

博士論文

外来化学療法時のパクリタキセルによる好中球減少予測因子の

薬物動態学的探索

Prediction of neutrophil reduction using paclitaxel
pharmacokinetic parameters in patients with gynecologic cancers
in an outpatient clinic

本論文は静岡県立大学大学院薬科学研究科博士論文である.

2019 年 3 月

(March 2019)

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 博士後期課程 薬科学専攻
臨床薬剤学講座

石川元章

Motoaki Ishikawa

略語

ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1
AUC	Area under the blood concentration-time curve
B	Unstandardized regression coefficient
BMI	Body mass index
BSA	Body surface area
CAD	Collision gas
CBDCA	Carboplatin
CDDP	Cisplatin
CE	Collision energy
CEP	Collision cell entrance potential
Cmax	Maximum drug concentration
Conc	Concentrated
CUR	Curtain gas
CV	Coefficient of variation
CXP	Collision cell exit potential
CYP	Cytochrome P450
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DP	Declustering potential
DTX	Docetaxel
EP	Entrance potential
FDA	Food and Drug Administration
GS1	Ion source gas 1

GS2	Ion source gas 2
HPLC	High performance liquid chromatography
Ihe	Interface heater
IS	Internal standard
IS Voltage	Ion spray voltage
LC-MS/MS	Liquid chromatography–tandem mass spectrometry
LDH	Lactate dehydrogenase
MDR-1	Multidrug resistance protein
MRM	Multiple reaction monitoring
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
PCR	Polymerase chain reaction
PMDA	Pharmaceuticals and medical devices agency
PTX	Paclitaxel
R1	Radical 1
R ²	Coefficient of determination
RCLB	Red cell lysis buffer
RE	Relative error
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
Rnase	Ribonuclease
SD	Standard deviation
SE	Standard error
TEM	Temperature
VIF	Variance inflation factor
3' <i>p</i> -OH-PTX	3' <i>p</i> hydroxy paclitaxel
6αOH-PTX	6α hydroxy paclitaxel

目次

序論	1
第 1 章 パクリタキセルおよび代謝物の血漿中濃度測定法の構築	6
第 1 節 緒言	6
第 2 節 方法	7
1-2-1 使用した試薬、器具	7
1-2-2 PTX および 6αOH-PTX の LC 条件と MS/MS 条件	8
1-2-3 薬物濃度測定方法	12
1-2-4 LC-MS/MS 測定法の評価	13
第 3 節 結果	14
1-3-1 血漿中総薬物濃度測定	14
第 4 節 考察	18
第 2 章 遺伝子多型と薬物体内動態との関連	19
第 1 節 緒言	19
第 2 節 方法	20
2-2-1 使用した試薬、器具	20
2-2-2 対象患者	22
2-2-3 <i>CYP3A5</i> 遺伝子多型解析	22
2-2-4 <i>ABCB1</i> 遺伝子多型解析	24
2-2-5 血漿中総 PTX および 6αOH-PTX 濃度測定	27
2-2-6 統計解析	27
第 3 節 結果	28
2-3-1 対象患者の <i>CYP3A5</i> および <i>ABCB-1</i> の Genotype 分布	28

2-3-2 遺伝子多型と血漿中濃度	30
第4節 考察	35
第3章 婦人科癌患者におけるパクリタキセルの体内動態との関連	36
第1節 緒言	36
第2節 方法	37
3-2-1 対象患者	37
3-2-2 統計解析	37
第3節 結果	38
3-3-1 患者背景	38
第4節 考察	45
総括	46
謝辞	49
参考文献	50

序論

日本におけるがんの罹患者数は1980年代以降増加しており、2017年の死因別では年間死亡数が38万6千人を超え、循環器系疾患の35万1千人を上回り、疾患別死因の第一位を占めている。婦人科がん(子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等)でもその年齢調整罹患率は近年増加し、2014年の全国合計値では子宮頸部、子宮体部、卵巣を合計すると女性においては乳房、大腸、胃に続き4位となっている。また、同様に2017年の死亡数でも大腸、胃に続いて第3位となっている。40歳代では乳癌、子宮癌、卵巣癌の罹患が多くを占めるため働く世代や子育て世代が対象となり、その治療が重要となってくる¹⁾。

パクリタキセル(PTX)は、1966年に米国National Cancer Instituteの抗腫瘍活性スクリーニングによりイチイ科の*Taxus brevifolia*の樹皮抽出物に抗腫瘍活性が見いだされ、1969年にPTXが単離、同定、1971年にその構造式が決定された^{2,3)}。PTXの抗腫瘍作用は、PTXが微小管を形成するチューブリンの β サブユニットに結合することに基づく。チューブリンは α および β のサブユニットからなり、これらが円筒状に並ぶことで中空のタンパク線維を構成している。PTXは、ビンカアルカロイドの結合部位とは異なる円筒状の微小管の内側に結合し、微小管の重合を促進・安定化する。微小管の過形成により微小管は細胞分裂の適切および必要な時期に解離することができなくなり、細胞を分裂期(M期)に停止させて細胞障害を発揮する⁴⁻⁷⁾。

PTXの臨床試験は1984年から開始されたが、過敏反応が問題視され、それを抑制するために24時間点滴が行われるようになった。1992年に米国およびカナダにおいて卵巣癌に承認され、その後順次世界各国で承認された⁸⁻¹²⁾。適切な前処置により過敏症対策がなされると、24時間点滴と比較し投与法が簡便な短時間点滴での開発が進められた¹²⁻¹⁵⁾。日本では3時間点滴静注において1997年に卵巣癌が承認され、1999年には非小細胞肺癌および乳癌、2001年5月に胃癌、2005年5月に子宮体癌、2007年12月には乳癌に

において1時間点滴静注が承認された。その後公知申請により子宮頸癌や食道癌等も承認された。卵巣癌の併用療法でもPTXとシスプラチン(CDDP)を用いるTP療法におけるPTXの3時間点滴と24時間点滴の比較が行われた結果、3時間点滴で骨髄抑制が少なかったため¹⁶⁾3時間点滴が一般的となった。さらに、PTXもCDDPも神経毒性を有するため神経毒性の少ないカルボプラチン(CBDCA)と併用するTC療法が検討された^{17,18)}。これらの結果CBDCAとCDDPの抗腫瘍効果が同等でありCBDCAは水分負荷を必要としない、末梢神経障害はCBDCAが軽微である、血小板減少はCBDCAのAUCにより管理できるなどの点からTC療法がNational Comprehensive Cancer Network(NCCN)ガイドライン¹⁹⁻²¹⁾、卵巣がん治療ガイドライン等²²⁻²⁴⁾においても標準的レジメンとして記載され使用されている。現在、PTXは本邦では卵巣癌、非小細胞肺癌、乳癌、胃癌、子宮体癌、頭頸部癌、食道癌、血管肉腫、子宮頸癌、膀胱癌、胚細胞腫瘍に承認され²⁵⁾、多くのがん患者に使用されている。

PTXの重大な副作用としては、ショック、アナフィラキシー様症状、骨髄抑制、末梢神経障害、麻痺、間質性肺炎、肺線維症、急性呼吸窮迫症候群、心筋梗塞、うっ血性心不全、心伝導障害、肺塞栓、血栓性静脈炎などがある。用量規制因子は骨髄抑制、末梢神経障害、粘膜炎²⁶⁾とされている。PTXの第Ⅰ相試験においては白血球減少や末梢神経障害はPTXの用量規制因子と規定された^{9,14,27)}。骨髄抑制はPTXの用量規制因子であり、PTXの添付文書においても骨髄抑制のある患者や感染症を合併している患者は投与禁忌となっている。特に発熱性好中球減少症には注意が必要で発熱性好中球減少症(FN)診療ガイドラインでは、重篤な感染症に発展し死に至ることもあるため、緊急事態として対応することが求められている²⁸⁾。PTXは婦人科がんにおいてCBDCAとの併用(TC療法)で進行・再発治療の1次治療に59%の奏効率が報告されている¹⁸⁾。しかしながら、PTX単剤(210 mg/m²)の卵巣癌に対する国内第Ⅱ相試験において、3週間に1回投与法におけるGradeⅢ以上の副作用の割合は白血球減少77.8%、好中球減少88.7%、ヘモグロ

ビン減少33.3%、血小板減少1.6%であった²⁹⁾。発熱性好中球減少症を発症すれば、休薬期間の延長や過剰な減量により却ってRelative Dose Intensity が低下するために治療強度が弱くなり効果が落ちる³⁰⁾可能性がある。

PTXは静脈内投与後速やかに血中から2～3相性の消失を示し、AUCやCmaxは投与量に比例しない非線形を示す³¹⁾。この非線形性は溶解剤として含まれるクレモホールELが原因であることが示唆されている^{32,33)}。PTXは肝臓で代謝され、胆汁中に排泄される^{31,34)}。代謝物に細胞障害性はみられず³⁴⁾、未変化体の腎臓からの排泄は10%以下³⁵⁾とされている。PTXの代謝はおもにCYP2C8により6αOH-PTXに変換され、一部はCYP3A4/5により3'pOH-PTXに代謝される³⁶⁻⁴⁰⁾。また、ABCB1により未変化体のまま胆汁中へ排泄される。フェノバルビタールの投与により3'pOH-PTXが増加し³⁶⁾、フルコナゾールの投与によってPTXのクリアランスが低下する³⁶⁾ことからCYP3A4も重要な代謝酵素と考えられている。また、全身からの消失には飽和⁴¹⁾も観察され、PTXの体内動態の著しいばらつきはCYPの活性の違いや薬物相互作用によるもの^{36-38,42)}と考えられている。PTXの代謝経路をFig. 1-1 に示す。

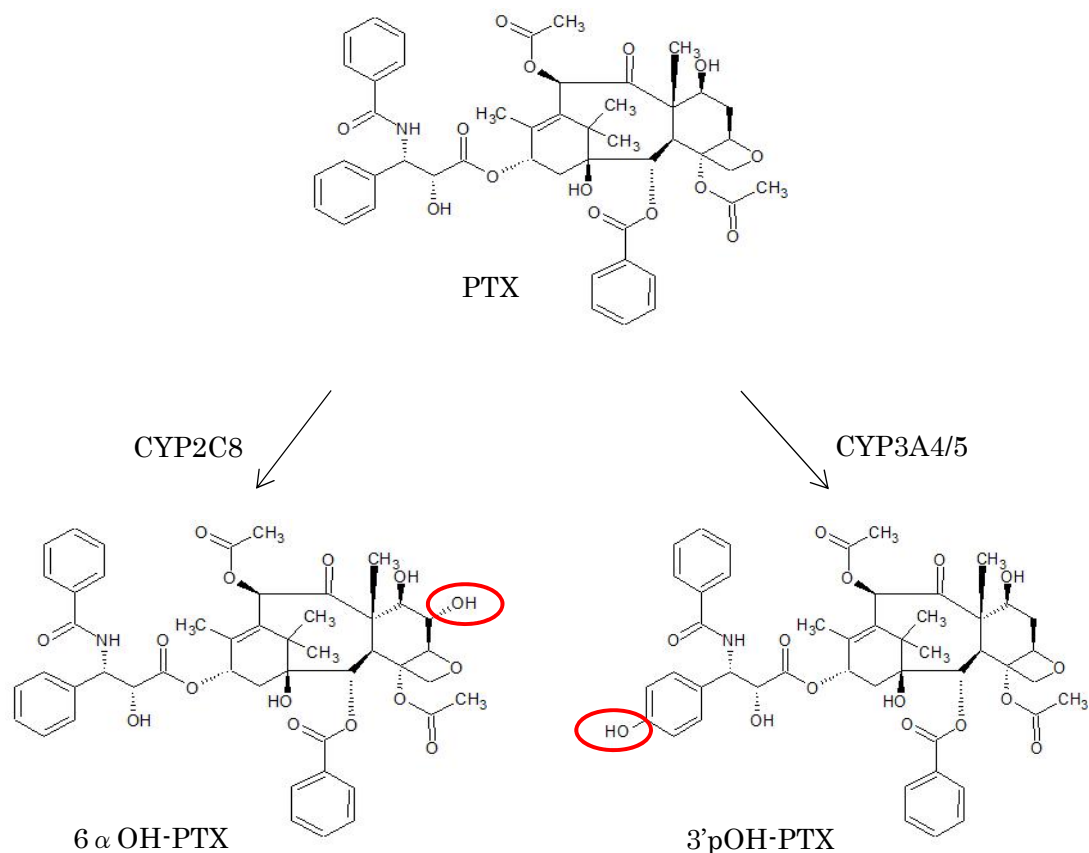


Fig. 1-1 PTX の代謝経路

また、CYP3A4だけでなくCYP3A5も3'p位の水酸化を触媒するが、その遺伝子多型である *CYP3A5*3* でコードされるタンパクは酵素として働かないとされている⁴³⁾。日本人の解析においては *CYP3A5*3/*3* の頻度は39.5%、55.9%という報告^{44,45)}があることから、CYP3Aにより代謝される薬物の体内動態のばらつきの原因を解明するうえで、CYP3A5の遺伝子型は重要な意味を持つ可能性がある。実際、タクロリムスにおいては高い血漿中トラフ濃度推移で腎機能障害等の発現リスクが *CYP3A5*3/*3* 患者で有意に高く⁴⁶⁾、CYP3A5の遺伝子多型に注意してモニタリングすることが必要と言われている⁴⁷⁾。

PTXによる好中球減少は血漿中濃度が0.05 μM以上の期間に依存する^{31,48,49)}ことからPTXはCYP2C8、CYP3A4/5における遺伝子多型による薬物動態の差から臨床的効果や

副作用に違いがあると考えられる。しかし、PTXのクリアランスとCYP2C8、CYP3A4、CYP3A5、ABCB1の遺伝子変異に関連性がないとする報告⁵⁰⁻⁵²⁾と、反対に*ABCB1* 2677G>T/Aおよび*CYP3A5* *3遺伝子多型と血漿中PTXのPKパラメータならびに重篤な好中球数、白血球数の減少が相関するという報告⁵³⁾がある。CYP3A4の遺伝子多型ではPTXの代謝物の薬物動態に影響を与え3'pOH-PTXのAUCが低下し、6αOH-PTXのAUCの上昇が認められているが、副作用との関連は見出されていない⁵⁴⁾。また、末梢神経障害⁵³⁾の耐性機序にはABCB1が関わり、その*ABCB1*遺伝子の3435C>T変異患者では3'pOH-PTXのAUCが高いとの報告⁵²⁾もあるため、*ABCB1*遺伝子多型が副作用発現に深く関連する可能性がある。

近年、抗がん薬投与は入院治療から外来治療に移行^{55,56)}しており、TC療法においてもその限りではない。PTXの有害事象は投与後24時間の血漿中濃度に関連し、AUCと白血球減少との間に有意な相関関係が認められている⁵²⁾が、外来治療では治療終了後帰宅するため24時間後に採血し、血漿中PTX濃度を測定することが困難である。しかし、TC療法では3時間のPTX投与後に1時間のCBDCAの投与となるためPTX投与終了1時間後に採血することは外来治療においても可能である。

本研究では婦人科がん患者を対象として、外来がん化学療法実施時に好中球減少に関連する薬物動態学的因子および患者背景因子を探索することで好中球減少を予測することを目的として、PTXおよび代謝物の血漿中濃度を測定し、代謝および排泄に関与するタンパクの遺伝子多型を検出した上で、患者背景情報と組み合わせて好中球減少発現における関連性を検討した。第一章ではPTXおよび代謝物の血漿中濃度の固相抽出による同時測定法を開発した。第二章では開発した薬物血漿中濃度測定法を用いて代謝酵素および排泄タンパク質の遺伝子多型と体内動態との関連性を検討した。第三章では、外来がん化学療法で入手可能な薬物動態パラメータを用いた重回帰式を用いて好中球減少の予測式を作成した。

第1章 パクリタキセルおよび代謝物の血漿中濃度測定法の構築

第1節 緒言

PTX および 6 α OH-PTX の血漿中濃度測定は、HPLC-UV 法^{57,58)}、Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)法^{59–62)}などが報告されている。LC-MS/MS を用いる方法が精度や真度の上で有利であるが、血液検体の前処理に酢酸エチルなどの有機溶媒を用いた液-液抽出を行っているものがほとんどである。固相抽出による前処理法は有機溶媒を用いる液-液抽出に比べて、目的成分をカラムに吸着させた後、少量の揮発性の高い溶媒で溶出させるため濃縮が容易であり、作業者の有機溶媒への曝露量が少なく危険性が低い。また、液-液抽出に比べ夾雑物をカラムで除去できるためマトリックス効果を受ける可能性が低い。PTX および 6 α OH-PTX を固相抽出で LC-MS/MS を用いて分離を行った報告はない。本章では固相抽出法を用いた LC-MS/MS によるヒト血漿中高感度 PTX および 6 α OH-PTX 測定法を開発し、米国医薬食品局(FDA)のガイドライン⁶³⁾および厚生労働省「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」⁶⁴⁾を参考にバリデーションを試みた。

第2節 方法

1-2-1 使用した試薬、器具

PTX の測定には以下の試薬、器具を使用した。

Paclitaxel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)

6 α -hydroxy paclitaxel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)

Docetaxel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)

Methanol (LC/MS 用) (Wako, Osaka)

Acetonitrile (LC/MS 用) (Wako, Osaka)

L-コンセーラ IEX[®]「ニッスイ」(Nissui, Pharmaceutical, Tokyo)

Phosphoric acid (高速液体クロマトグラフ用) (Wako, Osaka)

Formic acid (99%) (LC/MS 用) (Wako, Osaka)

Ammonium acetate (特級) (Wako, Osaka)

Oasis[®] HLB 1 cc (30 mg) Extraction Cartridges (Waters, Milford, MA)

Paclitaxel、6 α -hydroxy paclitaxel および docetaxel は、acetonitrile に溶解して stock solution を調製し、必要に応じて acetonitrile で希釈して使用した。すべての他の試薬と溶媒は、市販されている試薬特級品を用いた。

PTX の測定には以下の機器を使用した。

LC 装置 Prominence 20A (Shimadzu, Kyoto)

Pump: LC-20AD

Auto Sampler: SIL-20AC

Column oven: CTO-20A

MS 装置 API 3200 QTRAP (AB Sciex, Framingham, MA)

1-2-2 PTX および 6αOH-PTX の LC 条件と MS/MS 条件

PTX および 6αOH-PTX の血漿中総濃度測定に用いた LC 条件と MS 条件を Table 1-1、Table 1-2 に示した。

Table 1-1 LC 条件

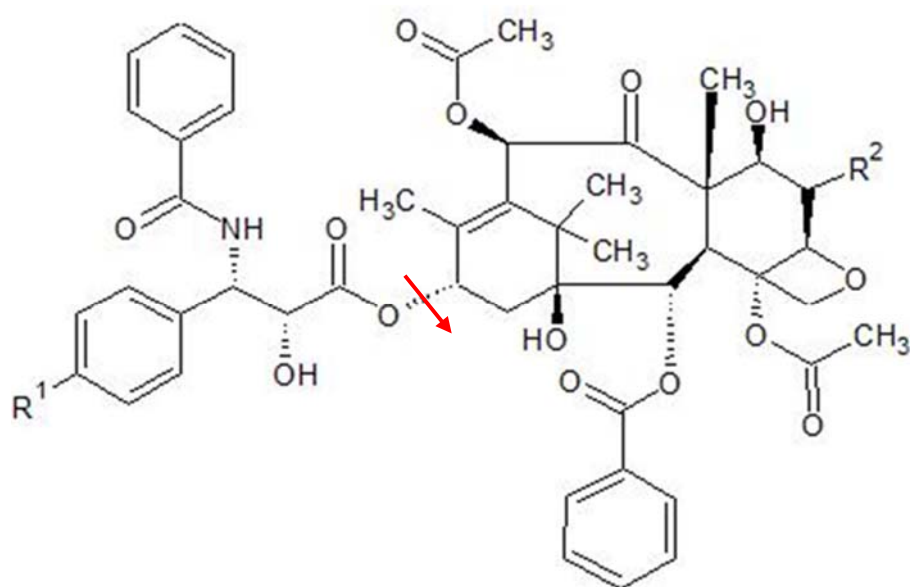
Column	Mightysil RP18MS (2.0×150 mm, 5 μm) (Kanto Chemical, Tokyo)
Column temperature	40°C
Mobile phase	CH ₃ CN: 2 mM Ammonium acetate (pH 6.67) = 65:35
Flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	10 μL
Internal standard (IS)	Docetaxel (DTX)

Table 1-2 MS 条件

Scan Type	Multiple reaction monitoring (MRM)
Polarity	Positive
Ion Source	Turbo Spray
DP	76
EP	5.5
CEP	40
CE	27
CXP	8
TEM	225
IS Voltage	5500
CUR	20
CAD	3
GS1	70
GS2	60

各薬物の化学構造とフラグメントイオンを Fig 1-2 に示した。

A) PTX とその代謝物

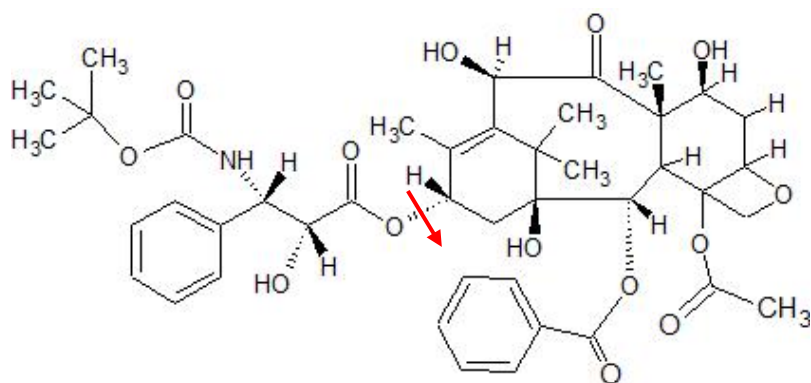


Compound	R ₁	R ₂
PTX	H	H
6aOH-PTX	H	OH

Compound	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	Fragment Ion (<i>m/z</i>)
PTX	854.1	509.3
6aOH-PTX	870.3	525.0

B) DTX

DTX



Compound	Precursor Ion (m/z)	Fragment Ion (m/z)
DTX	808.1	527.3

Fig. 1-2 各薬物の化学構造とフラグメントイオン

1-2-3 薬物濃度測定方法

薬物濃度測定時の血漿サンプル前処理方法を Fig. 1-3 に示した。血漿を 2%リン酸水溶液で希釈後 Oasis® HLB cartridge 1cc/30 mg を用いて固相抽出を行った。抽出液を遠心エバポレータで蒸発乾固処理した後、移動相で再溶解し測定サンプルとした。

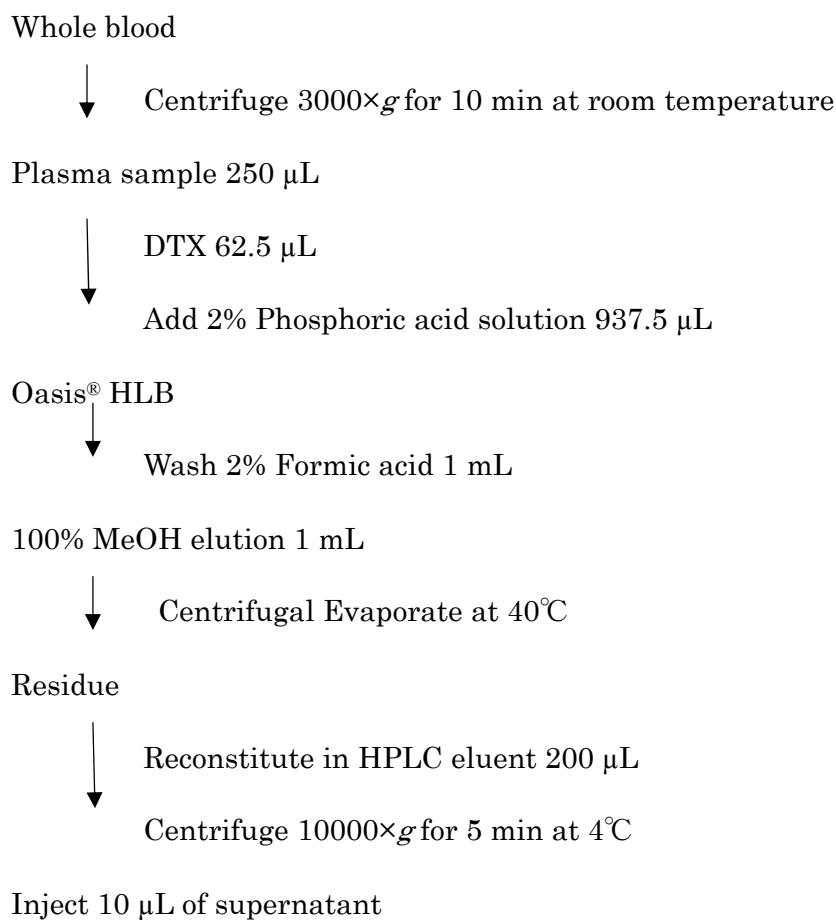


Fig. 1-3 薬物濃度測定における血漿サンプル前処理方法

1-2-4 LC-MS/MS 測定法の評価

LC-MS/MS 測定法の評価は、厚生労働省「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」⁶⁴⁾および FDA “Guidance for Industry、Bioanalytical Method Validation”⁶³⁾を参考に実施した。検量線の作製に際して、各濃度につき 3 ロットの標準液を作製し、濃度ごとに 1 ロットについて 5 回のインジェクションを 3 回行った。ロット毎の平均値を算出し、さらに 3 ロット総合の平均値を算出して、検量線にプロットした。低濃度のデータの重みが小さくなるため「1/(濃度)」で重み付けした最小二乗法を用いた。精度および真度の評価に際しても、各濃度につき 3 ロットの標準液を調製し、濃度ごとに 1 ロットについて 5 回のインジェクションを 3 回行い、ロット毎の平均値および 3 ロット総合の平均値を用いて算出した。

第3節 結果

1-3-1 血漿中総薬物濃度測定

1-3-1-1 標品のクロマトグラム

第2節で述べた方法により PTX、6αOH-PTX、および IS の標準液を LC-MS/MS を用いて測定した。結果を Fig. 1-4 に示した。

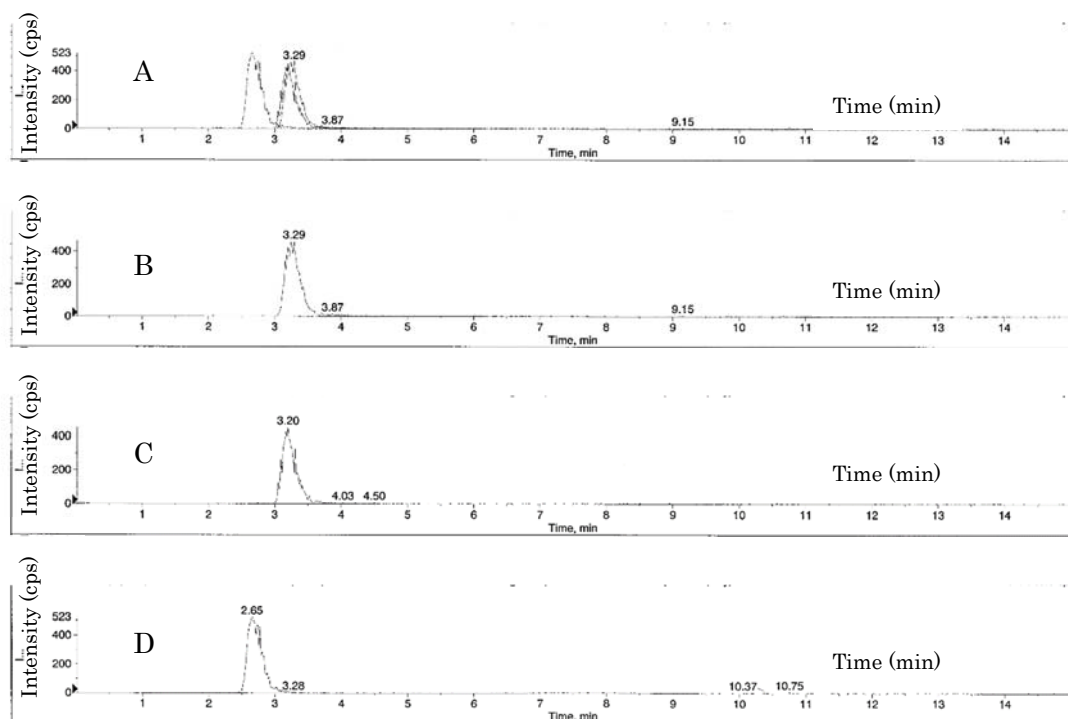


Fig. 1-4 標準液クロマトグラム

A: 混合物, B: PTX 20 ng/mL, C: 6αOH-PTX 20 ng/mL, D: DTX 100 ng/mL

全ての薬物が 5 分以内に溶出した。また、各クロマトグラムに夾雑ピークは見られなかった。

1-3-1-2 LC-MS/MS 測定による血漿中総薬物濃度の検量線の作製

血漿中薬物濃度の検量線作製用標準液は、DTX を IS として PTX および、6αOH-PTX の濃度を 0.5 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL として精度管理用ヒト血清（L-コンセーラ®）に溶解しものを用いた。LC-MS/MS を用いて作製した検量線を Fig. 1-5 に示した。

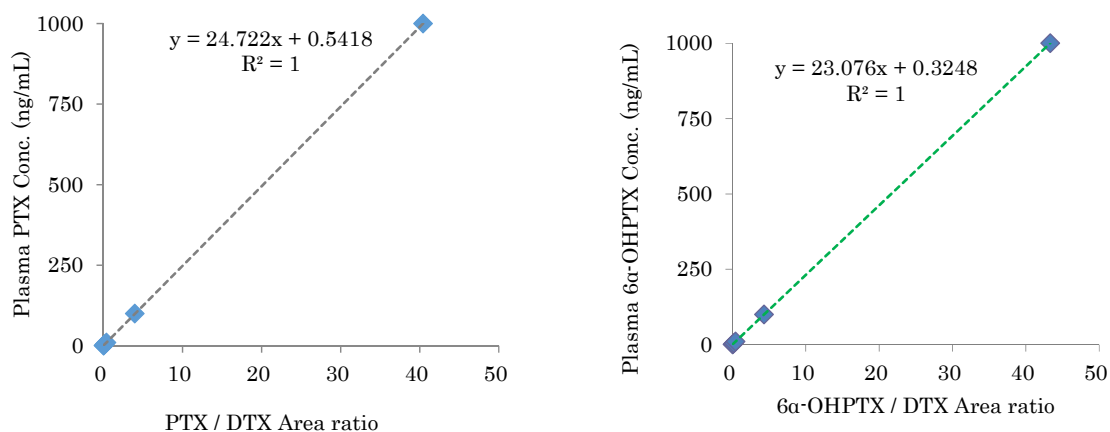


Fig. 1-5 LC-MS/MS 測定による薬物濃度検量線

本測定法によって、PTX および 6αOH-PTX の検量線は 0.5 - 1000 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した。検量線の決定係数は PTX で $R^2 = 1$ 、6αOH-PTX で $R^2 = 1$ であった。

1-3-1-3 薬物の精度および真度

PTX および 6αOH-PTX 測定時の精度および真度を LC-MS/MS を用いて評価した。精度は変動係数（CV）で、真度は相対誤差（RE）で表した。結果を Table 1-3、Table 1-4 に示した。

Table 1-3 PTX 測定時の精度および真度

Conc. (ng/mL)	PTX			
	Mean CV (%)		Mean RE (%)	
0.5	10.59		8.1	
	2.10	9.68	-8.7	-1.4
	7.88		-3.7	
1	5.7		3.3	
	11.59	7.00	-0.5	1.8
	3.23		2.6	
10	0.83		6.0	
	3.93	3.79	5.3	7.5
	2.08		11.2	
100	1.69		3.8	
	2.70	3.74	2.3	5.0
	2.44		8.9	
1000	0.80		1.4	
	1.48	4.16	3.6	5.0
	0.64		10.0	

PTX の精度は、0.5、1、10、100、および 1000 ng/mL の 5 濃度において 9.68%以下であり、真度も 7.5%以下であった。

Table 1-4 6αOH-PTX 測定時の精度および真度

Conc. (ng/mL)	6αOH-PTX			
	Mean CV (%)		Mean RE (%)	
0.5	1.72		16.6	
	8.44	7.76	18.2	13.9
	4.18		6.8	
1	11.27		12.6	
	4.48	8.94	4.0	10.8
	6.18		15.8	
10	3.11		6.1	
	1.66	4.69	-3.0	1.8
	3.41		2.4	
100	2.42		3.8	
	3.58	4.32	-2.9	1.6
	2.92		3.9	
1000	6.11		5.4	
	6.40	6.17	3.1	5.4
	7.49		7.8	

6αOH-PTX の各濃度の精度は 8.94%以下であった。また、真度も 13.9%以下であった。以上の結果から、本研究による測定法による、PTX およびその代謝物である 6αOH-PTX の血漿中濃度測定が可能となった。

第 4 節 考察

本研究は 5 濃度の検量線用標準試料を使用した検量線であるため厚生労働省「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン（平成 25 年 7 月 11 日）」における「少なくとも 6 濃度の検量線用標準試料が上記基準を満たすものとする」という基準には満たなかったが、当研究室における固相抽出法を用いた LC-MS/MS 法による PTX および 6αOH-PTX の血漿中濃度測定法が厚生労働省「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」および FDA の“Guidance for Industry、Bioanalytical Method Validation “以降の研究には 500 ng/mL 等の標準試料を加えることにより基準を満たせるものと考えられる。以上のことからこれまでの液-液抽出法を用いた測定法^{61,62)}ではなく有機溶媒への曝露量が少ないため作業員への危険性が低く、かつマトリックス効果を受ける可能性が低い固相抽出法を用いた LC-MS/MS 法による PTX および 6αOH-PTX の血漿中濃度測定法を確立できた。

第2章 遺伝子多型と薬物体内動態との関連

第1節 緒言

PTX はヒトにおいて主に肝で CYP2C8 や CYP3A4 で代謝を受ける。CYP2C8 は PTX の主な代謝酵素であり、CYP2C8 活性は、PTX の曝露に大きな影響を与えることが報告されている⁴⁰⁾。すなわち、*CYP2C8* 遺伝子に変異が生じることにより、6 α OH-PTX の生成が減少し、PTX の曝露量が大きくなる。しかし、このような報告がある一方、*CYP2C8* 遺伝子の変異は PTX の薬物動態に影響を与えないという報告もされており^{50,52)}、一貫した報告は得られていない。また、日本人において *CYP2C8* 遺伝子変異の頻度は非常に低い^{65,66)}とされているため CYP2C8 の遺伝子多型だけでは PTX の体内動態のばらつきは説明できない。PTX の主な代謝経路は CYP2C8 であるが、副次的に CYP3A4 や CYP3A5 において 3'*p*-OH-PTX に代謝される。CYP3A4 の遺伝子多型については PTX を投与した際の末梢神経障害と相関するとの報告がある^{67,68)}がこれらの報告では PTX の薬物動態パラメータは検討されていない。また、CYP3A4 の遺伝子多型と血漿中 3'*p*-OH-PTX 濃度の関係について評価している報告もほとんどない。そこで本研究は CYP3A4 と共に 3'*p* 位の水酸化を触媒する CYP3A5 の遺伝子多型に着目した。CYP3A5 については日本人の約 56~61% が CYP3A5 機能を欠損しているとの報告^{45,69)}があるため、PTX の体内動態に影響を及ぼし、副作用発現の予測因子となることが考えられる。本研究では PTX および 6 α OH-PTX の測定が可能なため、PTX および 6 α OH-PTX の血漿中濃度に及ぼす代謝酵素の遺伝子多型の影響について検討した。また、末梢神経障害⁵³⁾の耐性機序として関わる ABCB1 の 3435C>T 変異患者では 3'*p*-OH-PTX の AUC が高いとの報告⁵²⁾もある。また、ABCB1 は PTX の薬物排出トランスポーターであり、PTX の排出にも *ABCB1* 遺伝子の変異が関与する可能性がある。ABCB1 の遺伝子多型には、1236C>T、2677G>T/A、3435C>T が存在するため、本章ではこれらの遺伝子多型についても解析を行った。

第2節 方法

2-2-1 使用した試薬、器具

DNA の抽出には以下の試薬、器具を使用した。

スマイテスト EX-R&D(核酸抽出キット、Medical & Biological Laboratories, Nagoya)

RCLB(Red Cell Lysis Buffer、Medical & Biological Laboratories, Nagoya)

イソプロパノール(2-プロパノール)特級試薬

70%エタノール

超純水

PCR には以下の試薬および機器を使用した。

RNase-free water (Takara, Tokyo)

10×PCR Gold buffer contains no $MgCl_2$ (Applied Biosystems, Waltham, MA)

Gene Amp dNTP mix (Applied Biosystems, Waltham, MA)

$MgCl_2$ solution (Applied Biosystems, Waltham, MA)

Ampli Taq Gold (Applied Biosystems, Waltham, MA)

RFLP 法には以下の試薬を使用した。

RNase-free water (Takara, Tokyo)

10×SuRE/ Cut Buffer H (Takara, Tokyo)

Dde I (Takara, Tokyo)

10×M buffer (Takara, Tokyo)

Nde II (Takara, Tokyo)

0.1% BSA (Takara, Tokyo)

XbaI (Takara, Tokyo)

10×T buffer (Takara, Tokyo)

AfaI (Takara, Tokyo)

10×NdeII buffer (ニッポンジーン, Tokyo)

NdeII (ニッポンジーン, Tokyo)

電気泳動には以下の試薬、機器を使用した。

MetaPhor™ アガロース (ロンザジャパン株式会社, Tokyo)

滅菌蒸留水

Tris-Borate-EDTA buffer 10× powder pH8.3 (Takara, Tokyo)

20 bp DNA Ladder (Takara, Tokyo)

6×Loading Buffer (Takara, Tokyo)

10×Loading Buffer (Takara, Tokyo)

Ethidium bromide (Takara, Tokyo)

E-graph AE-9000 (ATTO, Tokyo)

2-2-2 対象患者

2013 年 4 月から 2014 年 6 月まで豊橋市民病院婦人科において卵巣癌、子宮体癌、子宮頸癌で TC 療法を実施する患者のうち厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針に従い同意を文書で得られた患者について PTX 投与終了後 1 時間(CBDCA 投与終了時すなわち PTX 投与開始 4 時間後)に点滴ルートの反対側の腕より 5 mL 採血を行った。採血後ただちに PTX 血漿中濃度測定用にマイクロチューブへ 1 mL ずつ、2 本へ分注し、 $3000 \times g$ 室温で 10 分間遠心した。遠心後上清をスクリーキャップ付きプラチューブへ分注し、 -80°C で保存し、残りは直ちに静岡県立大学に搬送後 DNA 抽出を行った。DNA は全血 2 mL からスマイテスト EX-R&D を用いて抽出した。

なお、本研究は豊橋市民病院の倫理審査委員会において承認を得て実施した(承認番号 No.127 ; 2013.4.24)。

2-2-3 *CYP3A5* 遺伝子多型解析

PCR 反応液は RNase-free water 27.6 μL 、10 \times PCR buffer 5 μL 、dNTPs 5 μL 、 MgCl_2 3 μL 、各 Primer 2 μL 、および Taq polymerase 0.4 μL 、DNA 抽出物 5 μL を混合し全量を 50 μL とした。制限酵素、Primer および PCR 条件を Table 2-1、Table 2-2 に示した。

Table 2-1 *CYP3A5* の PCR に用いた制限酵素および Primer

Allele	Restriction enzyme	Primer	Sequence
*3	<i>Dde</i> I	Forward	5'-CTT TAA AGA GCT CTT TTG TCT CTC A-3'
		Reverse	5'- CCA GGA AGC CAG ACT TTG AT -3'

Table 2-2 *CYP3A5* の PCR 条件

Allele	Conditions				Final extension
	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	
<i>*3</i>	94°C for 1 min	94°C for 30 s (36 cycles)	56°C for 30 s (36 cycles)	72°C for 30 s (36 cycles)	72°C for 5 min

CYP3A5 の RFLP 反応液の組成を Table 2-3 に示した。

Table 2-3 *CYP3A5* の RFLP 用反応液

<i>CYP3A5*3</i>	
Sample	8.0 μ L
10 \times NE Buffer	2.5 μ L
RNase-free water	13.5 μ L
<i>Hae</i> III	1.0 μ L

全量を 25 μ L として 37°C で over night インキュベートした⁷⁰⁾。その後 loading buffer 10 μ L を加え 3% アガロースゲルで 100 V、40 分間電気泳動を行った。Ethidium bromide で DNA を染色し、紫外線照射器でゲルを観察した。

2-2-4 *ABCB1* 遺伝子多型解析

PCR 反応液は 2-2-3 と同様の方法で調製した。制限酵素、Primer および PCR 条件を Table 2-4 、 Table 2-5 に示した。

Table 2-4 *ABCB1* の PCR に用いた制限酵素および Primer

Allele	Restriction enzyme	Primer	Sequence
<i>C1236T</i>	<i>HaeIII</i>	Forward	5'-TTT TTC TCA CGG TCC TGG TAG-3'
		Reverse	5'-CAT CCC CTC TGT GGG GTC ATA-3'
<i>G2677A</i>	<i>Xba I</i>	Forward	5'-TAC CCA TCA TTG CAA TAG CAG-3'
		Reverse	5'-TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC-3'
<i>G2677T</i>	<i>Afa I</i>	Forward	5'-TAC CCA TCA TTG CAA TAG CAG-3'
		Reverse	5'-TTT AGT TTG ACT CAC CTT TCT AG-3'
<i>C3435T</i>	<i>NdeII</i>	Forward	5'-TTG ATG GCA AAG AAA TAA AGC-3'
		Reverse	5'-CTT ACA TTA GGC AGT GAC TCG-3'

Table 2-5 *ABCB1* の PCR 条件

Allele	Conditions				
	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
<i>C1236T</i>	94°C for 2 min	94°C for 30 s (35 cycles)	60°C for 30 s (35 cycles)	72°C for 30 s (35 cycles)	72°C for 7 min
<i>G2677A</i>					
<i>G2677T</i>	94°C for 5 min	94°C for 1 min (43 cycles)	55°C for 1 min (43 cycles)	72°C for 2 min (43 cycles)	72°C for 5 min
<i>C3435T</i>					

ABCB1 の RFLP 反応液の組成を Table 2-6 に示した。

Table 2-6 *ABCB1* の RFLP 反応液

<i>C1236T</i>		<i>G2677A</i>		<i>G2677T</i>		<i>C3435T</i>	
Sample	8.0 μ L	Sample	8.0 μ L	Sample	8.0 μ L	Sample	8.0 μ L
10×M Buffer	2.5 μ L	10×T Buffer	2.5 μ L	10×M Buffer	2.5 μ L	10×Nde II Buffer	2.5 μ L
		0.1% BSA	2.0 μ L	0.1%BSA	2.0 μ L		
RNase-free	13.5 μ L	RNase-free	10.5 μ L	RNase-free	10.5 μ L	RNase-free water	10.5 μ L
water		water		water			
<i>Hae III</i>	1.0 μ L	<i>Afa I</i>	2.0 μ L	<i>XbaI</i>	2.0 μ L	<i>NdeII</i>	2.0 μ L

全量を 25 μ L として 37℃で over night インキュベートし^{71,72)}、その後 loading buffer 10 μ L を加え 3%アガロースゲルで 100 V、40 分間電気泳動を行った。Ethidium bromide で DNA を染色し、紫外線照射器でゲルを観察した。

2-2-5 血漿中総 PTX および 6αOH-PTX 濃度測定

第 1 章で確立した LC-MS/MS 法にて、血漿中総 PTX および 6αOH-PTX 濃度を測定した。

2-2-6 統計解析

遺伝子多型の分布は、Hardy-Weinberg 平衡に従っているかを確認した。遺伝子多型と薬物動態パラメータとの多群比較は、Scheffé 法を用いた。これらの統計解析には IBM の SPSS Ver. 22 を用いて $P < 0.05$ を有意とした。

第3節 結果

2-3-1 対象患者の *CYP3A5* および *ABCB-1* の Genotype 分布

原発がん種、がん化学療法歴および患者背景は第3章 Table 3-1、Table 3-2 および Table 3-3 に示した。卵巣癌と子宮体癌で 80%、初回治療は 70%だった。

CYP3A5 および *ABCB-1* の Genotype 分布は Table 2-7 に示した。*CYP3A5**3、*ABCB1* 1236 C>T、2677G>T/A および 3435C>T の genotype 分布は、Hardy–Weinberg 平衡に従っていた。

Table 2-7 *CYP3A5* および *ABCB1* の遺伝子型とアレル頻度

Polymorphism	Genotype	Frequency (%)	Genotype	Frequency (%)	Genotype	Frequency (%)	<i>p</i>	<i>q</i>
<i>CYP3A5</i>	*1/*1	1 (3.3%)	*1/*3	16 (53.3%)	*3/*3	13 (43.3%)	0.300	0.700
<i>ABCB1</i>								
1236	C/C	9 (30.0%)	C/T	14 (46.7%)	T/T	7 (23.3%)	0.533	0.467
C>T								
<i>ABCB1</i>					T/T			
2677	G/G	13 (43.3%)	G/T	8 (26.7%)	A/A	9 (30.0%)	0.567	0.433
G>T/A			G/A		T/A			
<i>ABCB1</i>								
3435	C/C	12 (40.0%)	C/T	15 (50.0%)	T/T	3 (10.0%)	0.650	0.350
C>T								

*CYP3A5**3/*3 については対象患者 30 名のうちの 43%であり、従来の報告^{44,45)}と同様の傾向を示した。また、*ABCB1* の C1236T 変異および C3435T の変異についてもこれまでの報告と同様な傾向となったが、G2677T/A については G/G の割合が高かった^{73,74)}。

2-3-2 遺伝子多型と血漿中濃度

遺伝子多型と血漿中 PTX 濃度、6αOH-PTX 濃度および 6αOH-PTX /PTX 濃度比の関係を Fig 2-1、Fig 2-2、Fig. 2-3 および Fig. 2-4 に示した。各遺伝子多型は wild/wild、wild/mutant、mutant/mutant の 3 群に分けて評価した。*CYP3A5* および *ABCB1* 遺伝子多型と血漿中 PTX 濃度、血漿中 6αOH-PTX 濃度および 6αOH-PTX /PTX 濃度比について相関はみられなかった。*CYP3A5**1/*1 は 1 例のみであったため統計解析は行わなかった。*CYP3A5**1/*3 と *3/*3 を有する患者の血漿中 PTX および 6αOH-PTX 濃度はそれぞれ同様な数値を示した。*ABCB1* C1236T については T/T 変異において血漿中 PTX および 6αOH-PTX 濃度は低い傾向にあったが、6αOH-PTX /PTX 濃度比は wild/wild、wild/mutant および mutant/mutant の 3 群で同じ傾向にあった。G2677T/A および C3435T 変異ではそれぞれ T/T(T/A)、T/T について血漿中 PTX、6αOH-PTX 濃度が高い傾向にあったが、6αOH-PTX /PTX 濃度比は同様の傾向を示した。

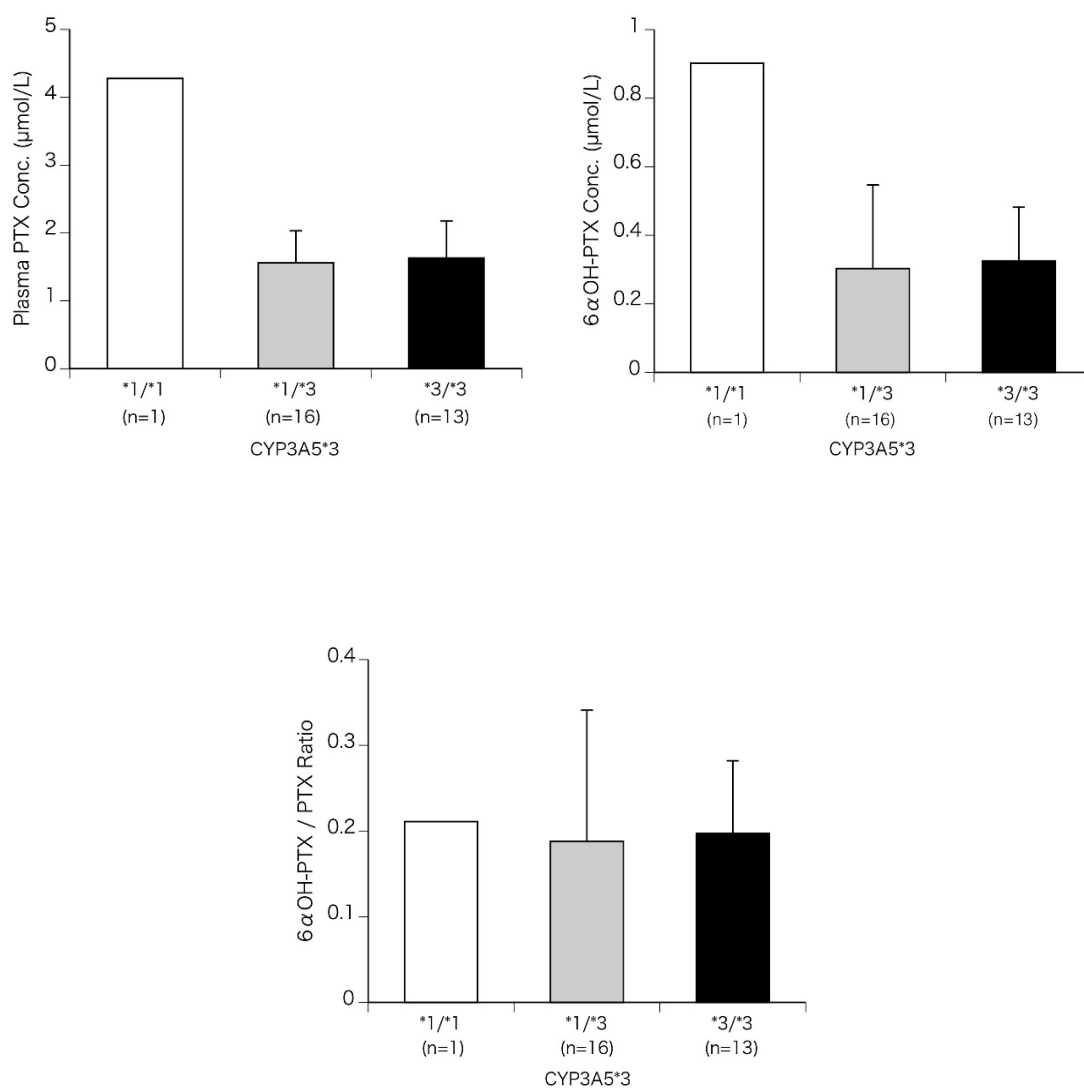


Fig. 2-1 *CYP3A5* 遺伝子多型と血漿中 PTX 濃度、6αOH-PTX 濃度および 6αOH-PTX /PTX 濃度比の関係（平均値 ± 標準偏差）

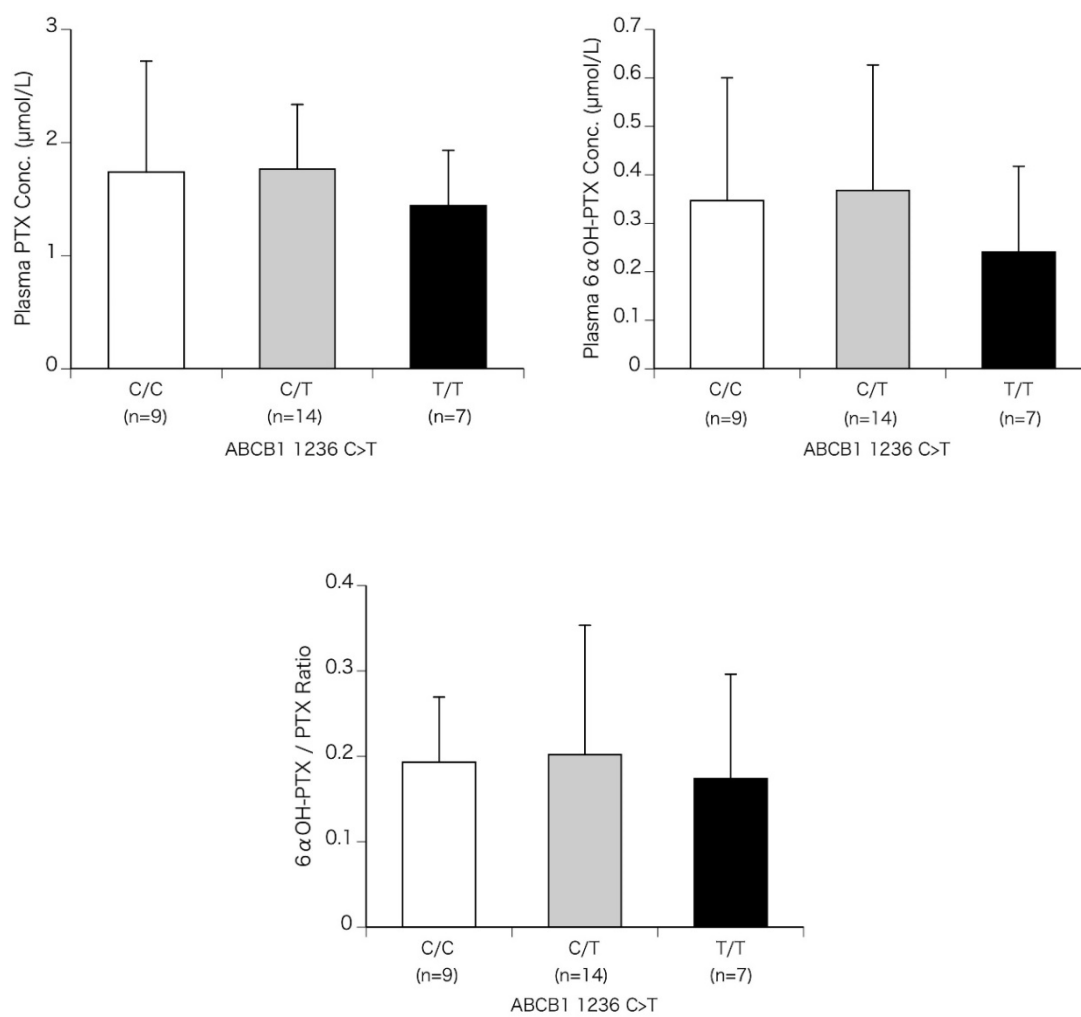


Fig. 2-2 *ABCB1* 1236 遺伝子多型と血漿中 PTX 濃度、6αOH-PTX 濃度および 6αOH-PTX / PTX 濃度比の関係（平均値 ± 標準偏差）

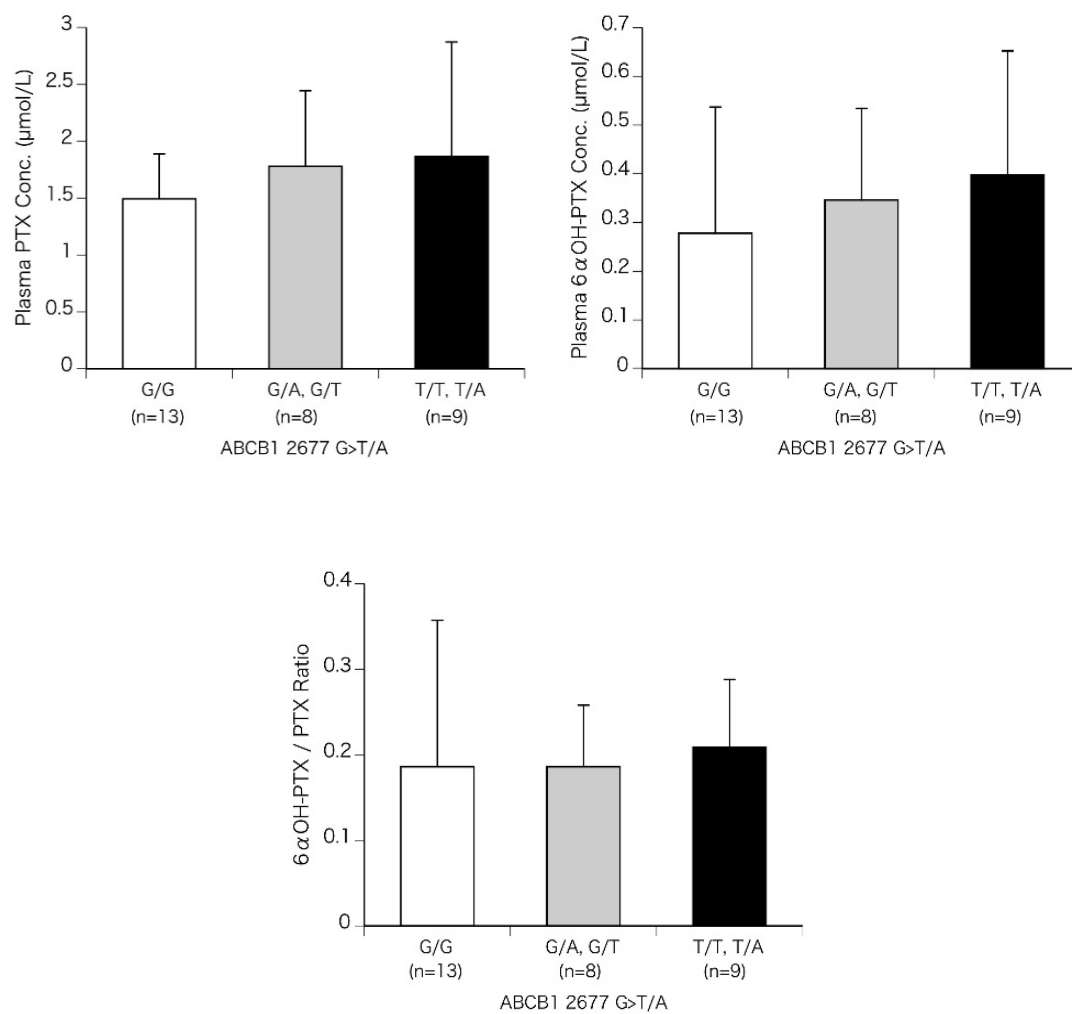


Fig. 2-3 *ABCB1* 2677 遺伝子多型と血漿中 PTX 濃度、6αOH-PTX 濃度および 6αOH-PTX /PTX 濃度比の関係（平均値 ± 標準偏差）

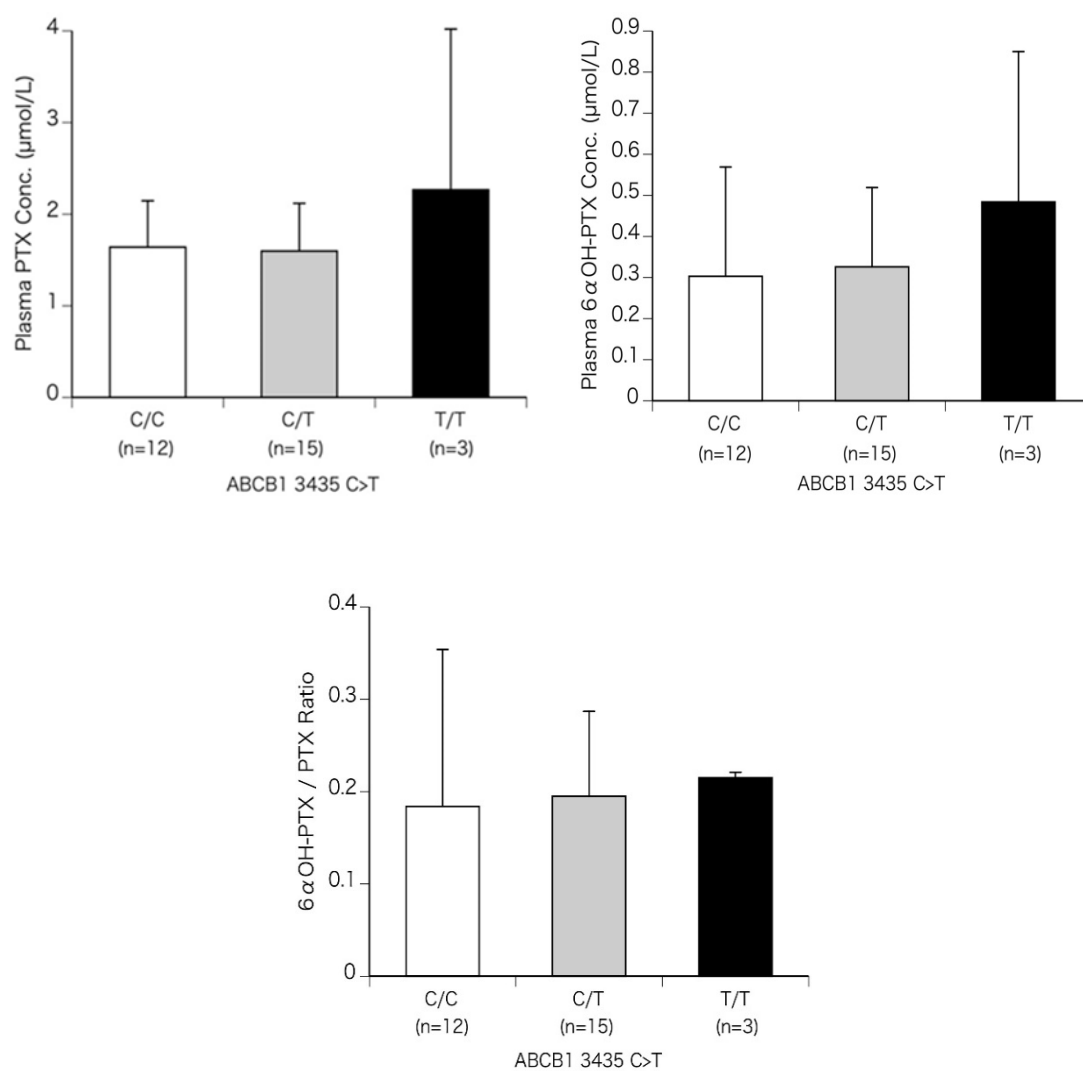


Fig. 2-4 *ABCB1* 3435 遺伝子多型と血漿中 PTX 濃度、6αOH-PTX 濃度および 6αOH-PTX / PTX 濃度比の関係（平均値 ± 標準偏差）

第4節 考察

CYP3A5 遺伝子多型の薬物動態への影響はタクロリムス、ミダゾラム、ジルチアゼム等で知られており、*CYP3A5* *1/*1 を有する患者では、タクロリムスのクリアランスが増大し、より投与量を増やす必要性が指摘されている⁷⁵⁻⁷⁷⁾。今回、*CYP3A5* 遺伝子多型については*1/*3と*3/*3のPTX投与終了1時間後の血漿中PTXおよび6αOH-PTX濃度、6αOH-PTX/PTX濃度比がそれぞれ同程度であった。*CYP3A5* 遺伝子多型ではヘテロ変異であっても*1アレルの存在により*CYP3A5*の活性が保たれるとされる報告がある⁷⁸⁾。PTXで*CYP3A5* 遺伝子多型と有害事象との発現を卵巣がん患者で検討した臨床研究では、*CYP3A5**3変異を有することがTC療法時の骨髄抑制を引き起こすとの報告がある⁷⁹⁾。一方で、卵巣癌患者で*CYP3A5**3遺伝子多型は、有害事象の発現に影響を与えないという報告もある⁵¹⁾。このように、PTXの体内動態に関する*CYP3A5*の遺伝子多型の影響には一致した見解が得られていない。今回の結果から、*CYP3A5* 遺伝子多型がPTXおよび6αOH-PTXの体内動態に与える影響はほとんどないと考えられた。また、*1/*1の1症例はPTXの投与量は175 mg/m²でほぼ平均投与量(166.7 mg/m²)であったが153.1 cm、35.50 kg、BMI 15.15とかなりの低体重^{80,81)}による影響があるものと推察された。ABCB1の遺伝子多型については末梢神経障害への影響や腫瘍細胞の耐性化などについて報告^{53,82,83)}があるが、好中球減少を指標とした本研究ではABCB1の遺伝子多型は血漿中PTX濃度等には影響を与えないと考えられた。

第3章 婦人科癌患者におけるパクリタキセルの体内動態との関連

第1節 緒言

がん化学療法は抗がん薬の進歩や支持療法の発達および診療報酬上の外来化学療法加算の新設などにより入院治療から外来治療として実施されるようになり、婦人科癌に対する TC 療法も外来治療として実施されている。しかし、外来治療は入院治療以上に副作用を予測し対応することが重要で、特に発熱性好中球減少症は死に至る危険性もあり注意が必要である。PTX は好中球減少と血漿中濃度が $0.05 \mu\text{M}$ を超えた時間に相関関係が報告されているが^{31,48,49)}、外来で投与された場合、24 時間後、48 時間後などの頻回の採血ができず好中球減少を予測できない。

また、PTX は CYP で代謝を受け、ABCB1 において胆汁中に排泄されるがそれらの遺伝子多型と PTX のクリアランスや有害事象との関連は明確となっていない。そこで外来で PTX の投与を終えてから帰宅するまでの間での採血において PTX およびその代謝物の血漿中濃度を測定し、あわせて代謝酵素や排泄トランスポーターの遺伝子多型を評価することから有害事象の予測因子を探索した。

第2節 方法

3-2-1 対象患者

第2章に記載の方法で採取した試料の一部を第1章で確立した測定法を用いて PTX および 6αOH-PTX の血漿中濃度を測定した。また、臨床検査値は電子カルテより調査を行った。血漿中濃度測定法および遺伝子多型検出法については第1章および第2章を参照。調査については第2章に示した通り豊橋市民病院倫理審査委員会の承認のうえ文書で同意の得られた患者について実施した。

3-2-2 統計解析

2変量の相関は Pearson の相関係数を求めた。重回帰分析では好中球減少率、好中球最低値をそれぞれ従属変数とし、年齢、身長、体重、PTX 投与量、*CYP3A5* 遺伝子多型、*ABCB1* 1236 C>T 遺伝子多型、*ABCB1* 2677 G>T/A 遺伝子多型、*ABCB1* 3435C>T 遺伝子多型、CBDCA 投与量、血清アルブミン値、血清クレアチニン値、血清総ビリルビン値、LDH、血漿中 PTX 濃度、血漿中 6αOH-PTX 濃度、血漿中 6αOH-PTX /PTX 濃度比を独立変数としてステップワイズ法を用い、-F 値確率は 0.1 以下を投入し、0.20 以上を除去した。また、好中球減少率は投与直前の好中球数からそのコースにおける最低値の差を投与直前値で除した百分率とした。なお、これらの統計解析には IBM の SPSS Ver22 を用いて $p<0.05$ を有意とした。

第3節 結果

3-3-1 患者背景

原発がん種、がん化学療法歴および患者背景を Table 3-1 、Table 3-2 、Table 3-3 に示した。

Table 3-1 原発がん種

Primary tumor	<i>n</i> (%)
Uterine body cancer	11(36.7)
Ovarian cancer	12(40.0)
Uterine body cancer / Ovarian cancer	1(3.3)
Cervical cancer	5(16.7)
Uterine sarcoma	1(3.3)

Table 3-2 がん化学療法歴

Chemotherapy history	<i>n</i>	Mean cycle (range)	History of other chemotherapies	Prior radiation
First six cycles of TC therapy	21	3.14 (2 - 6)	1	2
Second six cycles of TC therapy	4	1.50 (1- 2)	2	2
Third or more six cycles of TC therapy	5	-	4	2

Table 3-3 患者背景

Characteristic	Mean	SD	Range
Age(year)	61.5	11.93	31-81
Height(cm)	151.9	6.07	139.8-167.5
Weight(kg)	51.6	10.54	35.5-75.0
Body surface area(m ²)	1.46	0.15	1.22-1.74
No. of course done	5	4.61	2-22
Paclitaxel dose(/m ²)	166.7	16.0	130-180
Carboplatin dose (AUC)	4.6	0.61	3-5
White blood cells(/ μ L)	5578	2053	2260-13,350
Neutrophils(/ μ L)	3512	1520	1381-8998
Total Bilirubin(mg/dL)	0.51	0.12	0.40-0.90
Albumin(g/dL)	3.91	0.37	3.10-4.050
Serum creatinine(mg/dL)	0.63	0.12	0.42-0.90
BMI	22.3	4.05	15.1-32.1
Blood sampling time after the start of PTX infusion(h)	4.30	0.35	3.57-5.05
Neutrophil count before chemotherapy(/ μ L)	3512	1520	1381-8998
Neutrophil nadir count after chemotherapy(/ μ L)	1107	536	322-2498

血漿中 PTX 濃度、血漿中 6αOH-PTX 濃度および 6αOH-PTX /PTX 濃度比の関係を Fig 3-1 に示した。血漿中 6αOH-PTX 濃度と 6αOH-PTX /PTX 濃度比はかなり強い正の相関があり(R=0.8000)血漿中 PTX 濃度と 6αOH-PTX 濃度には正の相関があった(R=0.6680)。血漿中 PTX 濃度と 6αOH-PTX /PTX 濃度比には相関がなかった(R=0.1046)。

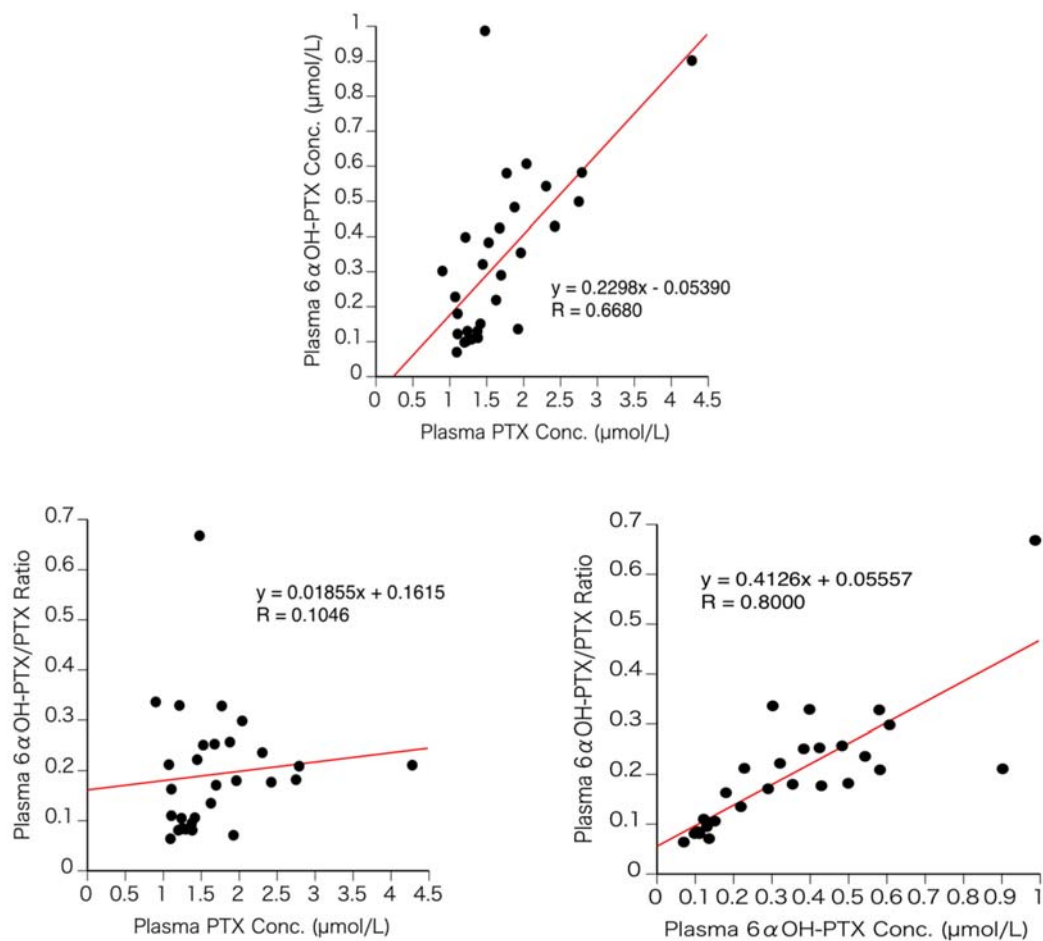


Fig. 3-1 血漿中 PTX 濃度、6αOH-PTX 濃度、6αOH-PTX /PTX 濃度比の関係

好中球減少率と身長、Day 0 (PTX 投与日)における好中球数および 6 α OH-PTX /PTX 濃度比の関係を Fig. 3-2 に示した。好中球減少率は身長と負の相関があり(R=0.5154)身長が低いほど好中球減少率が高かった。Day 0 における好中球数は好中球減少率と正の相関を示し(R=0.4378)、Day0 における好中球数が大きいほど減少率が大きかった。6 α OH-PTX /PTX 濃度比とは弱い正の相関(R=0.3404)を示し、6 α OH-PTX /PTX 濃度比が大きいほど減少率が低かった。

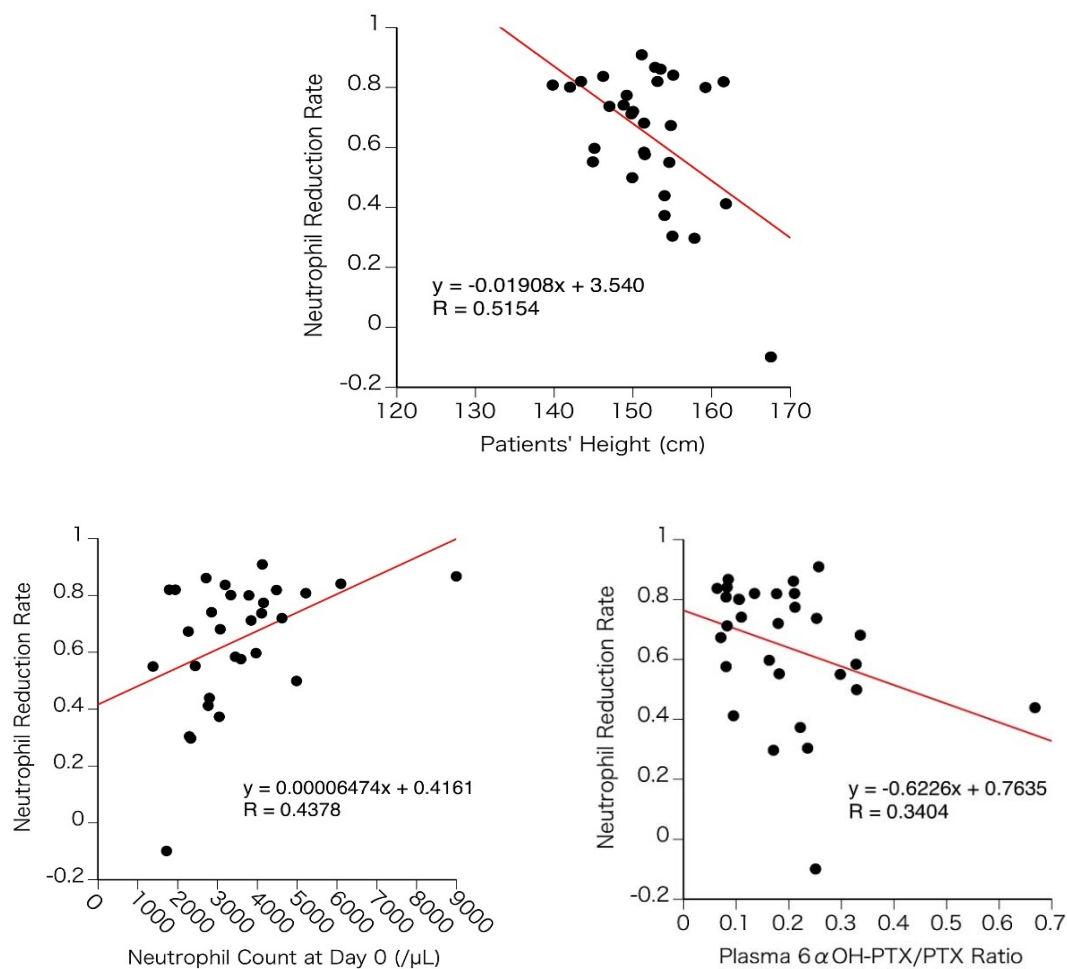


Fig. 3-2 好中球減少率と身長、Day0 における好中球数、6 α OH-PTX /PTX 濃度比の関係

投与後最低好中球数と血漿中 PTX 濃度、6αOH-PTX /PTX 濃度比、身長の関係を図 3-3 に示した。血漿中 PTX 濃度とは弱い負の相関($R=0.3320$)、6αOH-PTX /PTX 濃度比とは弱い正の相関($R=0.2920$)、身長とは弱い正の相関($R=0.2732$)を示した。

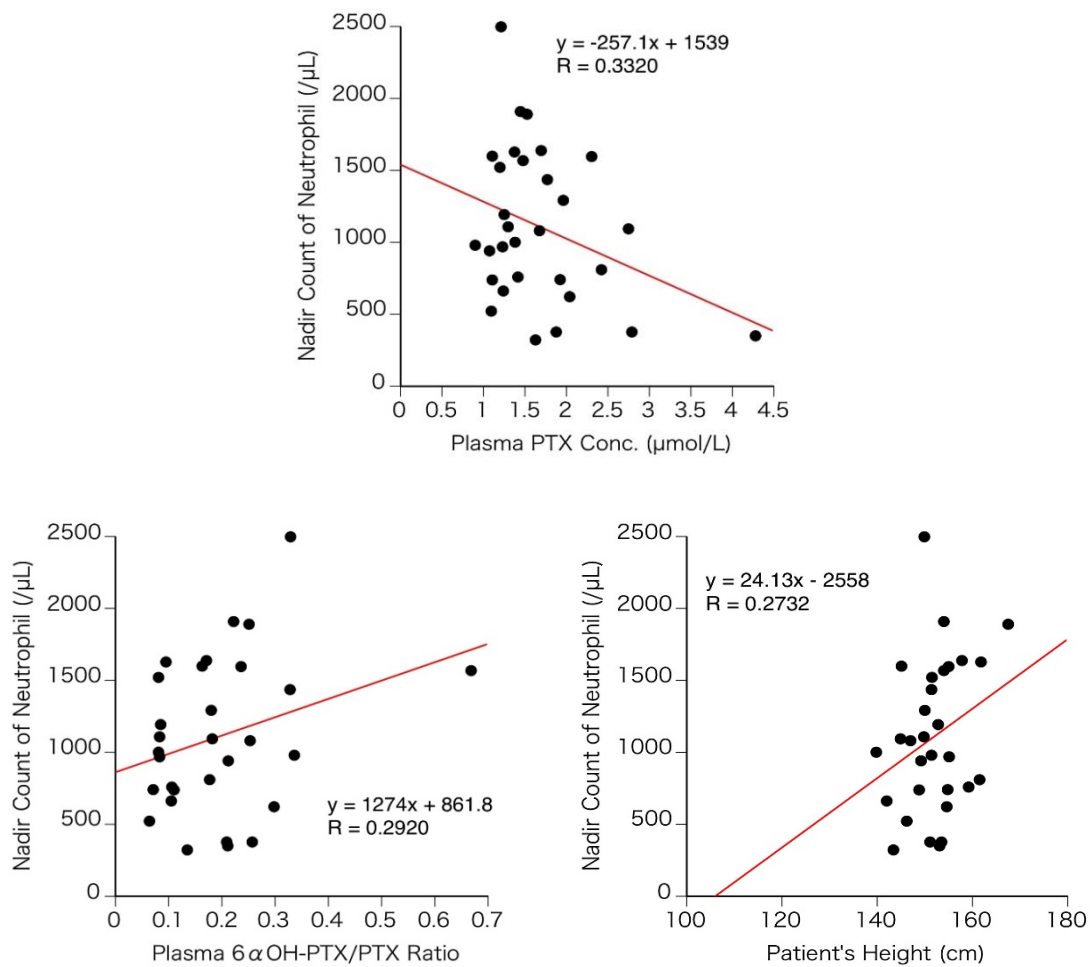


Fig. 3-3 最低好中球数と血漿中 PTX 濃度、6αOH-PTX /PTX 濃度比、身長の関係

重回帰分析の結果を Table 3-4 、 Table 3-5 に示した。

Table 3-4 重回帰解析によって求められた好中球減少率に影響する因子

Dependent variable	Factor	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients β	t	P	VIF
		B (95% CI)	SE				
Neutrophil reduction rate	Constant	2.975 (1.280 to 4.669)	0.824		3.609	0.001	
	Patient's height	-0.018 (-0.029 to -0.007)	0.005	-0.487	-3.372	0.002	1.038
	Neutrophil count at Day 0	6.888×10^{-5} (0.000-0.000)	0.000	0.466	3.060	0.0005	1.152
	PTX concentration	0.099 (-0.002 to 0.201)	0.049	0.307	2.016	0.054	1.150

Neutrophil reduction rate = $2.975 - 0.018 \times [\text{患者身長}] + 6.888 \times 10^{-5} \times [\text{投与直前の好中球数}] + 0.099 \times [\text{血漿中 PTX 濃度}]$.

B: partial regression coefficient B: standardized partial regression coefficient;

VIF: variance inflation factor SE, standard error CI: confidence interval

Table 3-5 重回帰解析によって求められた好中球最低値に影響する因子

Neutrophil nadir count	Constant	- 2533.909 (-7084.729 to 2016.910)	2213.940		-1.145	0.263	
	PTX concentration	- 315.385 (- 580.558 to - 50.213)	129.005	-0.407	-2.445	0.022	1.031
	Patient's height	25.859 (- 4.573 to 56.291)	14.805	0.293	1.747	0.092	1.044
	6αOH-PTX /PTX ratio	1267.722 (- 225.257 to 2760.702)	726.323	0.291	1.745	0.093	1.030

Neutrophil nadir count = - 2533-315.4 × [血漿中 PTX 濃度] + 25.86 × [患者身長] + 1268 ×[血漿中 6αOH-PTX /PTX 濃度比]

B: partial regression coefficient B: standardized partial regression coefficient;

VIF: variance inflation factor SE, standard error CI: confidence interval CI, confidence interval

第4節 考察

日本人は *CYP2C8* の遺伝子多型の頻度は低い^{65,66)}と言われているが、本研究においても PTX 投与終了 1 時間後の血漿中 PTX 濃度および 6αOH-PTX 濃度は相関関係にあり、PTX の代謝について *CYP2C8* 遺伝子多型の影響はなかった。*CPY3A5*3*、*ABCB1* 1236C>T、2677G>T/A、3435C>T についても PTX 投与 1 時間後のクリアランスに影響しないと考えられた。

重回帰分析の結果から好中球減少率は身長、Day 0 好中球数、血漿中 PTX 濃度により 47.7%が予測できること、また最低好中球数は血漿中 PTX 濃度、身長、6αOH-PTX /PTX 濃度比で 30.0%が予測できることが示された。また、どちらの独立変数にも身長が含まれていたことから、婦人科がん PTX を投与する場合には身長に注意して投与量を決定する必要があると考えられた。抗がん薬の投与量を決定する際には体表面積を用いることが多く、身長が重要な要素の 1 つとなっている。本邦では DuBois 式⁸⁴⁾や藤本式などさまざまな式⁸⁵⁾が提案されており、がん薬物療法時の腎障害診療ガイドライン⁸⁶⁾では体表面積の推算式の代表として DuBois 式が挙げられている。それらの式では身長および体重をもとに体表面積を算出している。投与量を計算するうえでは体重も重要な要因となっているが、身長については造血能力の指標となることも報告⁸⁷⁾されているため、低身長では造血能力が低く好中球減少が起きやすい可能性がある。身長については今後の研究が必要と考えられる。今回 *CYP3A5* や *ABCB1* の遺伝子多型で PTX の好中球減少の個人差の説明はつかなかったが、PTX とその主たる代謝物の 6αOH-PTX の血漿中濃度をモニタリングすることにより好中球数の減少を予測することができた。

総括

パクリタキセル(PTX)は婦人科がんの治療においてキードラッグとされ、カルボプラチン(CBDCA)と併用する TC 療法は術後(前)補助化学療法や進行・再発例に用いられている。PTX は主に CYP2C8 により代謝され、6 α OH-PTX に変換される。PTX の一部は CYP3A4/5 により代謝されるとともに、ABCB1 により未変化体のまま胆汁中へ排泄される。しかし、CYP2C8 には日本人で薬物動態に影響する遺伝子多型がほとんど観察されていない。PTX は静脈内投与後速やかに血中から 2~3 相性の消失を示し、AUC や Cmax は投与量に比例しない非線形を示す。PTX の用量規制因子は骨髄抑制(白血球減少、好中球減少)、末梢神経障害、粘膜障害とされる。好中球減少は発熱性好中球減少症を引き起こす危険性や、次サイクル以降の dose intensity を低下させ期待される治療効果が得られないなどの問題があるため、好中球数の管理が重要である。PTX による好中球減少症の発現は投与後 24 時間の血漿中濃度に関連することが報告されているものの、近年盛んになりつつある外来がん化学療法では投与 24 時間後に採血し、血漿中濃度を測定することは困難である。本研究では婦人科がん患者を対象として、外来がん化学療法実施時に好中球減少症に関与する薬物動態学的因子および患者背景因子を探索することで好中球減少を予測することを目的として、PTX 投与終了 1 時間後の採血で PTX および代謝物の血漿中濃度を測定し、代謝および排泄に関与するタンパクの遺伝子多型を検出した上で、患者背景情報と組み合わせて好中球減少症発現における関連性を検討した。

第 1 章では高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析装置(LS-MS/MS)を用いて血漿中 PTX 濃度および血漿中 6 α OH-PTX 濃度の測定法の確立を試みた。固相抽出法を用いて抽出過程を簡便化し、DTX を内部標準として米国医薬食品局(FDA)のガイドラインおよび厚生労働省「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」を参考にバリデーションを試みた。PTX および 6 α OH-PTX の

検量線は 0.5-1000 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した ($R^2=1$)。PTX および 6 α OH-PTX 測定時の精度は、0.5-1000 ng/mL の範囲でそれぞれ 9.68%以下および 8.94%以下であった。また、PTX および 6 α OH-PTX 測定時の真度は、0.5-1000 ng/mL の範囲でそれぞれ 7.50%以下および 13.9%以下であった。

第 2 章では *CYP3A5* および *ABCB1* 遺伝子多型を検出した。*CYP3A5* は日本人の約 56~61%が機能を欠損しているとされる^{45,69)}。また、PTX の耐性化に関連するトランスポーター *ABCB1* の遺伝子多型を調査した。遺伝子多型の測定には RFLP 法を用い *CYP3A5* は *3、*ABCB1* は 1236C>T、2677G>T/A、3435C>T について解析した。酵素代謝活性を示さない *CYP3A5**3/*3 遺伝子変異頻度は従来の報告^{44,45)}と同様の 43%であった。また、*ABCB1* の遺伝子変異頻度についても今までの報告と同様であり、*CYP3A5**3 と同様 Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。

第 3 章では TC 療法を実施している婦人科がん患者 30 名を対象に外来でも採血可能な PTX 投与終了 1 時間後 (CBDCA 投与終了直後) に採血し、PTX および 6 α OH-PTX の血漿中濃度を測定した。また、*CYP2C8* 活性の指標として血漿中 6 α OH-PTX /PTX 濃度比を用いた。血漿中 6 α OH-PTX 濃度と 6 α OH-PTX /PTX 濃度比はかなり強い正の相関があり ($R=0.8000$)、血漿中 PTX 濃度と 6 α OH-PTX 濃度にも正の相関があった ($R=0.6680$)。一方、血漿中 PTX 濃度と 6 α OH-PTX /PTX 濃度比には相関がなかった ($R=0.1046$)。このことから *CYP2C8* の遺伝子多型の影響はなく、*CYP* の代謝活性も飽和状態にないことが推察された。PTX 投与直前の好中球数からそのコースにおける最低値の差を投与直前値で除した好中球減少率は、患者の身長と負の相関があり ($R=0.5154$)、身長が低いほど好中球減少率が高かった。PTX 投与直前における好中球数は、好中球減少率と正の相関を示し ($R=0.4378$)、6 α OH-PTX /PTX 濃度比とは弱い正の相関 ($R=0.3404$) を示した。一方、*CYP3A5**3、*ABCB1* 1236C>T、2677G>T/A および 3435C>T の遺伝子多型は、血漿中 PTX、6 α OH-PTX 濃度および 6 α OH-PTX /PTX

濃度比に影響しなかった。CYP3A5 や ABCB1 の遺伝子多型のほか診療録から身長、体重、年齢、投与直前の白血球数・好中球数、AST、ALT、総ビリルビン、血清クレアチニンなどを調査し、ステップワイズ法を用いて好中球減少率および最低好中球数を求める重回帰分析を行った。その結果、好中球減少率は身長、PTX 投与直前の好中球数、血漿中 PTX 濃度により 47.7%が予測できること、また最低好中球数は血漿中 PTX 濃度、身長、6αOH-PTX /PTX 濃度比で 30.0%が予測できることが示された。

以上より、本研究によって外来診療で婦人科系がん化学療法を施行する際に血漿中 PTX 濃度および 6αOH-PTX /PTX 濃度比が好中球数の予測因子として有用であることが明らかになった。この結果は婦人科系がん治療における薬物血中濃度モニタリングの有用性を示すとともに、有害事象対策においても有益な知見を提供すると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜りかつ本稿の御校閲をいただきました静岡県立大学薬学部臨床薬学大講座臨床薬剤学分野、賀川義之教授に厚く御礼申し上げます。

本論文のご高覧と、ご指導、ご助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院伊藤邦彦教授、山田浩教授および並木徳之教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、数々の御協力を賜りました豊橋市民病院婦人科部長河井通泰先生に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、数々の御指導、御助言を賜りました静岡県立大学臨床薬学大講座臨床薬剤学分野、前田利男客員教授、宮寄靖則准教授、石井康子講師、内野智信講師、谷澤康玄助教に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、ご協力いただきました患者様に深く感謝の意を表します。

終わりに、本研究において数々の御協力を頂きました静岡県立大学薬学部臨床薬学大講座臨床薬剤学分野の諸氏ならびに学生生活において様々な場面でお世話になった方々に心より感謝の意を表します。

参考文献

1. 年次推移：[国立がん研究センター がん登録・統計]. Available at: https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/annual.html. (Accessed: 28th December 2018)
2. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E. *et al.* Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* **93**, 2325–7 (1971).
3. Schiff, P. B., Fant, J., Horwitz, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665–7 (1979).
4. Schiff, P. B., Horwitz, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1561–5 (1980).
5. Manfredi, J. J., Parness, J., Horwitz, S. B. Taxol binds to cellular microtubules. *J. Cell Biol.* **94**, 688–696 (1982).
6. Parness, J., Horwitz, S. B. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J. Cell Biol.* **91**, 479–487 (1981).
7. Kumar, N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **256**, 10435– 10441 (1981).
8. Brown, T., Havlin, K., Weiss G. *et al.* A phase I trial of taxol given by a 6-hour intravenous infusion. *J. Clin. Oncol.* **9**, 1261–1267 (1991).
9. Wiernik, P. H., Schwartz, E. L., Strauman, J. J. *et al.* Phase I Clinical and Pharmacokinetic study of taxol. *Cancer Res.* **47**, 2486–2493 (1987).
10. Rowinsky, E. K., Burke, P. J., Karp, J. E. *et al.* Phase I and Pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. *Cancer Res.* **49**, 4640–4647 (1989).

11. Holmes, F. A., Walters, R.S., Theriault, R. L. *et al.* Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 1797–1805 (1991).
12. Murphy, W. K., Fossella, F. V., Winn, R. J. *et al.* Phase II study of taxol in patients with untreated advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 384–388 (1993).
13. Sekine, I., Nishiwaki, Y., Watanabe, K. *et al.* Phase II study of 3-hour infusion of paclitaxel in previously untreated non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2**, 941–945 (1996).
14. Tamura, T., Sasaki, Y., Nishiwaki, Y. *et al.* Phase I study of paclitaxel by three-hour infusion: hypotension just after infusion is one of the major dose-limiting toxicities. *Jpn. J. Cancer Res.* **86**, 1203–1209 (1995).
15. Grem, J. L., Tutsch, K. D., Simon, K. J. *et al.* Phase I study of taxol administered as a short i.v. infusion daily for 5 days. *Cancer Treat. Rep.* **71**, 1179–84 (1987).
16. Eisenhauer, E. A., ten Bokkel Huinink, W. W., Swenerton, K.D. *et al.* European-Canadian randomized trial of paclitaxel in relapsed ovarian cancer: high-dose versus low-dose and long versus short infusion. *J. Clin. Oncol.* **12**, 2654–66 (1994).
17. Ozols, R. F., Bundy, B. N., Greer, B.E. *et al.* Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3194–3200 (2003).
18. Kitagawa, R., Katsumata, N., Shibata, T. *et al.* Paclitaxel plus carboplatin

- versus paclitaxel plus cisplatin in metastatic or recurrent cervical cancer: The open-label randomized phase III trial JCOG0505. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2129–2135 (2015).
19. Armstrong, D. K., Plaxe, S. C., Alvarez, R. D. *et al.* NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Ovarian Cancer *Version 2*.(2018).
 20. Koh, W. J., Abu-Rustum, N. R., Bean, S. *et al.* NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Uterine Neoplasms *Version 2*. (2019).
 21. Koh, W. J., Abu-Rustum, N. R., Bean, S. *et al.* NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Guidelines Cervical Cancer *Version 3*. (2019).
 22. 日本婦人科腫瘍学会, 卵巣がん治療ガイドライン2015年版.
 23. 日本婦人科腫瘍学会, 子宮体がん治療ガイドライン2013年版.
 24. 日本婦人科腫瘍学会, 子宮頸癌治療ガイドライン2017年版.
 25. タキソール注射液 添付文書, 2018年2月改訂
 26. Kohler, D. R., Goldspiel, B. R. Paclitaxel (taxol). *Pharmacotherapy* **14**, 3–34 (1994).
 27. Venook, A. P., Egorin, M. J., Rosner, G. L. *et al.* Phase I and Pharmacokinetic trial of paclitaxel in patients with hepatic dysfunction: Cancer and Leukemia Group B 9264. *J. Clin. Oncol.* **18**, 2780–2787 (2000).
 28. 日本臨床腫瘍学会. 発熱性好中球減少症(FN)診療ガイドライン(改訂第2版). (Nankōdō, 2017).
 29. Noda, K., Ikeda, M., Kudo, R. *et al.* [Phase II study of paclitaxel (BMS-181339) in patients with ovarian cancer by 3-hour intravenous infusion]. *Gan To Kagaku Ryoho.* **23**, 317–25 (1996).
 30. Bonadonna, G., Valagussa, P., Moliterni, A. *et al.* Adjuvant cyclophosphamide,

- methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer – the results of 20 years of follow-up. *N. Engl. J. Med.* **332**, 901–906 (1995).
31. Gianni, L., Kearns, C. M., Giani, A. *et al.* Nonlinear pharmacokinetics and metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships in humans. *J. Clin. Oncol.* **13**, 180–190 (1995).
 32. van Tellingen, O., Huizing, M. T., Panday, V. R. *et al.* Cremophor EL causes (pseudo-) non-linear pharmacokinetics of paclitaxel in patients. *Br. J. Cancer* **81**, 330–335 (1999).
 33. Gianni, L., Viganò, L., Locatelli, A. *et al.* Human pharmacokinetic characterization and in vitro study of the interaction between doxorubicin and paclitaxel in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **15**, 1906–1915 (1997).
 34. Sparreboom, A., Huizing, M. T., Boesen, J. J. *et al.* Isolation, purification, and biological activity of mono- and dihydroxylated paclitaxel metabolites from human feces. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **36**, 299–304 (1995).
 35. Sonnichsen, D. S., Relling, M. V. Clinical Pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin. Pharmacokinet.* **27**, 256–269 (1994).
 36. Sonnichsen, D. S., Liu, Q., Schuetz, E. G. *et al.* Variability in human cytochrome P450 paclitaxel metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 566–75 (1995).
 37. Cresteil, T., Monsarrat, B., Alvinerie, P. *et al.* Taxol metabolism by human liver microsomes: identification of cytochrome P450 isozymes involved in its biotransformation. *Cancer Res.* **54**, 386–392 (1994).
 38. Harris, J. W., Rahman, A., Kim, B. R. *et al.* Metabolism of taxol by human

- hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res.* **54**, 4026–4035 (1994).
39. Kumar, G. N., Walle, U. K., Walle, T. Cytochrome P450 3A-mediated human liver microsomal taxol 6 α -hydroxylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 1160–1165 (1994).
 40. Rahman, A., Korzekwa, K. R., Grogan, J. *et al.* Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* **54**, 5543–5546 (1994).
 41. Huizing, M. T., Keung, A. C., Rosing, H. *et al.* Pharmacokinetics of paclitaxel and metabolites in a randomized comparative study in platinum-pretreated ovarian cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **11**, 2127–2135 (1993).
 42. Beijnen, J. H., Huizing, M. T., ten Bokkel Huinink W. W. *et al.* Bioanalysis, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the novel anticancer drug paclitaxel (Taxol). *Semin. Oncol.* **21**, 53–62 (1994).
 43. Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y. *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat. Genet.* **27**, 383–391 (2001).
 44. 福圓修一. CYP3A5 SNPsの判定法確立および日本人における頻度解析. *Jpn J Clin Pharmacol Ther* **33**, 375S–376S (2002).
 45. Hiratsuka, M., Takekuma, Y., Endo, N. *et al.* Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **58**, 417–421 (2002).
 46. Miura, Y., Satoh, S., Saito, M. *et al.* Factors increasing quantitative interstitial fibrosis from 0 hr to 1 year in living kidney transplant patients

- receiving tacrolimus. *Transplantation* **91**, 78–85 (2011).
47. 加藤正太郎, 佐々木克也, 三浦昌朋. タクロリムスの年間費用に及ぼす製剤的要因DDS製剤と 患者側要因CYP3A5遺伝子多型の影響. 日本病院薬剤師会雑誌 **51**, 985–988 (2015).
48. Ohtsu, T., Sasaki, Y., Tamura, T. *et al.* Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of paclitaxel: a 3-hour infusion versus a 24-hour infusion. *Clin. Cancer Res.* **1**, 599–606 (1995).
49. Joerger, M., Huitema, A. D., Richel, D. J. *et al.* Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of paclitaxel and carboplatin in ovarian cancer patients: a study by the European organization for research and treatment of cancer-pharmacology and molecular mechanisms group and new drug development group. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6410–6418 (2007).
50. Henningsson, A., Marsh, S., Loos, W. J. *et al.* Association of CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 polymorphisms with the pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **11**, 8097–8104 (2005).
51. Marsh, S., Paul, J., King, C. R. *et al.* Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome after platinum plus taxane chemotherapy in ovarian cancer: The Scottish Randomised Trial in Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4528–4535 (2007).
52. Nakajima, M., Fujiki, Y., Kyo, S. *et al.* Pharmacokinetics of paclitaxel in ovarian cancer patients and genetic polymorphisms of CYP2C8, CYP3A4, and MDR1. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 674–82 (2005).
53. 岩佐紀宏. 卵巣癌TC療法新規投与法(カルボプラチン腹腔内投与／パクリタキセル週一回投与法)におけるパクリタキセル血中動態と遺伝子多型の関連. 埼玉医

科大学雑誌 **41**, T1-14 (2015).

54. Nakajima, Y., Yoshitani, T., Fukushima-Uesaka, H. *et al.* Impact of the haplotype CYP3A4*16B harboring the Thr185Ser substitution on paclitaxel metabolism in Japanese patients with cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**, 179–91 (2006).
55. 石川 元章, 中神 真寿美, 町支 優和ほか. 外来がん化学療法における説明に関する評価と課題. 日本病院薬剤師会雑誌 **44**, 1269–1273 (2008).
56. 後藤愛実, 小林豊英, 鈴木典子ほか. 外来化学療法センター開設における取り組みと薬剤師のかかわり. 日本病院薬剤師会雑誌 **44**, 93–96 (2008).
57. Huizing, M. T., Sparreboom, A., Rosing, H. *et al.* Quantification of paclitaxel metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **674**, 261–268 (1995).
58. Willey, T. A., Bekos, E. J., Gaver, R. C. *et al.* High-performance liquid chromatographic procedure for the quantitative determination of paclitaxel (Taxol) in human plasma. *J. Chromatogr.* **621**, 231–8 (1993).
59. Yamaguchi, H., Fujikawa, A., Ito, H. *et al.* Quantitative determination of paclitaxel and its metabolites, 6 α -hydroxypaclitaxel and p-3'-hydroxypaclitaxel, in human plasma using column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **27**, 539–44 (2013).
60. Gréen, H., Vretenbrant, K., Norlander, B. *et al.* Measurement of paclitaxel and its metabolites in human plasma using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry with a sonic spray ionization interface. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2183–9 (2006).

61. Mortier, K. A., Renard, V., Verstraete, A. G. *et al.* Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of docetaxel and paclitaxel in human plasma and oral fluid. *Anal. Chem.* **77**, 4677–83 (2005).
62. Zhang, W., Dutschman, G. E., Li, X. *et al.* Quantitation of paclitaxel and its two major metabolites using a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 2018–22 (2011).
63. FDA-Biopharmaceutics-2001. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Required* (2001).

doi:<http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fml.pdf>
64. 厚生労働省医薬食品局審査管理. 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン. (2013).
65. Nakajima, M., Fujiki, Y., Noda, K. *et al.* Genetic polymorphisms of CYP2C8 in Japanese population. *Drug Metab. Dispos.* (2003).
66. Hichiya, H. Tanaka-Kagawa, T., Soyama, A. Functional characterization of five novel CYP2C8 variants, G171S, R186X, R186G, K247R, and K383N, found in a Japanese population. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 630–636 (2005).
67. Kus, T., Aktas, G., Kalender, M. E. *et al.* Polymorphism of CYP3A4 and ABCB1 genes increase the risk of neuropathy in breast cancer patients treated with paclitaxel and docetaxel. *Onco. Targets. Ther.* **9**, 5073–5080 (2016).
68. de Graan, A. J., Elens, L., Sprowl, J. A. *et al.* CYP3A4*22 genotype and

- systemic exposure affect paclitaxel-induced neurotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **19**, 3316–3324 (2013).
69. Fukuen, S., Fukuda, T., Maune, H. *et al.* Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5* 3 and * 6, in a Japanese population. *Pharmacogenetics* **12**, 331–334 (2002).
 70. Balram, C., Zhou, Q., Cheung, Y. B. *et al.* CYP3A5*3 and *6 single nucleotide polymorphisms in three distinct Asian populations. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **59**, 123–126 (2003).
 71. Dai, D., Zeldin, D.C., Blaisdell, J. A. *et al.* Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* **11**, 597–607 (2001).
 72. Nakajima, M., Fujiki, Y., Noda, K. *et al.* Genetic polymorphisms of CYP2C8 in Japanese population. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 687–90 (2003).
 73. Azarpira, N., Aghdaie, M. H. Frequency of C3435 MDR1 and A6896G CYP3A5 single nucleotide polymorphism in an Iranian population and comparison with other ethnic groups. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **20**, 131–136 (2006).
 74. Qiu, F., He, X. J., Sun, Y. X. *et al.* Influence of ABCB1, CYP3A4*18B and CYP3A5*3 polymorphisms on cyclosporine A pharmacokinetics in bone marrow transplant recipients. *Pharmacol. Rep.* **63**, 815–25 (2011).
 75. Goto, M., Masuda, S., Kiuchi, T. *et al.* CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* **14**, 471–8 (2004).
 76. Iwasaki, K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical

- pharmacokinetics. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **22**, 328–335 (2007).
77. Chen, P., Li, J., Li, J. *et al.* Dynamic effects of CYP3A5 polymorphism on dose requirement and trough concentration of tacrolimus in renal transplant recipients. *J. Clin. Pharm. Ther.* **42**, 93–97 (2017).
 78. Gréen, H., Khan, M. S., Jakobsen-Falk, I. *et al.* Impact of CYP3A5 *3 and CYP2C8-HapC on paclitaxel / carboplatin-induced myelosuppression in patients with ovarian cancer. **5**, 4205–4209 (2011).
 79. Hu, L., Lv, Q. L., Guo, Y. *et al.* Genetic variation of CYP3A5 influences paclitaxel/carboplatin-induced toxicity in Chinese epithelial ovarian cancer patients. *J. Clin. Pharmacol.* **56**, 349–354 (2016).
 80. Body mass index - BMI. (2019).
 81. BMI e-ヘルスネット 情報提供. Available at:
<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/dictionary/metabolic/ym-002.html>. (Accessed: 5th January 2019)
 82. Taheri, M., Mahjoubi, F., Omranipour, R. Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients. *Genet. Mol. Res.* **9**, 34–40 (2010).
 83. Tulsyan, S., Mittal, R. D., Mittal, B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmgenomics. Pers. Med.* **9**, 47–58 (2016).
 84. Du Bois, D., Du Bois, E. F. Clinical calorimetry: Tenth paper a formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch. Intern. Med.* **XVII**, 863–871 (1916).
 85. 蔵澄美仁. 人体の体表面積算出式の適合性の評価. *Jpn.J.Biometeor* **39**, 101–106

(2003).

86. 日本腎臓病薬物療法学会編 集 日本腎臓学会 日本癌治療学会 日本臨床腫瘍学会. 2016-がん薬物療法時の腎障害診療ガイドライン. (2016).
87. Shimizu, Y., Sato, S., Koyamatsu, J. *et al.* Height indicates hematopoietic capacity in elderly Japanese men. *Aging (Albany. NY)*. **8**, 2407–2413 (2016).