

熊本大学学位論文

個別化医療の実現に向けた薬理遺伝学的検討

～抗てんかん薬治療と気道障害予防～

2008年3月

熊本大学大学院 薬学教育部 生命薬科学専攻 薬物治療学分野

瀬尾享志

Pharmacogenomic approach to improve personalized medicine and health care
– Antiepileptic drug therapy and prevention of airway disease –

Takayuki Seo

Pharmacogenomic approach to improve personalized medicine and health care – Antiepileptic drug therapy and the prevention of airway disease –

Takayuki Seo

The field of pharmacogenetics has now celebrated its 50th anniversary. Although science has delivered an impressive amount of information during those years, the field of pharmacogenetics/genomics has suffered due to a lack of sufficient integration into clinical practice. Indeed, commercially available pharmacogenomic tests have been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in recent years, but their application in patient care remains very limited. One reason for this is a shortage of clinical evidence regarding the direct impact of pharmacogenetics/genomics on healthcare.

Therefore, this study demonstrated the clinical impact of genetic polymorphisms on both antiepileptic drug (AED) therapy and the susceptibility to airway injury.

1) Pharmacogenomic study for antiepileptic drug therapy

The major clinical problem in epilepsy is that approximately 30% of such patients are AED-resistant, which is likely to be multifactorial in nature. In order to break through the trial-and-error approach that currently is associated with AED treatment, the performance of pharmacodynamic studies is thus considered to be imperative. In this chapter, we investigated the clinical impact of genetic polymorphisms on the efficacy and adverse effects of AED treatment as well as pharmacokinetics of AEDs, while taking the physiological, pathological and environmental factors of each subjects into careful considerations.

1-1) Study on the polymorphisms of drug metabolizing enzymes

We first investigated the influence of *cytochrome P450 (CYP) 3A5**3 polymorphism on the carbamazepine (CBZ) pharmacokinetics in 144 Japanese epileptic patients using a nonlinear mixed effect modeling program. The CBZ oral clearance in patients with the *CYP3A5**3/*3 genotype was 8% higher than in those with the *CYP3A5**1/*1 or *CYP3A5**1/*3 genotype. This finding suggested that the *CYP3A5**3 polymorphism is not a clinically important determinant in regard to the CBZ metabolism, while the relevance of this polymorphism to the clinical outcome may depend on the substrates.

We next evaluated the influence of the *CYP2C19* genotypes on the clobazam (CLB) therapy in 110 patients. The mean value of an active metabolite concentration, namely N-desmethyloclobazam (N-CLB), was 9 times higher in poor metabolizers (PMs) than in homozygous extensive metabolizer (EMs); and the responder rate was also significantly higher in PMs than in EMs (65.2% vs. 33.3%). On the other hand, the *CYP2C19* genotypes were not associated with the frequencies of tolerance and adverse reactions. In addition, the N-CLB concentrations were 36 times higher than the CLB concentrations in PMs. Therefore, N-CLB could substantially contribute to the clinical efficacy in CLB therapy.

1-2) Study on the polymorphisms of drug transporters

The up-regulation of drug efflux transporters, such as P-glycoprotein (ATP-binding cassette B1: ABCB1) and ABCC2, in the blood-brain barrier have been suggested to be a mechanism underlying AED-resistant epilepsy. We therefore investigated the association between the *ABCB1* polymorphisms and AED responsiveness or CBZ pharmacokinetics in 210 epileptic patients.

Drug-resistant patients were more likely to have the TT genotype at G2677T/A (adjusted odds ratio, 95% confidence interval; 3.4, 1.0–11.7) and at C3435T (3.6, 1.2–11.4). The frequency of the TTT haplotype at C1236T, G2677T/A and C3435T was significantly higher (1.8, 1.0–3.3); and the CGC/CGC diplotype were lower (0.1, 0.01–0.9) in drug-resistant patients than in drug-responsive patients. None of the polymorphisms affected the CBZ pharmacokinetics. Therefore, *ABCB1* polymorphisms may influence the AED responsiveness without inducing significant changes in the plasma concentrations of CBZ. These findings were the inverse of those reported on European epileptics, therefore, the influence of *ABCB1* polymorphisms on the P-glycoprotein activity may vary among races. In addition, the association between the *ABCC2* polymorphisms and AED responsiveness in 279 epileptic patients was investigated, but no association was observed.

2) Pharmacogenomic study for airway injury among Canadian grain workers

The pathogenesis of lung diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), is tightly linked to exposure to environmental chemicals, most notably tobacco smoke. Therefore, interindividual differences in the *in situ* activation and inactivation of chemical toxicants may contribute to the risk of developing COPD. In this chapter, we investigated the association between *CYP3A5**3 and *paraoxonase-1* (*PON1*) Q192R polymorphisms and the lung function of male Canadian grain workers, while focusing on gene-environment interactions.

Effects of *CYP3A5* polymorphism: The annual decline rate of the forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) in current smokers was greater among the *CYP3A5**1/*3 carriers than the *CYP3A5**3/*3 carriers (-48.7 ± 16.4 vs. -31.5 ± 4.7 mL/yr), and the incidences of chronic cough and COPD in current smokers were also higher among the *CYP3A5**1/*3 carriers than the *CYP3A5**3/*3 carriers (42.9% vs. 17.4% and 28.6% vs. 17.4%, respectively). These results suggested that *CYP3A5**1 may therefore be a novel genetic risk factor for airway injury in smokers and that *CYP3A5* may play a role in airway injury due to the bioactivation of chemicals in tobacco smoke. Inversely, the annual decline rate of FEV₁ in non-smokers was observed to be smaller among the *CYP3A5**1/*3 carriers than among the *CYP3A5**3/*3 carriers (-16.8 ± 8.5 vs. -25.7 ± 3.2 mL/yr). This result suggested that *CYP3A5* may play a protective role in the airways of non-smokers.

Effects of the *PON1* Q192R polymorphism: The annual decline rate of FEV₁ per forced vital capacity in current smokers was greater among the R allele carriers than among non-carriers (-0.58 ± 0.05 vs. -0.35 ± 0.04 %/yr). The incidences of chronic cough and COPD in current smokers were higher also among the R allele carriers than among non-carriers (33.3% vs. 15.6% and 29.2% vs. 9.4%, respectively). These results suggested that *PON1* may therefore play a protective role in the airways against the toxicity of cigarette smoke, and the R allele may thus be a novel genetic risk factor for airway injury.

The ubiquitous expression of drug metabolizing enzymes indicates that they may play a physiological role in protecting the tissues and organs from endogenous and environmental toxicants. Consequently, their polymorphisms may modify the occurrence and/or progression of other diseases besides COPD.

Pharmacogenomics promises the possibility of performing more personalized medicine in conjunction with individualized health promotion in near future. However, several challenges remain for clinical pharmacologist in order to effectively bring the field of pharmacogenomics into the daily clinical practice of medicine.

略語表

本論文において、次の略語を使用した。

6-MP	: 6-mercaptopurine	N-CLB	: N-desmethyloclobazam
AAT	: α 1-antitrypsin	NONMEM	: nonlinear mixed effect model
ABC	: ATP-binding cassette	OR	: odds ratio
ATP	: adenosine triphosphate	PB	: phenobarbital
ATS	: American Thoracic Society	PCR	: polymerase chain reaction
AUC	: area under curve	PD	: pharmacodynamics
BBB	: blood-brain barrier	P-gp	: P-glycoprotein
C/D	: concentration to the dose	PHT	: phenytoin
CBZ	: carbamazepine	PK	: pharmacokinetics
CI	: confidence interval	PM	: poor metabolizer
CL	: clearance	PON1	: paraoxonase-1
CLB	: clobazam	PPK	: population pharmacokinetics
COPD	: Chronic Obstructive Pulmonary Disease	QOL	: quality of life
CT	: computed tomography	RFLP	: restriction fragment length polymorphism
CYP	: cytochrome P450	RMSPE	: root mean squared prediction error
CZP	: clonazepam	RTLFL	: respiratory tract lining fluid
DOBF	: difference in objective function	SD	: standard deviation
FDA	: Food and Drug Administration	SE	: standard error
FEV ₁	: forced expiratory volume in the first second	SJS	: Stevens-Johnson syndrome
FVC	: forced vital capacity	SPE	: standardized prediction error
GDMSP	: Grain Dust Medical Surveillance Program	TDM	: therapeutic drug monitoring
GEE	: generalized estimating equations	TEN	: toxic epidermal necrolysis
GOLD	: Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease	TPMT	: thiopurine S-methyltransferase
HDL	: high density lipoprotein	UGT	: uridine diphosphate glucuronyltransferase
HLA	: human leukocyte antigen	Vd	: volume of distribution
ILAE	: International League against Epilepsy	VKORC1	: vitamin K epoxide reductase complex subunit 1
LDL	: low density lipoprotein	VPA	: valproic acid
mEH	: microsomal epoxide hydrolase	ZNS	: zonisamide
MPE	: mean prediction error	ヘテロEM	: heterozygous extensive metabolizer
MRI	: magnetic resonance imaging	ホモEM	: homozygous extensive metabolizer
MSPE	: mean squared prediction error		

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 抗てんかん薬治療における薬理遺伝学的検討	2
第 1 節 薬物代謝酵素の遺伝子多型に関する検討	2
第 1 項 CYP3A5 遺伝子多型が CBZ の体内動態に及ぼす影響	3
1-1 母集団薬物動態 (PPK) 解析	
1-2 妥当性の評価	
第 2 項 CYP2C19 遺伝子多型が CLB 治療に及ぼす影響	6
2-1 体内動態	
2-2 治療効果	
2-3 耐性発現	
2-4 副作用発現	
第 3 項 小括	13
第 2 節 薬物トランスポーターの遺伝子多型に関する検討	16
第 1 項 ABCB1 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響	17
1-1 遺伝子型の影響	
1-2 ハプロタイプ及びディプロタイプの影響	
1-3 CBZ の体内動態	
第 2 項 ABCC2 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響	24
2-1 遺伝子型の影響	
2-2 ハプロタイプ及びディプロタイプの影響	
2-3 精神遅滞との関係	
2-4 ビリルビン値に及ぼす影響	
第 3 項 小括	30
第 3 章 カナダ穀物取扱作業者の気道障害における薬理遺伝学的検討	33
第 1 項 喫煙及び職業性暴露と呼吸機能との関係	35
1-1 喫煙歴	
1-2 マスクの使用状況	
第 2 項 CYP3A5 遺伝子多型に関する検討	37
2-1 呼吸機能の比較	
2-2 呼吸機能に影響を与える因子の検討	
2-3 呼吸機能の年間減少率に与える影響	
2-4 慢性呼吸器症状及び COPD 頻度の比較	

第 3 項	<i>PON1</i> 遺伝子多型に関する検討	45
3-1	呼吸機能の比較	
3-2	呼吸機能に影響を与える因子の検討	
3-3	呼吸機能の年間減少率に与える影響	
3-4	慢性呼吸器症状及び COPD 頻度の比較	
第 4 項	小括	53
第 4 章	総括	56
第 5 章	方法の部	59
第 1 節	抗てんかん薬治療における薬理遺伝学的検討	59
第 1 項	対象	59
1-1	<i>CYP3A5</i> 遺伝子多型が CBZ 体内動態に及ぼす影響	
1-2	<i>CYP2C19</i> 遺伝子多型が CLB 治療に及ぼす影響	
1-3	<i>ABCB1</i> 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響	
1-4	<i>ABCC2</i> 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響	
第 2 項	データの収集及び試料の採取	62
2-1	データの収集	
2-2	試料の採取	
第 3 項	定義	63
3-1	てんかんの診断・分類・治療	
3-2	CLB 治療に対する有効性、耐性発現及び副作用発現	
3-3	抗てんかん薬に対する治療抵抗性	
第 4 項	母集団薬物動態解析	64
第 5 項	連鎖不平衡解析	65
第 6 項	統計解析	66
第 2 節	カナダ穀物取扱作業者の気道障害における薬理遺伝学的検討	67
第 1 項	対象及び研究デザイン	67
第 2 項	データの収集及び試料の採取	67
2-1	データの収集	
2-2	試料の採取	
第 3 項	統計解析	69
第 3 節	実験の部	71
謝辞		78
参考文献		80

第1章 緒言

薬理遺伝学は、1956年に Carson ら¹が、抗マラリア薬 primaquine の感受性と有害反応（溶血）の原因は glucose 6-phosphate dehydrogenase の遺伝的欠損であると報告したことに始まる。その後、1960年から90年代には cytochrome P450 (CYP) 2D6 や CYP2C9、CYP2C19、N-acetyltransferase 2、thiopurine S-methyltransferase (TPMT) など様々な薬物代謝酵素の遺伝子多型が薬物反応性の個体差の原因となることが報告され^{2,3}、薬物代謝酵素の遺伝子多型に基づいて患者を層別化する個別化薬物療法が注目された⁴⁻⁸。2004年以降、米国食品医薬品局（Food and Drug Administration : FDA）が 6-mercaptopurine (6-MP) 及び irinotecan による副作用回避のために、これらの薬物投与前にはそれぞれ TPMT 及び uridine diphosphate glucuronyltransferase (UGT) 1A1*28 の遺伝子多型を判定することを推奨し、添付文書にも記載された⁹⁻¹¹。さらに2007年8月には CYP2C9 または vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) の遺伝子多型を有する患者には warfarin の投与量を削減するように勧告し、遺伝子判定用キットを承認した^{11,12}。また、FDA は「Guidance for Industry : Pharmacogenomic Data Submissions」により医薬品開発への薬理遺伝学の利用を推奨している^{13,14}。

近年のゲノム科学の進歩により膨大な情報が蓄積され、薬物治療においては、トランスポーターやレセプターの研究も飛躍的に発展した¹⁵⁻¹⁸。しかしながら、基礎研究と臨床研究に結果の矛盾があり、さらに各臨床研究においても生理病態因子や環境因子、人種差などに伴う結果の不一致が存在することから^{19,20}、研究成果のごく一部しか臨床に還元されていないのが現状である。これらの問題を解決し、薬理遺伝学の臨床応用を拡大するためには、ヒト *in vivo* において、遺伝因子とその他の多様な因子を同時に考慮しながら、薬物動態 (pharmacokinetics ; PK) に止まらず、薬力学 (pharmacodynamics ; PD) に関する研究を行う必要がある^{8,20}。

本論文では上記の背景をもとに、薬理遺伝学の臨床応用に向けて、治療効果や有害反応を重視した抗てんかん薬治療に関する検討を行った。さらに、今後期待される個別化（疾病）予防への応用を目的として、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease : COPD）の発症と薬物代謝酵素の遺伝子多型との関係についても検討した。

第2章 抗てんかん薬治療における薬理遺伝学的検討

てんかんは「様々な原因による慢性の脳疾患で、大脳ニューロンの過剰な放電に由来する反復性の発作（てんかん発作）を主徴とし、様々な臨床症状と検査所見を伴う」と定義され²¹、人口の約0.6%が罹患する比較的頻度の高い神経疾患である²²。治療の原則は、抗てんかん薬による薬物治療であるが、抗てんかん薬が無効の治療抵抗性の患者が約3割存在し、臨床上大きな問題となっている²³⁻²⁵。また、抗てんかん薬の選択は発作型から決められ、try and error を繰り返しながら投与量を設定するいわゆる“さじ加減”に委ねられており、発作を抑制するまでに長期間を要し、有害反応も予見できない。さらに、多くの抗てんかん薬は治療有効域が狭く個体差も大きいため、通常 therapeutic drug monitoring (TDM) による管理が行われる²⁶。

2007年12月、FDAはcarbamazepine (CBZ) による中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis : TEN) や Stevens-Johnson syndrome (SJS) を含む皮膚の有害反応に関係する *human leukocyte antigen (HLA) -B*1502*²⁷⁻²⁹ を有する新規てんかん患者にはCBZの投与を避けるよう警告、添付文章にも記載された³⁰。てんかん治療における薬理遺伝学の応用は、初診時の抗てんかん薬の選択・投与量の設定を可能にし、迅速かつ安全で適切な治療の提供につながる。

第1節 薬物代謝酵素の遺伝子多型に関する検討

抗てんかん薬治療に影響を与えうる薬物代謝酵素の遺伝子多型は多数報告されているが、臨床的な意義が明らかなのはphenytoin (PHT) の体内動態や副作用における *CYP2C9*、*CYP2C19* 遺伝子多型の影響のみと言っても過言ではない^{31,32}。第2章／第1節では、世界中で広く用いられているCBZと日本では2000年に承認されたclobazam (CLB) に着目して検討を行った。

第 1 項 CYP3A5 遺伝子多型が CBZ の体内動態に及ぼす影響

CBZ は、部分発作や強直間代発作に対する第一選択薬として用いられるが、体内動態にはばらつきが大きく、治療有効域が 4~12 µg/mL と狭い³³。さらに、自己誘導を起こし、他の抗てんかん薬と併用することも多いため、慎重な投与設計が求められる^{33,34}。CBZ は主に CYP3A によって代謝されるが、2001 年に CYP3A5 のスプライシング異常を引き起こす CYP3A5*3 遺伝子多型が報告された³⁵。CYP3A5*3/*3 遺伝子型では肝臓の CYP3A5 蛋白が欠損するために、CYP3A 活性の個体差の原因の一つと考えられており^{35,36}、CBZ 体内動態に影響している可能性がある。そこで我々は、CYP3A5*3 遺伝子多型が CBZ の体内動態に及ぼす影響について検討した。

本項では、患者 144 例から得られた CBZ 血中濃度 561 測定点を用いて、非線形混合効果モデル (nonlinear mixed effect model : NONMEM) 法による母集団薬物動態解析 (population pharmacokinetics ; PPK) を行い、得られた結果の妥当性を評価した。CYP3A5*3 のアレル頻度は 72.9% で、9 例 (6.2%) が CYP3A5*1/*1、60 例 (41.7%) が CYP3A5*1/*3、75 例 (52.1%) が CYP3A5*3/*3 遺伝子型であった。遺伝子型頻度は Hardy-Weinberg 平衡を満たした ($P = 0.86$)。

1-1 母集団薬物動態 (PPK) 解析

まず、基本モデルに各固定効果を組み込むこと (増加法) で、CYP3A5 遺伝子型及び性別、年齢、体重、CBZ 投与量、併用薬 (valproic acid : VPA、PHT、phenobarbital : PB、zonisamide : ZNS、clonazepam : CZP、CLB) が CBZ の体内動態に与える影響を検討した。その結果、年齢と体重はクリアランス (clearance : CL) モデルを著しく改善したが (difference in objective function: DOBF > 10.83, $P < 0.001$)、強い相関を示したため ($R = 0.63$; $P < 0.001$)、完全モデルには体重を含めた。増加法においては、CYP3A5 遺伝子型及び CBZ 投与量、PHT と PB の併用が有意に CL モデルを改善し、体重が分布容積 (volume of distribution : Vd) モデルを改善した。

次に、増加法で有意にモデルを改善した固定効果を全て含めた完全モデルから、各固定効果を1つ除き、DOBFを求め、取り除いた固定効果の有意性を検討した(減少法)。CYP3A5遺伝子多型は、CYP3A5*1/*1遺伝子型に比べて、CYP3A5*1/*3遺伝子型では差を認めず、CYP3A5*3/*3遺伝子型でのみCLモデルを有意に改善した(Table 1)。最終モデルを式1、2に、母集団平均をTable 2に示す。

また、誤差モデルは、個体間変動には指数誤差モデル、個体内変動(残差変動)には比例誤差モデルが最適であった。

以下に示す最終モデル(式2)より、酵素を欠損するCYP3A5*3/*3遺伝子型ではCBZのCLが8%上昇し、PHT及びPBの併用によりCLがそれぞれ40%と21%上昇していた。

Table 1. A hypothesis to evaluate the CBZ CL and Vd model by eliminating the covariates from the full model

Hypothesis	DOBF*	P value	Conclusion
Did total body weight influence Vd?	15.5	< .001	Yes
Did total body weight influence CL?	9.8	< .005	Yes
Did daily CBZ dose influence CL?	211.2	< .001	Yes
Did coadministration of PHT influence CL?	30.9	< .001	Yes
Did coadministration of PB influence CL?	21.1	< .001	Yes
Did CYP3A5*1/*3 genotype influence CL?	0	> .05	No
Did CYP3A5*3/*3 genotype influence CL?	6.7	< .01	Yes

* Changes in DOBF of at least 6.6 ($P < 0.01$, $\chi^2 [df=1]$) were considered to be significant

最終モデル：

$$Vd/F (L) = 47.56 \times (BW/40)^{1.34} \quad (\text{式 1})$$

$$CL/F (L/hr) = 0.17 \times (BW/40)^{0.11} \times \text{Dose}^{0.45} \times 1.40^{\text{PHT}} \times 1.21^{\text{PB}} \times 1.08^{*3/*3} \quad (\text{式 2})$$

$$\left(\begin{array}{l} \text{BW : 体重 (kg)、Dose : CBZ 投与量 (mg/day)} \\ \text{PHT, PB : 併用有り = 1, 併用なし = 0} \\ \text{*3/*3 : CYP3A5*3/*3 = 1, CYP3A5*1/*1 or *1/*3 = 0} \end{array} \right)$$

Table 2. Final parameter estimates

Parameter	Meaning	Estimation	SE	95% CI
θ_{Vd0}	Coefficient for the whole formula on Vd	47.56	12.57	22.91 – 72.20
θ_{Vd1}	Power for total body weight on Vd	1.34	0.216	0.92 – 1.77
θ_{CL0}	Coefficient for the whole formula on CL	0.17	0.040	0.09 – 0.25
θ_{CL1}	Power for total body weight on CL	0.11	0.045	0.02 – 0.53
θ_{CL2}	Power for daily CBZ dose on CL	0.45	0.039	0.37 – 0.53
θ_{CL3}	Proportionality constant for PHT on CL	1.40	0.084	1.23 – 1.56
θ_{CL4}	Proportionality constant for PB on CL	1.21	0.052	1.11 – 1.32
θ_{CL5}	Proportionality constant for *3/*3 on CL	1.08	0.046	0.99 – 1.17
ω_{Vd}^2	interindividual variability of Vd	0.37	0.370	0 – 1.10
ω_{CL}^2	interindividual variability of CL	0.021	0.006	0.008 – 0.033
σ^2	Residual error variance	0.049	0.005	0.039 – 0.058

Model of Vd/F: $Vd / F = \theta_{Vd0} \times (BW/40)^{\theta_{Vd1}}$

Model of CL/F: $CL / F = \theta_{CL0} \times (BW/40)^{\theta_{CL1}} \times Dose^{\theta_{CL2}} \times \theta_{CL3}^{PHT} \times \theta_{CL4}^{PB} \times \theta_{CL5}^{*3/*3}$

1-2 妥当性の評価

NONMEM 法で得られた最終モデルの妥当性を得るために、Sheiner and Beal³⁷ 及び Vozeh ら³⁸の方法を用いて、32 症例の 69 測定点から評価を行った。予測の偏りの指標である mean prediction error (MPE) と、予測精度の指標である mean squared prediction error (MSPE)、root mean squared prediction error (RMSPE) は最終モデルで値が小さく、MPE の 95%信頼区間 (confidence interval : CI) は 0 を含んだ。また、standardized prediction error (SPE) の平均値は 0 に近く、95% CI は 0 を含んでおり、その標準偏差 (standard deviation : SD) は 1 に近かった。以上の結果より、最終モデルの妥当性を確認した。MPE、MSPE、RMSPE と SPE の平均値、標準偏差を Table 3 に示す。

Table 3. Prediction of errors established in the validation set by the basic and final models

	Basic model		Final model	
	Mean	95% CI	Mean	95% CI
MPE	0.50	-0.70 – 1.70	0.35	-0.10 – 0.79
MSPE	25.62	17.77 – 33.46	3.63	2.49 – 4.78
RMSPE	5.06	4.22 – 5.78	1.91	1.58 – 2.19
SPE				
Mean			0.19	-0.05 – 0.43
SD			1.02	

第2項 *CYP2C19* 遺伝子多型が CLB 治療に及ぼす影響

1,5-ベンゾジアゼピン系抗てんかん薬である CLB は、発作が抑制できない場合の併用薬として用いられ、様々な発作型に対して有効性が認められている³⁹⁻⁴¹。しかし、長期服用に伴う耐性の発現が临床上問題となる^{39,42}。CLB は主に *CYP3A* により代謝されて N-desmethyloclobazam (N-CLB) となり、*CYP2C19* により不活化される (Figure 1)⁴³。N-CLB は活性代謝物であり、半減期が CLB より長く、脳内濃度も高くなるため、治療効果や副作用への関与が示唆されている^{39,41,44}。2002 年に、N-CLB の異常高値と副作用を生じた *CYP2C19* 欠損型アレル保有症例が報告され⁴⁵、*CYP2C19* の遺伝的欠損によって血中 N-CLB 濃度が上昇することは示されたが^{43,45,46}、臨床における薬力学への影響は証明されていない。そこで我々は、*CYP2C19* 遺伝子多型が CLB の体内動態に与える影響を確かめて、CLB 治療の有効性、耐性発現、副作用発現に及ぼす影響について検討した。

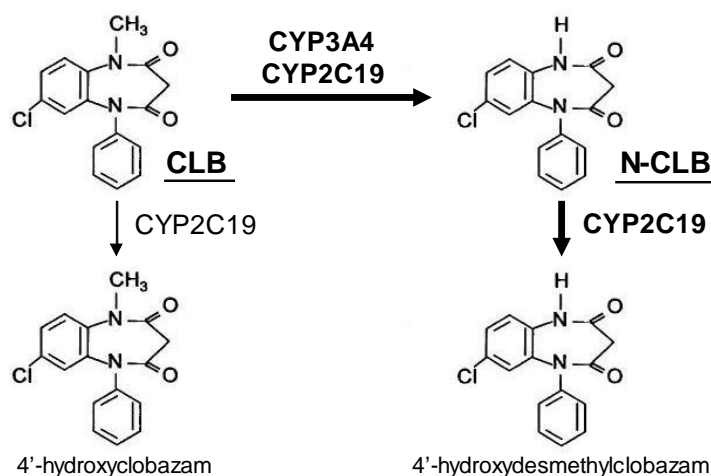


Figure 1. Chemical structures and main metabolic pathways of CLB and N-CLB⁴³

本項では、CLB 治療歴があるてんかん患者 110 例（男性 67 例，女性 43 例；年齢 15.5 ± 8.9 歳）を対象とした。*CYP2C19**2 及び *CYP2C19**3 のアレル頻度は、それぞれ 30.5%と 13.6%であり、ホモ野生型 (homozygous extensive metabolizer : ホモ EM) 41 例、ヘテロ変異型 (heterozygous extensive metabolizer : ヘテロ EM) 44 例、ホモ変異型 (poor metabolizer : PM) 25 例であった。*CYP2C19* 遺伝子型の頻度は Hardy-Weinberg 平衡を満たした ($P = 0.9$)。

2-1 体内動態

110 例の内、日常診療において CLB と N-CLB の TDM が行われた 50 例（ホモ EM : 16 例、ヘテロ EM : 22 例、PM : 12 例）の測定結果から、CLB 及び N-CLB の血中濃度を遺伝子型間で比較した（Table 4）。*CYP2C19* 遺伝子型間で CLB 投与量の差は認めなかったが、CLB 及び N-CLB 濃度、CLB 及び N-CLB の concentration to the dose (C/D) 比、N-CLB/CLB 濃度比に関しては有意な差を認めた。特に N-CLB 濃度は、*CYP2C19* 遺伝子型間で大きく異なり、PM の N-CLB 濃度及び C/D 比は、ホモ EM に比べて 8.4 倍 ($P = 0.007$) と 9.3 倍 ($P < 0.001$)、ヘテロ EM に比べて 3.6 倍 ($P = 0.02$) と 3.8 倍 ($P = 0.001$) であった。また、ホモ EM に比べて、ヘテロ EM の N-CLB 濃度及び C/D 比も 2.3 倍 ($P = 0.01$)、2.5 倍 ($P = 0.005$) と高く、遺伝子用量効果 (gene-dose effect) が考えられた。CLB の C/D 比に関しては、ヘテロ EM と PM の間に有意な差は認めなかった。

CLB と N-CLB 濃度の関係では、PM で N-CLB 濃度が CLB 濃度の約 36 倍高く、ホモ EM とヘテロ EM では、それぞれ 8 倍と 10 倍高かった。

Table 4. Association between the *CYP2C19* genotypes and CLB pharmacokinetics

	homozygous EM	heterozygous EM	PM	<i>P</i> value
CLB dose (mg/kg/day)	0.49 ± 0.20	0.49 ± 0.23	0.43 ± 0.30	0.72
CLB conc. (µg/mL)	0.14 ± 0.08	0.24 ± 0.13*	0.21 ± 0.15	0.04
N-CLB conc. (µg/mL)	0.92 ± 0.61	2.14 ± 1.69*	7.70 ± 6.04*‡	< 0.001
CLB C/D ratio	0.27 ± 0.10	0.57 ± 0.34*	0.55 ± 0.30*	0.005
N-CLB C/D ratio	1.99 ± 1.27	4.93 ± 3.72*	18.57 ± 9.87*‡	< 0.001
N-CLB/CLB ratio	7.57 ± 4.57	9.77 ± 7.94	35.66 ± 16.73*‡§	< 0.001

Presented are mean ± SD.

P values are determined by ANOVA and Games-Howell post-hoc test.

* $P < 0.05$ vs. homozygous EM. † $P < 0.001$ vs. homozygous EM. ‡ $P < 0.05$ vs. heterozygous EM. § $P < 0.001$ vs. heterozygous EM.

CLB 投与量と CLB 濃度の関係は、各 *CYP2C19* 遺伝子型で同様の相関を認め、相関係数 R は 0.48 ($P < 0.001$, Figure 2A) であった。一方、CLB 投与量と N-CLB 濃度は PM 群でのみ有意に相関した ($R = 0.72$, $P = 0.008$, Figure 2B)。

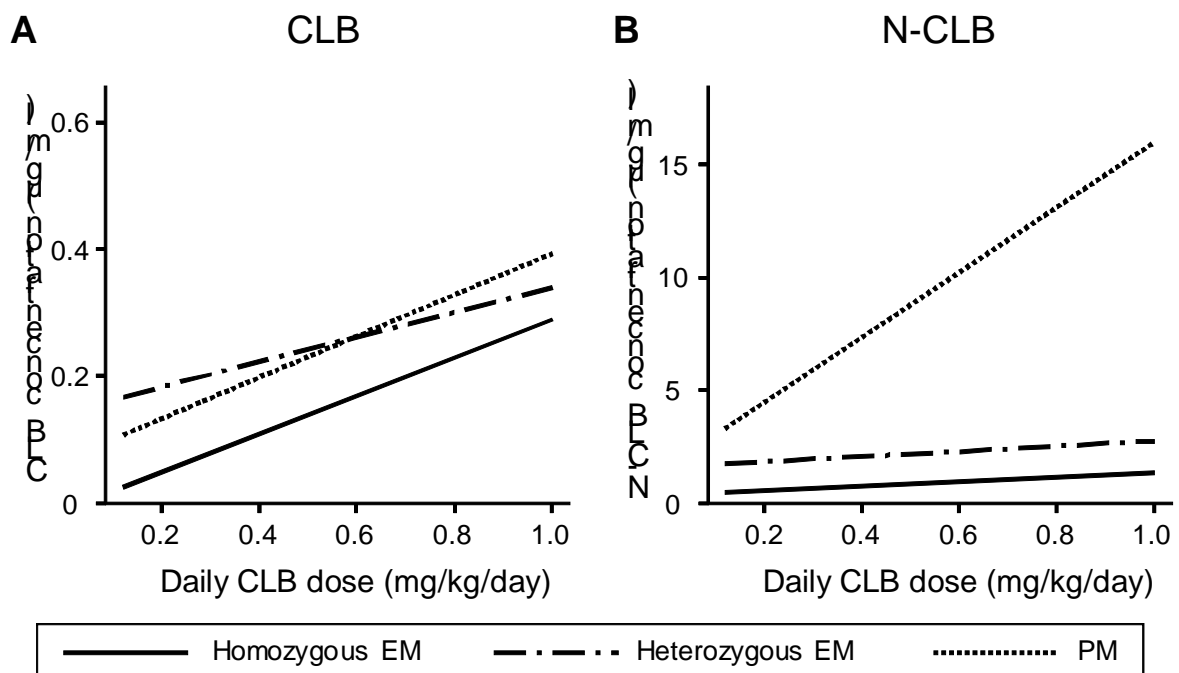


Figure 2. Correlations between CLB daily dose per body weight and serum concentrations of CLB (A) or N-CLB (B) with respect to the *CYP2C19* genotypes. The circles represent homozygous EM ($n = 16$), the triangles represent heterozygous EM ($n = 22$) and the squares represent PM ($n = 12$).

2-2 治療効果

発作頻度が CLB 治療開始前に比べて 50%以上減少した場合を有効と定義して^{47,48}、治療効果への影響を検討した。さらに、発作頻度が 75%以上減少及び 100%減少（完全抑制）した場合についても検討した。発作が 50%以上減少した患者は 48 例（46.2%）で、18 例（17.6%）は完全に抑制された。但し、6 例（完全抑制では 8 例）は CLB の服用期間が効果判定に不十分なため除外した。

各遺伝子型の有効率を Table 5 に示す。全ての基準で、ホモ EM に比べて PM で有効率が有意に高く、そのオッズ比（odds ratio : OR）は 7 以上であった（50%減少 : 9.9、75%減少 : 7.7、完全抑制 : 7.8）。また、ヘテロ EM はホモ EM と PM の中間の有効性（OR : 2.5 – 6.1）を示し、遺伝子用量効果が考えられた。

効果判定時の CLB 投与量は有効群に比べて無効群で有意に高かった（ 0.33 ± 0.20 vs. 0.64 ± 0.24 mg/kg/day ; $P < 0.001$ ）。

Table 5. Association between the *CYP2C19* genotypes and responder rate for CLB therapy

	Not observed	Observed	Unadjusted OR (95% CI)	<i>P</i> value	Adjusted OR (95% CI) [†]	<i>P</i> value
≥ 50% reduction						
Homozygous EM	26 (66.7)	13 (33.3)	1		1	
Heterozygous EM	22 (52.4)	20 (47.6)	1.8 (0.7 – 4.5)	0.19	2.5 (0.9 – 7.3)	0.09
PM	8 (34.8)	15 (65.2)	3.7 (1.3 – 11.1)	0.02	9.9 (2.5 – 39.6)	0.001
≥ 75% reduction						
Homozygous EM	27 (69.2)	12 (30.8)	1		1	
Heterozygous EM	23 (54.8)	19 (45.2)	1.9 (0.7 – 4.6)	0.18	2.9 (1.0 – 8.6)	0.05
PM	9 (39.1)	14 (60.9)	3.5 (1.2 – 10.3)	0.02	7.7 (2.1 – 28.3)	0.002
Seizure freedom						
Homozygous EM	34 (91.9)	3 (8.1)	1		1	
Heterozygous EM	32 (76.2)	10 (23.8)	3.5 (0.9 – 14.0)	0.07	6.1 (1.0 – 35.7)	0.04
PM	18 (78.3)	5 (21.7)	3.1 (0.7 – 14.7)	0.15	7.8 (1.1 – 54.7)	0.04

Data are the number of patients (percentages).

[†]OR estimated by logistic regression analysis and adjusted for gender, age, coadministration of CBZ, VPA, PHT, PB, and ZNS at the date of the evaluation, seizure type, etiology of epilepsy and complications.

CLB 治療を中止するまでの期間（平均 ± 標準誤差 [standard error : SE] ）に関して、Kaplan-Meier 法により検討し、log-rank test を用いて遺伝子型間の比較を行った。PM では 4.4 ± 0.4 年と、ホモ EM の 2.5 ± 0.3 年 ($P = 0.004$) 及びヘテロ EM の 3.2 ± 0.4 年 ($P = 0.03$) に比べて中止するまでの期間が有意に延長した (Figure 3)。

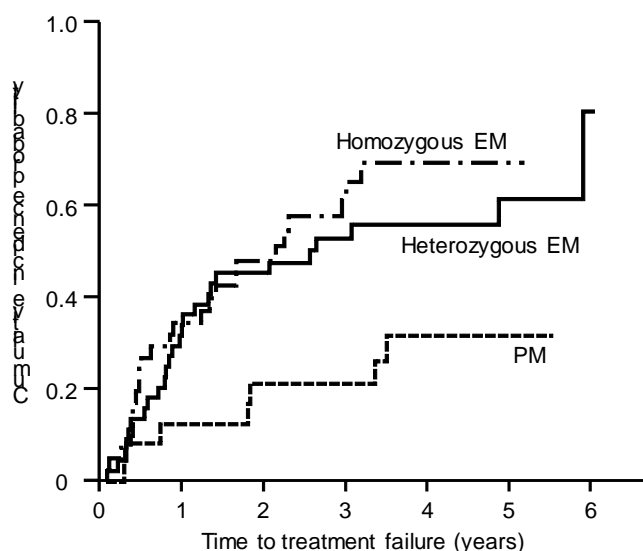


Figure 3. Kaplan-Meier curves show the probability of the cumulative incidence of treatment failure after starting CLB with respect to the *CYP2C19* genotypes. The difference among the *CYP2C19* genotypes was significant (log-rank test, $P = 0.02$). Pairwise comparisons: between homozygous EM ($n = 41$) and heterozygous EM ($n = 44$), $P = 0.42$; homozygous EM vs. PM ($n = 25$), $P = 0.004$; heterozygous EM vs. PM, $P = 0.03$.

2-3 耐性発現

発作頻度が CLB 治療開始前の 50%未満に減少し有効と判定した 48 例のうち、発作頻度が CLB 治療前の 50%以上に戻り耐性発現と定義⁴⁹した患者は 28 例 (58.3%) であった。耐性発現頻度及び発現までの時間については遺伝子型間で有意な差を認めなかった (Table 6、Figure 4)。

また、耐性が発現した 28 例中 18 例 (72.0%) は、CLB 投与量の増加で再び効果を認めたが、そのうち 12 例 (70.6%) は再度耐性が発現した (Table 6)。

Table 6. Association between the *CYP2C19* genotypes and tolerance to CLB therapy

	Not observed	Observed	<i>P</i> value
Development of tolerance (n = 48)			
homozygous EM	7 (53.8)	6 (46.2)	0.40
heterozygous EM	6 (30.0)	14 (70.0)	
PM	7 (46.7)	8 (53.3)	
Responder status after tolerance (n = 25)*			
homozygous EM	1 (16.7)	5 (83.3)	0.60
heterozygous EM	5 (38.5)	8 (61.5)	
PM	1 (16.7)	5 (83.3)	
Second tolerance after second responder status (n = 17)†			
homozygous EM	1 (25.0)	3 (75.0)	0.15
heterozygous EM	4 (50.0)	4 (50.0)	
PM	0	5 (100)	

Data are the number of patients (percentages).

* In three patients, the CLB dosage was not increased after the development of tolerance.

† In one patient, the second tolerance was not assessed.

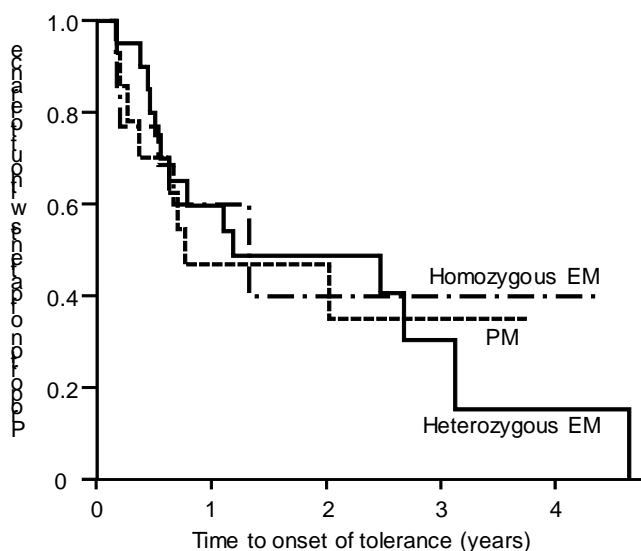


Figure 4. Kaplan-Meier curves show the probability of survival from the onset of tolerance after a responder status with respect to the *CYP2C19* genotypes. There was no significant difference among the *CYP2C19* genotypes (log-rank test, $P = 0.98$). Homozygous EM (n = 13), heterozygous EM (n = 20) and PM (n = 15).

2-4 副作用発現

110 症例中 51 例 (46.4%) が CLB 治療開始または CLB 増量時に副作用を認めた。眠気が 36 例 (32.7%) と最も多く、ふらつき 9 例 (8.2%)、体重増加 8 例 (7.3%)、唾液増加 6 例 (5.5%) などであった (Table 7)。そのうち、副作用のため CLB を中止した症例は 3 例で、1 例 (ホモ EM) は発作増加、2 例 (ホモ EM とヘテロ EM) は眠気が原因であった。

何らかの副作用を認めた頻度は PM で 64.0% と、ホモ EM の 39.0%、ヘテロ EM の 43.2% に比べて高い傾向であったが、有意差はなく ($P = 0.07$)、それぞれの副作用に関しても *CYP2C19* 遺伝子多型による影響は認めなかった (Table 7)。

Table 7. Association between the *CYP2C19* genotypes and adverse reactions

	homozygous EM	heterozygous EM	PM	<i>P</i> value
Drowsiness	13 (31.7)	13 (29.5)	10 (40.0)	0.13
Dizziness	1 (2.4)	4 (9.1)	4 (16.0)	0.12
Weight gain	1 (2.4)	3 (6.8)	4 (16.0)	0.12
Hypersalivation	2 (4.9)	3 (6.8)	1 (4.0)	1.00
Others*	3 (7.3)	3 (6.8)	3 (12.0)	0.75

Data are the number of patients (percentages).

* Insomnia ($n = 3$); fatigue ($n = 1$); irritability ($n = 1$); increased seizures ($n = 1$); headache ($n = 1$); enuresis ($n = 1$); eczema ($n = 1$).

第3項 小括

第1項では、PPK解析により *CYP3A5*3/*3* 遺伝子型で CBZ の CL が 8% 上昇することを示した。

CYP3A は肝臓及び小腸における主な代謝酵素で、総 *CYP* 発現量のそれぞれ約 30% と 60% を占める。その基質特異性は広く、多くの内因性・外因性物質を基質とし、約半数の薬物の代謝に関与すると考えられている⁵⁰⁻⁵²。これまで *CYP3A* 活性はほとんどが *CYP3A4* に起因すると考えられてきたが、*CYP3A5* は肝臓及び小腸の総 *CYP3A* 発現量の 5-85% を占め^{35,36,50,53,54}、*in vitro* の検討から *CYP3A5*3* 遺伝子多型が *CYP3A5* 発現量を大きく低下させることが報告された^{35,36,55}。以上より、*CYP3A* が基質となる薬物の体内動態の個体差に *CYP3A5*3* 遺伝子多型が関与することが考えられる。本論文では、対象の生理的要因や病態的要因、個体間・個体内変動を考慮した母集団パラメータ推定が可能な NONMEM 法を用いた^{56,57}。解析の結果、予想とは逆に *CYP3A5*3/*3* 遺伝子型で CL が上昇した。しかしながら上昇は 8% と小さく（式 2）、臨床的な意義は低いと考えられた。

我々は、CBZ は *CYP3A* の誘導剤であり自己誘導を起こすが^{33,34}、*CYP3A5*3/*3* 遺伝子型ではスプライシング異常のため誘導されず、*CYP3A5*1* アレル保有者では誘導されて、*CYP3A5*3* 遺伝子多型による CBZ の CL 低下に差が出ると考えた。しかし、予想に反してわずかながら *CYP3A5*3/*3* 遺伝子型で CL が上昇した。Rifampin や PB による *CYP3A* の誘導性は、*CYP3A5* より *CYP3A4* の方が 2-10 倍高く^{58,59}、rifampin による誘導後の midazolam CL が、*CYP3A5*3/*3* 遺伝子型では *CYP3A5*1/*1* に比べ有意に上昇することが報告されており⁶⁰、*CYP3A5*3/*3* 遺伝子型では、*CYP3A4* がより強く誘導されることで CBZ の CL が上昇した可能性が考えられた⁵⁰。

一方で、*CYP3A4* と *CYP3A5* の基質特異性は類似しているが、酵素活性は相対的に異なり⁶¹⁻⁶³、CBZ から主要代謝物である CBZ 10,11-epoxide への *CYP3A5* による代謝活性は *CYP3A4* の 40-90% である^{61,64}。ヒト *in vivo* において、*CYP3A5*3* 遺伝子多型が基質薬物の体内動態に与える影響には矛盾する報告があるが⁶⁵⁻⁷²、CBZ のように *CYP3A4* での活性が *CYP3A5* より強い diltiazem や alprazolam、nifedipine⁶³ では、遺伝子多型による体内動態への差を認めず⁶⁸⁻⁷⁰、*CYP3A5* での活性が強い tacrolimus⁶² では *CYP3A5*1* アレル保有者で CL が高かった^{65,66}。以上

より、基質薬物への *CYP3A5*3* 遺伝子多型の影響は *CYP3A4* と *CYP3A5* の相対的な活性の違いに起因する可能性も否定できない。

今回得られた結果は、妥当性の評価を行い (Table 3)、CBZ の体内動態に *CYP3A5*3* 遺伝子多型が大きく影響しないことを示した。しかし、*CYP3A5*3* 遺伝子多型の臨床的な意義に関しては、基質、ハプロタイプ、人種、環境因子などの様々な影響を考慮さらに検討する必要がある。

第2項では、*CYP2C19* 遺伝子多型が CLB 治療に影響し、1) PM では N-CLB 血中濃度が CLB より約 36 倍高いこと、2) PM の N-CLB 血中濃度はホモ EM より約 9 倍高く、PM で奏効率が高いこと、3) ヘテロ EM での N-CLB 濃度及び奏効率はホモ EM と PM の間となること、4) *CYP2C19* 遺伝子多型は耐性の発現や副作用発現には有意に影響しないことを示した。

CYP2C19 の PM 頻度はアジア人で 13-23%、白人で 1-8%と日本人に多く⁷³、日本人の PM は、スプライシング異常を起こす *CYP2C19*2* (30%) とストップコドンができる *CYP2C19*3* (5%) で 99%以上が説明できる^{74,75}。CLB の体内動態には *CYP2C19* が重要であり (Figure 1)⁴³、特に活性代謝物である N-CLB は、ほとんど *CYP2C19* で代謝されるので、その遺伝子欠損によって濃度が上昇することが報告されている^{43,45,46}。本研究においても、*CYP2C19* 遺伝子型間で N-CLB の濃度が異なり、ホモ EM と比べて、ヘテロ EM で約 2.5 倍、PM で約 9 倍上昇し、遺伝子用量効果を認めた (Table 4)。一方、CLB 濃度はヘテロ EM と PM で上昇していたがホモ EM と比べて大きな差はなかった (Table 4)。本研究に用いた血中濃度は日常診療の TDM 結果なので、採血時間、投与量、併用薬等は患者間で異なっていたが、遺伝子型間で偏りはなく、CLB 及び N-CLB の半減期はそれぞれ 18 時間、42 時間³⁹と長いため影響は少ないと考えた。

本検討での CLB の有効率は 46.2%で、過去の報告 (42-50%)⁷⁶⁻⁷⁸ と一致したが、*CYP2C19* 遺伝子多型を考慮すると、PM では 65.2%でホモ EM の 33.3%に比べて有効率が有意に上昇し、OR は 7 以上であった (Table 5)。また、ヘテロ EM の有効率は 47.6%とホモ EM と PM の中間で、有効率に関しても遺伝子用量効果を認めた (Table 5)。N-CLB には CLB の約 1/4 の抗てんかん作用があり^{79,80}、N-CLB のみの投与による抗てんかん作用も認められていること⁷⁹、PM の血中 N-CLB 濃度は CLB 濃度の約 36 倍であったことから (Table 4)、N-CLB が治療効果に大き

く関与していると考えられる。ホモ EM やヘテロ EM での N-CLB 濃度が不十分と考えられる患者では、CYP2C19 阻害剤である抗てんかん薬 felbamate や stiripentol (日本では未承認)⁸¹⁻⁸³ との併用で、薬物動態学的及び薬力学的な相互作用による有効性の増加が期待できる。

高い耐性発現率は CLB 治療における最大の問題である^{39,42}。本研究では有効例の 58.3% (全例の 20.9%) に耐性が認められたが (Table 6)、耐性発現率や発現までの時間に CYP2C19 遺伝子多型は影響せず、過去に報告されたように^{39,42,44}、耐性発現に N-CLB の関与は少ないことが示唆された。また、Haigh らは CLB に耐性が発現した患者 9 例中 8 例に N-CLB の効果を認めた報告をしており、N-CLB は CLB より優れた抗てんかん薬であることが示唆されている⁷⁹。一方、これまでに耐性の発現を回避するため、少量から開始し漸増したり、休薬日を設けたり、ベンゾジアゼピンの変更、ベンゾジアゼピンの拮抗薬である flumazenil の投与が試みられているが、いずれの方法も成功していない^{39,84}。このことから、N-CLB による治療は有効性の面だけでなく、耐性発現との関係においても有益と考えられた。

今回、CLB による副作用は 46.4% の患者に認められたが、多くは軽度あるいは一時的な眠気やふらつきなどであった。この頻度はこれまでに日本人で報告された頻度 47%^{77,85} と同程度であったが、白人から報告された 25-40%^{39,42,76,84} より若干高かった。CYP2C19 遺伝子型別に見ると、PM は 64.0% と、ヘテロ EM の 43.2% やホモ EM の 39.0% より高い傾向があった。このことから、人種間の副作用の発現頻度の差は遺伝子欠損頻度の差による可能性も考えられる。有害反応への影響は、副作用により CLB を中止した 3 例は全て EM であり、対象数が不十分であったため、明らかにできなかった。今後、対象を増やして、前向き研究で N-CLB の臨床効果を検証する必要がある。

第2節 薬物トランスポーターの遺伝子多型に関する検討

てんかんは様々な原因で生じ、人口の約0.6%が罹患する頻度の高い神経疾患であるが、大部分は抗てんかん薬により発作を抑制できる^{22,86,87}。しかし、約3割は適切な抗てんかん薬治療に対しても抵抗性を示し、死亡リスクの増加や quality of life (QOL) の低下の他、経済的・社会的な問題を有するため^{23,24,88}、その発作抑制が重要な課題となっている。その原因の一つに、薬物排泄トランスポーターによる作用部位からの薬物排泄(トランスポーター仮説)が提唱されている^{24,25}。

1995年に Tishler ら⁸⁹が、治療抵抗性を示すてんかん患者の脳血管内皮細胞では正常な細胞より P-glycoprotein (P-gp) をコードする *adenosine triphosphate (ATP) -binding cassette (ABC) B1* の mRNA が10倍以上多く発現していたことを報告した。その後、治療抵抗性患者の切除脳組織や実験動物を用いた研究から P-gp や ABCC2 などの薬物排泄トランスポーターが blood-brain barrier (BBB) や星状膠細胞に過剰に発現し (Table 8)^{24,89-92}、脳内(作用部位)の抗てんかん薬濃度の上昇を妨げることで治療抵抗性を引き起こすことが示唆されている^{24,93,94}。

本章、第2節では、*ABCB1* 遺伝子多型が抗てんかん薬の治療効果に及ぼす影響と *CBZ* の体内動態に与える影響を検討した。さらに、*ABCC2* 遺伝子多型が治療効果に及ぼす影響についても検討した。

Table 8. Overexpression of multidrug transporters in epileptogenic brain tissue²⁴

Multidrug transporter (protein and/or gene)	Epileptogenic brain tissue from	Multidrug transporter overexpressed in		
		Capillary endothelial cells	Astrocytes	Neurons
P-gp (ABCB1/MDR1)	Patients	+	+	+
	Rats (kainate)	+	+	+
	Rats (pilocarpine)	?	+	+
	Rats (kindling)	+	?	?
ABCC1/MRP1	Patients	-	+	+
ABCC2/MRP2	Patients	+	+	?
ABCC3/MRP3	Patients	-	?	?
ABCC5/MRP5	Patients	+	?	?
ABCG2/BCRP	Patients	-	-	-

With respect to the data on epileptogenic brain tissue from patients, it should be noted that the expression of drug transporters may be pathology specific.

第 1 項 *ABCB1* 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響

P-gp は脳、消化管、肝臓など多くの組織に発現し、ATP の加水分解エネルギーを利用した、細胞内から細胞外への方向選択的な異物の排泄に関与する^{95,96}。P-gp の基質特異性は広く、CBZ など多くの抗てんかん薬が P-gp の基質となることが報告されている^{24,25,93-95}。また、薬物トランスポーターの遺伝子多型及び複数の遺伝子多型を組み合わせたハプロタイプには表現型に影響することが報告されており^{95,97-103}、2003 年に Siddiqui らは *ABCB1* C3435T 遺伝子多型の CC 遺伝子型では TT 遺伝子型に比べ治療抵抗性患者が 2.7 倍多かったことを報告した¹⁰⁴。それ以来、複数のグループから異なる結果が報告され¹⁰⁵⁻¹⁰⁹、*ABCB1* 遺伝子多型と治療抵抗性との関係は未だ明らかでない。そこで我々は、*ABCB1* 遺伝子多型が抗てんかん薬の治療抵抗性に及ぼす影響について検討した。

本項では、てんかん患者 210 例（男性 119 例、女性 91 例；年齢 17.4 ± 9.6 歳）を対象として、最終診察日から遡り 1 年間発作が全くない場合を有効性、1 度でも発作を認めた場合を抵抗性と定義した²³。対象者 210 例中、126 例（60.0%）が抵抗性を示し、若年でのてんかん発症（OR, 0.8 ; 95% CI, 0.8 – 0.9 ; $P < 0.001$ ）、症候性（OR, 7.5 ; 95% CI, 2.9 – 19.2 ; $P < 0.001$ ）、潜因性てんかん（OR, 12.9 ; 95% CI, 5.0 – 33.1 ; $P < 0.001$ ）、重症心身障害の合併（OR, 3.5 ; 95% CI, 1.5 – 8.0 ; $P = 0.003$ ）が治療抵抗性に関係していた。

1-1 遺伝子型の影響

-129C、1236T、2677T、G2677A、3435T のアレル頻度はそれぞれ 6.7%、66.4%、46.9%、12.9%、44.8%であり、*ABCB1* 遺伝子型頻度は Hardy-Weinberg 平衡を満たした ($P > 0.25$)。

各アレル及び*ABCB1* 遺伝子型と治療抵抗性との関係を Table 9、Table 10 に示す。-129C、1236T、2677A アレルは影響しなかったが、3435T アレルは抵抗性患者に有意に多く (OR, 2.0 ; 95% CI, 1.1 – 3.6 ; $P = 0.02$)、2677T アレルも多い傾向であった (OR, 1.8 ; 95% CI, 1.0 – 3.2 ; $P = 0.06$)。また、G2677T/A の TT 遺伝子型が GG 遺伝子型に比べ治療抵抗性と有意に関係し (OR, 3.4 ; 95% CI, 1.0 – 11.7 ; $P = 0.05$)、治療抵抗性患者に C3435T の CT 遺伝子型 (OR, 2.6 ; 95% CI, 1.0 – 6.8 ; $P = 0.05$) 及び TT 遺伝子型 (OR, 3.6 ; 95% CI, 1.2 – 11.4 ; $P = 0.03$) が CC 遺伝子型に比べ有意に多かった。しかしながら、多重比較の問題を考慮して、Bonferroni の方法で P 値を補正すると、全て $P > 0.0125$ であり有意ではなかった。

Table 9. Allele frequencies of the *ABCB1* polymorphisms in drug responsive and resistant epilepsy

Alleles	Responsive	Resistant	OR (95% CI)*	<i>P</i> value
T-129C				
T	158 (94.0)	233 (92.5)	1	
C	10 (6.0)	19 (7.5)	1.7 (0.5 – 5.5)	0.39
C1236T				
C	60 (35.7)	81 (32.1)	1	
T	108 (64.3)	171 (67.9)	1.1 (0.6 – 2.0)	0.67
G2677T/A				
G	74 (44.0)	95 (37.7)	1	
T	72 (42.9)	125 (49.6)	1.8 (1.0 – 3.2)	0.06
A	22 (13.1)	32 (12.7)	0.8 (0.3 – 2.0)	0.68
C3435T				
C	106 (63.1)	126 (50.0)	1	
T	62 (36.9)	126 (50.0)	2.0 (1.1 – 3.6)	0.02

Data are the number of patients (percentages).

* OR estimated by logistic regression analysis and adjusted for gender, age, age at the onset of epilepsy, the F72.1 or F73.1 complication, history of AEDs, and seizure type and etiology of epilepsy.

Table 10. Genotype frequencies of the *ABCB1* polymorphisms in drug responsive and resistant epilepsy

Genotypes	Responsive	Resistant	OR (95% CI)*	<i>P</i> -value
T-129C				
TT	74 (88.1)	107 (84.9)	1	
TC	10 (11.9)	19 (15.1)	1.79 (0.5 – 6.3)	0.36
CC	0	0	—	—
C1236T				
CC	15 (17.9)	16 (12.7)	1	
CT	30 (35.7)	49 (38.9)	1.8 (0.5 – 5.8)	0.36
TT	39 (46.4)	61 (48.4)	1.5 (0.5 – 4.6)	0.51
G2677T/A				
GG	22 (26.2)	18 (14.3)	1	
GT	22 (26.2)	44 (34.9)	2.8 (0.9 – 8.8)	0.07
TT	20 (23.8)	33 (26.2)	3.4 (1.0 – 11.7)	0.05
GA	8 (9.5)	15 (11.9)	2.0 (0.4 – 9.3)	0.36
TA	10 (11.9)	15 (11.9)	1.6 (0.3 – 7.4)	0.55
AA	2 (2.4)	1 (0.8)	0.2 (0.1 – 4.8)	0.31
C3435T				
CC	36 (42.9)	34 (27.0)	1	
CT	34 (40.5)	58 (46.0)	2.6 (1.0 – 6.8)	0.05
TT	14 (16.7)	34 (27.0)	3.6 (1.2 – 11.4)	0.03

Data are the number of patients (percentages).

* OR estimated by logistic regression analysis and adjusted for gender, age, age at the onset of epilepsy, the F72.1 or F73.1 complication, history of AEDs, and seizure type and etiology of epilepsy.

1-2 ハプロタイプ及びディプロタイプの影響

T-129C、C1236T、G2677T/A、C3435T 遺伝子多型間には有意な連鎖不平衡を認められた。連鎖不平衡係数 $|D'|$ を Table 11 に示す。本論文では、過去の報告^{106,108}と同様に、特に連鎖不平衡が強い C1236T、G2677T/A、C3435T のハプロタイプ及びディプロタイプについて治療抵抗性との関係を検討した。C1236T、G2677T/A、C3435T が全て T アレルである TTT のハプロタイプが最も高頻度に認められ、その頻度は 37.4% であった。他にハプロタイプ頻度が 5% 以上のものは TGC (17.6%)、CGC (16.9%)、CAC (11.4%)、TTC (8.3%) であった。連鎖不平衡がない場合の推定頻度と実際の頻度との比較を Figure 5 に示す。

Table 11. Pairwise linkage disequilibrium coefficients between *ABCB1* polymorphisms

	T-129C	C1236T	G2677T/A	C3435T
T-129C		0.86	0.57	-0.80
C1236T	3.4×10^{-11}		0.68	-0.62
G2677T/A	5.9×10^{-12}	1.0×10^{-40}		0.72
C3435T	1.1×10^{-4}	4.4×10^{-16}	3.4×10^{-44}	

Linkage disequilibrium coefficients (D') are given in the right upper part; P values are given in the left lower part.

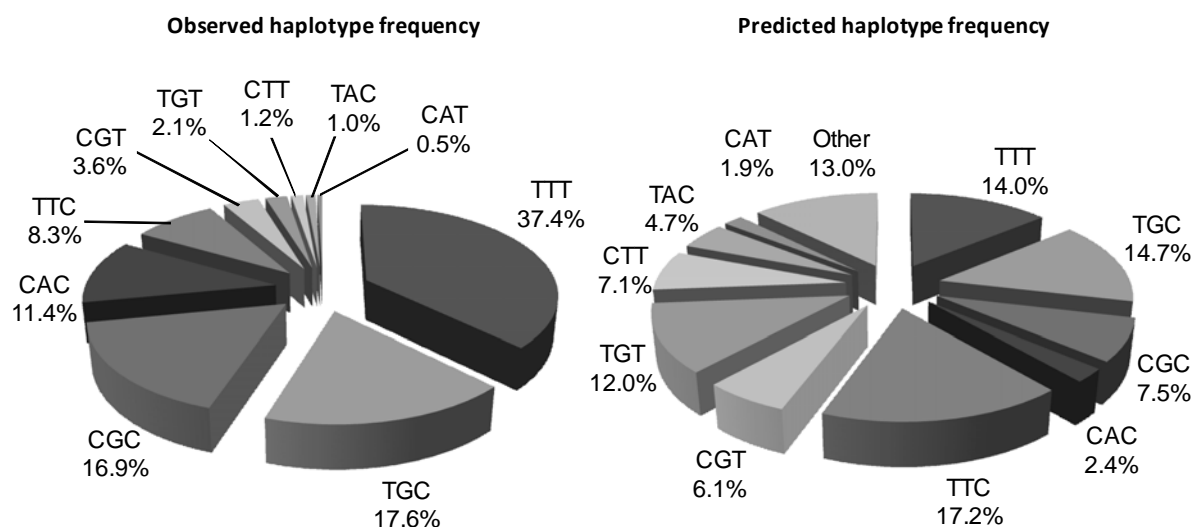


Figure 5. Observed and predicted *ABCB1* haplotype frequency

各ハプロタイプ及びディプロタイプと治療抵抗性との関係を Table 12、Table 13 に示す。TTT ハプロタイプは抵抗性患者に多く認められ (OR, 1.8 ; 95% CI, 1.0 – 3.3 ; $P = 0.04$)、逆のハプロタイプを組み合わせた CGC/CGC (OR, 0.1 ; 95% CI, 0.01 – 0.9 ; $P = 0.04$) と TGC/CGC ディプロタイプ (OR, 0.2 ; 95% CI, 0.1 – 1.0 ; $P = 0.04$) は有効性患者に多かった。但し、Bonferroni の方法を用いて、多重比較の問題を考慮すると有意ではなかった。

Table 12. Haplotype frequencies of the *ABCB1* polymorphisms at the C1236T, G2677T/A and C3435T in drug responsive and resistant epilepsy

Haplotypes	Responsive	Resistant	OR (95% CI)*	<i>P</i> value
TTT	51 (30.4)	106 (42.1)	1.8 (1.0 – 3.3)	0.04
TGC	34 (20.2)	40 (15.9)	0.6 (0.3 – 1.2)	0.17
CGC	33 (19.6)	38 (15.1)	0.7 (0.3 – 1.4)	0.31
CAC	18 (10.7)	30 (11.9)	1.1 (0.4 – 2.7)	0.85
TTC	18 (10.7)	17 (6.7)	1.0 (0.4 – 2.8)	0.97
CGT	5 (3.0)	10 (4.0)	1.5 (0.4 – 5.7)	0.58
TGT	2 (1.2)	7 (2.8)	1.9 (0.2 – 15.9)	0.54
CTT	3 (1.8)	2 (0.8)	3.1 (0.2 – 46.1)	0.41
TAC	3 (1.8)	1 (0.4)	0.04 (0.01 – 0.4)	0.006
CAT	1 (0.6)	1 (0.4)	0.14 (0.01 – 4.4)	0.26

Data are the number of patients (percentages).

Haplotype inferred computationally.

* OR estimated by logistic regression analysis and adjusted for gender, age, age at the onset of epilepsy, the F72.1 or F73.1 complication, history of AEDs, and seizure type and etiology of epilepsy.

Table 13. Diplotypes frequencies of the *ABCB1* polymorphisms at the C1236T, G2677T/A and C3435T in drug responsive and resistant epilepsy

Diplotypes	Responsive	Resistant	OR (95% CI)*	<i>P</i> -value
TTT/TTT	11 (13.1)	27 (21.4)	2.0 (0.7 – 5.8)	0.23
TTT/TGC	10 (11.9)	18 (14.3)	1.0 (0.3 – 3.1)	0.98
TTT/CGC	5 (6.0)	10 (7.9)	2.2 (0.5 – 9.9)	0.29
TTT/CAC	7 (8.3)	13 (10.3)	1.2 (0.3 – 4.9)	0.84
TTT/TTC	5 (6.0)	5 (4.0)	1.3 (0.2 – 6.8)	0.78
TGC/CGC	8 (9.5)	6 (4.8)	0.2 (0.1 – 1.0)	0.04
CGC/CGC	8 (9.5)	2 (1.6)	0.1 (0.01 – 0.9)	0.04
CGC/CAC	1 (1.2)	8 (6.3)	4.8 (0.4 – 64.1)	0.23
Other 32 genotypes [†]	29 (34.5)	37 (29.4)	—	—

Data are the number of patients (percentages).

Diplotype inferred computationally.

* OR estimated by logistic regression analysis and adjusted for gender, age, age at the onset of epilepsy, complication, history of AEDs, and classification of epilepsies and epileptic syndromes.

[†] Diplotypes with total frequencies over the two groups below 5%.

1-3 CBZ の体内動態

患者 174 例（男性 97 例、女性 77 例；年齢 15.4 ± 8.9 歳）の定常状態の CBZ 血中濃度を測定し、*ABCB1* 遺伝子多型が CBZ の C/D 比に影響を与えるか否かについて検討した。CBZ の平均血中濃度は 6.2 ± 2.4 $\mu\text{g/mL}$ 、CBZ 最終服用後から採血までの時間は 3.9 ± 2.1 時間であった。併用薬に関しては、38 例が VPA を、12 例が PHT、15 例が PB を併用していた。遺伝子型、ハプロタイプ、ディプロタイプいずれにおいても CBZ の C/D 比に有意な影響は認めなかった。ただし、C3435T の TT 及び CT 遺伝子型の CBZ の C/D 比は CC 遺伝子型に比べて低く (0.64 ± 0.27 , 0.65 ± 0.31 , 0.72 ± 0.30)、CGC/CGC、TGC/CGC ディプロタイプでは他に比べて高かった (0.78 ± 0.32 , 0.82 ± 0.30 , 0.66 ± 0.30)。これらの結果は、C3435T の TT 及び CT 遺伝子型に治療抵抗性患者が多く、CGC/CGC、TGC/CGC ディプロタイプに有効性患者が多い結果と矛盾しない。

さらに、同 174 例 630 測定点の CBZ 血中濃度データから NONMEM 法による PPK 解析を行った結果においても、*ABCB1* 遺伝子多型は CBZ の CL に影響を与えなかった (Table 14)。

Table 14. Association between *ABCB1* polymorphisms and CBZ CL model

Hypothesis	DOBF*	P value	Conclusion
T-129C TC genotype	0.17	> 0.05	No
C1236T CT or TT genotype	0.15	> 0.05	No
C1236T TT genotype	0.65	> 0.05	No
G2677T/A GT or TT genotype	2.02	> 0.05	No
G2677T/A TT genotype	0.38	> 0.05	No
C3435T CT or TT genotype	0.51	> 0.05	No
C3435T TT genotype	0.72	> 0.05	No

* Changes in DOBF of at least 3.84 ($P < 0.05$, χ^2 [df =1]) were considered to be significant

第 2 項 *ABCC2* 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響

ABCC2 は主に肝臓に特異的に発現しており、アニオン性物質や各種抱合体を排泄し¹¹⁰、一部の抗てんかん薬が基質になることが報告されている。しかし、*ABCC2* 遺伝子多型と治療抵抗性については、治療抵抗性を示す 7 例の脳組織において、*ABCC2* タンパク発現量が G1249A の GA 遺伝子型で GG 遺伝子型に比べて増加していた報告のみである¹¹¹。そこで我々は、*ABCC2* 遺伝子多型が抗てんかん薬の治療抵抗性に及ぼす影響について検討した。

本項では、てんかん患者 279 例（男性 156 例、女性 123 例；年齢 20.9 ± 10.1 歳）を対象とした。対象者 279 例中、133 例（47.7%）が抵抗性を示し、過去の報告^{23,112}と同様に、若年でのてんかん発症（ $P < 0.001$ ）、症候性・潜因性てんかん（ $P < 0.001$ ）、精神遅滞の合併（ $P < 0.001$ ）が抵抗性と有意に関係した（Table 15）。

Table 15. Demographic characteristics of the drug responsive and resistant epilepsy

	Responsive	Resistant	<i>P</i> value
Male	79 (54.1)	77 (57.9)	0.55
Age (years)	20.7 ± 11.00	21.1 ± 9.10	0.69
Body weight (kg)	49.1 ± 18.5	46.4 ± 20.4	0.25
Onset of epilepsy (years)	5.8 ± 5.0	3.7 ± 4.6	< 0.001
Duration of therapy (years)	8.7 ± 4.40	9.6 ± 4.5	0.09
Mental retardation	72 (49.3)	113 (85.0)	< 0.001
Seizure type ^a			
Partial	95 (65.1)	95 (71.4)	0.38
Generalized	47 (32.2)	33 (24.8)	
Etiology			
Idiopathic	42 (28.8)	8 (6.0)	< 0.001
Cryptogenic	66 (5.2)	50 (37.6)	
Symptomatic	38 (26.0)	75 (56.4)	
Prescribed AEDs ^b			
Carbamazepine	64 (43.8)	76 (57.1)	0.03
Phenytoin	6 (4.1)	19 (14.3)	0.003
Phenobarbital	14 (9.6)	24 (18.0)	0.05
Valproic acid	38 (26.0)	47 (35.3)	0.12
Zonisamide	12 (8.2)	22 (16.5)	0.04
Clobazam	17 (11.6)	44 (33.1)	< 0.001

Presented are mean ± SD or number of patients (percentages).

^a The nine patients had unclassified seizures.

^b Prescribed AEDs at the last visit: monotherapy (*n* = 139); polytherapy of 2 drugs (*n* = 86); polytherapy of more than 3 drugs (*n* = 54).

2-1 遺伝子型の影響

G-1774delG、C-24T、G1249A、C3972T のアレル頻度はそれぞれ 30.0%、20.4%、14.6%、21.8%であった。各遺伝子型と治療抵抗性との関係を Table 16 に示す。ABCC2 遺伝子多型は抗てんかん薬の治療抵抗性に影響を与えなかった。

Table 16. Frequencies of ABCC2 genotypes in drug responsive and resistant epilepsy

Variants	Responsive	Resistant	<i>P</i> value ^a
G-1774delG			
G/G	77 (58.8)	54 (41.2)	0.08
G/delG	58 (45.0)	71 (55.0)	
delG/delG	11 (57.9)	8 (42.1)	
C-24T			
C/C	93 (53.1)	82 (46.9)	0.81
C/T	47 (50.0)	47 (50.0)	
T/T	6 (60.0)	4 (40.0)	
G1249A			
G/G	104 (50.5)	102 (49.5)	0.25
G/A	35 (54.7)	29 (45.3)	
A/A	7 (77.8)	2 (22.2)	
C3972T			
C/C	89 (52.0)	82 (48.0)	0.66
C/T	48 (51.1)	46 (48.9)	
T/T	9 (64.3)	5 (35.7)	

Data are the number of patients (percentages).

^a *P* values were determined by Fisher's exact test.

2-2 ハプロタイプ及びディプロタイプの影響

全ての *ABCC2* 遺伝子多型間に有意な連鎖不平衡を認めた。連鎖不平衡係数 $|D'|$ を Table 17 に示す。5%以上のハプロタイプは4つのみで、GCGC (32.7%)、delGCGC (28.8%)、GTGT (18.2%)、GCAC (14.4%) であった。連鎖不平衡がない場合の推定頻度と実際の頻度との比較を Figure 6 に示す。

Table 17. Pairwise linkage disequilibrium coefficients between *ABCC2* polymorphisms

	G-1774delG	C-24T	G1249A	C3972T
G-1774delG		0.80	-1.0	0.94
C-24T	4.7×10^{-10}		-0.89	-0.86
G1249A	1.4×10^{-10}	1.3×10^{-5}		-1.0
C3972T	1.1×10^{-14}	1.1×10^{-85}	2.3×10^{-7}	

Linkage disequilibrium coefficients (D') are given in the right upper part; P values are given in the left lower part.

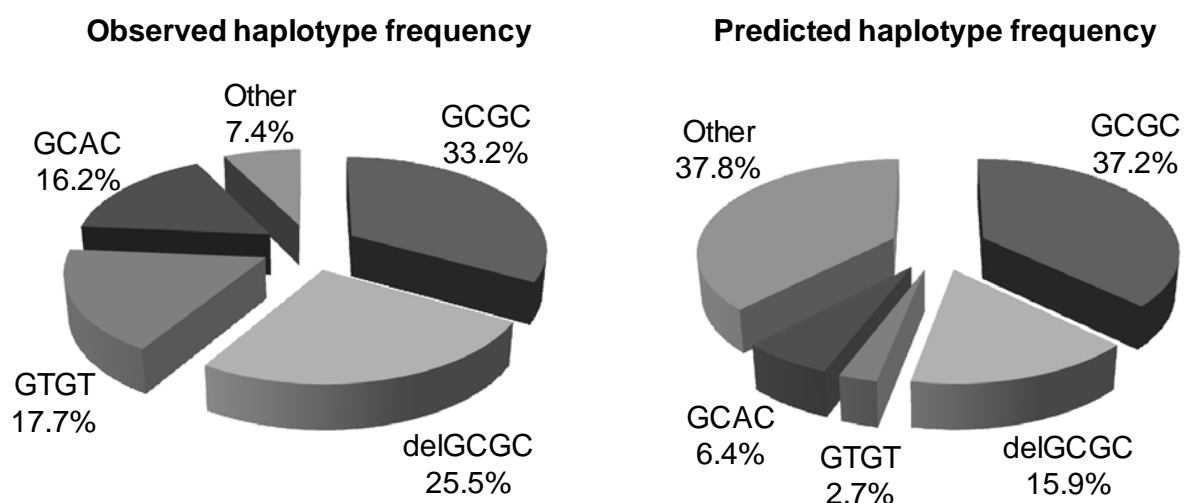


Figure 6. Observed and predicted *ABCC2* haplotype frequency

各ハプロタイプと治療抵抗性との関係を Table 18 に示す。Bonferroni の多重比較法による補正を行うと有意ではないが、delGCGC ハプロタイプは治療抵抗性患者に多く認められた (25.5% vs. 32.7% ; $P = 0.049$)。

しかし、精神遅滞を合併した患者が delGCGC ハプロタイプに多く存在したことから、精神遅滞合併の有無により層別して解析を行ったところ、delGCGC ハプロタイプは治療抵抗性に影響しなかった。

Table 18. Frequencies of *ABCC2* haplotypes in drug responsive and resistant epilepsy

Haplotypes ^a	Responsive	Resistant	<i>P</i> value ^b
GCGC	33.2%	32.3%	0.83
delGCGC	25.5%	32.7%	0.049
GTGT	17.7%	18.8%	0.73
GCAC	16.2%	12.0%	0.19
Other ^c	7.4%	4.2%	—

^a Haplotype configuration was defined as G-1774delG, C-24T, G1249A and C3972T

^b *P* values were obtained after 10,000 permutation tests.

^c Haplotypes with frequency below 5%.

2-3 精神遅滞との関係

精神遅滞の合併患者に delGCGC ハプロタイプが多く存在していたため (32.4% vs. 22.0% ; $P = 0.009$; Table 15)、*ABCC2* 遺伝子多型と精神遅滞の関係を検討した。各 *ABCC2* 遺伝子型の検討では、G-1774delG が有意に精神遅滞と関係し、delG を有する患者で精神遅滞の合併患者が多かった (72.3% vs. 59.5% ; $P = 0.03$; Table 19)。さらに、精神遅滞を合併していない患者では Hardy-Weinberg 平衡を満たしたが ($P = 1.0$)、精神遅滞合併患者では偏りを認め ($P = 0.07$)、delG/delG 遺伝子型の頻度が予測値 ($n = 20$) に比べて、実測値 ($n = 14$) で低かった。

Table 19. Frequencies of *ABCC2* haplotypes in mental retardation (MR) and non-mental retardation (Non-MR) groups

Haplotypes ^a	Non-MR (n = 94)	MR (n = 185)	<i>P</i> value ^b
GCGC	35.5%	31.4%	0.34
delGCGC	22.0%	32.4%	0.009
GTGT	17.9%	18.3%	1.00
GCAC	15.2%	13.8%	0.61
Other ^c	9.4%	4.1%	—

^a Haplotype configuration was defined as G-1774delG, C-24T, G1249A and C3972T

^b *P* values were obtained after 10,000 permutation tests.

^c Haplotypes with frequency below 5%.

2-4 ビリルビン値に及ぼす影響

直接ビリルビンは *ABCC2* の基質¹¹⁰ であるため、血清総ビリルビン値を *ABCC2* 活性の指標として代用し、*ABCC2* 遺伝子型及びハプロタイプ間で比較した。結果、全ての *ABCC2* 遺伝子多型及びハプロタイプは血清総ビリルビン値に影響を与えなかった。

第3項 小括

第1項では、*ABCB1* の遺伝子多型である G2677T/A と C3435T の TT 遺伝子型及び C1236T、G2677T/A、C3435T の TTT ハプロタイプが治療抵抗性と関係し (Table 10、Table 12)、CGC/CGC ディプロタイプが有効性と関係することを明らかにした (Table 13)。また、それらの結果は白人での報告と異なり、人種差を認めた。

Siddiqui ら¹⁰⁴ が *ABCB1* C3435T の CC 遺伝子型が治療抵抗性と関係することを報告して以来、支持する結果^{106,108} と否定する結果^{105,107,109}、さらには CGC/CGC ディプロタイプが治療抵抗性に影響していたこと^{106,108} も報告され、*ABCB1* の遺伝子多型の治療抵抗性に与える影響ははっきりしていない。本研究の結果は、C3435T の TT 遺伝子型が治療抵抗性と関係し、CGC/CGC ディプロタイプは有効性と関係しており、白人での報告と相反する結果となった。*ABCB1* 遺伝子多型が mRNA やタンパクの発現量、活性、基質薬物の体内動態に与える影響については矛盾した報告が多数存在する^{95,96,98}。しかし、白人では C3435T の CC 遺伝子型で小腸での P-gp 発現量が増加し、ジゴキシンの area under curve (AUC) が減少していた一方⁹⁷、日本人では十二指腸の *ABCB1* mRNA 量が C アレルで減少し¹¹³、ジゴキシンの AUC は増加しており¹¹⁴、meta-analysis で、ジゴキシンの体内動態に対する C3435T 遺伝子多型の影響が白人と日本人では相反することが明らかにされた¹¹⁵。さらに、最近 Leschziner らは白人てんかん患者を対象とした前向きコホート研究で *ABCB1* 遺伝子多型が治療抵抗性に影響しないことを報告した¹¹⁶。一方、Kwan らは中国人を対象とした検討で C3435T の TT 遺伝子型が治療抵抗性と関係するという我々の結果を支持する報告をしている¹¹⁷。以上より、*ABCB1* 遺伝子多型はアレル頻度やハプロタイプ頻度⁹⁵のみならず、表現型も人種によって異なる可能性が考えられた。

てんかんは様々な原因による症候群であり、様々な要因が抗てんかん薬の反応性に影響する^{23,86,87,112}。本研究対象においても、過去の報告と同様に、若年でのてんかん発症、症候性・潜因性てんかん、精神遅滞（重症心身障害）の合併が治療抵抗性と有意に関係した。近年、Szoeki ら³¹ や Ferraro ら¹¹⁸ はてんかん分類や服用薬、投与量などの治療効果に影響を与える交絡因子を考慮して、てんかんの薬理遺伝学研究を行うことの重要性を述べている。本研究では、ロジスティック回帰分析を用いて、てんかん分類や発作型などの臨床情報を踏まえて解析を行っ

た。過去の *ABCB1* 遺伝子多型と治療抵抗性との関係を検討した研究では臨床情報が考慮されておらず、相反する結果の一因となった可能性が考えられる。

近年、*CBZ* を十分量服用しているにもかかわらず血中濃度が上昇せず、脳血管内皮細胞や星状膠細胞などで *P-gp* が過剰に発現していた治療抵抗性てんかんの症例が報告された¹¹⁹。*P-gp* は消化管にも発現しているので⁹⁵、*ABCB1* 遺伝子型は抗てんかん薬の血中濃度にも影響を与えているのではないかと仮定して、*ABCB1* 遺伝子多型の *CBZ* 体内動態に与える影響も検討したが、血中濃度及び *CL* 共に影響を認めなかった。しかし、*CBZ* の *C/D* 比が *C3435T* の *TT*、*CT* 遺伝子型で低く、*CGC/CGC*、*TGC/CGC* ディプロタイプで高い結果は治療抵抗性の結果に矛盾しない。さらに *CBZ* は *P-gp* の基質であるか否か議論があり^{94,120}、*CBZ* による *CYP* や *P-gp* の誘導や^{33,121}、*P-gp* 欠損による代償機構¹²² が知られているため、*ABCB1* 遺伝子型は *CBZ* の血中濃度に影響しないという結論には至らないが、脳内濃度にも影響する可能性が示唆された。

第2項で検討した *ABCC2* 遺伝子多型に関しては、*G1249A* の *GA* 遺伝子型を有する治療抵抗性患者の脳組織では、*ABCC2* タンパク発現量が増加していたとの報告があるものの¹¹¹、本研究では *G1249A* を含め、全ての *ABCC2* 遺伝子多型及びハプロタイプと治療抵抗性との有意な関係は認めなかった (Table 16、Table 18)。

抗てんかん薬が *ABCC2* の基質であるか否かについての情報は限られているが、*PHT* では脳内濃度や治療効果が *ABCC2* 遺伝子欠損ラットで上昇することが認められており、*CBZ* や *VPA* も *ABCC2* の基質となることが示唆されている²⁴。しかし、否定的な報告^{123,124} と共に、動物種差¹²³ や *P-gp* による代償機構を認めた報告¹²⁵、さらには *CBZ* や *PB* による *ABCC2* の誘導^{110,121} が報告されており、*ABCC2* の抗てんかん薬輸送や治療抵抗性への関与については明確ではない。一方で、本研究で検討した *G-1774delG*、*C-24T*、*G1249A*、*G3972T* の4つの遺伝子多型及びハプロタイプは *ABCC2* mRNA やタンパクの発現量、活性、基質薬物の体内動態、副作用発現率に影響することが報告されている⁹⁹⁻¹⁰³。しかし、これらの遺伝子多型は *ABCC2* の基質であるビリルビン値¹¹⁰ に影響せず、表現型への関与についても未だ不明である⁹⁸。このため、今研究結果から *ABCC2* と治療抵抗性との関係及び *ABCC2* 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響を否定することはできず、さらなる研究が必要である。

G-1774delG、C-24T、G1249A、C3972T の delGCGC ハプロタイプ、特に G-1774delG は交絡因子である精神遅滞と有意に関係した。しかし、ABCC2 の遺伝的欠損が原因である Dubin-Johnson 症候群の患者が精神遅滞を合併するわけではなく¹¹⁰、ABCC2 の変異が精神遅滞の原因であるとは考え難い。ABCC2 は染色体 10q のサブテロメア領域近くの 10q23-24 に存在しているが、染色体末端部のテロメアに隣接したサブテロメア領域は、染色体間の組み換えや分節重複の起こりやすい領域であり¹²⁶、原因不明の精神遅滞ではこのサブテロメア領域に高頻度に構造異常が認められている^{127,128}。本研究においても、ABCC2 遺伝子多型間に強い連鎖不平衡を認めており、G-1774delG または delGCGC ハプロタイプがこの領域にある精神遅滞関連遺伝子と連鎖しているのではないかと推察した。

今回の研究は、多重比較の問題を考慮して Bonferroni の方法による補正を行うと有意差が消失し、他の変異^{95,98}や他のトランスポーター^{24,25,90,91}、さらには他のメカニズム^{24,25,129}の影響も考えられるため^{24,25}、さらなる研究が必要である。

第3章 カナダ穀物取扱作業者の気道障害における薬理遺伝学的検討

COPD は有害な粒子やガスの吸入によって生じた気道の炎症に基づく進行性の気流制限を呈する疾患で、慢性的な咳嗽や喀痰、労作時呼吸困難などを生じ、病態の進行に伴う呼吸困難、急性増悪による繰り返しの入院、QOL の低下、治療に伴う医療費の増大などが問題視されている^{130,131}。死亡者数は年々増加し、2020年には世界の死亡原因の3位になると予想されている¹³¹。しかし、未だ COPD の根本的な治療法はなく、発症及び進行の予防が重要である。

喫煙は COPD の確立された危険因子である (Table 20)^{130,131}。また有機粉塵はその中に含まれる化学物質や微生物が気道を直接障害する他、エンドトキシンが活性酸素の産生を増加させて、気流閉塞や気道炎症を引き起こす¹³²⁻¹³⁵。その結果、穀物の運搬や貯蔵などに携わる穀物取扱作業者では職業的有機粉塵暴露によって呼吸機能の低下や呼吸器症状を生じ、COPD の発症リスクが高い^{134,136-139}。

一方、COPD 発症に関する候補の遺伝因子は数多く報告されているが (Table 21)、 α_1 -antitrypsin (AAT) の遺伝的欠損以外は明確ではない^{130,131,140,141}。しかしながら、COPD の発症率は喫煙者の 10-20% であり、遺伝子環境相互作用 (gene-environment interaction) による呼吸機能障害の感受性の個体差が示唆されている¹⁴¹⁻¹⁴⁵。

Table 20. Risk factors for developing COPD¹⁴⁶

Degree of certainty	Environmental factors	Host factors
Certain	Tobacco smoke Some occupational exposures	α_1 -antitrypsin deficiency
Good evidence	Outdoor air pollution Low socioeconomic status Alcohol intake Environmental tobacco smoke in childhood Other occupational exposures	Low birth weight Childhood respiratory infection Atopy (high IgE) Bronchial hyperresponsiveness Family case-history
Supposed	Adenovirus infection Dietary deficiency of vitamin C Indoor air pollution	Genetic predisposition

Table 21. Candidate genes involved in the development of COPD¹⁴⁰

Susceptibility Genes	
Proteases-antiproteases	α_1 -Antitrypsin (AAT), Matrix metalloproteinases (MMP) Disintegrin and metalloproteinase (ADAM) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)
Metabolizing enzymes	Microsomal epoxide hydrolase (mEH) Glutathione S-transferases (GST) Cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP2A6, CYP2E1
Antioxidants	Heme oxygenase-1 (HO) Extra cellular superoxide dismutase (EC-SOD) Nuclear factor-E2 p45-related factor 2 (NRF2)
Inflammatory mediators	Tumor necrosis factor α (TNF- α), Surfactant gene proteins (SP) Transforming growth factor β (TGF- β), Interleukins (IL) Vascular endothelial growth factor (VEGF) Vitamin D binding protein (VDBP), Toll-like receptors (TLR) Interleukin receptors antagonist (ILRN) Immunoglobulin E receptor I- β (FceRI- β), Defensins
Mucociliary clearance	Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) Human calcium-activated chloride channel 1 (CLCA1) β_2 -adrenergic receptor (ADRB2)

肺は直接外界に曝される臓器であり、多くの代謝酵素が存在するが¹⁴⁷、その活性の個体差がタバコ煙などの物質への感受性に影響し、呼吸機能の低下や COPD の発症に関与すると考えられる^{147,148}。これまでに、気管支上皮細胞に発現する第二相の代謝酵素である microsomal epoxide hydrolase (mEH) がタバコ煙中に含まれるエポキシド体や活性酸素種を代謝すること、さらに *mEH* 遺伝子多型が気道障害や COPD の発症や進行に影響することが示唆された^{142,149-151}。しかしながら、代謝酵素の遺伝子多型と気道障害に関する研究は十分ではない。

本章では、カナダの穀物取扱作業者を対象として、過去に検討されていない代謝酵素:CYP3A5 と paraoxonase-1 (PON1)に着目して、*CYP3A5*3* 及び *PON1 Q192R* 遺伝子多型が気道障害に及ぼす影響を遺伝子環境相互作用を含めて検討した。

第 1 項 喫煙及び職業性暴露と呼吸機能との関係

カナダの男性穀物取扱作業者 216 例（年齢：37.0 ± 9.4 歳、就労年数：13.2 ± 8.9 年）から得た呼吸機能及び慢性呼吸器症状の発現頻度を、喫煙歴または就労中のマスク使用の有無で比較した。ただし、呼吸機能のうち、一秒量（forced expiratory volume in the first second: FEV₁）及び一秒率（FEV₁/forced vital capacity: FEV₁/FVC）を閉塞性換気障害、努力肺活量（FVC）を拘束性換気障害の指標とした。

1-1 喫煙歴

喫煙歴で分類した呼吸機能と慢性呼吸器症状の発現頻度を Table 22 に示す。喫煙者、禁煙者、非喫煙者はそれぞれ 56 例（25.9%）、52 例（24.1%）、108 例（50.0%）であり、咳嗽、喀痰、喘鳴、軽い運動による息切れの頻度はそれぞれ 23 例（10.6%）、21 例（9.7%）、28 例（13.0%）、14 例（6.5%）であった。喫煙歴で呼吸機能に差はなかったが、慢性呼吸器症状の発現頻度が禁煙者及び非喫煙者に比べて喫煙者で有意に高かった（咳嗽： $P = 0.001$ ，喀痰： $P < 0.001$ ，喘鳴： $P < 0.001$ ；Table 22）。

Table 22. Lung function variables and chronic respiratory symptoms by smoking status

	Current smoker	Ex-smoker	Never smoker	<i>P</i> value
Lung function variables				
FEV ₁ (L)	5.5 ± 0.9	5.3 ± 0.9	5.6 ± 0.8	0.14
FEV ₁ % predicted	97.1 ± 13.6	98.9 ± 12.3	99.0 ± 11.8	0.61
FVC (L)	4.2 ± 0.8	4.1 ± 0.7	4.4 ± 0.7	0.05
FVC % predicted	102.3 ± 12.1	101.1 ± 12.0	102.5 ± 11.5	0.77
FEV ₁ /FVC (%)	76.3 ± 6.6	77.8 ± 4.7	78.3 ± 6.3	0.12
FEV ₁ /FVC % predicted	94.8 ± 7.9	97.9 ± 5.6	96.7 ± 7.9	0.09
Chronic respiratory symptoms				
Cough	13 (23.2)	5 (9.6)	5 (4.6)	0.001
Phlegm	13 (23.2)	5 (9.6)	3 (2.8)	< 0.001
Wheezing	17 (30.6)	5 (9.4)	6 (5.6)	< 0.001
Breathlessness	5 (8.9)	3 (5.8)	6 (5.6)	0.69

Presented are mean ± SD or number of subjects (percentages).

1-2 マスクの使用状況

マスクの使用状況で分類した呼吸機能と慢性呼吸器症状の発現頻度を Table 23 に示す。取り扱う穀物の頻度は高い順に barley (75.0%)、canola (71.3%)、wheat (67.6%)、oats (67.1%)、flax (66.7%)、field peas (65.3%)、rye (48.1%)、canary seed (36.6%) であった。対象者の半数以上 (55.6%) が穀物粉塵の暴露時に常時もしくは頻回にマスクを使用し、マスク使用群の FEV₁ 及び FVC は、マスク不使用群に比べて有意に低かった。

Table 23. Lung function variables and chronic respiratory symptoms by mask wearing status

	Always or most of the time	Sometimes or never	P value
Lung function variables			
FEV ₁ (L)	4.4 ± 0.7	4.1 ± 0.7	< 0.001
FEV ₁ % predicted	100.7 ± 11.3	95.8 ± 13.3	0.004
FVC (L)	5.7 ± 0.9	5.3 ± 0.8	0.003
FVC % predicted	104.1 ± 11.3	100.0 ± 11.9	0.01
FEV ₁ /FVC (%)	78.0 ± 6.0	77.0 ± 6.1	0.23
FEV ₁ /FVC % predicted	96.8 ± 7.5	95.8 ± 7.4	0.32
Chronic respiratory symptoms			
Cough	10 (8.3)	12 (13.0)	0.36
Phlegm	14 (11.7)	6 (6.5)	0.24
Wheezing	12 (10.0)	14 (15.2)	0.29
Breathlessness	4 (3.3)	10 (10.9)	0.05

Presented are mean ± SD or number of subjects (percentages).

第 2 項 CYP3A5 遺伝子多型に関する検討

CYP は種々の物質の代謝をする一方で、タバコ煙や農薬に含まれる有害化学物質を代謝活性化することが知られ^{147,148,152,153}、*CYP1A1* や *CYP2E1*、*CYP2A6* の遺伝子多型による代謝活性化の違いが COPD の発症に関与することが示唆されている¹⁵⁴⁻¹⁵⁶。*CYP3A5* は肺では *CYP3A4* より優位に発現し、ヒトの呼吸器に発現する主な CYP 分子種の 1 つとして、特に気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、気管支腺、肺胞マクロファージに高度に発現している^{152,157,158}。*CYP3A5* にはスプライシング異常を起こして *CYP3A5* を発現しない *CYP3A5*3* 遺伝子多型が存在する^{35,50}。このことから、*CYP3A5* 遺伝子多型による気道の *CYP3A5* 発現の有無が有害物質による気道障害への感受性に影響する可能性が考えられる。そこで我々は、*CYP3A5*3* 遺伝子多型が呼吸機能及び慢性呼吸器症状の発現に及ぼす影響を検討した。

本項では、カナダの男性穀物取扱作業員 206 例（年齢：37.4 ± 9.4 歳、就労年数：13.5 ± 8.9 年）を対象とした。*CYP3A5*3* のアレル頻度は 94.7% で、過去の報告（80-95%）^{50,159} と一致し、各遺伝子型の頻度は、184 例（89.3%）が *CYP3A5*3*3*、22 例（10.7%）が *CYP3A5*1*3* 遺伝子型で、*CYP3A5*1*1* 遺伝子型はいなかった。遺伝子型頻度は Hardy-Weinberg 平衡を満たした（ $P = 0.9$ ）。

2-1 呼吸機能の比較

2002-2004 年の横断研究により、*CYP3A5* 遺伝子型間で呼吸機能を比較した。*CYP3A5* 遺伝子多型は単独では FEV₁ 及び FVC に影響しなかったが、*CYP3A5* 遺伝子型と喫煙歴との相互作用を認めたため (Table 24)、喫煙歴で層別化して検討した。*CYP3A5* 遺伝子型と喫煙歴により層別化した呼吸機能検査値を Table 24 に示す。非喫煙者では、*CYP3A5**1/*3 遺伝子型の FEV₁ 及び FVC が、*CYP3A5**3/*3 遺伝子型に比べて有意に高く、禁煙者では逆に *CYP3A5**1/*3 遺伝子型で低かった。

Table 24. Lung function variables stratified according to the *CYP3A5* genotype and smoking status

	<i>CYP3A5</i> *3/*3	<i>CYP3A5</i> *1/*3	<i>P</i> value*	<i>P</i> value†
FEV ₁ (L)				
Current smoker	4.19 ± 0.73	4.21 ± 1.02	0.01	0.96
Ex-smoker	4.22 ± 0.68	3.45 ± 0.54		0.02
Never smoker	4.35 ± 0.67	4.82 ± 0.72		0.04
FEV ₁ % predicted				
Current smoker	97.9 ± 13.9	95.6 ± 14.0	0.004	0.69
Ex-smoker	100.2 ± 11.9	88.5 ± 14.7		0.05
Never smoker	98.0 ± 11.3	109.0 ± 13.1		0.005
FVC (L)				
Current smoker	5.50 ± 0.87	5.68 ± 1.31	0.03	0.63
Ex-smoker	5.45 ± 0.91	4.57 ± 0.55		0.04
Never smoker	5.61 ± 0.82	6.03 ± 0.84		0.13
FVC % predicted				
Current smoker	102.9 ± 11.7	103.8 ± 14.3	0.05	0.87
Ex-smoker	102.3 ± 12.2	93.0 ± 9.7		0.11
Never smoker	102.1 ± 11.3	109.7 ± 13.3		0.05

Presented are mean ± SD.

* *P* value for interactions of *CYP3A5* genotype × smoking status

† *P* value analyzed by each smoking status

2-2 呼吸機能に影響を与える因子の検討

男性穀物取扱作業者 206 例から得られた 1987 年以降のデータをもとに、一般化推定方程式 (generalized estimating equations: GEE) を用いて呼吸機能の推定を行い、呼吸機能に影響する因子を同定した。年齢、身長、体重、就労年数、喫煙歴、喫煙量、*CYP3A5* 遺伝子型、マスクの使用状況、アレルギー歴を検討し、喫煙及びマスクの使用状況と *CYP3A5* 遺伝子型の相互作用も検討した。

Table 25 に解析結果を示す。年齢は就労年数と強く相関したため ($R = 0.84$; $P < 0.001$)、多重共線性の問題から回帰式には就労年数のみを加えた。就労年数、身長、体重は FEV_1 及び FVC と強く関係し ($P < 0.001$)、喫煙、*CYP3A5**3/*3 遺伝子型、アレルギー歴は FEV_1 を有意に低下させた。一方、喫煙量の増加は FVC を有意に減少させた。さらに、喫煙と *CYP3A5* 遺伝子多型に相互作用を認め、*CYP3A5**3/*3 遺伝子型の喫煙者は他の群に比べて FEV_1 が 637.2 ± 449.0 mL 高かった ($P = 0.005$)。マスクの使用状況は影響せず、*CYP3A5**3 遺伝子多型との相互作用も認めなかった。

Table 25. Estimates ($\pm 1.96 \times \text{SE}$) of regression coefficients based on a multivariate regression analysis of the lung function values

	FEV ₁ (mL)	<i>P</i> value	FVC (mL)	<i>P</i> value
Constant	-4090.8 \pm 1686.4	< 0.001	-7195.6 \pm 2211.3	< 0.001
Height (cm)	55.8 \pm 9.8	< 0.001	79.8 \pm 12.7	< 0.001
Weight (kg)	-7.9 \pm 3.7	< 0.001	-9.2 \pm 4.5	< 0.001
Years in industry	-24.6 \pm 5.5	< 0.001	-15.5 \pm 6.7	< 0.001
Current smokers [*]	-525.5 \pm 410.2	0.01	-316.1 \pm 561.5	0.27
Ex-smokers [*]	-399.8 \pm 454.1	0.08	-338.5 \pm 543.5	0.22
Pack-years of smoking	-7.8 \pm 8.2	0.06	-8.6 \pm 7.1	0.02
<i>CYP3A5</i> *3/*3 genotype [†]	-428.7 \pm 309.3	0.007	-338.2 \pm 447.3	0.14
Use of masks sometimes or never [‡]	2.2 \pm 265.0	0.99	41.9 \pm 234.2	0.73
History of allergy	-100.3 \pm 90.7	0.03	-60.2 \pm 98.4	0.23
Interactions				
Current smokers with *3/*3	637.2 \pm 449.0	0.005	431.8 \pm 597.0	0.16
Ex-smokers with *3/*3	470.9 \pm 491.2	0.06	312.3 \pm 582.1	0.29
Pack-years of smoking with *3/*3	4.5 \pm 9.0	0.33	5.2 \pm 8.2	0.22
Use of masks with *3/*3 [‡]	-30.4 \pm 270.3	0.83	-69.3 \pm 241.9	0.57

^{*} Reference category never smokers; [†] reference category *CYP3A5**1/*3 genotype; [‡] reference category always or most of the time

Minus (-) represents the direction of decrease

2-3 呼吸機能の年間減少率に与える影響

2回以上呼吸機能検査が行われた141例の結果をもとに、GEEを用いて、FEV₁及びFVCの年間減少率を求めた。年間減少率は初回調査時の呼吸機能、身長、体重、就労年数、喫煙歴（呼吸機能測定時の喫煙の有無）、喫煙量、マスクの使用状況、アレルギー歴で調整した。

FEV₁及びFVCの年間減少率（平均 ± 1.96×SE）はそれぞれ -27.4 ± 2.5 mL/yr、 -12.2 ± 3.3 mL/yrであった。FEV₁の年間減少率には喫煙が影響し、喫煙者では非喫煙者よりFEV₁の年間減少率が有意に大きかった（ -33.3 ± 4.6 vs. -24.7 ± 3.0 mL/yr ; $P < 0.001$ ）。また、CYP3A5遺伝子多型は単独ではFEV₁の年間減少率に影響しなかったが（CYP3A5*1/*3: -26.4 ± 8.5 mL/yr、CYP3A5*3/*3: -27.5 ± 2.7 mL/yr）、喫煙との相互作用を認め（ $P = 0.003$ ）、喫煙者ではCYP3A5*1/*3遺伝子型の年間減少率がCYP3A5*3/*3遺伝子型に比べて有意に大きかった（ -48.7 ± 16.4 vs. -31.5 ± 4.7 mL/yr ; $P = 0.02$; Figure 7A）。一方、非喫煙者では逆にCYP3A5*1/*3遺伝子型の年間減少率がCYP3A5*3/*3遺伝子型に比べて小さい傾向があった（ -16.8 ± 8.5 vs. -25.7 ± 3.2 mL/yr ; $P = 0.06$; Figure 7A）。

FVCの年間減少率は喫煙歴で差を認めず、CYP3A5遺伝子多型が独立して影響した（CYP3A5*1/*3: -24.6 ± 9.7 mL/yr、CYP3A5*3/*3: -10.6 ± 3.5 mL/yr ; $P = 0.006$ ）。さらに、喫煙者ではCYP3A5*1/*3遺伝子型のFVCの年間減少率はCYP3A5*3/*3遺伝子型に比べて有意に大きかった（ -27.4 ± 18.9 vs. -5.8 ± 6.5 mL/yr ; $P = 0.04$; Figure 7B）。

マスクの使用状況はFEV₁の年間減少率に影響しなかったが、FVCにおいてはCYP3A5遺伝子多型と相互作用を認め、マスクの不使用群においてCYP3A5*1/*3遺伝子型の年間減少率がCYP3A5*3/*3遺伝子型に比べて有意に大きかった（ -28.4 ± 35.4 vs. -4.8 ± 30.8 mL/yr ; $P < 0.001$ ）。

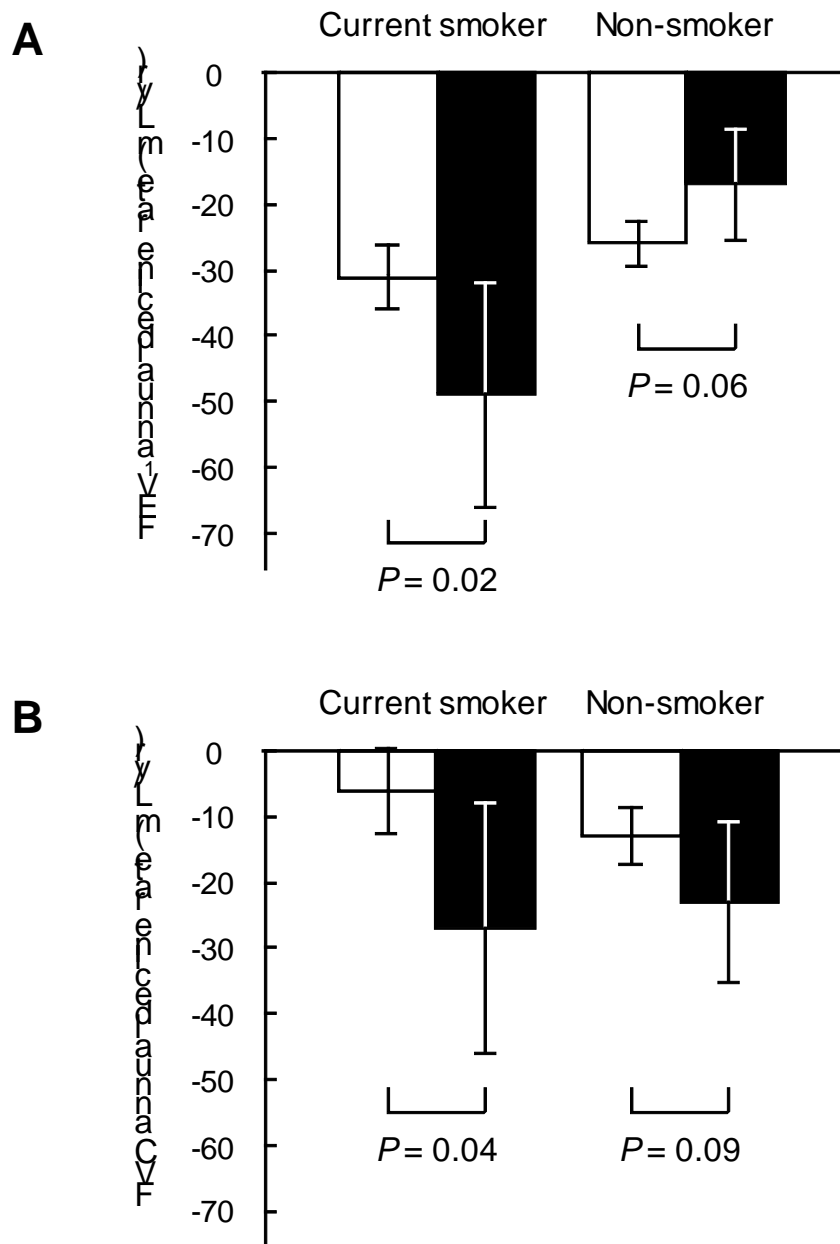


Figure 7. Estimated annual decline rates in FEV₁ (A) and FVC (B) according to smoking status and *CYP3A5**3 genotype. White columns are *CYP3A5**3/*3 and black columns are *CYP3A5**1/*3. The annual decline rates were adjusted for the baseline lung function, height, weight, years in industry, pack-years of smoking, history of allergy and use of masks. The smoking status was classified according to the state at the time of each lung function measurement. Minus (-) represents the direction of decline. The error bars show a 95% confidence interval of the mean.

2-4 慢性呼吸器症状及び COPD 頻度の比較

CYP3A5 遺伝子型による慢性呼吸器症状の頻度分布を Table 26 に示す。喀痰、喘鳴、息切れには差を認めず、咳嗽の頻度は *CYP3A5**1/*3 遺伝子型で *CYP3A5**3/*3 遺伝子型に比べて高い傾向にあった ($P = 0.06$)。喫煙歴で層別化すると、咳嗽の頻度は *CYP3A5**1/*3 遺伝子型の喫煙者で 42.9% と最も高く (Figure 8)、*CYP3A5**3/*3 遺伝子型の非喫煙者に比べて OR が 11.4 (95% CI, 1.8 – 71.1 ; $P = 0.009$; Figure 8) であった。

Table 26. Association between chronic respiratory symptoms and *CYP3A5* genotypes

Chronic respiratory symptoms	<i>CYP3A5</i> *3/*3	<i>CYP3A5</i> *1/*3	<i>P</i> value
Cough	16 (8.7)	5 (22.7)	0.06
Phlegm	18 (9.8)	2 (9.1)	1.00
Wheezing	25 (13.6)	2 (9.1)	0.75
Breathlessness	12 (6.5)	1 (4.5)	1.00

Data ate the number of subjects (percentages).

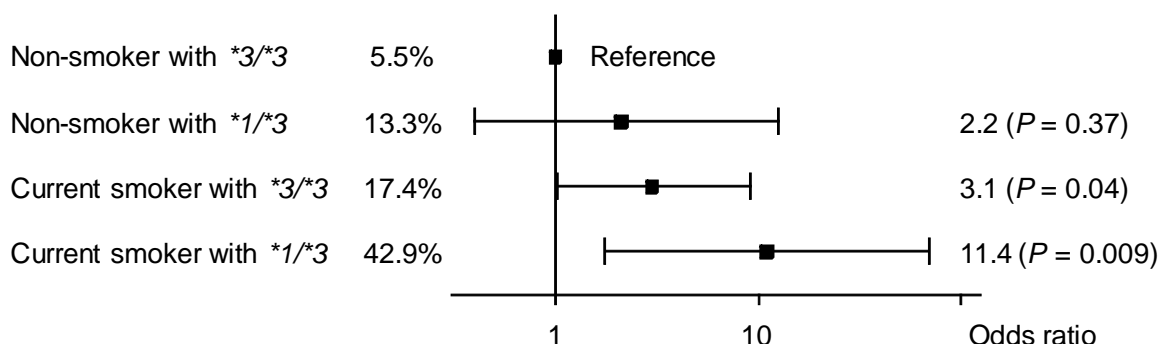


Figure 8. The distribution of the combinations of *CYP3A5* genotype and smoking status in subjects with chronic cough. The horizontal axis is plotted on a log doubling scale.

Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) のガイドライン¹³¹に従い FEV₁/FVC が 70%未満の者を COPD と定義すると、COPD は 22 例 (10.7%) 存在し、18 例 (9.8%) が *CYP3A5**3/*3 遺伝子型、4 例 (18.2%) が *CYP3A5**1/*3 遺伝子型であった。喫煙歴で層別化すると、咳嗽と同様に、COPD の頻度が *CYP3A5**1/*3 遺伝子型の喫煙者で 28.6% と最も高く (Figure 9)、有意差はないが、*CYP3A5**3/*3 遺伝子型の非喫煙者に比べて OR が 4.3 (95% CI, 0.6 – 28.9; *P* = 0.13; Figure 9) であった。

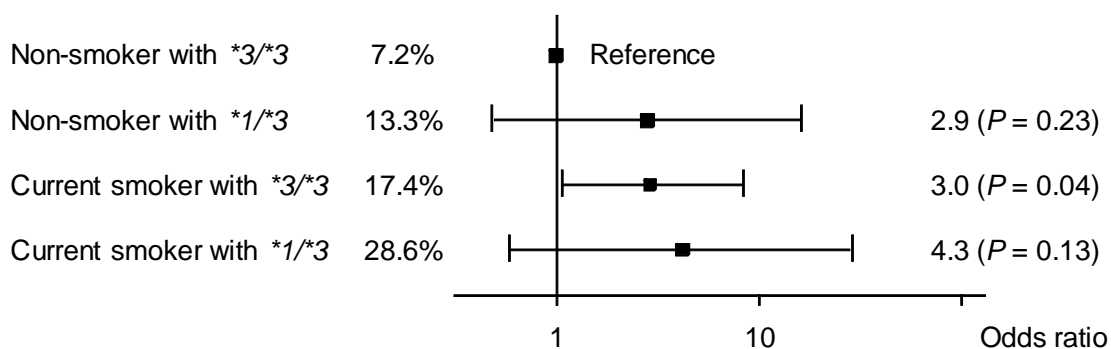


Figure 9. The distribution of the combinations of *CYP3A5* genotype and smoking status in subjects with COPD. The horizontal axis is plotted on a log doubling scale.

第3項 *PON1* 遺伝子多型に関する検討

PON1 は有機リン系殺虫剤の活性代謝物や芳香族エステルを加水分解する酵素であり^{160,161}、low density lipoprotein (LDL) の酸化抑制による抗炎症作用・抗動脈硬化作用¹⁶²⁻¹⁶⁴やエンドトキシン毒性に対する生体保護作用¹⁶⁴⁻¹⁶⁶が報告されている。*PON1* はラット末梢気道のクララ細胞¹⁶⁷や嗅粘膜のボウマン囊¹⁶⁸に存在するため、*PON1* の酵素活性や抗炎症作用(酸化抑制能)に変化を起こす *PON1* Q192R 遺伝子多型^{162,169,170} はタバコ煙や農薬による気道障害への感受性に影響することが予想される。そこで我々は、*PON1* 遺伝子多型が呼吸機能及び慢性呼吸器症状の発現に及ぼす影響を検討した。

本項では、カナダの男性穀物取扱作業員 216 例(年齢: 37.0 ± 9.4 歳、就労年数: 13.2 ± 8.9 年)を対象とした。*PON1* Q192R のアレル頻度は Q アレルが 73.6%と過去の報告(67-74%)¹⁶⁴と一致し、Q/Q、Q/R、R/R の遺伝子型頻度はそれぞれ 113 例(52.3%)、92 例(42.6%)、11 例(5.1%)であり、Hardy-Weinberg 平衡を満たした($P = 0.6$)。なお、本論文では R/R を有する対象が少ないため、R アレルを有する群(Q/R or R/R 遺伝子型)と Q/Q 遺伝子型群の 2 群間で解析した。

3-1 呼吸機能の比較

2002-2004 年の横断研究により、*PON1* Q192R 遺伝子型間で呼吸機能を比較した。Q192R 遺伝子多型は単独では呼吸機能検査値に影響しなかったが、FEV₁ と FEV₁/FVC の予測値に Q192R 遺伝子型と喫煙歴の相互作用を認めたため($P = 0.01$, $P = 0.05$; Table 27)、喫煙歴で層別化して検討した。Q192R 遺伝子型と喫煙歴により分類した呼吸機能検査値を Table 27 に示す。喫煙者では、Q/R or R/R 遺伝子型の喫煙者は、Q/Q 遺伝子型の喫煙者に比べて、FEV₁ の予測値と FEV₁/FVC の実測値及び予測値が有意に低下していた。禁煙者及び非喫煙者では、*PON1* Q192R 遺伝子型の影響は認めなかった。また、FVC に関しては喫煙歴に関係なく遺伝子型は影響しなかった。

Table 27. Lung function variables stratified according to the *PONI* Q192R genotype and smoking status

	Q/Q	Q/R or R/R	<i>P</i> value [*]	<i>P</i> value [†]
FEV ₁ (L)				
Current smoker	4.34 ± 0.67	3.98 ± 0.84	0.24	0.08
Ex-smoker	4.14 ± 0.74	4.13 ± 0.66		0.97
Never smoker	4.39 ± 0.72	4.42 ± 0.67		0.83
FEV ₁ % predicted				
Current smoker	100.9 ± 11.2	92.0 ± 15.1	0.01	0.01
Ex-smoker	98.1 ± 12.1	99.7 ± 12.6		0.66
Never smoker	97.6 ± 11.1	100.5 ± 12.4		0.21
FVC (L)				
Current smoker	5.58 ± 0.80	5.38 ± 1.09	0.74	0.44
Ex-smoker	5.30 ± 0.96	5.36 ± 0.89		0.83
Never smoker	5.63 ± 0.82	5.62 ± 0.84		0.93
FVC % predicted				
Current smoker	104.2 ± 9.1	99.8 ± 15.0	0.25	0.18
Ex-smoker	99.9 ± 11.8	102.1 ± 12.4		0.52
Never smoker	101.8 ± 10.6	103.2 ± 12.5		0.51
FEV ₁ /FVC (%)				
Current smoker	78.0 ± 5.9	74.1 ± 6.8	0.07	0.03
Ex-smoker	78.2 ± 4.0	77.4 ± 5.3		0.55
Never smoker	77.9 ± 7.1	78.7 ± 5.3		0.52
FEV ₁ /FVC % predicted				
Current smoker	96.8 ± 7.1	92.1 ± 8.3	0.05	0.03
Ex-smoker	98.1 ± 4.5	97.7 ± 6.5		0.78
Never smoker	96.1 ± 9.0	97.4 ± 6.5		0.42

Presented are mean ± SD.

^{*} *P* value for interactions of Q192R genotype × smoking status

[†] *P* value analyzed by each smoking status

3-2 呼吸機能に影響を与える因子の検討

男性穀物取扱作業 216 例から得られた 1987 年以降のデータをもとに、GEE を用いて呼吸機能の推定を行い、影響する因子を同定した。年齢、身長、体重、就労年数、喫煙歴、喫煙量、*PON1* 遺伝子型、マスクの使用状況、アレルギー歴を検討し、喫煙及びマスクの使用状況と *PON1* 遺伝子型も検討した。

Table 28 に解析結果を示す。年齢は就労年数と強く相関したため ($R = 0.84$; $P < 0.001$)、多重共線性の問題から回帰式には就労年数のみを加えた。就労年数は全ての呼吸機能値に有意に影響し、年数の増加と共に呼吸機能が低下した。また、身長・体重は FEV_1 及び FVC と関係し ($P < 0.001$)、アレルギー歴は FEV_1 及び FEV_1/FVC を有意に低下させた。*Q192R* 遺伝子多型単独では呼吸機能に影響しなかったが、 FEV_1 、 FEV_1/FVC において喫煙と相互作用を認め、*R* アレル保有の喫煙者は他の群に比べて FEV_1 及び FEV_1/FVC が有意に低下した (-379.7 ± 314.4 mL, $P = 0.02$; $-3.62 \pm 3.19\%$, $P = 0.03$)。マスクの使用状況は影響せず、遺伝子多型との相互作用も認めなかった。

Table 28. Estimates ($\pm 1.96 \times \text{SE}$) of regression coefficients based on a multivariate regression analysis of the lung function values

	FEV ₁ (mL)	P value	FVC (mL)	P value	FEV ₁ /FVC (%)	P value
Constant	-5127.4 \pm 1674.8	< 0.001	-8036.3 \pm 2163.3	< 0.001	100.24 \pm 19.05	< 0.001
Height (cm)	59.8 \pm 10.0	< 0.001	82.7 \pm 12.7	< 0.001	-0.10 \pm 0.11	0.06
Weight (kg)	-9.4 \pm 4.3	< 0.001	-9.7 \pm 4.7	< 0.001	-0.01 \pm 0.04	0.55
Years in industry	-24.0 \pm 5.7	< 0.001	-15.5 \pm 6.7	< 0.001	-0.20 \pm 0.07	< 0.001
Current smoker [*]	203.4 \pm 207.6	0.05	170.4 \pm 236.8	0.16	1.18 \pm 2.33	0.32
Ex-smoker [*]	93.3 \pm 188.7	0.33	-27.6 \pm 217.0	0.80	2.06 \pm 2.13	0.06
Pack-years of smoking	-2.4 \pm 3.7	0.21	-1.1 \pm 4.5	0.64	-0.03 \pm 0.05	0.21
Q/R or R/R genotype [†]	140.2 \pm 189.3	0.15	114.8 \pm 230.7	0.33	0.78 \pm 2.26	0.50
Use of masks sometimes or never [‡]	5.0 \pm 72.7	0.89	7.5 \pm 80.8	0.86	-0.20 \pm 0.89	0.67
History of allergy	-105.4 \pm 87.0	0.02	-60.6 \pm 96.4	0.22	-1.22 \pm 1.12	0.03
Interactions						
Current smoker with R allele	-379.7 \pm 314.4	0.02	-206.5 \pm 369.3	0.27	-3.62 \pm 3.19	0.03
Ex-smoker with R allele	-118.1 \pm 329.3	0.48	-46.1 \pm 392.8	0.98	-1.54 \pm 3.04	0.32
Pack-years of smoking with R allele	-3.3 \pm 6.1	0.28	-6.3 \pm 7.1	0.08	0.01 \pm 0.08	0.91
Use of masks with R allele	-40.4 \pm 101.1	0.43	-42.6 \pm 109.4	0.44	0.11 \pm 1.30	0.87

^{*} Reference category never smokers; [†] reference category Q/Q genotype; [‡] reference category always or most of the time

Minus (-) represents the direction of decrease.

3-3 呼吸機能の年間減少率に与える影響

2回以上呼吸機能検査が行われた147例の結果をもとに、GEEを用いて、年間減少率を求めた。年間減少率は初回調査時の呼吸機能、身長、体重、就労年数、喫煙歴（呼吸機能測定時の喫煙の有無）、喫煙量、マスクの使用状況、アレルギー歴で調整した。

FEV₁、FVC及びFEV₁/FVCの年間減少率（平均 ± 1.96×SE）はそれぞれ-28.6 ± 2.6 mL/yr、-14.4 ± 3.2 mL/yr、-0.31 ± 0.02 %/yrであった。喫煙者のFEV₁とFEV₁/FVCの年間減少率は、非喫煙者に比べて有意に大きかった（FEV₁：-36.8 ± 4.7 vs. -24.8 ± 3.0 mL/yr；*P* < 0.001、FEV₁/FVC：-0.46 ± 0.04 vs. -0.24 ± 0.02 %/yr；*P* < 0.001）。また、*PON1* 遺伝子多型単独ではFEV₁とFEV₁/FVCの年間減少率に影響しなかったが、喫煙との相互作用を認め（*P* = 0.05、*P* < 0.001）、喫煙者ではQ/R or R/R 遺伝子型のFEV₁/FVC年間減少率がQ/Q 遺伝子型に比べて有意に大きくなり（-0.58 ± 0.05 vs. -0.35 ± 0.04 %/yr；*P* < 0.001；Figure 10）、FEV₁年間減少率に関しても同様の傾向を認めた（-40.9 ± 6.4 vs. -33.0 ± 7.0 mL/yr；*P* = 0.10；Figure 10）。一方、非喫煙者では遺伝子型間で差を認めなかった。また、FVCの年間減少率には*PON1* 遺伝子多型の影響を認めなかった。

また、全ての呼吸機能に対してマスクの使用状況は影響せず、遺伝子多型との相互作用も認めなかった。

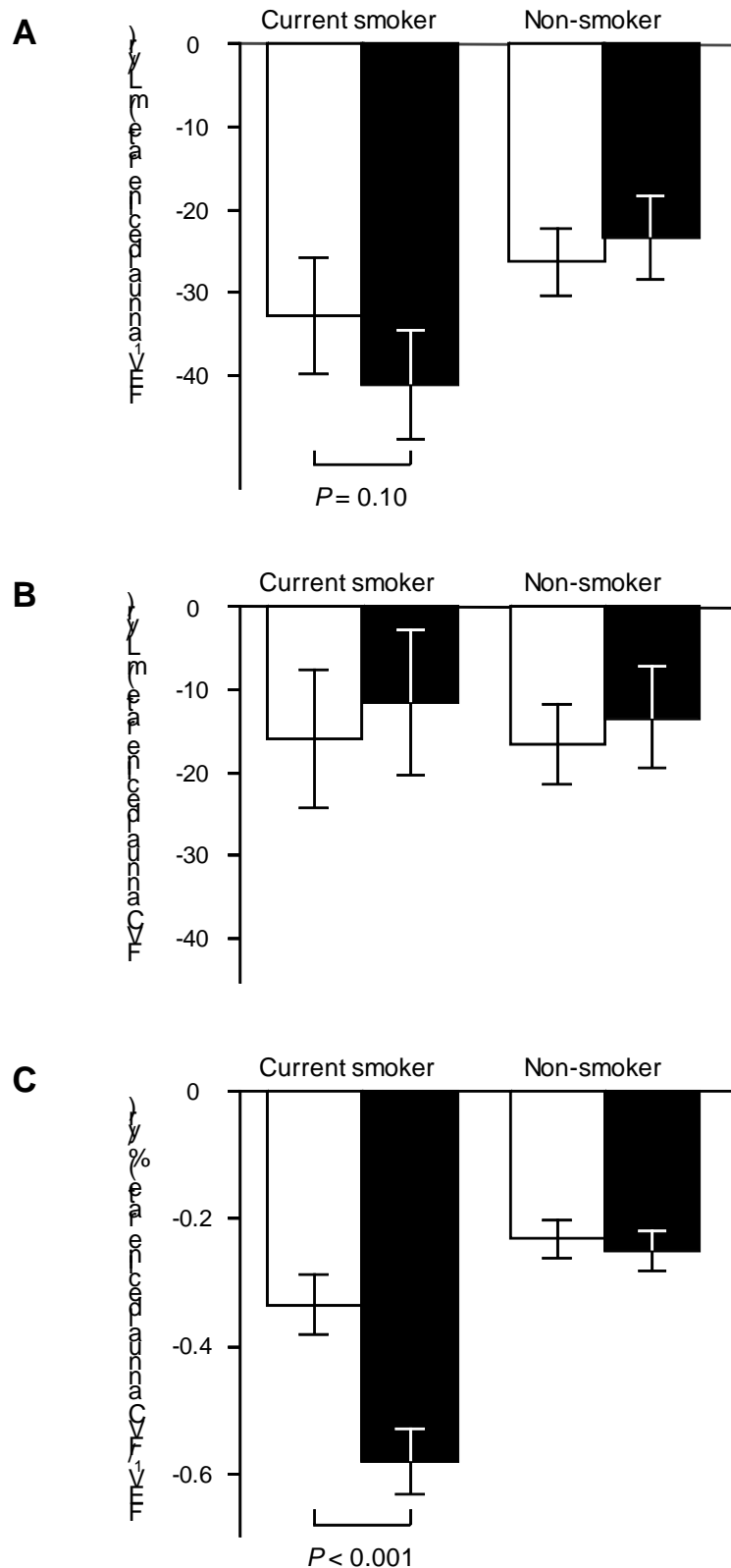


Figure 10. The estimated annual decline rates in FEV₁ (A), FVC (B) and FEV₁/FVC (C) according to smoking status and Q192R genotype. The annual decline rates were adjusted for the baseline lung function, height, weight, years in the industry, pack-years of smoking, history of allergy and use of masks. The smoking status was classified according to the state at the time of each lung function measurement. Error bars show a 95% confidence interval of the mean. Black columns are the 192R allele carriers and white columns are non-carriers.

3-4 慢性呼吸器症状及び COPD 頻度の比較

PON1 Q192R 遺伝子型による慢性呼吸器症状の頻度分布を Table 29 に示す。喀痰、喘鳴、息切れには差を認めず、咳嗽の頻度は Q/R or R/R 遺伝子型で Q/Q 遺伝子型に比べて高い傾向にあった ($P = 0.07$)。喫煙歴で層別化すると、咳嗽の頻度は R アレル保有の喫煙者で 33.3% と最も高く (Figure 11)、Q/Q 遺伝子型の非喫煙者に比べて OR が 11.9 (95% CI, 2.7 – 53.2 ; $P = 0.001$; Figure 11) であった。

Table 29. Association between chronic respiratory symptoms and *PON1* genotypes

Chronic respiratory symptoms	Q/Q	Q/R or R/R	<i>P</i> value
Cough	8 (7.1)	15 (14.6)	0.07
Phlegm	10 (8.8)	11 (10.7)	0.65
Wheezing	17 (15.0)	11 (10.7)	0.34
Breathlessness	10 (8.8)	4 (3.9)	0.14

Data ate the number of subjects (percentages).

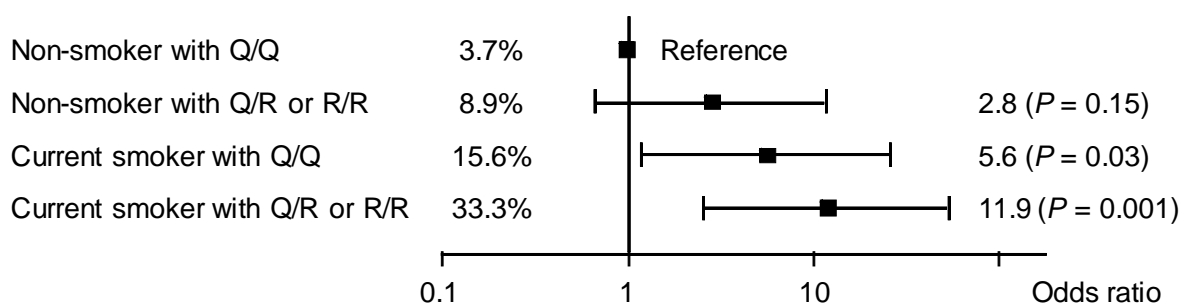


Figure 11. The distribution of the combinations of *PON1* genotype and smoking status in subjects with chronic cough. The horizontal axis is plotted on a log doubling scale.

COPD (FEV₁/FVC < 70%)¹³¹ は 22 例 (10.2%) に認められ、10 例が Q/Q 遺伝子型、12 例が Q/R or R/R 遺伝子型であった。喫煙歴で層別化すると、COPD の頻度は R アレル保有の喫煙者で 29.2% と最も高く、Q/Q 遺伝子型の非喫煙者に比べて有意に OR が上昇した (OR, 5.0 ; 95% CI, 1.5 – 17.4 ; P = 0.01 ; Figure 12)。

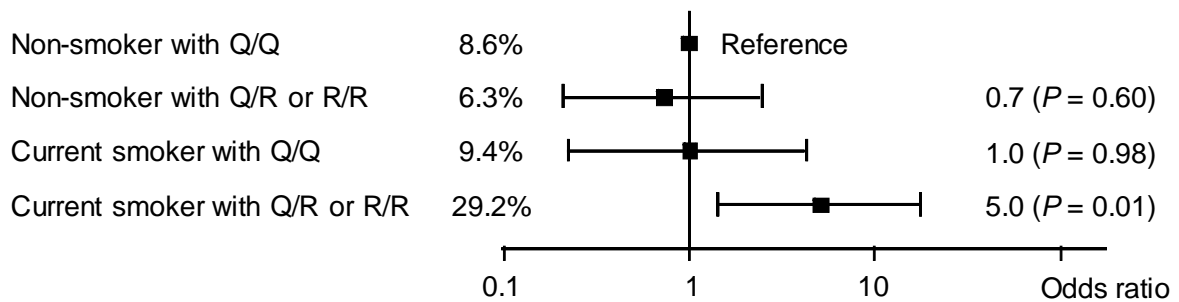


Figure 12. The distribution of the combinations of *PON1* genotype and smoking status in subjects with COPD. The horizontal axis is plotted on a log doubling scale.

第4項 小括

CYP3A5 遺伝子多型に関する検討では、この遺伝子多型と喫煙の相互作用により (Table 24-Table 25、Figure 7)、*CYP3A5*1* アレル保有の喫煙者では FEV_1 と FVC の年間減少率が大きく (Figure 7)、慢性咳嗽及び COPD の頻度が高いことを示した (Figure 8、Figure 9)。一方、非喫煙者では *CYP3A5*1* アレル保有者で FEV_1 が高く (Table 24)、 FEV_1 年間減少率が小さかった (Figure 7)。

CYP は呼吸器の様々な組織に発現して内因性物質や環境化学物質を不活化もしくは活性化する^{147,148,152,153}。*CYP* 遺伝子多型と COPD との関係は、これまでに *CYP1A1*、*CYP2A6*、*CYP2D6*、*CYP2E1* について報告があり¹⁵⁴⁻¹⁵⁶、*CYP1A1* や *CYP2E1* の発現量や活性が増加する遺伝子多型では COPD 発症のリスクが増加し^{154,155}、*CYP2A6* の遺伝的欠損型では低下して¹⁵⁶、代謝活性化の亢進による COPD 発症リスクの上昇が考えられている^{148,154-156}。

本研究では、*CYP3A5* が正常に発現する *CYP3A5*1* アレル保有の喫煙者で、 FEV_1 年間減少率が大きく (Figure 7)、慢性咳嗽及び COPD の頻度が高かった (Figure 8、Figure 9)。*In vitro* では、タバコ煙中の化学物質が *CYP3A* によって代謝活性化することが報告されており¹⁴⁸、*CYP3A5*1* アレル保有の喫煙者では、*CYP3A5* によりタバコ煙中の化学物質が代謝活性化されて COPD の発症に影響すると考えられた。一方で、非喫煙者では FEV_1 が *CYP3A5*1/*3* 遺伝子型で高く、年間減少率が小さい傾向にあり (Table 24、Figure 7)、喫煙以外の環境もしくは生体内の因子に対しては *CYP3A5* が防御的に作用する可能性が示唆されたことは興味深い。

さらに、*CYP3A5*1/*3* 遺伝子型では、閉塞性障害の指標となる FEV_1 だけでなく、拘束性障害の指標となる FVC 年間減少率が喫煙に関係なく大きかった (Figure 7)。*CYP3A5* は肺胞の I 型・II 型上皮細胞や血管内皮細胞、肺胞マクロファージなどにも発現しているため¹⁵⁷、気道障害のみならず肺胞障害にも影響する可能性が考えられた。

CYP3A5 は、気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、気管支腺、肺胞マクロファージに高度に発現している^{147,153,157,158}。*CYP3A5*3* 遺伝子多型はスプライシング異常を起こし、*CYP3A5* を欠損することが肝臓や小腸では報告されているが、呼吸器での影響については不明である。また、肺癌発症のリスクが、白人では *CYP3A5*1/*1* 遺伝子型により増加し¹⁷¹、台湾人では *CYP3A5*1* アレル保有者で低

下する¹⁷²との相反する報告があり、*CYP3A5* 遺伝子多型が呼吸器に及ぼす影響については、さらなる研究が必要である。

PON1 遺伝子多型に関する検討では、*PON1* Q192R 遺伝子多型は喫煙と相互作用をして (Table 27-Table 28、Figure 10)、*PON1* Q192R の R アレル保有の喫煙者では FEV₁ と FEV₁/FVC の年間減少率が大きく (Figure 10)、慢性咳嗽及び COPD の頻度が高いことを示した (Figure 11、Figure 12)。

COPD 発症には遺伝子環境相互作用が重要視されている¹⁴¹⁻¹⁴⁵。本研究では、*PON1* Q192R 遺伝子多型と喫煙との相互作用を認め、Q192R の Q/R or R/R 遺伝子型の喫煙者で FEV₁ 及び FEV₁/FVC の年間減少率が大きく (Figure 10)、慢性咳嗽及び COPD の頻度が高かった (Figure 11、Figure 12)。*PON1* は有機リン系殺虫剤などを代謝する一方^{160,161}、血中での酸化 LDL 形成抑制による抗酸化能を有し、抗炎症作用や抗動脈硬化作用を示す¹⁶²⁻¹⁶⁴。*PON1* Q192R の R アレルは抗酸化能が低く^{162,173}、心血管疾患や脳梗塞の危険因子となる¹⁷⁴⁻¹⁷⁷。タバコ煙中には多くの活性酸素種が含まれ、肺胞や気道を酸化的に傷害するために、抗酸化能が低い R アレル保有者^{162,173}では喫煙による酸化的気道障害に感受性が高いと考えられた。さらに、喫煙者の血清中 *PON1* 濃度及び活性は非喫煙者に比べて低いことが報告されており^{170,178-180}、喫煙による *PON1* 活性の低下も呼吸機能の低下を助長している可能性がある。

PON1 は肝臓から high density lipoprotein (HDL) と結合して血中へ分泌されるが^{169,181}、ラット末梢気道のクララ細胞にも発現することが報告された¹⁶⁷。クララ細胞は異物の解毒、低分子量蛋白の合成や respiratory tract lining fluid (RTLFL) への分泌によって、気道のクリアランスに関与すると考えられている¹⁸²。我々は、気道分泌物であるヒト誘発喀痰中に *PON1* 蛋白及びアシルエステラーゼ活性を証明した¹⁸³。

以上より我々は、*PON1* は気道の第一線の防御機構を担う RTLFL¹⁸⁴ に存在し、さらに喫煙などの有害物質を吸入した際に、血漿中の *PON1* が HDL と共に RTLFL 中へ濾出して¹⁸⁴ 酸化的障害を抑制することで、気道保護作用を示すと考えた。近年、*PON1* の他に *PON2* と *PON3*¹⁶⁴ が気道上皮細胞に発現し、それらの *PON* が緑膿菌の増殖を抑制して、肺及び気道での緑膿菌感染症に対する保護作用を示すことが示唆された^{185,186}。緑膿菌は COPD 患者の喀痰中から検出される一般的な病

原菌の一つであり^{187,188}、細菌感染は COPD の急性増悪に関係することから臨床
上問題視されている^{189,190}。従って今後は、PON の気道感染防御作用も注目され
るであろう。

有機粉塵やエンドトキシンは暴露量依存的に、気道を障害し呼吸機能の低下を
引き起こす^{134,136,138,142}。本研究でも、マスク不使用群の FEV₁ 及び FVC はマスク
使用群に比べて有意に低下した (Table 23)。しかし、本研究では穀物粉塵やエン
ドトキシンの暴露量が明確でなく、非暴露群を含めた検討を行っていないため、
職業性暴露に対する気道障害への影響は明らかにできなかった。

本研究は呼吸機能が比較的正常な集団を対象としたため、COPD 患者が少なく、
遺伝子型や喫煙歴で層別して検討を行うためには対象数が十分ではなかった。ま
た、*CYP3A5*1/*1* 遺伝子型はおらず、*PON1 R/R* 遺伝子型も少ないために遺伝子
用量効果を検証できなかった。一方、*CYP3A5*3* と *PON1 Q192R Q* アレルのアレ
ル頻度 (94.7%と 73.6%) は過去の報告 (80-95%^{50,159}と 67-74%¹⁶⁴) と一致したが、
共に上限であり、COPD 発症のリスクが高い *CYP3A5*1* や *Q192R R* アレルの保有
者が脱落 (離職) してしまう healthy worker effect が考えられた。このように、本
論文では検討できなかった他の交絡因子 (残差交絡)^{130,191} が存在するかもしれな
い。最後に、本研究では女性を除外し、穀物取扱作業者のみを対象としたため、
女性や職業性暴露を受けていない集団への一般化可能性 (generalizability) を明ら
かにできなかった。今後は、前向きな追跡調査や、疾患群を対象とした研究によ
る検証試験が必要である。

第4章 総括

薬理遺伝学は50年の歳月をかけて進歩し³、遺伝情報に基づく個別化薬物療法がFDAの承認を受けるに至った^{9-12,30}。しかし、臨床応用可能な情報は研究成果のごく一部に限られており、この現状を打開するためには遺伝因子と同時に生理・病態因子や環境因子を併せて考慮したPDに関する臨床研究が必要である^{8,19}。

第2章では、安全で有効な治療を目指して、薬物代謝酵素の遺伝子多型が抗てんかん薬治療に及ぼす影響を、世界で頻用されている抗てんかん薬：CBZ及び新規抗てんかん薬：CLBに着目して検討した。さらに、薬物排泄トランスポーターの遺伝子多型が抗てんかん薬の治療効果に及ぼす影響を検討した。

第3章では、疾患感受性の個体差に関する遺伝因子を明らかにして、より効率的な疾患の予防や早期発見に役立てるために、薬物代謝酵素の遺伝子多型が気道障害に及ぼす影響をカナダの穀物取扱作業者を対象として検討した。

抗てんかん薬治療に影響を与えうる薬物代謝酵素の遺伝子多型は多数報告されているが、臨床的な意義が確立されているものは少ない^{31,32}。そこで第2章／第1節では、遺伝因子を考慮したPPK解析により、CYP3A5*3遺伝子多型がCBZ体内動態に及ぼす影響を確認し、CBZ治療における本多型の臨床的意義が少ないことを明らかにした。しかし、CYP3A5*3遺伝子多型の影響は基質などで異なることから、各基質での検討が必要である。次に、CLB治療において、CYP2C19遺伝子多型が活性代謝物N-CLBの血中濃度に影響し、PMでは有効性が高いことを示した。PMではN-CLBの血中濃度がホモEMの約9倍に上昇し、高い有効性を示すにもかかわらず、耐性や副作用の発現率には差を認めなかったことから、N-CLBによる治療、もしくはその血中濃度の至適化によって安全性と有効性を向上できる可能性が示唆された。

抗てんかん薬の治療抵抗性は临床上大きな問題であり^{23-25,88}、その原因の一つにP-gp (ABCB1) やABCC2などの薬物排泄トランスポーターの過剰発現に伴う作用部位からの薬物排泄が挙げられる^{24,25,93,94}。第2章／第2節では、ABCB1及びABCC2の遺伝子多型がてんかんの治療抵抗性に及ぼす影響を検討し、ABCB1遺伝子多型及びハプロタイプは治療抵抗性に影響するが、ABCC2遺伝子多型及びハプロタイプは影響しないことを明らかにした。また、ABCB1遺伝子多型はCBZ

の血中濃度には影響を与えなかったことから、脳内濃度にのみ影響する可能性を示唆した。今回の研究で治療抵抗性に関係した *ABCB1* の遺伝子型やハプロタイプは、白人での研究結果と逆であり、その表現型に人種差が存在することを示した。

抗てんかん薬治療では *try and error* が繰り返されて、発作抑制までに長時間を要するうえ、約 3 割のてんかん患者は治療抵抗性を示す^{23,26}。本研究成果や過去の報告^{31,32,192,193}を踏まえて、薬理遺伝学を抗てんかん薬治療に応用することは、適切な抗てんかん薬の選択や投与量の設定による早期の発作抑制や副作用軽減を可能にし、安全で有効な個別化薬物療法と QOL の改善につながると考える。

COPD の最大の危険因子は喫煙であるが、発症するのは喫煙者の一部であり、COPD 発症の感受性には遺伝因子が影響すると考えられている^{130,131,144}。第 3 章では、薬物代謝酵素：CYP3A5 と PON1 の遺伝子多型が共に喫煙と相互作用をして、喫煙者の気道障害に対する感受性に影響することを初めて明らかにした。また、*in vitro* 研究から CYP3A5 はタバコ煙中の化学物質を代謝活性化することが判っており、この作用によって CYP3A5 蛋白を発現する *CYP3A5*1* アレル保有者で喫煙による気道障害のリスクが高まったと考えられた。逆に *CYP3A5*1* アレルを有する非喫煙者においては、CYP3A5 が保護的に働いている可能性が示唆され、気道における CYP3A5 活性の生理学的意義を考える上で興味深い。PON1 に関しては、*PON1* Q192R の R アレル保有者で喫煙による気道障害のリスクが高いことを示し、PON1 が気道保護作用を有する可能性を示唆した。

COPD による死亡者数は年々増加しているにも関わらず、未だ根本的な治療法が存在せず、QOL 低下や医療費増大防止の観点からも、COPD の発症と進行の予防が重要視されている^{130,131}。我々は、COPD の発症もしくは進行を修飾する遺伝因子を同定することにより、患者の危険度に合わせた効率的な予防や早期発見ができると考えている¹⁹⁴⁻¹⁹⁷。具体的には、喫煙による癌発症リスクに関係する遺伝子情報を患者に還元することで禁煙率が高くなるとの報告があり¹⁹⁶、遺伝子情報に基づいた個別化指導による効果的な禁煙の実現や、さらには局所の薬物代謝酵素の抑制や誘導による新たな治療の可能性も期待される。

2004 年以降 FDA は、6-MP に対する *TPMT*、irinotecan に対する *UGT1A1*28* さらに warfarin に対する *CYP2C9* 及び *VKORC1* を薬物応答を規定する因子として認

め^{9,10,12}、2007年末にはTENやSJSなどの有害反応防止のためにHLA-B*1502保有者には、CBZ投与を避けるよう警告した³⁰。一方で、CYP2D6及びCYP2C19の遺伝子型を判定するDNA判定キットAmpliChip CYP450 Testが承認され¹⁹⁸、30分で遺伝子型を判定する方法も開発されて¹⁹⁹、薬理遺伝学情報の臨床での実用化が技術的にも可能となった。近年は、新薬開発にも薬理遺伝学が取り入れられており^{13,200}、今後遺伝子情報に基づく個別化医療は益々発展すると予想される。

副作用の予防は薬物治療における最大の課題であり、これまでに承認された遺伝子型検査は全て副作用回避を目的としている^{9-12,30}。一方で、本論文でも示したように、薬物治療に抵抗性を示す患者が高頻度に存在することも重要な問題であり²⁰¹、薬理遺伝学の臨床応用の拡大による副作用の回避のみならず、治療効果の向上^{5,6}の実現を期待する。

近年、疾患感受性に関する研究も新たな展開を迎えている。本研究のような、疾患の発症と進展を修飾する遺伝因子の解明は、個々の危険度に応じた効率的な予防による発症者の減少（1次予防）と共に、疾患の早期発見・早期治療・重症化の防止（2次予防）や再発防止（3次予防）にも役立ち、QOLの向上や医療費の削減に役立つ。

現実には、遺伝子多型の臨床的意義を解明する以外に、医師・薬剤師教育や遺伝子研究に対する市民の理解などの基盤整備や倫理面の問題も残されているが^{19,202}、本研究の成果は、遺伝子情報に基づく個別化医療を推進する一助になるものと考えられる。

第5章 方法の部

第1節 抗てんかん薬治療における薬理遺伝学的検討

第1項 対象

1996年以降に独立行政法人国立病院機構熊本再春荘病院の小児科外来を受診、もしくは重症心身障害児病棟へ入院し、本研究に対して同意が得られたてんかん患者のべ281例（男性158例、女性123例、年齢：13.4 ± 9.5歳）のうち、下記に示す適格基準を満たす者を対象とした。なお、本研究は、熊本大学医学薬学研究部等倫理委員会と国立病院機構熊本再春荘病院倫理委員会承認のもとに実施した。

1-1 CYP3A5 遺伝子多型が CBZ の体内動態に及ぼす影響

適格基準1を満たす144例を対象に PPK 解析を行い、32例を対象に得られた結果の妥当性を検証した（Table 30）。

適格基準1

- A) 1996年以降に CBZ の服用歴があり、TDM が行われた者
- B) TDM 時の年齢、体重、投与量、採血後の時間、併用薬が明らかであること
- C) コンプライアンスが良好で、CBZ の血中濃度が定常状態に達していること
- D) 肝・腎機能が正常であること

Table 30. Demographic characteristics of the patients in study 1-1

	PPK group (n = 144)	Validation group (n = 32)
Number of observations	561	69
Men / Women	78 / 66	20 / 12
Age (years)	15.7 ± 8.3 (0.8 – 49.3)	16.5 ± 9.9 (1.3 – 34.2)
Total body weight (kg)	40.1 ± 16.6 (7.5 – 75.0)	38.5 ± 17.1 (9.4 – 66.0)
CBZ dose (mg/day)	416.8 ± 232.0 (70 – 1600)	377.1 ± 195.5 (100 – 900)
CBZ concentration (µg/mL)	6.4 ± 2.5 (2.0 – 19.9)	6.4 ± 2.2 (2.3 – 11.7)
Coadministration		
VPA / PHT / PB	50 / 16 / 28	7 / 2 / 1

Presented are mean ± SD (range) or number of patients.

1-2 CYP2C19 遺伝子多型が CLB 治療に及ぼす影響

適格基準 2 の A,B を満たす 110 例 (Table 31) を対象とした。体内動態、有効性及び耐性発現に関する検討は、加えて C-F、G、G,H を満たすそれぞれ 50 例、104 例、48 例を対象とした。

適格基準 2

- A) 2000 年 5 月以降に、熊本再春荘病院で CLB 服用歴がある者
- B) コンプライアンスが良好であること
- C) CLB と N-CLB の血中濃度が測定されていること
- D) TDM 時の年齢、体重、投与量、採血後の時間、併用薬が明らかであること
- E) CLB と N-CLB の血中濃度が定常状態に達していること
- F) 肝・腎機能が正常であること
- G) 有効性を評価するために十分な期間 CLB による治療を行っていること
- H) 有効性を示した者

1-3 ABCB1 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響

適格基準 3 の A-C を満たす 210 例 (Table 31) を対象として、治療抵抗性に関する検討を行い、A-G 全てを満たす 174 例を対象に ABCB1 遺伝子多型と CBZ 体内動態との関連性を検討した。

適格基準 3

- A) 熊本再春荘病院で 2 年以上抗てんかん薬治療を受けている者
- B) CBZ 服用歴がある者
- C) コンプライアンスが良好であること
- D) 1996 年以降に CBZ の TDM が行われた者
- E) TDM 時の年齢、体重、投与量、採血後の時間、併用薬が明らかであること
- F) CBZ の血中濃度が定常状態に達していること
- G) 肝・腎機能が正常であること

1-4 ABCC2 遺伝子多型が治療抵抗性に及ぼす影響

適格基準 4 を満たす 279 例 (Table 31) を対象として治療抵抗性に関する検討を行った。

適格基準 4

- A) 熊本再春荘病院で 2 年以上抗てんかん薬治療を受けている者
- B) コンプライアンスが良好であること

Table 31. Demographic characteristics of epileptic patients for each study

	Study 1-2 (n = 110) [*]	Study 1-3 (n = 210) [†]	Study 1-4 (n = 279) [‡]
Male	67 (60.9)	119 (56.7)	156 (55.9)
Age (years)	15.5 ± 11.00	17.4 ± 10.1	20.9 ± 10.1
Body weight (kg)	41.3 ± 21.9	44.0 ± 21.0	47.9 ± 19.4
Onset of epilepsy (years)	4.0 ± 4.6	4.6 ± 4.5	4.8 ± 4.9
Duration of therapy (years)	2.4 ± 1.7	9.8 ± 7.3	9.1 ± 4.5
Mental retardation	68 (61.8)	123 (58.6)	185 (66.3)
Seizure type [‡]			
Partial	48 (43.6)	103 (49.0)	190 (68.1)
Generalized	62 (56.4)	107 (51.0)	80 (28.7)
Etiology			
Idiopathic	8 (7.3)	38 (18.1)	50 (17.9)
Cryptogenic	48 (43.6)	78 (37.1)	116 (41.6)
Symptomatic	54 (49.1)	94 (44.8)	113 (40.5)
Prescribed antiepileptic drugs			
Carbamazepine	57 (51.8)	141 (67.1)	140 (50.2)
Valproic acid	45 (40.9)	66 (31.4)	85 (30.5)
Phenytoin	21 (19.1)	28 (13.3)	25 (9.0)
Phenobarbital	13 (11.8)	31 (14.8)	38 (13.6)
Zonisamide	14 (12.7)	26 (12.4)	34 (12.2)
Clobazam	110 (100)	46 (21.9)	61 (21.9)

Presented are mean ± SD or number of patients (percentages).

^{*}Data when Clobazam was started

[†]Data of the last visit day

[‡]The nine patients had unclassified seizures in study 1-4.

第 2 項 データの収集及び試料の採取

2-1 データの収集

熊本再春荘病院のカルテと TDM 結果から診断名、病歴、合併症（精神遅滞、重症心身障害など）、生理所見（性別、年齢、体重など）、抗てんかん薬の服用歴（服用薬、投与量、血中濃度など）、他の併用薬、血液一般及び生化学検査値、臨床症状（発作頻度、効果、副作用など）を調査して、ケースカードを作成した。得られたケースカードを基にデータベースを作成し、解析に使用した。

2-2 試料の採取

知能の発達が正常でない被験者、または 16 歳未満の全被験者については代諾者に、知能の発達が正常な 16 歳以上 20 歳未満の被験者については被験者本人と代諾者に、知能の発達が正常な 20 歳以上の被験者については被験者本人に対して、研究の主旨を十分に説明し、文書による同意を得た。同意を得た被験者から、血液又は口腔粘膜細胞を採取した。

血液は診察時に行う採血と同時に看護婦が採取した。口腔粘膜細胞は口をゆすいだ後に滅菌綿棒で両頬裏を 30 秒こすり、これをドライヤーの冷風で乾燥させ、密閉して保存した。

第3項 定義

3-1 てんかんの診断・分類・治療

てんかんの診断、分類、治療は、熊本再春荘病院のてんかん専門医師によって、ガイドラインに従い行われた^{23,33,203}。以下に、ガイドラインの概要を示す。

まず、病歴や発作の状況などを聴取して、脳波や computed tomography (CT)、magnetic resonance imaging (MRI) など神経画像の検査を行い、非けいれん発作の除外とてんかん発作型及びてんかん（症候群）の分類を行う。発作型及びてんかん（症候群）の分類は国際抗てんかん連盟（International League against Epilepsy : ILAE）の基準に従う^{204,205}。以上を基に、薬剤を選択し、効果や副作用、TDM 結果に注意しながら投与量を設定する。治療は原則単剤から行う。効果が得られない場合や副作用を認めた場合は2剤目を単剤で治療する。それでも発作が抑制されない場合は3剤目もしくは多剤併用治療を考慮する。CLB は効果が得られない場合の併用薬として用いる。コンプライアンスは診察と TDM 結果から判断した。

3-2 CLB 治療に対する有効性、耐性発現及び副作用発現

有効性の評価は発作頻度に基づき、CLB による治療開始前の 50%以上減少した場合を有効と定義した^{47,48}。評価の時期は、CLB 治療前の発作周期の約 5 倍の期間観察した後として、1) 毎日発作がある患者は 1 週間、2) 1 週間に数回発作がある患者は 1 ヶ月間、3) 1 ヶ月間に数回発作がある患者は 6 ヶ月間、4) 2-3 ヶ月間に 1 回発作がある患者は 1 年間経過した時点で有効性を評価した。有効性は 50%以上減少の他に 75%以上減少、100%減少（完全抑制）も検討した。耐性は Löscher と Schmmidt⁴⁹ の定義に従い、有効と判断された後に発作頻度が CLB 治療開始前の 50%以上に戻った場合に耐性が発現と判断した。副作用については、Naranjo probability scale²⁰⁶ で 5 点以上の場合を副作用発現と定義した。

3-3 抗てんかん薬に対する治療抵抗性

治療抵抗性の定義は、Kwan ら²³ の定義に従い、最終診察日から遡り 1 年間発作が全くない患者を治療有効性、1 度でも発作を認めた患者を治療抵抗性とした。

第4項 母集団薬物動態解析

CBZ の母集団薬物動態解析は WinNonMix[®] (Version 2.0.1, Pharsight Corp., Mountain View, CA) を用いて、NONMEM 法により行った²⁰⁷。拡張最小二乗法の最適化アルゴリズムには Quasi-Newton 法を用い、計算には First Order 法を用いた。体内動態モデルは吸収ラグタイムを考慮しない 1 次吸収過程を伴う 1-コンパートメントモデルに近似した。単回投与後の時間 t (hr) における CBZ 血中濃度 C ($\mu\text{g/mL}$) は以下のように表される。

$$C_p = C_0 \times e^{-kt} + \frac{D \times ka \times k}{CL \times (ka - k)} (e^{-kt} - e^{-kat}) \quad (\text{式 3})$$
$$CL = k \times Vd$$

モデルに含まれる薬物動態パラメータは分布容積 Vd (L)、一次吸収速度定数 ka (h^{-1})、一次排泄速度定数 k (h^{-1})、全身クリアランス CL (L/hr) である。また、 D は投与量 (mg/day) である。すべての投与が経口投与であるため絶対的バイオアベイラビリティ (F) は算出できず、 CL は CL/F と解釈した。反復投与時の濃度は重ねあわせの法則を用いて算出した²⁰⁸。

変量効果については、等誤差モデル、比例誤差モデル、指数誤差モデルの中から最適なものを評価し、CBZ の体内動態に影響を与える因子 (固定効果) は、変数増減法を用いて最終モデルを導いた。固定効果は、*CYP3A5* と *ABCB1* の遺伝子多型の他に、性別、年齢、体重、CBZ 投与量、併用薬 (*VPA*、*PHT*、*PB*、*ZNS*、*CZP*、*CLB*) を検討した。以上の固定効果は、下記のように薬物動態パラメータの記述に加えた。

$$\bar{P} = P_0 \prod_{k=1}^m f_k \quad (\text{式 4})$$

ここで \bar{P} は母集団平均パラメータ (\bar{Vd} 、 \bar{ka} 、 \bar{CL}) であり、 P_0 は薬物動態パラメータの基準値 (Vd_0 、 ka_0 、 CL_0) である。 f_k は k 番目の因子 FC_k が連続変数の場合 $(FC_k)^{\theta_k}$ 、 FC_k が名義変数の場合 $f_k = (\theta_k)^{FC_k}$ (θ_k は固定効果パラメータ) とした固定効果変数である。

モデルの統計学的有意性の評価には、NONMEM 解析によって得られる目的関数の変動値 (DOBF) と χ^2 値を比較する尤度比検定を用いた²⁰⁹。

得られた式(最終モデル)の妥当性の評価には、Sheiner と Beal³⁷の方法を用い、予測の偏りの指標である MPE と、予測精度の指標である MSPE、RMSPE を算出した。また、Vozeh ら³⁸の方法により SPE を用いて評価を行った。最終モデルが正しく、パラメータの推定値に偏りがなければ、SPE の平均値とその標準偏差 (SD_{SPE}) はそれぞれ 0 と 1 に近づく。

評価における統計学的処理として MPE と SPE の 95% CI を算出し、この区間が 0 を含まなければ、危険率 5% で有意に偏りがあると判断した。

第 5 項 連鎖不平衡解析

ABCB1 遺伝子多型 (T-129C、C1236T、G2677A/T、C3435T) 及び *ABCC2* 遺伝子多型 (G-1774del、C-24T、G1249A、C3972T) の連鎖不平衡解析を SNPalyze software (Version 6.0, Dynacom Co. Ltd, Chiba, Japan) を用いて行った。また、expectation-maximization (EM) アルゴリズムによりハプロタイプ及びディプロタイプを推定した²¹⁰。さらに、*ABCC2* ハプロタイプと抗てんかん薬治療に対する反応性及び精神遅滞との関係は EM アルゴリズムを用いた haplotype-based case-control study を行い、有意レベルは 10,000 permutation test から求めた。

第 6 項 統計解析

対象者の特徴は、数値変数に対して Student's t-test または ANOVA、順序変数に対して Mann-Whitney U-test または Kruskal-Wallis test、名義変数に対して χ^2 test または Fisher's exact test を用いて比較した。各遺伝子型頻度の Hardy-Weinberg 平衡からのずれは χ^2 test により評価した。

第 2 章／第 1 節の、CLB による有効性と *CYP2C19* 遺伝子多型との関係はロジスティック回帰分析により検討し、性別、年齢、てんかん分類、発作型分類、合併症の有無、有効性評価時の CBZ、VPA、PHT、PB、ZNS 併用の有無での調整済み OR を求めた。CLB が無効と判断され服用を中止するまでの時間と耐性が発現するまでの時間は Kaplan-Meier 法により推定し、*CYP2C19* 遺伝子型間での発生率の比較は log-rank test を用いて行った。また、耐性発現率及び副作用発現率と遺伝子多型の比較には Fisher's exact test を用いた。CLB と N-CLB 血中濃度は Student's t-test または ANOVA により比較し、群間比較は遺伝子型群間で等分散性を示さなかったことから Games-Howell の多重比較法を用いた。また、CLB 投与量と CLB 及び N-CLB の血中濃度の相関は Pearson の相関係数を用いて評価した。CBZ の母集団薬物動態解析の統計学的評価には尤度比検定を用いた(第 4 項参照)。

第 2 章／第 2 節の、抗てんかん薬治療に対する反応性(有効性・抵抗性)と *ABCB1* 遺伝子多型との関係はロジスティック回帰分析により検討し、性別、年齢、てんかん分類、発作型分類、初発発作年齢、合併症の有無、抗てんかん薬服用歴での調整済み OR を求めた。多重比較の問題は Bonferroni の方法を用いて補正した。CBZ の C/D 比は Student's t-test または ANOVA を用いて *ABCB1* 遺伝子型間で比較した。治療反応性及び精神遅滞と各 *ABCC2* 遺伝子多型との関係は Fisher's exact test を用い、OR はロジスティック回帰分析から求めた。一方、*ABCC2* ハプロタイプとの関係は haplotype-based case-control study を用いて検討した(第 5 項参照)。

これらの統計解析には SPSS software (version 15.0; SPSS Inc, Chicago, Ill) を用い、 $P < 0.05$ を有意差有りとした。

第2節 カナダ穀物取扱作業者の呼吸機能における薬理遺伝学的検討

第1項 対象及び研究デザイン

1978年に開始された Canadian Grain Dust Medical Surveillance Program (GDMSP) の参加者から、カナダのサスカチュワン地方在住の男性穀物取扱作業者をランダムに抽出した。これらのうち、本研究に同意し、*CYP3A5* 及び *PON1* の遺伝子多型が判定できた各々206例と216例を各研究の対象とした (Table 32)。2002 - 2004年のデータから横断研究を行い、さらに1987年以降のデータを基に後ろ向きコホート研究 (縦断研究) を行った。なお、本研究はサスカチュワン大学倫理委員会の承認を受けている。

第2項 データの収集及び試料の採取

2-1 データの収集

GDMSPでは3年おきに質問表 (資料1) による年齢、就労年数、喫煙歴、粉塵の暴露歴、マスク使用状況、呼吸器関連の自覚症状などの確認と、身長・体重及び呼吸機能の測定が行われている。そこで、対象者の質問票と測定結果及び遺伝子多型解析の結果からデータベースを作成した。

呼吸機能は American Thoracic Society (ATS) のガイドラインに従い²¹⁾、スパイロメーターを用いて看護師が測定した。測定項目として FEV₁、FVC、FEV₁/FVC を測定した。また、サスカチュワン地方の非喫煙者の穀物取扱作業者 345名のデータを基に回帰分析を行い、予測値を算出後、%予測値を求めた。各呼吸機能検査値の予測値及び%予測値の算出式を以下に示す。

$$\begin{aligned} \text{FEV}_1 &= -1.87686 + 0.04031 \times \text{身長} - 0.02493 \times \text{年齢} \\ \text{FVC} &= -4.88871 + 0.06260 \times \text{身長} - 0.02152 \times \text{年齢} \\ \text{FEV}_1/\text{FVC} &= 118.32196 - 0.18338 \times \text{身長} - 0.14503 \times \text{年齢} \\ \% \text{予測値} &= \text{実測値} / \text{予測値} \times 100 \end{aligned}$$

Table 32. Demographic characteristics of Saskatchewan grain handlers

	<i>CYP3A5</i> *3 (n = 206)	<i>PON1</i> Q192R (n = 216)
Age (years)	37.4 ± 9.4	37.0 ± 9.4
Height (cm)	177.2 ± 6.5	177.1 ± 6.5
Weight (kg)	91.9 ± 15.4	91.5 ± 15.6
Years in industry	13.5 ± 8.9	13.2 ± 8.9
Smoking status		
Current smoker	53 (25.7)	56 (25.9)
Years of smoking	19.9 ± 9.5	19.5 ± 9.0
Pack-years of smoking [†]	14.9 ± 12.7	14.3 ± 12.4
Ex-smoker	50 (24.3)	52 (24.1)
Years of smoking	15.5 ± 7.0	15.2 ± 6.9
Pack-years of smoking [†]	12.9 ± 10.1	12.5 ± 10.1
Never smoker	103 (50.0)	108 (50.0)
Employment of masks		
Always	44 (21.4)	43 (19.9)
Most of the time	71 (34.5)	77 (35.6)
Sometimes	81 (39.3)	86 (39.8)
Never	7 (3.4)	6 (2.8)
History of allergy	41 (19.9)	42 (19.4)
History of asthma	10 (4.9)	9 (4.2)
Lung function values		
FEV ₁ (L)	4.29 ± 0.72	4.28 ± 0.72
FEV ₁ % predicted	98.7 ± 12.5	98.5 ± 12.4
FVC (L)	5.55 ± 0.88	5.52 ± 0.88
FVC % predicted	102.6 ± 11.8	102.1 ± 11.7
FEV ₁ /FVC (%)	77.4 ± 6.0	77.7 ± 6.1
FEV ₁ /FVC % predicted	96.2 ± 7.5	96.5 ± 7.5

Presented are mean ± SD or number of patients (percentages).

[†] Packs/day × years (1 pack = 25 cigarette)

2-2 試料の採取

調査員が各地を訪問し、口をゆすいだ後に滅菌綿棒で両頬裏を 30 秒こすり、口腔粘膜細胞を採取した。これを室温で一晩風乾させ、密閉して保存した。収集した試料は熊本大学に空輸した。

第 3 項 統計解析

対象者の特徴は、数値変数に対して Student's t-test または ANOVA、名義変数に対して χ^2 test を用いて比較した。また、遺伝子型頻度の Hardy-Weinberg 平衡からのずれは χ^2 test により評価した。横断研究における肺機能検査値の比較には two-way ANOVA を用い、遺伝子型と喫煙歴との遺伝子-環境因子間相互作用を調べた。相互作用を認めた場合は、各喫煙歴において遺伝子型の影響を Student's t-test で検討した。また同様に、遺伝子型とマスク使用状況との相互作用についても検討した。さらに、GOLD のガイドライン¹³¹に基づき $FEV_1/FVC < 70\%$ と定義した COPD と遺伝子多型との関係をロジスティック回帰分析により喫煙歴を考慮して検討した。その際、身長、体重、就労年数、マスク使用状況、アレルギー既往歴での調整済み OR を求めた。

同一対象者について繰り返し同一項目の調査や測定を実施した経時観察研究（後ろ向きコホート研究）では、繰り返し測定したデータに相関があることから、この相関を考慮した GEE を用いて検討を行った²¹²。解析モデルには、母集団平均を求める際に有用な marginal モデルを用い、相関構造（誤差項の共分散構造）は、independent、exchangeable、first-order autoregressive、unstructured 型の中から最適なものを選択して、後の解析には first-order autoregressive 型を用いた。呼吸機能に影響を与える因子は、遺伝子多型の他に、年齢、身長、体重、就労年数、喫煙歴（喫煙者、禁煙者、非喫煙者の 3 群に分類）、喫煙量 [箱/日数×年数（1 箱 25 本）]、アレルギー既往歴、マスク使用状況、喫煙歴と遺伝子多型との相互作用、喫煙量と遺伝子多型との相互作用、マスク使用状況と遺伝子多型との相互作用を検討した。一方、呼吸機能の年間減少率に関する検討では、共変量として初回調査時の呼吸機能、身長、体重、就労年数、喫煙歴（呼吸機能測定時の喫煙有無で分類）、喫煙量、アレルギー既往歴、マスク使用状況を考慮した。

肺機能値または年間減少率（従属変数）に対する共変量（説明変数）の影響（回帰係数 β ）は次の例(式 5)に示す通りである。

$$\begin{aligned} FEV_{1ij} = & \beta_0 + \beta_1 \times \text{身長}_{ij} + \beta_2 \times \text{体重}_{ij} + \beta_3 \times \text{就労年数}_{ij} + \beta_4 \times \text{喫煙者}_{ij} + \beta_5 \times \text{禁煙者}_{ij} \\ & + \beta_6 \times \text{喫煙量}_{ij} + \beta_7 \times CYP3A5^{*3/*3}_i + \beta_8 \times \text{アレルギー既往}_{ij} + \beta_9 \times \text{マスク不使用者}_{ij} \\ & + \beta_{10} \times CYP3A5^{*3/*3} \times \text{喫煙者}_{ij} + \beta_{11} \times CYP3A5^{*3/*3} \times \text{禁煙者}_{ij} + \beta_{12} \times CYP3A5^{*3/*3} \\ & \times \text{喫煙量}_{ij} + \beta_{13} \times CYP3A5^{*3/*3} \times \text{マスク不使用者}_{ij} + \varepsilon_{ij} \end{aligned} \quad (\text{式 5})$$

ここで FEV_{1ij} 、身長_{ij}、体重_{ij}、就労年数_{ij}、喫煙量_{ij}は穀物取扱作業員 i の j 番目の測定時における値であり、喫煙者_{ij}、禁煙者_{ij}、 $CYP3A5^{*3/*3}_i$ 、アレルギー既往_{ij}、マスク不使用者_{ij}は穀物取扱作業員 i の j 番目の測定時に当てはまれば 1、当てはまらなければ 0 とする 2 値変数である。

これらの統計解析には SAS software (version 9.01 SAS Institute, Inc., Cary, NC) と SPSS software (version 15.0; SPSS Inc, Chicago, Ill) を用い、 $P < 0.05$ を有意差有りとした。

第3節 実験の部

3-1 試薬・機器

<u>試薬</u>	<u>メーカー</u>
滅菌綿棒	Sanyo, Osaka, Japan
Taq polymerase (5 U/ μ L)	Promega, Madison, WI
<i>Bbs I</i> , <i>Mbo I</i> (5 U/ μ L)	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>Alw I</i> , <i>Dde I</i> , <i>MspA1 I</i> , <i>Nco I</i> , <i>Rsa I</i> (10U/ μ L)	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>Ban I</i> , <i>EcoR V</i> (20 U/ μ L)	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>Hae III</i> , <i>Msp I</i> (10 U/ μ L)	Takara, Shiga, Japan
<i>BamH I</i> (15 U/ μ L)	Nippon Gene, Tokyo, Japan

他の試薬、溶媒は全て特級以上の市販品を用いた。

<u>使用機器</u>	<u>型式</u>	<u>メーカー</u>
サーマルサイクラー	Program Temp Control System PC-808	Astec, Fukuoka, Japan
恒温槽	Water Bath Shaker Personal-11 / Thermo Minder SM-05	Tietech, Nagoya, Japan
電気泳動装置	Sub-Cell Model 192 Agarose gel Electrophoresis Systems	Advance, Tokyo, Japan
UV 照射写真撮影装置	プリントグラフ AE-6911CX	Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan

3-2 DNA の抽出

末梢血からの DNA 抽出は DNA Extractor WB Kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて行った。また、swab 法（口腔粘膜細胞採取法）による粘膜細胞からの DNA 抽出は Richards ら²¹³の方法を一部改変して行った。1.5 mL チューブに綿棒先端を入れ、50 mM NaOH を 600 μ L 加え 10 秒間振盪した。95 °C で 30 分間保温した後、1 M Tris (pH 8.0) を 60 μ L 加え 10 秒間振盪した。綿棒先端を取り除き、残液を DNA 試料とし、解析に使用するまで-30 °C で保存した。

3-3 遺伝子型解析

Primer の合成は Invitrogen (Tokyo, Japan) に依頼した。

Table 33. Primer sequences used for the amplification of PCR fragments and for pyrosequencing

SNPs		Sequence
<i>CYP2C19</i> *2	Forward	5'-AAT TAC AAC CAG AGC TTG GC-3'
	Reverse	5'-TAT CAC TTT CCA TAA AAG CAA G-3'
<i>CYP2C19</i> *3	Forward	5'-AAC ATC AGG ATT GTA AGC AC-3'
	Reverse	5'-TCA GGG CTT GGT CAA TAT AG-3'
<i>CYP3A5</i> *3	Forward	5'-CTT TAA AGA GCT CTT TTG TCT CTC A-3'
	Reverse	5'-CCA GGA AGC CAG ACT TTG AT-3'
<i>ABCB1</i> T-129C	Forward	5'-AGT CAT CTG TGG TGA GGC TG-3'
	Reverse	5'-AAC GGC CAC CAA GAC GTG A-3'
<i>ABCB1</i> C1236T	Forward	5'-TTG AAT GAA GAG TTT CTG ATG TTT TC-3'
	Reverse	5'-CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG-3'
<i>ABCB1</i> G2677A/T	Forward	5'-TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG-3'
	Reverse	5'-TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G-3'
<i>ABCB1</i> C3435T	Forward	5'-TGA TGG CAA AGA AAT AAA GCG A-3'
	Reverse	5'-TGA CTC GAT GAA GGC ATG TAT GT-3'
<i>ABCC2</i> G-1774del	Forward	5'-CCT TGC CAG CAC TTA TCT TGT-3'
	Reverse [†]	5'-biotin-AAT GGC CAA CAG GTA TAT GAC A-3'
	Sequencing	5'-TTG CCA GCA CTT ATC TT-3'
<i>ABCC2</i> C-24T	Forward	5'-CTG TTC CAC TTT CTT TGA TGA-3'
	Reverse	5'-TCT TGT TGG TGA CCA CCC TAA-3'
<i>ABCC2</i> G1249A	Forward	5'-ATC CTT GGC TTT GTC CTT GG-3'
	Reverse	5'-AAT AAT CAG GTT CAC TGT TTC TCC CA-3'
<i>ABCC2</i> C3972T	Forward	5'-AAT AAT TCA GAG GGA TCA CTT GTG ATA T-3'
	Reverse	5'-TCC CTC CAT CCA AAT GAT GA-3'
<i>PONI</i> Q192R	Forward	5'-AAG GCT CCA CCC CAC ATC TT -3'
	Reverse	5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC-3'

[†] Biotinylated primers.

CYP2C19、CYP3A5

*CYP2C19*2*、*CYP2C19*3* 及び *CYP3A5*3* は polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP法) により得られた RFLP産物をアガロースゲル (3%) で電気泳動して判定を行った^{75,214,215}。PCR-RFLP法の反応条件を Table 34、Table 35 に示す。

なお、*CYP2C19* の遺伝子型は、変異アレルを 2 つ有する PM、1 つ有するヘテロ EM、1 つも有さないホモ EM の 3 群に分類した。

Table 34. PCR reaction conditions

	<i>CYP2C19*2</i>	<i>CYP2C19*3</i>	<i>CYP3A5*3</i>
Composition of PCR mixtures			
Distilled water [†]	17.25 µL	17.25 µL	18.25 µL
10×Gene Taq universal buffer	2.50 µL	2.50 µL	2.50 µL
dNTPs (2.5 mM)	2.00 µL	2.00 µL	2.00 µL
Primers (10 µM)	1.00 µL	1.00 µL	1.00 µL
Taq polymerase (5 U/µL)	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL
DNA sample [†]	2.00 µL	2.00 µL	1.00 µL
PCR reaction conditions			
Amplification	40 cycles	40 cycles	37 cycles
Initial denature	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Denature	94°C, 30 sec	94°C, 1 min	94°C, 1 min
Annealing	57°C, 1 min	57°C, 1 min	56°C, 1 min
Extension	72°C, 1 min	72°C, 2 min	72°C, 1 min
Final extension	72°C, 5 min	72°C, 5 min	72°C, 5 min

[†] When genomic DNA was prepared from buccal cells, DNA sample was increased by 1.5 µL and Distilled water decreased by 1.5 µL.

Table 35. RFLP reaction conditions

	<i>CYP2C19*2</i>	<i>CYP2C19*3</i>	<i>CYP3A5*3</i>
Restriction enzyme	<i>Msp I</i>	<i>BamH I</i>	<i>DdeI</i>
Digestion	37°C, 1 hr	37°C, 1 hr	37°C, 1 hr
Composition			
Distilled water	7.50 µL	7.50 µL	7.50 µL
10×Reaction buffer	2.00 µL	2.00 µL	2.00 µL
Restriction enzyme	0.50 µL	0.50 µL	0.50 µL
PCR product	10.00 µL	10.00 µL	10.0 µL
Fragment length (base pair)			
Wild type	49, 120	21, 93	71, 129
Mutation type	169	114	22, 71, 107

ABCB1

T-129C、C1236T、G2677A/T 及び C3435T は PCR-RFLP 法により得られた RFLP 産物をアガロースゲル（3%）で電気泳動して判定を行った²¹⁶⁻²¹⁸。PCR-RFLP 法の反応条件を Table 36、Table 37 に示す。なお、G2677A/T は次のように判定した。

<u>G2677A</u>	<u>G2677T</u>		<u>G2677A/T</u>
Wild type	Wild type	⇒	GG
Wild type	Heterozygous mutation type	⇒	GT
Heterozygous mutation type	Wild type	⇒	GA
Homozygous mutation type	Wild type	⇒	AA
Heterozygous mutation type	Heterozygous mutation type	⇒	AT
Wild type	Homozygous mutation type	⇒	TT

Table 36. PCR reaction conditions

	T-129C	C1236T	G2677A/T	C3435T
Composition of PCR mixtures				
Distilled water [†]	19.75 μ L	20.10 μ L	19.90 μ L	19.75 μ L
10 \times Gene Taq universal buffer	2.50 μ L	2.50 μ L	2.50 μ L	2.50 μ L
dNTPs (2.5 mM)	0.50 μ L	0.80 μ L	0.50 μ L	0.50 μ L
Primers (10 μ M)	1.00 μ L	1.00 μ L	1.00 μ L	1.00 μ L
Taq polymerase (5 U/ μ L)	0.25 μ L	0.10 μ L	0.10 μ L	0.25 μ L
DNA sample [†]	1.00 μ L	1.00 μ L	1.00 μ L	1.00 μ L
PCR reaction conditions				
Amplification	37 cycles	38 cycles	35 cycles	35 cycles
Initial denature	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 3 min
Denature	94°C, 30 sec	94°C, 30 sec	94°C, 30 sec	94°C, 20 sec
Annealing	57°C, 30 sec	57°C, 30 sec	56°C [‡] , 30 sec	55°C, 20 sec
Extension	72°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 30 sec
Final extension	72°C, 5 min	72°C, 5 min	72°C, 5 min	72°C, 5 min

[†] When genomic DNA was prepared from buccal cells, DNA sample was increased by 1.5 μ L and Distilled water decreased by 1.5 μ L.

[‡] When genomic DNA was prepared from buccal cells, the annealing was held at 58°C.

Table 37. RFLP reaction conditions

	T-129C	C1236T	G2677A	G2677T	C3435T
Restriction enzyme	<i>MspA1 I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Ban I</i>	<i>Mbo I</i>
Digestion	37°C, 1 hr	37°C, 1 hr	37°C, 2 hr	37°C, 1 hr	37°C, 1 hr
Composition					
Distilled water	3.65 μ L	3.75 μ L	3.75 μ L	3.75 μ L	3.75 μ L
10 \times Reaction buffer	1.00 μ L	1.00 μ L	1.00 μ L	1.00 μ L	1.00 μ L
100 \times BSA	0.10 μ L	—	—	—	—
Restriction enzyme	0.25 μ L	0.25 μ L	0.25 μ L	0.25 μ L	0.25 μ L
PCR product	5.00 μ L	5.00 μ L	5.00 μ L	5.00 μ L	5.00 μ L
Fragment length (base pair)					
Wild type	74, 141	35, 147, 269	106, 118	26, 198	49, 144
Mutation type	32, 74, 109	182, 269	24, 82, 118	224	193

ABCC2

C-24T、G1249A 及び C3972T は PCR-RFLP 法により得られた RFLP 産物をアガロースゲル（3%）で電気泳動して判定を行った^{102,103}。一方、G-1774del は PCR 後、住商ファーマインターナショナル株式会社（Yokohama, Japan）に委託し Pyrosequencing 法により同定した。PCR 法の反応条件を Table 38 に、RFLP 法の反応条件を Table 39 に示す。

Table 38. PCR reaction conditions

	C-24T	G1249A	C3972T	G-1774del
Composition of PCR mixtures				
Nuclease free water	4.00 µL	4.00 µL	4.00 µL	21.00 µL
2×Go Taq mix buffer	6.00 µL	6.00 µL	6.00 µL	25.00 µL
Primers (10 µM)	1.00 µL	1.00 µL	1.00 µL	2.00 µL
DNA sample	1.00 µL	1.00 µL	1.00 µL	2.00 µL
PCR reaction conditions				
Amplification	30 cycles	30 cycles	30 cycles	45 cycles
Initial denature	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Denature	94°C, 1 min	94°C, 1 min	94°C, 1 min	94°C, 30 sec
Annealing	56°C, 1 min	56°C, 1 min	56°C, 1 min	56°C, 30 sec
Extension	72°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 30 sec
Final extension	72°C, 5 min	72°C, 5 min	72°C, 5 min	72°C, 5 min

Table 39. RFLP reaction conditions

	C-24T	G1249A	C3972T
Restriction enzyme	<i>Bbs I</i>	<i>Nco I</i>	<i>Eco RV</i>
Digestion	37°C, 8 hr	37°C, 5 hr	37°C, 5 hr
Composition			
Distilled water	3.20 µL	3.00 µL	1.90 µL
10×Reaction buffer	1.00 µL	1.00 µL	1.00 µL
100×BSA	—	—	0.10 µL
Restriction enzyme	0.80 µL	1.00 µL	2.00 µL
PCR product	5.00 µL	5.00 µL	5.00 µL
Fragment length (base pair)			
Wild type	56, 155	112	27, 125
Mutation type	211	24, 88	152

PONI

PONI Q192R の同定は Humbert ら²¹⁹ によって報告された PCR-RFLP 法に従って行った。得られた RFLP 産物はアガロースゲル (3%) で電気泳動を行った。PCR-RFLP 法の反応条件を Table 40 に示す。

Table 40. PCR-RFLP reaction conditions of *PONI* Q192R

Composition of PCR mixtures		PCR reaction conditions	
Distilled water	16.75 μ L	Amplification	30 cycles
10 \times Gene Taq Universal buffer	2.50 μ L	Initial denature	95°C, 3 min
dNTPs (2.5 mM)	2.00 μ L	Denature	95°C, 1 min
Primers (10 μ M)	1.00 μ L	Annealing	55°C, 30 sec
Taq polymerase (5 U/ μ L)	0.25 μ L	Extension	72°C, 1 min
DNA sample	2.50 μ L	Final extension	72°C, 3 min
Composition of RFLP mixtures		RFLP reaction conditions	
Distilled water	3.75 μ L	Restriction enzyme	<i>Alw I</i>
10 \times Reaction buffer	1.00 μ L	Digestion	37°C, 3 hr
Restriction enzyme	0.25 μ L	Fragment length (base pair)	
PCR product	5.00 μ L	Wild type	223
		Mutation type	35, 188

謝辞

本研究を行うに際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部薬物治療学分野 中川和子教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して、終始御懇篤なる御指導と御助言を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部薬物治療学分野 佐藤圭創准教授、堀雅晴助教ならびに浜松医科大学臨床薬理学講座 石崎高志教授、大分大学医学部創薬育薬医学講座 櫻井眞治助教に深く感謝の意を表します。

本論文作成に当たり、有益なる御助言と御校閲を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部 齋藤秀之教授ならびに磯濱洋一郎准教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、共同研究として終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました国立病院機構熊本再春荘病院小児科部長 石津棟暎先生に深謝申し上げます。

本研究を行うに際して、ご協力を賜りました国立療養所再春荘病院治験コーディネーター 鶴崎康史先生、坂本茂子先生、作田弘美先生、西岡明子先生、田山由香里先生、故佐藤由紀子先生に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して、遺伝子解析に関して有益なる御助言と御協力を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部遺伝子機能応用学分野 首藤剛講師に深謝申し上げます。

本共同研究及び留学を行うに際して、多大なる御指導と御支援を賜りましたSaskatchewan 大学 Dr. James A.Dosman、Dr. Helen H.McDuffie、Dr. Punam Pahwa に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して、御協力頂きました猿渡淳二博士、中田直之修士、進藤順一修士、上田奈穂修士、萩原隆嗣修士、比嘉容子修士、橋本未雷修士、村田司修士、由留部圭伍修士、江越正芳修士、上田賢太郎修士、後藤周志修士、永田理恵修士、鬼木健太郎修士、安部智英学士、梅本雄一郎学士、高石千聖学士、橋本奈味修士、福島優美修士、池田一之修士、中川瑞奈修士、富安裕子修士、村本洋介修士ならびに当分野の諸氏に心より感謝申し上げます。

本大学院在学期間に実習でお世話になりました諸病院、薬局の薬剤師の先生方に心より感謝申し上げます。

終始御理解頂き支えて下さった先輩方、家族と友人たちに心より感謝致します。

最後に、本研究に御理解頂き、参加頂きました多くの患者様及びその御家族ならびにボランティア参加に御協力いただきました皆様に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Alving, A.S., Carson, P.E., Flanagan, C.L. & Ickes, C.E. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 124, 484-5 (1956).
2. Weinshilboum, R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 348, 529-37 (2003).
3. Meyer, U.A. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet* 5, 669-76 (2004).
4. Evans, W.E. & Relling, M.V. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 429, 464-8 (2004).
5. Eichelbaum, M., Ingelman-Sundberg, M. & Evans, W.E. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 57, 119-37 (2006).
6. Roses, A.D. Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs. *Nat Rev Genet* 5, 645-56 (2004).
7. Evans, W.E. & Relling, M.V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286, 487-91 (1999).
8. Kirchheiner, J., Fuhr, U. & Brockmoller, J. Pharmacogenetics-based therapeutic recommendations--ready for clinical practice? *Nat Rev Drug Discov* 4, 639-47 (2005).
9. Haga, S.B., Thummel, K.E. & Burke, W. Adding pharmacogenetics information to drug labels: lessons learned. *Pharmacogenet Genomics* 16, 847-54 (2006).
10. Maitland, M.L., Vasisht, K. & Ratain, M.J. TPMT, UGT1A1 and DPYD: genotyping to ensure safer cancer therapy? *Trends Pharmacol Sci* 27, 432-7 (2006).
11. Wilke, R.A. et al. Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 6, 904-16 (2007).
12. Food and Drug Administration. FDA approves updated warfarin (coumadin) prescribing information: new genetic information may help providers improve initial dosing estimates of the anticoagulant for individual patients. in *FDA News* (2007 Aug 16).
13. Goodsaid, F. & Frueh, F.W. Implementing the U.S. FDA guidance on pharmacogenomic data submissions. *Environ Mol Mutagen* 48, 354-8 (2007).
14. Lesko, L.J. & Woodcock, J. Translation of pharmacogenomics and pharmacogenetics: a regulatory perspective. *Nat Rev Drug Discov* 3, 763-9 (2004).
15. Evans, W.E. & McLeod, H.L. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 348, 538-49 (2003).
16. Sadee, W. & Dai, Z. Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2, R207-14 (2005).
17. Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y. & Sugiyama, Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 55, 425-61 (2003).
18. Goldstein, D.B., Tate, S.K. & Sisodiya, S.M. Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet* 4, 937-47 (2003).
19. Colhoun, H.M., McKeigue, P.M. & Davey Smith, G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361, 865-72 (2003).
20. Ariyoshi, N. Clinical pharmacogenetics and future prospects in drug therapy. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 120, 181-6 (2002).
21. Gastaut, H. Dictionary of Epilepsy. Part I: Definitions. (World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1973).
22. Mac, T.L. et al. Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a

- systematic review. *Lancet Neurol* 6, 533-43 (2007).
23. Kwan, P. & Brodie, M.J. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 342, 314-9 (2000).
 24. Schmidt, D. & Loscher, W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 46, 858-77 (2005).
 25. Remy, S. & Beck, H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 129, 18-35 (2006).
 26. Browne, T.R. & Holmes, G.L. Epilepsy. *N Engl J Med* 344, 1145-51 (2001).
 27. Man, C.B. et al. Association between HLA-B*1502 allele and antiepileptic drug-induced cutaneous reactions in Han Chinese. *Epilepsia* 48, 1015-8 (2007).
 28. Chung, W.H. et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* 428, 486 (2004).
 29. Mockenhaupt, M., Messenheimer, J., Tennis, P. & Schlingmann, J. Risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in new users of antiepileptics. *Neurology* 64, 1134-8 (2005).
 30. Food and Drug Administration. Carbamazepine prescribing information to include recommendation of genetic test for patients with Asian ancestry: connection of genetic information with medication use can improve safe use of product. in *FDA News* (2007 Dec 12).
 31. Szoeki, C.E. et al. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. *Lancet Neurol* 5, 189-96 (2006).
 32. Depondt, C. & Shorvon, S.D. Genetic association studies in epilepsy pharmacogenomics: lessons learnt and potential applications. *Pharmacogenomics* 7, 731-45 (2006).
 33. Brodie, M.J. & Dichter, M.A. Antiepileptic drugs. *N Engl J Med* 334, 168-75 (1996).
 34. Patsalos, P.N. & Perucca, E. Clinically important drug interactions in epilepsy: general features and interactions between antiepileptic drugs. *Lancet Neurol* 2, 347-56 (2003).
 35. Kuehl, P. et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 27, 383-91 (2001).
 36. Lin, Y.S. et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 62, 162-72 (2002).
 37. Sheiner, L.B. & Beal, S.L. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm* 9, 503-12 (1981).
 38. Vozeh, S., Maitre, P.O. & Stanski, D.R. Evaluation of population (NONMEM) pharmacokinetic parameter estimates. *J Pharmacokinet Biopharm* 18, 161-73 (1990).
 39. Shorvon, S.D. (ed.) *Benzodiazepines: clobazam*, 763-77 (Raven Press Ltd, New York, 1995).
 40. Dichter, M.A. & Brodie, M.J. New antiepileptic drugs. *N Engl J Med* 334, 1583-90 (1996).
 41. Ng, Y.T. & Collins, S.D. Clobazam. *Neurotherapeutics* 4, 138-44 (2007).
 42. Remy, C. Clobazam in the treatment of epilepsy: a review of the literature. *Epilepsia* 35 Suppl 5, S88-91 (1994).
 43. Giraud, C. et al. In vitro characterization of clobazam metabolism by recombinant cytochrome P450 enzymes: importance of CYP2C19. *Drug Metab Dispos* 32, 1279-86 (2004).
 44. Kilpatrick, C., Bury, R., Fullinaw, R. & Moulds, R. Clobazam in the treatment of epilepsy. *Clin Exp Neurol* 23, 139-44 (1987).
 45. Contin, M. et al. Evidence of polymorphic CYP2C19 involvement in the human metabolism of N-desmethyloclobazam. *Ther Drug Monit* 24, 737-41 (2002).

46. Kosaki, K. et al. A major influence of CYP2C19 genotype on the steady-state concentration of N-desmethylobazam. *Brain Dev* 26, 530-4 (2004).
47. Elger, C. et al. Eslicarbazepine acetate: a double-blind, add-on, placebo-controlled exploratory trial in adult patients with partial-onset seizures. *Epilepsia* 48, 497-504 (2007).
48. Glauser, T.A. et al. Double-blind placebo-controlled trial of adjunctive levetiracetam in pediatric partial seizures. *Neurology* 66, 1654-60 (2006).
49. Loscher, W. & Schmidt, D. Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. *Epilepsia* 47, 1253-84 (2006).
50. Xie, H.G., Wood, A.J., Kim, R.B., Stein, C.M. & Wilkinson, G.R. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 5, 243-72 (2004).
51. Burk, O. & Wojnowski, L. Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, 105-24 (2004).
52. Wilkinson, G.R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 352, 2211-21 (2005).
53. Lamba, J.K., Lin, Y.S., Schuetz, E.G. & Thummel, K.E. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 1271-94 (2002).
54. Yamaori, S. et al. CYP3A5 Contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects. *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 120-9 (2004).
55. Westlind-Johnsson, A. et al. Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 31, 755-61 (2003).
56. Wahlby, U., Jonsson, E.N. & Karlsson, M.O. Assessment of actual significance levels for covariate effects in NONMEM. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 28, 231-52 (2001).
57. Yukawa, E. Population-based investigations of drug relative clearance using nonlinear mixed-effect modelling from information generated during the routine clinical care of patients. *J Clin Pharm Ther* 24, 103-13 (1999).
58. Rae, J.M., Johnson, M.D., Lippman, M.E. & Flockhart, D.A. Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 849-57 (2001).
59. Usui, T., Saitoh, Y. & Komada, F. Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs. Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor. *Biol Pharm Bull* 26, 510-7 (2003).
60. Floyd, M.D. et al. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics* 13, 595-606 (2003).
61. Huang, W. et al. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 32, 1434-45 (2004).
62. Kamdem, L.K. et al. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem* 51, 1374-81 (2005).
63. Williams, J.A. et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* 30, 883-91 (2002).
64. Ohmori, S. et al. Differential catalytic properties in metabolism of endogenous and exogenous substrates among CYP3A enzymes expressed in COS-7 cells. *Biochim Biophys Acta* 1380, 297-304 (1998).

65. Haufroid, V. et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 14, 147-54 (2004).
66. Hesselink, D.A. et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 74, 245-54 (2003).
67. Anglicheau, D. et al. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 75, 422-33 (2004).
68. Fukuda, T. et al. CYP3A5 genotype did not impact on nifedipine disposition in healthy volunteers. *Pharmacogenomics J* 4, 34-9 (2004).
69. Gashaw, I. et al. Cytochrome p450 3A4 messenger ribonucleic acid induction by rifampin in human peripheral blood mononuclear cells: correlation with alprazolam pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 74, 448-57 (2003).
70. Yamamoto, T. et al. Effects of the CYP3A5 genetic polymorphism on the pharmacokinetics of diltiazem. *Clin Chim Acta* 362, 147-54 (2005).
71. Shih, P.S. & Huang, J.D. Pharmacokinetics of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in Chinese with different CYP3A5 genotypes. *Drug Metab Dispos* 30, 1491-6 (2002).
72. Wong, M. et al. CYP3A5 genotype and midazolam clearance in Australian patients receiving chemotherapy. *Clin Pharmacol Ther* 75, 529-38 (2004).
73. Gardiner, S.J. & Begg, E.J. Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol Rev* 58, 521-90 (2006).
74. de Morais, S.M. et al. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 46, 594-8 (1994).
75. de Morais, S.M. et al. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* 269, 15419-22 (1994).
76. Canadian Clobazam Cooperative Group. Clobazam in treatment of refractory epilepsy: the Canadian experience. A retrospective study. *Epilepsia* 32, 407-16 (1991).
77. Shimizu, H. et al. Use of clobazam for the treatment of refractory complex partial seizures. *Seizure* 12, 282-6 (2003).
78. Montenegro, M.A. et al. Efficacy of clobazam as add-on therapy in patients with refractory partial epilepsy. *Epilepsia* 42, 539-42 (2001).
79. Haigh, J.R., Pullar, T., Gent, J.P., Dailley, C. & Feely, M. N-desmethylclobazam: a possible alternative to clobazam in the treatment of refractory epilepsy? *Br J Clin Pharmacol* 23, 213-8 (1987).
80. Fielding, S. & Hoffmann, I. Pharmacology of anti-anxiety drugs with special reference to clobazam. *Br J Clin Pharmacol* 7 Suppl 1, 7S-15S (1979).
81. Contin, M., Riva, R., Albani, F. & Baruzzi, A.A. Effect of felbamate on clobazam and its metabolite kinetics in patients with epilepsy. *Ther Drug Monit* 21, 604-8 (1999).
82. Giraud, C. et al. In vitro and in vivo inhibitory effect of stiripentol on clobazam metabolism. *Drug Metab Dispos* 34, 608-11 (2006).
83. Chiron, C. et al. Stiripentol in severe myoclonic epilepsy in infancy: a randomised placebo-controlled syndrome-dedicated trial. STICLO study group. *Lancet* 356, 1638-42 (2000).
84. Shorvon, S.D. The use of clobazam, midazolam, and nitrazepam in epilepsy. *Epilepsia* 39 Suppl

- 1, S15-23 (1998).
85. Sugai, K. Clobazam as a new antiepileptic drug and clorazepate dipotassium as an alternative antiepileptic drug in Japan. *Epilepsia* 45 Suppl 8, 20-5 (2004).
 86. Duncan, J.S., Sander, J.W., Sisodiya, S.M. & Walker, M.C. Adult epilepsy. *Lancet* 367, 1087-100 (2006).
 87. Guerrini, R. Epilepsy in children. *Lancet* 367, 499-524 (2006).
 88. Devinsky, O. Patients with refractory seizures. *N Engl J Med* 340, 1565-70 (1999).
 89. Tishler, D.M. et al. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 36, 1-6 (1995).
 90. Aronica, E. et al. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45, 441-51 (2004).
 91. Dombrowski, S.M. et al. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 42, 1501-6 (2001).
 92. Volk, H.A. & Loscher, W. Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain* 128, 1358-68 (2005).
 93. Kwan, P. & Brodie, M.J. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 46, 224-35 (2005).
 94. Loscher, W. & Potschka, H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 6, 591-602 (2005).
 95. Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T. & Kim, R.B. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75, 13-33 (2004).
 96. Fromm, M.F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 25, 423-9 (2004).
 97. Hoffmeyer, S. et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3473-8 (2000).
 98. Cascorbi, I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 112, 457-73 (2006).
 99. Choi, J.H. et al. MRP2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury. *Pharmacogenet Genomics* 17, 403-15 (2007).
 100. de Jong, F.A. et al. Irinotecan-induced diarrhea: functional significance of the polymorphic ABCC2 transporter protein. *Clin Pharmacol Ther* 81, 42-9 (2007).
 101. Haenisch, S. et al. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J* 7, 56-65 (2007).
 102. Rau, T. et al. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 80, 468-76 (2006).
 103. Naesens, M., Kuypers, D.R., Verbeke, K. & Vanrenterghem, Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 82, 1074-84 (2006).
 104. Siddiqui, A. et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 348, 1442-8 (2003).
 105. Tan, N.C. et al. Failure to confirm association of a polymorphism in ABCB1 with

- multidrug-resistant epilepsy. *Neurology* 63, 1090-2 (2004).
106. Zimprich, F. et al. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 63, 1087-9 (2004).
 107. Sills, G.J. et al. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia* 46, 643-7 (2005).
 108. Hung, C.C., Tai, J.J., Lin, C.J., Lee, M.J. & Liou, H.H. Complex haplotypic effects of the ABCB1 gene on epilepsy treatment response. *Pharmacogenomics* 6, 411-7 (2005).
 109. Kim, Y.O. et al. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance 1 gene in Korean epileptics. *Seizure* 15, 67-72 (2006).
 110. Nies, A.T. & Keppler, D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 453, 643-59 (2007).
 111. Vogelgesang, S. et al. Expression of multidrug transporters in dysembryoplastic neuroepithelial tumors causing intractable epilepsy. *Clin Neuropathol* 23, 223-31 (2004).
 112. Callaghan, B.C., Anand, K., Hesdorffer, D., Hauser, W.A. & French, J.A. Likelihood of seizure remission in an adult population with refractory epilepsy. *Ann Neurol* 62, 382-9 (2007).
 113. Nakamura, T. et al. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 71, 297-303 (2002).
 114. Sakaeda, T. et al. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 18, 1400-4 (2001).
 115. Chowbay, B., Li, H., David, M., Cheung, Y.B. & Lee, E.J. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br J Clin Pharmacol* 60, 159-71 (2005).
 116. Leschziner, G. et al. Clinical factors and ABCB1 polymorphisms in prediction of antiepileptic drug response: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 5, 668-76 (2006).
 117. Kwan, P. et al. Association between ABCB1 C3435T polymorphism and drug-resistant epilepsy in Han Chinese. *Epilepsy Behav* 11, 112-7 (2007).
 118. Ferraro, T.N., Dlugos, D.J. & Buono, R.J. Challenges and opportunities in the application of pharmacogenetics to antiepileptic drug therapy. *Pharmacogenomics* 7, 89-103 (2006).
 119. Lazarowski, A. et al. Neuronal MDR-1 gene expression and persistent low levels of anticonvulsants in a child with refractory epilepsy. *Ther Drug Monit* 26, 44-6 (2004).
 120. Owen, A. et al. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol* 51, 345-9 (2001).
 121. Giessmann, T. et al. Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther* 76, 192-200 (2004).
 122. Schuetz, E.G. et al. Altered expression of hepatic cytochromes P-450 in mice deficient in one or more mdr1 genes. *Mol Pharmacol* 57, 188-97 (2000).
 123. Baltés, S. et al. Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology* 52, 333-46 (2007).
 124. Baltés, S., Fedrowitz, M., Tortos, C.L., Potschka, H. & Loscher, W. Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and

- in vivo transport assays. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 331-43 (2007).
125. Hoffmann, K. & Loscher, W. Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR(-) rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats. *Epilepsia* 48, 631-45 (2007).
 126. Linardopoulou, E.V. et al. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature* 437, 94-100 (2005).
 127. Irving, M. et al. Deletion of the distal long arm of chromosome 10; is there a characteristic phenotype? A report of 15 de novo and familial cases. *Am J Med Genet A* 123, 153-63 (2003).
 128. De Vries, B.B., Winter, R., Schinzel, A. & van Ravenswaaij-Arts, C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 40, 385-98 (2003).
 129. Tate, S.K. et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5507-12 (2005).
 130. Mannino, D.M. & Buist, A.S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 370, 765-73 (2007).
 131. Rabe, K.F. et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 532-55 (2007).
 132. Victor, V.M. & De la Fuente, M. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. *Physiol Res* 52, 789-96 (2003).
 133. Rylander, R., Bake, B., Fischer, J.J. & Helander, I.M. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. *Am Rev Respir Dis* 140, 981-6 (1989).
 134. Moira, C.Y., Enarson, D.A. & Kennedy, S.M. The impact of grain dust on respiratory health. *Am Rev Respir Dis* 145, 476-87 (1992).
 135. Wang, X.R. et al. A 20-year follow-up study on chronic respiratory effects of exposure to cotton dust. *Eur Respir J* 26, 881-6 (2005).
 136. Matheson, M.C. et al. Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 60, 645-51 (2005).
 137. Pahwa, P., McDuffie, H.H. & Dosman, J.A. Longitudinal changes in prevalence of respiratory symptoms among Canadian grain elevator workers. *Chest* 129, 1605-13 (2006).
 138. Pahwa, P., Senthilselvan, A., McDuffie, H.H. & Dosman, J.A. Longitudinal estimates of pulmonary function decline in grain workers. *Am J Respir Crit Care Med* 150, 656-62 (1994).
 139. Walter, R., Gottlieb, D.J. & O'Connor, G.T. Environmental and genetic risk factors and gene-environment interactions in the pathogenesis of chronic obstructive lung disease. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4, 733-42 (2000).
 140. Sampsonas, F., Karkoulas, K., Kaparianos, A. & Spiropoulos, K. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond α 1-antitrypsin deficiency. *Curr Med Chem* 13, 2857-73 (2006).
 141. Molino, N.A. Genetics of COPD. *Chest* 125, 1929-40 (2004).
 142. Hang, J. et al. Microsomal epoxide hydrolase, endotoxin, and lung function decline in cotton textile workers. *Am J Respir Crit Care Med* 171, 165-70 (2005).
 143. He, J.Q., Connett, J.E., Anthonisen, N.R., Pare, P.D. & Sandford, A.J. Glutathione S-transferase variants and their interaction with smoking on lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 388-94 (2004).

144. Kleeberger, S.R. & Peden, D. Gene-environment interactions in asthma and other respiratory diseases. *Annu Rev Med* 56, 383-400 (2005).
145. Kinnula, V.L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax* 60, 693-700 (2005).
146. Viegi, G., Scognamiglio, A., Baldacci, S., Pistelli, F. & Carrozzi, L. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respiration* 68, 4-19 (2001).
147. Zhang, J.Y., Wang, Y. & Prakash, C. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human lung. *Curr Drug Metab* 7, 939-48 (2006).
148. Castell, J.V., Donato, M.T. & Gomez-Lechon, M.J. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 1, 189-204 (2005).
149. Hersh, C.P. et al. Genetic association analysis of functional impairment in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 977-84 (2006).
150. Cheng, S.L., Yu, C.J., Chen, C.J. & Yang, P.C. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J* 23, 818-24 (2004).
151. Smith, C.A. & Harrison, D.J. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 350, 630-3 (1997).
152. Ding, X. & Kaminsky, L.S. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 149-73 (2003).
153. Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J. & Raunio, H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol* 32, 391-411 (2002).
154. Arif, E. et al. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta* 382, 37-42 (2007).
155. Gaspar, P. et al. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genet Mol Biol* 27, 133-138 (2004).
156. Minematsu, N. et al. Association of CYP2A6 deletion polymorphism with smoking habit and development of pulmonary emphysema. *Thorax* 58, 623-8 (2003).
157. Anttila, S. et al. Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16, 242-9 (1997).
158. Raunio, H., Hakkola, J. & Pelkonen, O. Regulation of CYP3A genes in the human respiratory tract. *Chem Biol Interact* 151, 53-62 (2005).
159. Daly, A.K. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet* 45, 13-31 (2006).
160. Li, W.F. et al. Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics* 10, 767-79 (2000).
161. Costa, L.G., Cole, T.B., Vitalone, A. & Furlong, C.E. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta* 352, 37-47 (2005).
162. Aviram, M. et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 101, 2510-7 (2000).
163. Mackness, B., Quarck, R., Verreth, W., Mackness, M. & Holvoet, P. Human paraoxonase-1

- overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1545-50 (2006).
164. Draganov, D.I. & La Du, B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, 78-88 (2004).
165. La Du, B.N. et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 119-120, 379-88 (1999).
166. Wu, A., Hinds, C.J. & Thiemermann, C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock* 21, 210-21 (2004).
167. Rodrigo, L., Hernandez, A.F., Lopez-Caballero, J.J., Gil, F. & Pla, A. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chem Biol Interact* 137, 123-37 (2001).
168. Genter, M.B. et al. Microarray-based discovery of highly expressed olfactory mucosal genes: potential roles in the various functions of the olfactory system. *Physiol Genomics* 16, 67-81 (2003).
169. Deakin, S.P. & James, R.W. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)* 107, 435-47 (2004).
170. Ferre, N. et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 49, 1491-7 (2003).
171. Dally, H. et al. The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics* 13, 607-18 (2003).
172. Yeh, K.T. et al. CYP3A5*1 is an inhibitory factor for lung cancer in Taiwanese. *Kaohsiung J Med Sci* 19, 201-7 (2003).
173. Mackness, B., Mackness, M.I., Arrol, S., Turkie, W. & Durrington, P.N. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 423, 57-60 (1998).
174. Ng, C.J. et al. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 38, 153-63 (2005).
175. Wheeler, J.G., Keavney, B.D., Watkins, H., Collins, R. & Danesh, J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 363, 689-95 (2004).
176. Ranade, K. et al. Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. *Stroke* 36, 2346-50 (2005).
177. Baum, L. et al. Paraoxonase 1 gene Q192R polymorphism affects stroke and myocardial infarction risk. *Clin Biochem* 39, 191-5 (2006).
178. James, R.W., Leviev, I. & Righetti, A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 101, 2252-7 (2000).
179. Mackness, B. et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1451-7 (2001).
180. Erguder, I.B. et al. Short-term effects of smoking cessation on blood antioxidant parameters and paraoxonase activity in healthy asymptomatic long-term cigarette smokers. *Inhal Toxicol* 18,

- 575-9 (2006).
181. Costa, L.G., Vitalone, A., Cole, T.B. & Furlong, C.E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 69, 541-50 (2005).
 182. Mango, G.W. et al. Clara cell secretory protein deficiency increases oxidant stress response in conducting airways. *Am J Physiol* 275, L348-56 (1998).
 183. 高田恵司. Paraoxonase 1 (PON1) 遺伝子多型の呼吸機能への影響、及び誘発喀痰による気道内 PON1 活性の証明に関する研究. in 熊本大学大学院薬学教育部 生命薬科学専攻 医療薬学講座 薬物治療学分野 修士論文 (2007).
 184. Cross, C.E., van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Louie, S. & Halliwell, B. Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10, 185-91 (1994).
 185. Ozer, E.A. et al. Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiol Lett* 253, 29-37 (2005).
 186. Stoltz, D.A. et al. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L852-60 (2007).
 187. Alamoudi, O.S. Bacterial infection and risk factors in outpatients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: A 2-year prospective study. *Respirology* 12, 283-7 (2007).
 188. Nseir, S. et al. Multiple-drug-resistant bacteria in patients with severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: Prevalence, risk factors, and outcome. *Crit Care Med* 34, 2959-66 (2006).
 189. Wedzicha, J.A. & Seemungal, T.A. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet* 370, 786-96 (2007).
 190. Celli, B.R. & Barnes, P.J. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 29, 1224-38 (2007).
 191. Prescott, E., Lange, P. & Vestbo, J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 13, 1109-14 (1999).
 192. Goto, S. et al. Population estimation of the effects of cytochrome P450 2C9 and 2C19 polymorphisms on phenobarbital clearance in Japanese. *Ther Drug Monit* 29, 118-21 (2007).
 193. Ueda, K. et al. Glutathione S-transferase M1 null genotype as a risk factor for carbamazepine-induced mild hepatotoxicity. *Pharmacogenomics* 8, 435-442 (2007).
 194. Ho, M.K. & Tyndale, R.F. Overview of the pharmacogenomics of cigarette smoking. *Pharmacogenomics J* 7, 81-98 (2007).
 195. Munafò, M.R., Shields, A.E., Berrettini, W.H., Patterson, F. & Lerman, C. Pharmacogenetics and nicotine addiction treatment. *Pharmacogenomics* 6, 211-23 (2005).
 196. Ito, H. et al. An intervention study of smoking cessation with feedback on genetic cancer susceptibility in Japan. *Prev Med* 42, 102-8 (2006).
 197. Sanderson, S.C. & Michie, S. Genetic testing for heart disease susceptibility: potential impact on motivation to quit smoking. *Clin Genet* 71, 501-10 (2007).
 198. de Leon, J. AmpliChip CYP450 test: personalized medicine has arrived in psychiatry. *Expert Rev Mol Diagn* 6, 277-86 (2006).
 199. Mitani, Y. et al. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat Methods* 4, 257-62 (2007).
 200. Ratner, M. FDA pharmacogenomics guidance sends clear message to industry. *Nat Rev Drug*

- Discov* 4, 359 (2005).
201. 辻本豪三. 薬理ゲノミクス (ファーマコゲノミクス) とテーラーメイド医療. *医学のあゆみ* 201, 581-6 (2002).
 202. Weinshilboum, R. & Wang, L. Pharmacogenomics: bench to bedside. *Nat Rev Drug Discov* 3, 739-48 (2004).
 203. Nadkarni, S., LaJoie, J. & Devinsky, O. Current treatments of epilepsy. *Neurology* 64, S2-11 (2005).
 204. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 22, 489-501 (1981).
 205. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30, 389-99 (1989).
 206. Naranjo, C.A. et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 30, 239-45 (1981).
 207. Beal, S.L. & Sheiner, L.B. Estimating population kinetics. *Crit Rev Biomed Eng* 8, 195-222 (1982).
 208. Reith, D.M., Hooper, W.D., Parke, J. & Charles, B. Population pharmacokinetic modeling of steady state carbamazepine clearance in children, adolescents, and adults. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 28, 79-92 (2001).
 209. Sheiner, L.B., Rosenberg, B. & Marathe, V.V. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm* 5, 445-79 (1977).
 210. Nakajima, T. et al. Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am J Hum Genet* 70, 108-23 (2002).
 211. American Thoracic Society. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 1107-36 (1995).
 212. Liang, K.Y. & Zeger, S.L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73, 13-22 (1986).
 213. Richards, B. et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet* 2, 159-63 (1993).
 214. Fukuen, S. et al. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5*3 and *6, in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 12, 331-4 (2002).
 215. Kubota, T., Chiba, K. & Ishizaki, T. Genotyping of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in an extended Japanese population. *Clin Pharmacol Ther* 60, 661-6 (1996).
 216. Cascorbi, I. et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 69, 169-74 (2001).
 217. Chowbay, B., Cumaraswamy, S., Cheung, Y.B., Zhou, Q. & Lee, E.J. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 13, 89-95 (2003).
 218. Furuno, T. et al. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 12, 529-34 (2002).
 219. Humbert, R. et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3, 73-6 (1993).

資料 1. Saskatchewan 大学で使用されている質問表

As part of your work, which of the following have you handled? Check all that apply:

Wheat (includes spring, durum and winter wheat)

Oats

Barley

Mixed Grains

Rye

Canola (rapeseed)

Flaxseed

Soybeans

Field peas

Lentils

Canary seed

Sunflower seed

Mustard seed

Beans (any type)

GRAINWORKERS' HEALTH MAINTENANCE PROGRAM QUESTIONNAIRE

DATE _____ TEST LOCATION _____ CODE # _____

A. GENERAL INFORMATION

1. Name: _____ 2. Address: _____
 Postal Code: _____ 3. Telephone: _____
 4. Employer: _____ 5. Job Title: _____ Location: _____
 6. Date of Birth: Day ____ Month ____ Year ____ 7. Age: ____ yrs. 8. Sex: Male ____ Female ____
 Years in Industry _____ Periodic Examination # _____ S.H.S.P # _____
 S.I.N # _____

B. CONSENT

I agree to participate in this surveillance programme. I understand that the records of this examination will be held in confidence at the Centre for Agricultural Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, and that information in group statistics will not identify any worker.

 Employees Signature

 Date

C. GENERAL HEALTH STATUS

9. Do you have any health problems/medical conditions ? YES ____ NO ____
 If YES, please explain: _____

10. Do you have to take any medications regularly ? YES ____ NO ____
 If YES, please list: _____

11. Do you have a history of:

	YES	NO		YES	NO
Angina or heart disease	___	___	Recent abdominal surgery	___	___
Recent chest cold	___	___	Recent chest injury	___	___
Abnormal heart rhythm	___	___	Recent chest surgery	___	___
High blood pressure	___	___	Lung disease	___	___
Asthma	___	___	Type _____		
Spontaneous Pneumothorax	___	___			

12. Have you ever been hospitalized ? YES ____ NO ____

13. Have you missed work due to an illness or injury in the last year ? YES ____ NO ____
 If YES, how many days ? _____ Why? _____

D. THESE QUESTIONS PERTAIN TO RESPIRATORY SYMPTOMS. PLEASE ANSWER "YES" OR "NO" IF POSSIBLE.

COUGH

14. a) Do you usually have a cough ?
(Ignore a single cough to clear throat.) YES____ NO____
- b) Do you usually cough as much as 4 to 6 times a day, 4 or more days out of the week ?
YES____ NO____
- c) Do you usually cough at all on getting up, or first thing in the morning ?
YES____ NO____
- d) Do you usually cough during the rest of the day or at night ?
YES____ NO____

IF NO TO ALL OF THE ABOVE, SKIP TO QUESTION 15. IF YES TO ANY OF THE ABOVE, ANSWER THE FOLLOWING:

- e) Do you usually cough like this on most days for 3 consecutive months or more during the year ?
YES____ NO____
- f) For how many years have you had this cough ? _____years.
-

PHLEGM

15. a) Do you usually bring up phlegm from your chest ?
(exclude phlegm from the nose) YES____ NO____
- b) Do you usually bring up phlegm like this as much as twice a day, 4 or more days out of the week ?
YES____ NO____
- c) Do you usually bring up phlegm on getting up, or first thing in the morning ?
YES____ NO____
- d) Do you usually bring up phlegm during the rest of the day or at night ?
YES____ NO____

IF NO TO ALL OF THE ABOVE, SKIP TO QUESTION 16. IF YES TO ANY OF THE ABOVE, ANSWER THE FOLLOWING:

- e) Do you bring up phlegm like this on most days for 3 consecutive months or more during the year ?
YES____ NO____
- f) For how many years has this phlegm been present ? _____Years.
-

WHEEZE

16. Does your chest ever sound wheezy or whistling :
- a) When you have a cold ? YES____ NO____
- b) Occasionally apart from colds ? YES____ NO____
- c) Most days or nights ? YES____ NO____
- d) For how many years has this been present ? _____Years.
-

BREATHLESSNESS

17. Are you troubled by shortness of breath when hurrying on the level or walking up a slight hill ?
YES____ NO____

E. ALLERGIES

18. a) Do you have any allergies ? YES___ NO___
If YES, describe allergies and symptoms: _____
b) Were your allergies diagnosed by allergy skin tests ? YES___ NO___
19. When exposed to grain dust do you experience any of the following:
- | | YES | NO | | YES | NO |
|---------------------|-----|-----|-----------------------------------|-----|-----|
| Stuffy nose | ___ | ___ | Wheeze | ___ | ___ |
| Itchy or runny eyes | ___ | ___ | __immediate | | |
| Skin rash | ___ | ___ | __delayed (after work / at night) | | |
| Increased cough | ___ | ___ | Shortness of breath | ___ | ___ |
| Increased phlegm | ___ | ___ | Fever and / or chills | ___ | ___ |
| | | | (flu like symptoms) | | |
- If YES to any of the above: How long have these symptoms been noticeable ? _____years.
Do your symptoms improve on days off / holidays ? YES___ NO___
Do your symptoms occur in spite of use of respirators ? YES___ NO___
20. What type of dusts or fumes cause these symptoms ? (Please tick the appropriate responses.)
- | | | |
|------------------|------------------|-----------------|
| ___ Wheat | ___ Oats | ___ Barley |
| ___ Flax | ___ Canola | ___ Lentil |
| ___ Hay | ___ Hog Barn | ___ Cattle barn |
| ___ Poultry barn | ___ Fertilizer | ___ Pesticides |
| ___ Canary Seed | ___ Mouldy grain | ___ Other _____ |
-

F. RESPIRATORY PROTECTION

21. Do you wear a dust mask / respirator when exposed to grain or fertilizer dust ?
NEVER___ SOMETIMES___ MOST OF THE TIME___ ALWAYS___
22. Do you wear a chemical cartridge respirator when handling pesticides ?
NEVER___ SOMETIMES___ MOST OF THE TIME___ ALWAYS___
23. Do you experience any difficulty using this respirator ? YES___ NO___
If YES, please explain _____
24. Have you ever been instructed in the proper use and care of the respirator that you use ?
YES___ NO___
-

G. PREVIOUS OCCUPATIONAL EXPOSURE

25. a) Have you ever farmed ? YES___ NO___
If YES, number of years farming ? _____
If currently farming, what are the parts of your farming operation ?
___grain ___oilseeds ___hogs ___cattle ___poultry ___other (specify) _____
- b) Have you ever worked in a mine ? YES___ NO___
If YES, number of years _____ What type of mine ? _____
- c) Do you weld ? YES___ NO___

H. SMOKING HISTORY

26. a) Have you ever smoked cigarettes regularly ? (Regularly means more than 20 packs of cigarettes or 12 oz. of tobacco in a lifetime or more than 1 cigarette per day for 1 year.) YES _____ NO _____

If YES, answer the following.

- b) Do you now smoke cigarettes ? YES _____ NO _____
c) How many years have you smoked in total ? _____ Years When did you stop ? _____
d) How many cigarettes per day do (did) you smoke on an average ? _____ cigarettes / day

27. a) Have you ever smoked a pipe regularly ? (YES means more than 12 oz. of pipe tobacco in a lifetime.) YES _____ NO _____

If YES, answer the following. If NO, skip to question 28.

- b) How old were you when you started to smoke a pipe regularly ? _____ years.
c) If you have stopped smoking a pipe completely, how old were you when you stopped ? _____ years.
d) On the average over the entire time you smoked a pipe, how much pipe tobacco did you smoke per week ? _____ oz./ week.

28. a) Have you ever smoked cigars regularly ? (YES means more than one cigar per week for a year) YES _____ NO _____

If YES, answer the following. If NO, skip to question 29.

- b) How old were you when you started smoking cigars regularly ? _____ age
c) If you stopped smoking cigars completely, how old were you when you stopped ? _____ age
d) On the average, over the entire time you smoked cigars, how many cigars did you smoke per week ? _____ cigars / week

I. BACK PAIN

29. a) Do you ever experience back pain ? YES _____ NO _____

If YES, PLEASE COMPLETE THE REST OF THE QUESTION.

- b) Do you have back pain more often than once a week ? YES _____ NO _____
c) Have you had other symptoms with the back pain ? YES _____ NO _____
If YES, which? _____ pain / numbness in the legs
_____ pain / numbness in the arms
_____ other _____

- d) Can you associate the onset of back pain with certain activities at work ? YES _____ NO _____
If YES, please specify ? _____
e) Can you associate the onset of back pain with certain activities at home ? YES _____ NO _____
If YES, please specify ? _____

MEASUREMENTS

Blood Pressure: RT. _____ LT. _____
Height _____ cm. Weight _____ Pulse _____

If further examination is recommended due to the results of this examination, may we send a copy of these test results to your physician ? YES _____ NO _____

Family Physician: _____ Address: _____