.R., McQueen, C.A. Hepatic gene expression and lipid homeostasis in C57BL/6 mice exposed to hydrazine or acetylhydrazine. *Toxicol.Sci.* 82: 318-332, 2004.
- [33] Yue, J., Peng, R.X., Yang, J., Kong, R., Liu, J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol.Sin.* 25: 699-704, 2004.
- [34] Attri, S., Rana, S.V., Vaiphei, K., Sodhi, C.P. Isoniazid- and rifampicin-induced oxidative hepatic injury-protection by N-acetylcysteine. *Hum.Exp.Toxicol.* 19: 517-522, 2000.
- [35] Sarich, T.C., Adams, S.P., Petricca, G., Wright, J.M. Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pretreatment with an amidase inhibitor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 289: 695-702, 1999.
- [36] 野田敦子. イソニアジド肝障害と代謝物ヒドラジン - ヒドラジン由来の活性中間代謝物 -. *薬物動態.* 4: 83-93, 1989.
- [37] Hickman, D., Risch, A., Buckle, V., Spurr, N.K. Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *Biochem.J.* 297 ( Pt 3): 441-445, 1994.
- [38] <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>
- [39] Deguchi, T. Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine

- N-acetyltransferase of human liver. *J.Biol.Chem.* 267: 18140-18147, 1992.
- [40] 喜多知子, 柴田敏之, 奥山勝彦. 薬物代謝酵素の遺伝子多型と薬物動態(4) アセチル化酵素. *月刊薬事* 42: 872-880, 2000.
- [41] Butcher, N.J., Boukouvala, S., Sim, E., Minchin, R.F. Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacogenomics J.* 2: 30-42, 2002.
- [42] Parkin, D.P., Vandenplas, S., Botha, F.J., Vandenplas, M.L. Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 155: 1717-1722, 1997.
- [43] Cascorbi, I., Drakoulis, N., Brockmoller, J., Maurer, A. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am.J.Hum.Genet.* 57: 581-592, 1995.
- [44] Deguchi, T., Mashimo, M., Suzuki, T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J.Biol.Chem.* 265: 12757-12760, 1990.
- [45] Mashimo, M., Suzuki, T., Abe, M., Deguchi, T. Molecular genotyping of N-acetylation polymorphism to predict phenotype. *Hum.Genet.* 90: 139-143, 1992.
- [46] Ait Moussa, L., Khassouani, C.E., Hue, B., Jana, M. Determination of the acetylator phenotype in Moroccan tuberculosis patients using isoniazid as metabolic probe. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* 40: 548-553, 2002.
- [47] Smith, C.A., Wadelius, M., Gough, A.C., Harrison, D.J. A simplified assay for the arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism validated by phenotyping with isoniazid. *J.Med.Genet.* 34: 758-760, 1997.
- [48] Lee, S.Y., Lee, K.A., Ki, C.S., Kwon, O.J. Complete sequencing of a genetic polymorphism in NAT2 in the Korean population. *Clin.Chem.* 48: 775-777, 2002.
- [49] Tanaka, E. Update: genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes in humans. *J.Clin.Pharm.Ther.* 24: 323-329, 1999.
- [50] <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.html>
- [51] Bolt, H.M., Roos, P.H., Thier, R. The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.*

- 76: 174-185, 2003.
- [52] Wu, M.S., Chen, C.J., Lin, M.T., Wang, H.P., et al. Genetic polymorphisms of cytochrome p450 2E1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to gastric carcinoma in Taiwan. *Int.J.Colorectal Dis.* 17: 338-343, 2002.
- [53] Hildesheim, A., Anderson, L.M., Chen, C.J., Cheng, Y.J. CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J.Natl.Cancer Inst.* 89: 1207-1212, 1997.
- [54] Persson, I., Johansson, I., Bergling, H., Dahl, M.L. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett.* 319: 207-211, 1993.
- [55] Uematsu, F., Kikuchi, H., Motomiya, M., Abe, T. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn.J.Cancer Res.* 82: 254-256, 1991.
- [56] Hayashi, S., Watanabe, J., Kawajiri, K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J.Biochem.* 110: 559-565, 1991.
- [57] Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., Fryer, A.A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat.Res.* 482: 21-26, 2001.
- [58] 澤田康文. 薬物動態 作用と遺伝子多型 薬物治療の患者個別化を目指した 21世紀の新展開, 医療ジャーナル社, 2001.
- [62] Seifart, H.I., Gent, W.L., Parkin, D.P., van Jaarsveld, P.P., Donald, P.R. High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, acetylisoniazid and hydrazine in biological fluids. *J.Chromatogr.B.Biomed.Appl.* 674: 269-275, 1995.
- [60] Mitchell JR, Thorgeirsson UN, Black M. Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydrazine metabolites. *Clin Pharmacol Ther.* 18: 70-9, 1975.
- [61] Lauterburg BH, Smith CV, Todd EL. Pharmacokinetics of the toxic hydrazino metabolites formed from isoniazid in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 235: 566-70, 1985.
- [62] Gurumurthy P. Krishnamurthy MS. Nazareth O. Lack of relationship

- between hepatic toxicity and acetylator phenotype in three thousand South Indian patients during treatment with isoniazid for tuberculosis. *Am rev respire Dis.* 129: 58-61, 1984.
- [63] Singh J, Grg AP, Thakur VS. Ntitubercular treatment induced hepatotoxicity: Dose acetylator status matter?. *Indian J Physiol Pharmacol.* 39: 43-6, 1995.
- [64] Noda A, Hsu KY, Noda H. Is isoniazid-Hepatotoxicity Induced by the Metabolite, hydrazine? *J UOEH.* 5: 183-90, 1983.
- [65] Huang W, Su Y, Huang C. Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)H : quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. *J Hepato.* 47: 128-34, 2007.
- [66] Leiro V, Villar AF, Valverde D. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liv Int.* 28: 835-9, 2008.
- [67] 安永実沙, 大野雅子, 森崎智子, 渡邊麻里子, 初山邦男, 山本勇, 東純一. リファンピシンによるアミダーゼ誘導がイソニアジドの肝障害を誘発する. *臨床薬理.* 3: 407S-408S, 2002.
- [68] Askgaard, D.S., Wilcke, T., Dossing, M. Hepatotoxicity caused by the combined action of isoniazid and rifampicin. *Thorax.* 50: 213-214, 1995.
- [69] Sarma, G.R., Immanuel, C., Kailasam, S., Narayana, A.S., Venkatesan, P. Rifampin-induced release of hydrazine from isoniazid. A possible cause of hepatitis during treatment of tuberculosis with regimens containing isoniazid and rifampin. *Am.Rev.Respir.Dis.* 133: 1072-1075, 1986.
- [70] Watanabe, J., Hayashi, S., Nakachi, K., Imai, K. PstI and RsaI RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 7194, 1990.
- [71] Hayashi, S., Watanabe, J., Kawajiri, K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J.Biochem.* 110: 559-565, 1991.
- [72] Fukino, K., Hashimoto, M., Kato, K., Negishi, E. Analysis between Clinical Efficacy of Salazosulfapyridine and Plasma Concentrations of Sulfapyridine in Patients with Rheumatoid Arthritis.

- Jpn.J.Ther.Drug.Monit. 24: 113-121, 2007.
- [73] Kumagai, S., Komada, F., Kita, T., Morinobu, A. N-acetyltransferase 2 genotype-related efficacy of sulfasalazine in patients with rheumatoid arthritis. *Pharm.Res.* 21: 324-329, 2004.
- [74] Komiya, Y., Tsukino, H., Nakao, H., Kuroda, Y. Human glutathione S-transferase A1, T1, M1, and P1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 131: 238-242, 2005.
- [75] Fukino, K., Sasaki, Y., Hirai, S., Nakamura, T. Effects of N-acetyltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 and Glutathione-S-transferase (GST) genotypes on the serum concentrations of isoniazid and metabolites in tuberculosis patients. *J.Toxicol.Sci.* 33: 187-195, 2008.
- [76] Uematsu, F., Ikawa, S., Kikuchi, H., Sagami, I. Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics.* 4: 58-63, 1994.
- [77] Fernandez-Villar, A., Sopena, B., Fernandez-Villar, J., Vazquez-Gallardo, R. The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* 8: 1499-1505, 2004.
- [78] Devoto, F.M., Gonzalez, C., Iannantuono, R., Serra, H.A. Risk factors for hepatotoxicity induced by antituberculosis drugs. *Acta Physiol.Pharmacol.Ther.Latinoam.* 47: 197-202, 1997.
- [79] Powell, H., Kitteringham, N.R., Pirmohamed, M., Smith, D.A., Park, B.K. Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: assessment by mRNA, genotype and phenotype. *Pharmacogenetics.* 8: 411-421, 1998.
- [80] Lucas, D., Menez, C., Girre, C., Berthou, F. Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics.* 5: 298-304, 1995.
- [81] Madan, A., Graham, R.A., Carroll, K.M., Mudra, D.R. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab.Dispos.* 31: 421-431, 2003.
- [82] 林正弘, 谷川原祐介 : 生物薬剤学, 南江堂, 2001.
- [83] Augustynowicz-Kopec, E., Zwolska, Z. Bioavailability factors of isoniazid in

- fast and slow acetylators, healthy volunteers. *Acta Pol.Pharm.* 59: 452-457, 2002.
- [84] Augustynowicz-Kopec, E., Zwolska, Z., Niemirowska-Mikulska, H. Bioavailability of isoniazid in healthy volunteers--fast and slow INH acetylators. *Pneumonol.Alergol.Pol.* 70: 167-179, 2002.
- [85] Peloquin, C.A., Jaresko, G.S., Yong, C.L., Keung, A.C. Population pharmacokinetic modeling of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide. *Antimicrob.Agents Chemother.* 41: 2670-2679, 1997.
- [86] Kubota, R., Ohno, M., Hasunuma, T., Iijima, H., Azuma, J. Dose-escalation study of isoniazid in healthy volunteers with the rapid acetylator genotype of arylamine N-acetyltransferase 2. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 63: 927-933, 2007.
- [87] 日本結核病学会治療委員会. 「結核医療の標準」の見直し 2008.
- [88] Kinzig-Schippers, M., Tomalik-Scharte, D., Jetter, A., Scheidel, B. Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize isoniazid doses?. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49: 1733-1738, 2005.
- [89] Donald, P.R., Parkin, D.P., Seifart, H.I., Schaaf, H.S. The influence of dose and N-acetyltransferase-2 (NAT2) genotype and phenotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of isoniazid. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 63: 633-639, 2007.
- [90] Wada, M., Okumura, M., Hoshino, H., Mitarai, S. Relapse rate of pulmonary tuberculosis within two years following completion of twice weekly intermittent chemotherapy. *Kekkaku.* 83: 353-358, 2008.
- [91] Wada, M., Mizoguchi, K., Okumura, M., Mitarai, S. Twice-weekly intermittent chemotherapy during the maintenance phase of the short-course treatment for new patients with pulmonary tuberculosis. *Kekkaku.* 81: 363-369, 2006.
- [92] 大橋京一, 藤村昭夫. 疾患からみた臨床薬理学 改訂2版. じほう, 2003.
- [93] 緒方宏泰、奥村勝彦：薬物血中濃度モニタリングのための Population Pharmacokinetics 入門. 薬事時報社, 1998.
- [94] 田中久：医薬品の開発 薬物動態評価とコンピュータ. 廣川書店, 1991.
- [95] 谷河賞彦、塩見真理、土綿慎一、小松完爾：医薬品開発ツールとしての母集団 PK-PD 解析. 朝倉書店, 2010.

- [96] Severini, T.A.: Likelihood Methods in Statistics, Oxford Statistical Science Series, No 22, 2000.
- [97] Andrew Hooker: Conditional weighted residuals, an improved model diagnostic for the FO/FOCE methods. PAGE 15 (2006) Abstr 1001, <http://www.page-meeting.org/?abstract=1001>
- [98] Parke, J., Holford, N.H., Charles, B.G. A procedure for generating bootstrap samples for the validation of nonlinear mixed-effects population models. *Comput. Methods Programs Biomed.* 59: 19-29, 1999.
- [99] Peloquin, C.A. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis. *Drugs.* 62: 2169-2183, 2002.
- [100] Peloquin, C.A. Using therapeutic drug monitoring to dose the antimycobacterial drugs. *Clin. Chest Med.* 18: 79-87, 1997.
- [101] 廣田豪, 樋口駿. 年齢・性差と薬物動態. *肝胆膵.* 51: 173-179, 2005.
- [102] Kinirons, M.T., O'Shea, D., Kim, R.B., Groopman, J.D. Failure of erythromycin breath test to correlate with midazolam clearance as a probe of cytochrome P4503A. *Clin. Pharmacol. Ther.* 66: 224-231, 1999.
- [103] Tamminga, W.J., Wemer, J., Oosterhuis, B., Weiling, J. CYP2D6 and CYP2C19 activity in a large population of Dutch healthy volunteers: indications for oral contraceptive-related gender differences. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 55: 177-184, 1999.
- [104] Donald, P.R., Sirgel, F.A., Venter, A., Parkin, D.P. The influence of human N-acetyltransferase genotype on the early bactericidal activity of isoniazid. *Clin. Infect. Dis.* 39: 1425-1430, 2004.
- [105] Jayaram, R., Shandil, R.K., Gaonkar, S., Kaur, P. Isoniazid pharmacokinetics-pharmacodynamics in an aerosol infection model of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2951-2957, 2004.

## 論文目録

本学位論文の内容は下記の発表論文による。

1. 佐々木結花、山岸文雄、川崎剛、志村龍飛、水野里子、藤川文子、上野光一、平井成和、生城山克巳、曾束貴代、中村高行：肺結核治療における肝障害と INH 代謝。国立医療学会誌「医療」63 (5)、312-320 (2009)

2. Takayo Sotsuka, Yuka Sasaki, Shigekazu Hirai, Fumio Yamagishi and Koichi Ueno: Association of Isoniazid-metabolizing Enzyme Genotypes and Isoniazid-induced Hepato- toxicity in Tuberculosis Patients. *in vivo* 25, 803-812 (2011)

## 謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 高齢者薬剤学研究室 上野光一教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究において御指導、御助言を賜りました山浦克典講師、佐藤洋美助教に謹んで感謝致します。

本研究の遂行に際し、多大なる御協力と貴重な御助言を頂きました国立病院機構千葉東病院 院長 山岸文雄先生、第三診療部長 佐々木結花先生（現 JR 東日本健康推進センター 呼吸器科部長）ならびに八木毅典医師に心より感謝致します。更に、貴重なサンプルの採取にご協力頂きました看護部職員の皆様に深謝いたします。

また、本研究の意義を御理解頂き、貴重なサンプルを提供して下さいました患者様に心より感謝致します。

本研究に対し、御協力と御助言を頂きました高齢者薬剤学研究室の平井成和修士、中山典幸修士ならびに在校生の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究の審査に際し、貴重なご意見とご鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 佐藤信範教授、堀江利治教授ならびに関根祐子教授に謹んで深謝いたします。

最後に、常に心の支えとなり温かく見守ってくれた両親、弟、祖母、叔母、そしてその笑顔でいつも力を与えてくれる娘に心より感謝を述べて、私の謝辞とかえさせていただきます。

2012年2月17日

曾束 貴代

## 審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 佐藤 信範

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 堀江 利治

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 関根 祐子