

抗てんかん薬による副作用の発現に関する要因の解析

家入, 一郎

<https://doi.org/10.11501/3135153>

出版情報 : 九州大学, 1997, 博士 (薬学), 論文博士
バージョン :
権利関係 :

総括

本論文では、TDMを実施しているにも関わらず認める副作用の諸背景を明らかにするために、てんかん患者を対象として、薬剤疫学的検討を行った（第I章）。その結果、多くの要因を明らかにすることができた。対象とした副作用には、急性に発現するもの、慢性的に徐々に発現するものを併せて取り扱った。その中で、フェニトインを長期服用することで生じることが知られている歯肉増殖に注目して、投与した薬物の関与について検討を加えた（第II章）。その結果、薬物療法を行う場合、あまりその存在を意識することのない代謝物、しかも、光学異性体代謝物(R-p-HPPH)の関与が示唆された。さらに、その光学異性体代謝物の生成は遺伝的代謝多型(CYP2C19)と深く関連があることが明らかとなり、遺伝子診断を応用することで、歯肉増殖を発現しやすい患者を推定する可能性について言及した（第III章）。副作用、薬剤疫学、光学異性体、遺伝的代謝多型といったキーワードは、ここ10年、薬学あるいは臨床薬理学の分野で注目される新しい研究分野を指す。適切な薬物療法を行うに必要と考えられる情報作りにあたって、これら考慮すべき項目を大きく包括できた点でも、本論文の臨床的意義は大きいと考える。

本研究では多くのことが明らかとなったが、残る2、3の問題点について論じてみたい。

1) 薬剤疫学的検討を行うことで、副作用を発現しやすい要因（例えば、処方薬物数、併用薬の種類、薬物の投与量）を明らかにすることが可能である。本研究では、今までデータソースとして利用されることのなかった血中濃度という情報を取り扱うことで、得られた結果をTDM担当者が使いやすくすることに心がけた。さらに、代謝物の濃度をも取り扱うことで、代謝の関与を考えることが可能となり、その後の研究の展開のきっかけともなった。従来より、副作用の発現には併用薬の関与が指摘されていた。しかし、具体的な副作用防止の手段には、多くの場合触れられていない。本研究では、併用した場合の目標とする血中濃度を、日常参考にする有効濃度より低く設定することの必要性などを具体的

な数字を挙げ指摘した。現在までに報告されている多くの薬剤疫学的検討を見ると、取り扱われるデータの構成要素は画一的であり、工夫に欠ける点があるように思われる。結果を利用する側の目的に合わせたデータを取り込み、検討を加える必要があると考える。

薬剤疫学的検討を実施する際には、もう1つ重要な留意点がある。それは、得られた結果を検証することである。第I章では、薬剤疫学的検討を一種のスクリーニングとして捉えたため、文献的な考察のみに重点を置き、得られた結果を評価した。しかし、患者集団から得られた情報を患者個々の薬物療法に反映させるためには、第I章、第II章で得られた知見を患者個々で再評価していく必要があろう。

2) 第II章、第III章では、CYP2C19の遺伝的代謝多型によりその生成が左右されるフェニトインの光学異性体代謝物である(R)-p-HPPHが歯肉増殖に関与する可能性のあることを示した。遺伝的代謝多型は、現在のトピックスであるが、薬物療法に関わる情報である以上、その臨床的意義を伴わなければならない。本論文でも取り上げたプロトンポンプインヒビターであるオメプラゾールは強力な酸分泌抑制作用を有し、長期投与によりガストリン性の胃癌を発症させることがラットにより認められている¹²³⁾。一方、CYP2C19欠損者では、オメプラゾールの代謝が遅れ、非欠損者に比べ、高いオメプラゾール血中濃度とガストリン濃度が報告されている¹²⁴⁾。ヒトでの影響について薬剤疫学的検討の結果が待たれる。著者が調べた範囲では、CYP2C19の多型の臨床的意義を指摘する研究は、前述の胃癌と本研究の歯肉増殖への関与の2報のみである。CYP2C19多型の臨床的意義を明らかにする研究が少ない理由として、第III章でも触れたように、CYP2D6とは異なり、酵素欠損者が欧米人では少ないこと、メフェニトインの国内使用が困難なこと、CYP2C19の基質薬物があまり分かっていないことなどが挙げられる。

第III章で用いた遺伝子診断法は本研究や著者らの報告¹⁰⁶⁾に示したように、信頼しうるものである。今後、ヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 実験やTDMなどに積極的に応用することにより、まだ不明な副作用発現の背景要因を明らかにすることに役立つものと確信する。

実験の部

副作用一覧 [第 I 章、第 II 章]

調査した副作用の一覧を以下に示す。

Central Nervous System Disorders	中枢神経症状
Somnolence	眠気
Mental function impairment	知的機能低下
Slowness of mentation	集中困難
Headache	頭痛
Vertigo	めまい
Diplopia and other ocular disorders	複視・その他の視覚症状
Tremor	振戦
Ataxia	運動失調
Skin and Connective Tissue Disorders	皮膚・結合組織症状
Gingival hyperplasia	歯肉増殖
Rash	発疹
Hypertrichosis	多毛
Digestive Tract Disorders	消化器症状
Dry mouth	口渇
Constipation	便秘
Anorexia	食欲不振
Nausea or vomiting	悪心・嘔吐
Miscellaneous Disorders	その他の症状
General fatigue	全身倦怠
Dysmenorrhea	生理（月経）不順
Weakness	脱力

副作用調査実施時の留意点 [第 I 章、第 II 章]

副作用調査は総て患者の定期的な受診日に行った。従って、調査のための来院依頼

や採血時間の統一化はいっさい行っていない。また、対象患者の選択に当たっては、薬物療法が調査実施1ヶ月前にさかのぼり変更されていない患者のみを対象とすることを原則とした。本検討での副作用調査や採血は日常の診療の範囲内で行ったが、実施に当たっては患者に本検討の目的、意義を良く説明した上、合意が得られた場合にのみ行った。

副作用調査方法 [第 I 章、第 II 章]

第 I 章での副作用調査は、患者の日常生活で問題となる19項目の副作用を、第 II 章では歯肉増殖が発現した患者と副作用が発現しなかった患者を対象とし、以下に述べる順序で行った。

1. 診察の待時間を利用し、副作用の種類やその発現の有無を記載した質問用紙に患者自身あるいはその家族より解答を得る。質問内容は簡単に理解しやすい表現で記載することに心がけた。待時間を利用したこの調査は、患者自身（家族）による副作用の主観的評価ならびに次に示す医師による客観的評価の基礎材料とした。
2. 次に、患者の解答を基に診察時に主治医が副作用の有無の確認を行い、患者の報告した副作用の客観的評価を行った。患者と医師の評価が一致した項目を副作用としてカウントした。さらにここで確認された副作用をその程度に応じ0からⅢまでの4段階に層別し記録した。層別の基準について、0は副作用が認められない場合、Ⅰは患者の主観的評価のみで日常生活に支障が生じない程度の副作用、Ⅱは患者の主観的評価はあるものの各種検査¹²⁵⁾(神経学的検査など)で明らかな症状が認められない場合、Ⅲは主観的評価に加え、明らかな症状が認められ、薬物の減量や中止を検討あるいは実施を必要とする場合と定義した。

てんかん分類 [第 I 章]

てんかんの診断は、国際てんかん分類に従い、主治医が行った。以下、取り扱ったてんかん分類を示す。

英語表記	日本語訳	一般的略語
simple partial seizures	単純部分発作	SPS

complex partial seizures	複雑部分発作	CPS
generalized seizures	全汎発作	GS
secondarily generalized seizures	二次性全汎化発作	secondarily GS
myoclonic seizures	ミオクロニー発作	
generalized tonic clonic seizures	全汎強直間代発作	GTCS

薬物血中濃度関連 [第I章、第II章、第III章]

A. 総濃度 (Total concentration, TL)

phenobarbital、phenytoin、carbamazepine、valproic acid、primidonの血中濃度測定はTDx (Abbott) により行った。この測定システムは蛍光偏光免疫測定法 (Fluorescence Polarization Immunoassay, FPIA) と呼ばれている。

B. 遊離形濃度 (Free concentration, FL)

本論文で言う血中濃度とは血清中に含まれる薬物量を指す。抗てんかん薬の多くは血清中の蛋白と結合している。普通、ルーチンの測定は蛋白と結合している分画としていない分画の合計であり、総濃度と呼ばれる。一方、結合していない薬物の濃度を遊離形濃度と言い、薬理的活性を示すのは、この遊離形薬物とされる。薬物が結合する蛋白は薬物の化学的性質により異なり、アルブミンと α 1-acid-glycoproteinの2種類の蛋白がある。前者はphenytoinやvalproic acidが、後者はcarbamazepineと主に結合する。これら薬物の結合率は薬物ごとにほぼ一定の値をとる。従って、遊離形濃度の測定はルーチンでは行わず、血清蛋白濃度が低い患者や蛋白濃度の変化が予想される場合に測定の意義が生じる。臨床的には蛋白結合率が高いこれら3薬物の遊離形濃度の測定が重要となる。これに対し、phenobarbitalは蛋白結合率が低く、測定は重要ではない。このことから、本検討においても、phenobarbitalの遊離形濃度の測定は行っていない。遊離形濃度の測定には、総濃度と同様にTDxを使用した。また、遊離形薬物は限外濾過(MPS-3, Amicon)により得た。採血後、得られた血清1mlを3500rpm, 10min, 室温の条件で濾過を行い、濾液を測定試料とした。

C. 遊離形分画 (Free fraction, FF)

蛋白結合率は血清中の総濃度に対する遊離形濃度の占める割合 (FL/TL) で表現し、一般にこの比を遊離形分画と呼ぶ。

D. 血清中 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH) ラセミ体濃度

血清中 p-HPPH濃度の測定はSawchukとCartierらの報告した方法¹²⁶⁾を変更して行った。HPLCの装置および条件を以下に示す。

装置：島津LC-3A
 カラム：TSK gel ODS-80TM(4.6mmI.D.×15cm, 5 μ g, Tosoh)
 検出器：UV (島津SPD-2A)
 検出波長：254nm 注入量：20 μ l
 流速：1.2ml/min カラム温度：室温
 移動相 (M.P)：50mM phosphate buffer(pH6.8)-Acetonitrile(67:33)

抽出操作を示す。

```

Serum 200  $\mu$ l
  ↓ + I.S. (Methyl phenytoin)
  ↓ + 0.2M CH3COOH buffer
adjust pH 5.0
  ↓ +  $\beta$ -glucuronidase 500 unit (0.1ml)
incubation at 37°C for 5hr
  ↓ + phosphate buffer (pH 7.5) 1ml
  ↓ + anhydrous ether 2ml
vortex mix for 1min
  ↓
centrifuge at 2600rpm for 10min
  ↓
ether phase
  ↓ + phosphate buffer (pH 11.2) 0.5ml
vortex mix for 1min
  ↓
centrifuge at 2600rpm for 10min
  ↓
water phase
  ↓ + phosphate buffer (pH 6.8) 0.5ml
  ↓ + anhydrous ether 2ml
(to be continued)
  
```

```

(continued)
  ↓
vortex mix for 1min
  ↓
centrifuge at 2600rpm
  ↓ for 10min
ether phase
  ↓
evaporate
  ↓
residue
  ↓ + M.P 80  $\mu$ l
HPLC 20  $\mu$ l
  
```

E. 血清中 carbamazepine-10,11-epoxide (CBZE) 濃度

血清中CBZEの測定はChelbergらの報告した方法¹²⁷⁾を一部変更して行った。

HPLCの装置および条件を以下に示す。

装置：島津LC-3A

カラム：TSK gel ODS-80TM (4.6mm I.D. × 15cm, 5 μg, Tosoh)

検出器：UV (島津SPD-2A)

検出波長：212nm

流速：0.8ml/min

注入量：15 μl

移動相(M.P)：Acetonitrile/H₂O(38:62)

温度：室温

抽出方法を示す。

Serum 50 μl

↓ + I.S. (Methyl carbamazepine)

↓ + 1N NaOH 50 μl

↓ + tert-butylmethylether 1ml

vortex mix for 2min

↓
centrifuge at 3000g for 10min

↓
ether phase

↓
evapolate

↓
residure

↓ + M.P 50 μl

HPLC 15 μl

F. 血清および尿中(R),(S)-p-HPPH光学異性体血中濃度

HPLC条件および抽出操作は江藤らの方法^{128,129)}に準じて行った。

HPLC条件を以下に示す。

システムコントローラー：島津 SCL-10A

ポンプ：島津 LC-10AS (2台)

検出器：UV (島津 SPD-10A) (2台)

データモジュール：島津 C-R4A

カラム：LichroCARTHPLC-CartridgeSupersher RP-18e (E.Merck)

カラムサイズ：50 and 25 mm × 4 mm I.D., 4 μm

流速：0.8 ml/min

検出波長：210 nm

温度：室温

カラムスイッチ時間：12 min

移動相：pump A - 20 mM KH₂PO₄ containing 16% acetonitrile

pump B - 11.2 mM β-CyD, 20 mM KH₂PO₄ containing 8% methanol

抽出操作を以下に示す。

Sample (serum or urine 500 μl)

↓ + 200unit/600 μl β-glucuronidase (75mM KH₂PO₄-K₂HPO₄, pH6.8)

↓ Incubation for 30 min (serum), 6 hr (urine) at 37°C

↓ + 5 μl I.S. solution (allobarbital)

↓ 1 ml

↓ Extrelute column (Merk)

↓ standing for 10 min

↓ Elution (3ml of tert-butylmethylether)

↓ Evaporate

↓ Residure

↓ +100 μl of 50% MeOH

HPLC 20 μl

本測定方法では、数種類の抗てんかん薬および代謝物を一斉に分析することが可能である。長さ25mm (カラムA) と50mm (カラムB) のODS系カラム2本を高圧流路切換バルブ (FCV-2AH, Shimadzu) で連結したカラムスイッチングシステムを構築した。システムの概要を Fig.A-1 に示す。最初バルブによりカラムAとカラムBが連結しており (バルブ中の実線で記載)、Phenobarbital、Zonisamide、さらに(rac)-p-HPPH、(rac)-mephobarbitalがカラムAより完全に溶出した時間 (12分) にバルブを切り換える (バルブ中の点線で記載)。これにより、カラムAは移動相Aで置換され、カラムA内に留まっていたphenytoinやcarbamazepineが溶出され、検出器Aで検出される。一方、カラムBにはβ-CyDが添加された移動相Bが引続き流入するため、(rac)-p-HPPHおよび(rac)-mephobarbitalの完全な光学分割が可能となり、検出器BによりPhenobarbital、Allobarbital (I.S.)、Zonisamideとともに検出される。定量は、クロマトグラムの内標物質とのピーク高さ比より算出し行った。測定はすべて三重測定で行った。

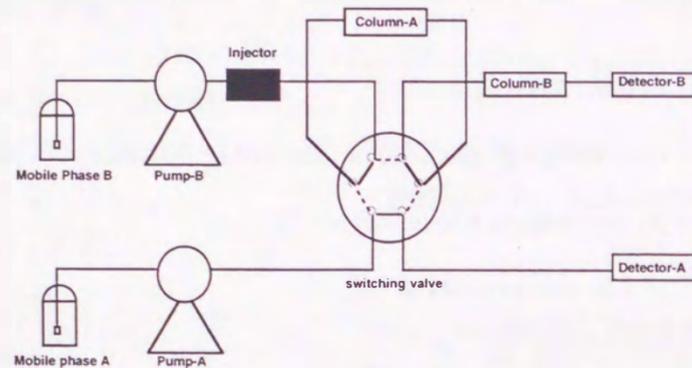


Fig. A-1 HPLC conditions of Column Switching System

Drug free serumに標準溶液を加え抽出した場合と患者血清から抽出した際のクロマトグラムより、患者血清および服用薬物による妨害ピークは認められず、良好な分離が可能であった。さらに、Drug free serumに標準溶液を添加し、phenytoinが $0.6 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 、(R)、(S)-p-HPPHがそれぞれ $0.24 \sim 4.0 \mu\text{g/ml}$ となるように調製した。これらを抽出後、HPLCで測定し、内標物質とのピーク高さ比から検量線を作成した。両代謝物とも設定濃度域で良好な直線性が得られた。

(S)-p-HPPHが $0.24 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.2 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.4 \mu\text{g/ml}$ 、(R)-p-HPPHが $0.06 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.12 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.24 \mu\text{g/ml}$ の標準溶液を用いて回収率を検討した ($n=5$)。p-HPPHの回収率は、両代謝物ともにコントロールと比較して90%以上であった。

(S)-p-HPPHが $0.24 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.2 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.4 \mu\text{g/ml}$ 、(R)-p-HPPHが $0.06 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.12 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.24 \mu\text{g/ml}$ の標準溶液を用いて再現性を検討した ($n=5$)。同時再現性、日差再現性とも両代謝物の各濃度における変動係数は6%以下であった。

分析には以下に示す試薬を用いた。

Phenytoin (PHT)	大日本製薬株式会社提供
D,L-5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (p-HPPH)	Aldrich Chemical
Allobarbitol	東京化成工業株式会社
β -cyclodextrin (β -CyD)	東京化成工業株式会社
Tert-butylmethylether	東京化成工業株式会社
Acetonitrile (HPLC用)	和光純薬工業株式会社
Methanol (HPLC用)	和光純薬工業株式会社
KH_2PO_4 (特級)	和光純薬工業株式会社
K_2HPO_4 (特級)	和光純薬工業株式会社
β -glucuronidase (特級)	Sigma Chemical
Drug free serum (Lypocheck)	Bio-Rad Laboratories

測定に使用した水はすべて蒸留水をMilli-Q Water Purification System (Millipore社製)により製造した超純水を使用した。

薬物標準溶液はメタノールを溶媒とし、Phenytoinが $100 \mu\text{g/ml}$ 、(rac)-p-HPPHが $80 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるように調製した。これを遮光し、冷所保存した。

内標準溶液はAllobarbitolをメタノールに溶解し、 $300 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製した。これを遮光し、冷所保存した。

本定量法における検出限界は(R)-p-HPPH、(S)-p-HPPHともに 10ng/ml であった。

細胞実験関連 [第II章]

A.p-HPPH光学異性体標準品の分離・精製

以下に示す条件で(rac)-p-HPPHを各異性体に分割し精製した。

HPLC条件

ポンプ：島津 LC-3A

検出器：UV (島津 SPD-2A)

カラム：Chiralcel OJ (250 mm \times 4.6 mm I.D, 10 μm , Daicel)

温度：室温

移動相：water-ethanol (30:70 v/v%)

流速：0.5 ml/min

検出波長：228 nm

absorbance：1.28

標品をメタノールに溶解後、(R)-p-HPPHおよび(S)-p-HPPHを含む各フラクションを溶媒ごと分取した。分取した溶媒は減圧条件下でエバポレーターを用い除去し、エタノールを加え溶解させ遮光し、冷所保存した。なお、それぞれのp-HPPH光学異性体はHPLCにより測定を行い、単独ピークであることを確認した。さらに、Poupaertら¹³⁰⁾とButler¹³¹⁾らの報告に従って、旋光度等による確認も実施した。

B. ヒト皮膚繊維芽組織細胞増殖

1) 細胞培養

細胞培養には以下に示す培養キットを使用した。

FibloPack (倉敷紡績株式会社)

正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF) 2次培養細胞 約 4×10^5 個

無血清繊維芽細胞増殖培地 (F-GM)

- ・ 改変MCDB202 (DBM)
- ・ 組み換えヒト型繊維芽細胞増殖因子 (hFGF-B) (1ng/ml)
- ・ インスリン (5 μ g/ml)
- ・ Sodium bicarbonate (14mM)
- ・ 抗菌剤 (ゲンタマイシン 50 μ g/ml、アムホテリシン B 0.25 μ g/ml)

トリプシン(0.025W/V%)/EDTA(0.01W/V%)溶液

HEPES緩衝生理食塩液

トリプシン中和液

細胞入荷後、まず顕微鏡で細胞の状態を観察し、双極の繊維芽細胞の形態をした細胞が単層でサブコンフルエントな状態であるかを確認し、70%アルコール(エタノールまたはイソプロパノール)でフラスコの外側を消毒した後、フラスコを密栓したまま、37°C、5% CO₂加湿状態で温度が平衡になるまでインキュベートした(細胞のダメージによりインキュベート時間は5~24時間とした)。インキュベート後、無菌下で注意深くNHDFの入ったフラスコを開け、パスツールピペットを用い、古い培地を取り除き、新鮮なF-GM 5mlを加えた。微生物による汚染を防ぐ目的で、フラスコの首の部分やキャップに付着した培地は総て取り除いた。フラスコのキャップをゆるめ、37°C、5% CO₂加湿状態で24~48時間

インキュベートした後に継代培養を行った。

2) 継代培養 (NHDF分割)

NHDFを顕微鏡で観察し、細胞が多数の有糸分裂を含むサブコンフルエントな状態であることを確認した後、フラスコからmedium(F-GM)を吸引除去した。HEPES緩衝液5mlで細胞層を洗浄し、トリプシン/EDTA溶液2mlで細胞層を覆い、少量を残し、吸引除去後、軽くフラスコをたたき細胞をはがした。細胞がはがれた後、フラスコにトリプシン中和液5mlを加え、遠心チューブに移した。さらに、5mlのトリプシン中和液またはHEPES緩衝液でフラスコをリンスし、細胞を回収した。

220×gで5分間遠心した後、上清を捨て、F-GM5mlを加え再浮遊させた。浮遊液 100 μ lにトリパンプルを加え、よく攪拌し、血球計算盤を用い、細胞数を計測した。

約5000個/cm²の細胞密度で、新しいフラスコに接種し、24時間インキュベートした。24時間後、培地を交換し、顕微鏡で観察し、細胞が少なくとも80%付着していることを確認した。F-GMの交換は2日毎に行った。培養はコンフルエントな状態になるまで繰り返し、平均で12日間を必要とした。

3) 薬物の添加

コンフルエントな状態を顕微鏡で確認後、フラスコからはがした細胞を計測した後、F-GMを適量加え、各遠心チューブに均等に分注し、220×gで遠心分離を行った後、上清を捨て、薬物の入ったF-GMまたはF-GMのみをそれぞれ1.2mlずつ各遠心チューブに加え、ピペットにより細胞と混和した後、各wellに200 μ lずつ分注した。各薬物は予めアンプルに封入し、110°C、40分間高圧蒸気滅菌を行ったものを用い、最終濃度として、(R)、(S)、(rac)-p-HPPHが2、20 μ g/ml、PHTが2、20 μ g/mlとなるように調製した。コントロール群は培地 (medium, F-GM)のみとし、 5×10^4 cell/7mm well (96 multi-well plate, Falcon)の細胞密度で、37°C、5%CO₂条件下にて培養を行った。[3H]-thymidine取り込み実験には薬物添加後8日目の細胞を、細胞数の計数には添加後12日目の細胞を用いた。

4) 細胞数計数

トリプシン/EDTA溶液を50 μ l/well加え、よく攪拌した後、トリパンプルー250 μ lを加え、さらに攪拌後、血球計算盤を用い細胞数を計測した。

5) サイミジン取り込み測定

[3H]-thymidineを先に述べた方法で作成したplateに加える(1 μ Ci/well, 1 μ Ci/ml)。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下で24時間培養した後、トリプシン/EDTA溶液を50 μ l/wellを加え、 β -sheetに移す。一晚乾燥させた後、 β -sheetを専用の袋に入れ、シンチレーションカクテルを加えシールする。これをBetaplateTM1205 (シンチレーションカウンター)を用いて解析した。

臨床試験 [第三章]

1) 対象および選択基準

次の条件を満たす日本人の健常な成人男女を対象とした。

- a) 「医薬品の臨床試験の実施に関する基準」に準拠して、下記の事項について文書および口頭にて説明を受けた後、自由意志による同意が得られ、同意書に署名、押印した者。
 - ①試験の目的、方法
 - ②予期される作用および副作用等
 - ③試験への参加に同意しない場合であっても不利益を受けないこと
 - ④試験への参加に同意した場合でも随時これを撤回できること、また同意を撤回しても不利益を受けないこと
 - ⑤被検者として遵守すべき事項
 - ⑥その他被検者の人権の保護に関し必要な事項
- b) 試験実施機関である、医療法人相生会臨床薬理センターの事務局に登録されているボランティア会会員である者
- c) 健康診断(問診、医師の診察、生理学的検査、血液生化学的検査、血清学的検査、尿検査)を試験前1ヶ月以内に実施し、担当医師が被検者として適切であると判断した者
- d) 主な選択基準
 - ①年齢20-45歳

②体重40-80 kg

③肥満度(Broca係数): \pm 20%

e) 次の項目に該当するものは除外した。

①薬物過敏症の既往歴のある者。

②試験の実施前2ヶ月以内に治療を受けたもの、あるいは献血をしたもの、または4ヶ月以内に新医薬品の第一相試験に参加した者。

2) 試験の方法

- a) 投与方法: 朝空腹時にフェニトイン 100 mgを水150 mlと共に服用する。投与後、4時間は絶食とし、その間の摂水は制限した。
- b) 採血: 肘静脈より10 mlを真空採血管で採血する。全血はDNAの抽出を行うまで4 $^{\circ}$ Cで保存した。
- c) 蓄尿: 投与前、投与後-4時間、4-8時間、8-12時間、12-24時間、24-36時間の各時間帯での蓄尿を行った。尿量計測後、20mlを取り、-20 $^{\circ}$ Cで測定まで保存した。
- d) 臨床観察、諸検査: 身長、体重を入院時に、体温、血圧、脈拍、医師の診察、血液生化学的検査、尿検査を投与前と投与後24、48時間目に実施した。また、入院期間中は、自覚症状、他覚所見および看護に関する記録を行った。

3) 被検者の制限事項

- a) 試験の実施1週間前より担当医師の認めた薬剤以外の服用を、2日前より酒類の摂取を試験終了時まで、いずれも禁止した。
- b) 試験前日の夕食時より退院時まで飲食、喫煙等について規制した。

4) 被検者の安全確保

試験の実施中、被検者の安全に対し十分な監視体制をとり、自覚症状とあわせて試験進行の是非を確認した。副作用が発現した被検者には適切な処置を行い、試験担当医師が必要と判断した場合、その時点で試験を中止することとした。

遺伝子診断関連 [第三章]

EDTA-2Na入りの採血管に10 mlの全血を採取し、リンパ球よりDNAを抽出キット(Genomix, Talent, Italy)を用い抽出した。*CYP2C19* geneの野生型(wt)と2種類の点突然変異は、de Moraisらの報告した方法^{7,8)}に一部変更を加え行った。

exon 5の変異(*CYP2C19m1*)の検出は、鋳型DNA (200 ng)に10×PCR buffer (10 mM Tris, HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.01% gelatin)、200 μMのdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、0.2 μMのプライマー、1.25 unitのAmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer)、1.5 mM MgCl₂を加え、全量を50 μlとし、以下に示す条件で増幅を行った。

initial denaturation step at 94°C for 5 min

denaturation at 94°C for 1 min

annealing at 57°C for 1 min

extension at 72°C for 2 min

以上 40cycles

final extension step at 72°C for 5 min

制限酵素処理は、PCR産物に*Sma*Iを16 unit加え、37°C、3時間インキュベーションすることで行った。

exon 4の変異(*CYP2C19m2*)の検出は、鋳型DNA (200 ng)に10×PCR buffer (67 mM Tris, HCl, pH 8.8, 17 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM β-mercaptoethanol, 7 μM EDTA, 0.2 mg/ml bovine serum albumin)、200 μMのdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、0.25 μMのプライマー、2.5 unitのAmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer)、5 mM MgCl₂を加え、全量を50 μlとし、以下に示す条件で増幅を行った。

initial denaturation step at 94°C for 1 min

denaturation at 94°C for 1 min

annealing at 55°C for 1 min

extension at 72°C for 1 min

以上 30cycles

final extension step at 72°C for 14 min

制限酵素処理は、PCR産物に*Bam*HIを24 unit加え、37°C、3時間インキュベーションすることで行った。

制限処理後は、3%アガロース電気泳動に展開した。典型的な泳動パターンをFig.A-2に示す。

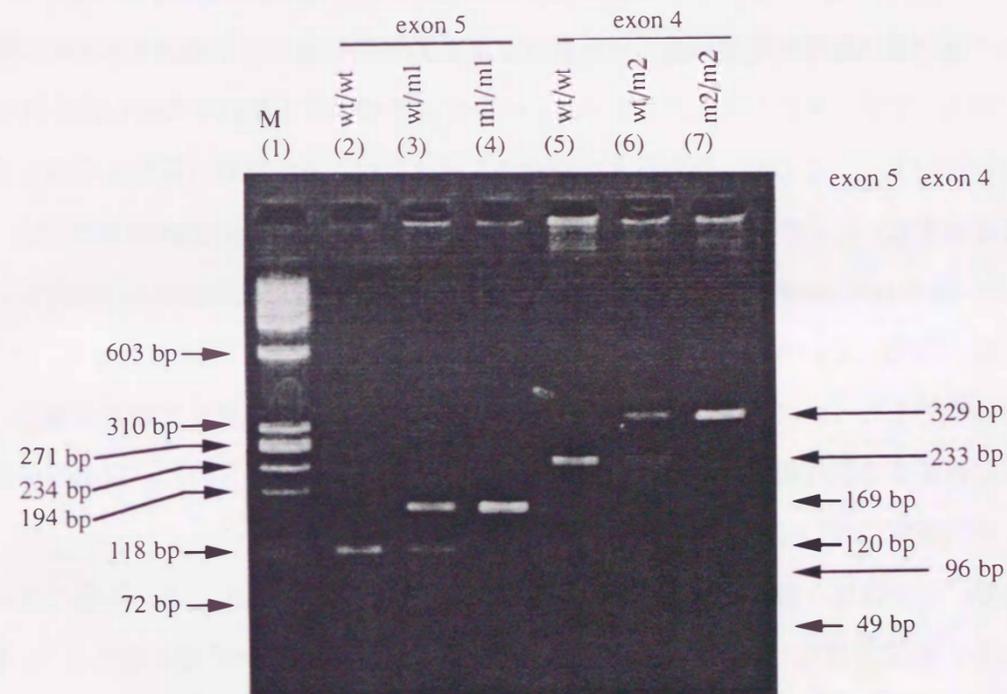


Fig. A-2 Analysis of DNA in various genotype patterns for *CYP2C19* gene. Lanes 2, 3, and 4 represent the results of PCR amplification and digestion with *Sma*I to detect *CYP2C19m1*, and lanes 5, 6, and 7 represent PCR amplification and digestion with *Bam*HI to detect *CYP2C19m2*. Arrows to the left of the panel indicate the size of the molecular weight markers shown in lane M.

統計処理

[第I章]

副作用発現群と非発現群間の薬物の投与量および血中濃度比較には一元配置分散分析 (one way analysis of variance, ANOVA)を使用し、多範囲検定にはLSD法 (least-significant-difference method)を用いた。

各種副作用発現に關与する要因を明らかにする目的で、判別関数分析 (stepwise discriminant function analysis, DFA)を行った。Table 4 に示した要因について検討を加えた。実際の分析では、ある要因を加えた場合の χ^2 値を参考とし、副作用の認められない患者群とある種の副作用が発現した患者群が有意に判別されるか (χ^2 値の改善) を評価する。

薬物の組合せの副作用発現頻度への影響は χ^2 検定により評価した。組合せはPB、PHT、CBZ、VPA、アセタゾラミド、プリミドン、ベンゾジアゼピン系薬物の中から得られる2種類の併用パターンとした。対象患者の詳細でも述べたが、それぞれの薬物を単独に服用する患者が少ないことから、次に述べる処理を行った。1) 例えば、phenytoin 服用群と phenytoin+carbamazepine服用群の発現頻度を比較する場合、前者にはcarbamazepine以外の薬物も同時に服用している患者を、また、後者には2種類以外の薬物の服用も行っている患者を含め検討を行った。2) 副作用が認められない患者と発現した患者を比較する場合、後者には評価する副作用に加え、他の副作用も同時に認める患者も含めた。以上の点を考慮し、発現頻度について2×2分画表を作成し評価を加えた。

投与量、血中濃度、併用薬剤数についての副作用発現境界値の算出にも、同様に発現頻度による χ^2 検定を使用した。また、発現頻度の低い副作用ではYatesの補正を行った。実際の操作では、例えば、投与量の発現境界値を算出する場合、投与量をその最小値から最大値まで小刻みに動かし、各境界値で区切られる頻度により検定を行い、有意でかつ最も小さい値を発現境界値とした。

最後に、得られた境界値以下の値を示すにも拘らず副作用が発現した患者の背景 (患者リスクファクターとした) を検討した。発現境界値以下で、副作用発現群と非発現群間の投与量や血中濃度、臨床検査値などをt検定により比較し、有意に異なる項目をリスクファクターとした。また、平均値の比較を行う際、両群の分散の程度が等しい場合にはStudent' t-testを、異なる場合にはWelch's t-testを行った。

[第 II 章]

多群間の平均値の比較で、3群以上の比較には一元配置分散分析 (one way analysis of variance, ANOVA)を使用し、多範囲検定には、LSD法 (least-significant-difference method)を

用いた。また、2群間の比較には、Wilcoxon testを使用した。

[第 III 章]

2群間の平均値の比較には、Wilcoxon testを使用した。また、2変数の相関はSpearmanの順位相関係数により評価を加えた。本評価法は、通常の単純相関に比べ、両変数の独立性に優れていると言われる。

引用文献

- 1) D.G.Grahame-Smith and J.K.Aronson: The oxford of clinical pharmacology and drug therapy, Oxford Univ Press, Oxford, 1984.
- 2) D.H.Lawson: Pharmacoepidemiology: a new discipline, *Br.Med.J.*, **289**:940 (1984).
- 3) 清水直容: 薬剤疫学、内科-薬の副作用-, vol.64:628 (1989).
- 4) M.J.Eadie: Formation of active metabolites of antiepileptic drugs: a review of their pharmacokinetics and therapeutic significance, *Clin.Pharmacokinet.*, **21**:27 (1991).
- 5) A.K.Scott: Stereoisomers and drug toxicity, *Drug Safety*, **8**:149 (1993).
- 6) I.A.Choonara, S.Cholerton, B.P.Haynes, A.M.Breckenridge and B.K.Park: Stereoselective interaction between the R-enantiomer of warfarin and cimetidine, *Br.J.Clin.Pharmacol.*, **21**:271 (1986).
- 7) S.M.F.de Morais, G.R.Wilkinson, J.Blaisdell, K.Nakamura, U.A.Meyer and J.A.Goldstein: The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in human, *J.Biol.Chem.*, **269**:15419 (1994).
- 8) S.M.F.de Morais, G.R.Wilkinson, J.Blaisdell, K.Nakamura and J.A.Goldstein: Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese, *Molecular Pharmacol.*, **46**:594 (1994).
- 9) M.J.Brodie and J.Feely: Practical clinical pharmacology. Therapeutic drug monitoring and clinical trial, *Br.Med.J.*, **296**:1110 (1988).
- 10) M.S.Porta and A.G.Hartzema: The contribution of epidemiology to the study of drugs, *Drug Intell.Clin.Pharm.*, **21**:741 (1987).
- 11) Anonymous: Adverse reactions to antiepileptic drugs: a multicenter study of clinical practice. Collaborative Group for Epidemiology of Epilepsy, *Epilepsia*, **27**:323 (1986).
- 12) R.H.Mattson, J.H.Cramer, J.F.Collins, D.B.Smith, A.V.Delgado-Escueta, T.R.Browne, P.D.Williamson, D.M.Treiman, J.O.McNamara, C.B.McCutchen, R.W.Homan, W.E.Crill, M.F.Lubozynski, N.P.Rosenthal and A.Mayersdorf: Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures, *N.Engl.J.Med.*, **313**:145 (1985).
- 13) J.G.Millichap and F.Aymat: Treatment and prognosis of petit mal epilepsy, *Pediatric Clinics of North America*, **204**:192 (1968).
- 14) R.A.Buchanan and J.A.Allen: Diphenylhydantoin (Dilantin) and phenobarbital blood levels in epileptic children, *Neurology*, **21**:866 (1970).
- 15) J.L.Herranz, J.A.Armijo and R.Arteaga: Clinical side effects of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, and valproate during monotherapy in children, *Epilepsia*, **29**:794 (1988).
- 16) A.Troupin, L.M.Ojeman and L.Halpern: Carbamazepine -a double-blind comparison with phenytoin, *Neurology*, **27**:511 (1977).
- 17) W.Froscher, M.Eichelbaum and G.Hildebrand: Prospective studies on epilepsy therapy with carbamazepine, *Fortschr.Neurol.Psychiatr.*, **50**:396 (1982).
- 18) N.Simonsen, P.Z.Olsen and V.Kuhl: A comparative controlled study between carbamazepine and diphenylhydantoin in psychomotor epilepsy, *Epilepsia*, **17**:169 (1976).
- 19) A.Covanis, A.K.Gupta and P.M.Jeavons: Sodium valproate: monotherapy and polytherapy, *Epilepsia*, **23**:693 (1982).
- 20) W.Froscher, H.U.Schulz and R.Gugler: Antiepileptic therapy with valproinic acid. Correlations of side effects and serum levels of valproinic acid, *Fortschr.Med.*, **97**:1464 (1979).
- 21) P.M.Jeavons and J.E.Clark: Sodium valproate in treatment of epilepsy, *Br.Med.J.*, **2**:584

- (1974).
- 22) T.H.Jones: Sodium valproate-induced menstrual disturbances in young women, *Hormone Res.*, 35:82 (1991).
 - 23) J.J.Cereghino,J.T.Brock,J.C.Van Meter,J.K.Penry,L.D.Smith and B.G.White: The efficacy of carbamazepine combinations in epilepsy, *Clin.Pharmacol.Ther.* , 18:733 (1975).
 - 24) I.Ieiri,S.Higuchi,Y.Nakao,E.Yukawa,K.Ohtsubo,M.Yoshikawa and T.Aoyama: Therapeutic drug monitoring services at kyushu university hospital in Japan, *Drug Intell.Clin.Pharm.* , 24:629 (1990).
 - 25) P.J.M.Guelen,E.Van Der Kleijen and U.Woudstra,"Clinical Pharmacology of Anti-epileptic Drugs" ed. by H.Schneider,D.Janz,C.Gardner-Thorpe.H.M einardi and A.L.Sherwin, Springer-Verlag, Berlin, pp2-10 (1975).
 - 26) E.H.Reynold and S.D.Shorvon:Monotherapy or polytherapy for epilepsy ?, *Epilepsia*, 22:1 (1981).
 - 27) D.M.Turnbull,M.D.Rawlins,D.Weigtman and D.W.Chadwick: Plasma concentrations of sodium valproate: thier clinical value, *Br.Med.J.* , 290:815 (1983).
 - 28) P.J.Thompson and M.R.Trimble: Anticonvulsant serum levels: relationship to impairments of cognitive function, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiat* , 46:227 (1983).
 - 29) P.J.Thompson and M.R.Trimble,"International Congress and Symposium Series",Academic Press, London, pp.33-38 (1981).
 - 30) K.W.Sommerbeck,A.Therlgaard,K.E.Rasmussen,V.Lohren,L.Gram and K.Wulff: Valproate sodium: evaluation of so-called psychotropic effect. A controlled study, *Epilepsia*, 18:159 (1977).
 - 31) E.F.Hridberg and M.Dam: Clinical pharmacokinetics of anticonvulsants, *Clin.Pharmacokinet.* , 1:161 (1976).
 - 32) H.G.M.Westenberg,E.van der Kleijen,T.T.Oei and R.A.deZeeuw: Kinetics of carbamazepine and carbamazepine-epoxide, deterimed by use of plasma and saliva, *Clin.Pharmacol.Ther.* , 23:320 (1978).
 - 33) J.F.Schoeman,A.A.Elya,E.M.Brett and P.T.Lascalles: Correlation between plasma carbamazepine-10,11-epoxide concentration and drug side effects in children with epilepsy, *Develop.Med.Child.Neurol.* , 26:756 (1984).
 - 34) J.Bruni: Phenytoin-Toxicity. In :Antiepileptic drugs, 4th edition, edited by R.H.Levy, R.H.Mattson and B.S.Meldrum, pp.345, Raven Press, NY (1995)
 - 35) P.J.Thompson and M.R.Trimble: Anticonvulsant drugs. Cognitive function and behavior, *Epilepsia*, 24 (suppl. 1):S55 (1983).
 - 36) E.H.Reynolds: Serum levels of anticonvulsant drugs. Interpretation and clinical value, *Pharmacol.Ther.* , 8:217 (1980).
 - 37) T.F.Blaschke,P.J.Meffin,K.L.Melmon and M.Rowland: Influence of acute viral hepatitis on phenytoin kinetics and protein bindings, *Clin.Pharmacol.Ther.* , 17:685 (1975).
 - 38) W.D.Hooper,D.K.Du Betz,F.Bochner,L.H.Cotter,G.A.Smith,M.J.Eadie and J.H.Tyrer: Plasma protein binding of carbamazepine, *Clin.Pharmacol.Ther.* , 17:433 (1975).
 - 39) H.Biltz: Uber die Konstitution der Einwirkungsprodukte von substituierten Harnstoffen auf Benzil and uber einige neue Methden zur Darstellung der 5,5Diphenylhydantoin, *Berl.Dtsch. Chem.Ges.* , 41:1379 (1908).
 - 40) H.H.Merritt and T.J.Putnam: A new series of anticonvulsant drugs tested by experiments of animals, *Arch.Neurol.Psychiatr.* , 39:1003 (1938).
 - 41) J.Bruni:Phenytoin. In:A textbook for the clinical applivation of therapeutic drug monitoring, edited by W.J.Taylor, pp253-267, Abbott Laboratories,Texas (1988).
 - 42) W.A.Dill,A.Kazenko,L.M.Wold and A.J.Glazko: Studies of 5,5-diphenylhydantoin (Dilantin) in animals and man, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* , 118:270 (1956).

- 43) A.J.Glazko, T.Chang, J.Baukema, W.A.Dill, J.R.Goulet and R.A.Buchanan: Metabolic disposition of diphenylhydantoin in normal human subjects following intravenous administration, *Clin.Pharmacol.Ther.* , **10**:498 (1969).
- 44) F.Martz, C.III.Failinger and D.Blake: Phenytoin teratogenesis: Correlation between embryopathic effect and covalent binding of putative arene oxide metabolite in gestational tissue, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* , **203**:231 (1977).
- 45) T.C.Butler, K.H.Dudley, D.Johnson and S.B.Robert: Studies of the metabolism of 5,5-diphenylhydantoin relating principally to the stereoselectivity of the hydroxylation reactions in man and the dog, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* , **199**:82 (1976).
- 46) L.Fattore, M.Stablein, G.Bredfeldt, T.Semla, M.Moran and J.M.Doherty-Greenberg: Gingival hyperplasia : a side effect of nifedipine and diltiazem, *Special Care in Dentistry*, **11**: 107 (1991).
- 47) S.Barclay, J.M.Thomason, J.R.Idle and R.A.Seymour: The incidence and severity of nifedipine induced gingival over-growth, *J.Clin.Periodontol.* , **19**:311 (1992).
- 48) 安盛俊雄、陳 来舜、山添 康、加藤隆一: ヒト肝におけるフェニトインの位置および立体選択的水酸化: CYP2C分子種の遺伝的多型との関連性, 薬物動態, **7**, Supplement, 127 (1992).
- 49) S.Fritz, W.Lindner, I.Roots, B.M.Frey and A.Kupfer: Stereochemistry of aromatic phenytoin hydroxylation in various drug hydroxylation phenotypes in human, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* , **241**:615 (1987).
- 50) J.A.Goldstein, M.B.Faletto, M.Romkes-Sparks, T.Sullivan, S.Kitareewan, J.L.Raucy, J.M.Lasker and B.I.Ghanayem: Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in human, *Biochem.*, **33**:1743 (1994).
- 51) Y.Horai, M.Nakano, T.Ishizaki, K.Ishikawa, H-H.Zhou, C-L.Liao and L-M.Zhang: Metoprolol and mephenytoin oxidation polymorphisms in far eastern oriental subjects: Japanese versus mainland Chinese, *Clin.Pharmacol.Ther.* , **46**:198 (1989).
- 52) O.P.Kinball: The treatment of epilepsy with sodium diphenyl hydantoinate, *JAMA*, **112**:1244 (1939).
- 53) L.A.Klar: Gingival hyperplasia during dilantin-therapy; A survey of 312 patients, *J.Public Health Dent.*, **33**:180 (1973).
- 54) R.T.Butler, K.L.Kalkwarf and W.B.Kaldahl: Drug-induced gingival hyperplasia: phenytoin, cyclopolin, and nifedipine, *J.Am.Dent.Assoc.* , **144**:56 (1987).
- 55) D.Lederman, H.Lumerman, S.Reuben and P.D.Freedman: Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy, *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.*, **57**:620 (1984).
- 56) G.P.Wysocki, H.A.Gretzinger, A.Laupasis, R.A.Ulan and C.R.Stiller: Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cycloclin A therapy, *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.*, **55**:274 (1983).
- 57) J.Seager, D.L.Jamison, J.Wilson, A.R.Hayward and J.F.Soothill: IgA deficiency, epilepsy, and phenytoin treatment, *Lancet*, **2**:632 (1975).
- 58) J.A.Aarli and O.Tonder: Effect of antiepileptic drugs on serum and salivary IgA, *Scand.J. Immunol.*, **4**:391 (1975).
- 59) J.A.Aarli: Changes in serum immunoglobulin levels during phenytoin treatment of epilepsy, *Acta.Neurol.Scand.* , **54**:423 (1976).
- 60) B.N.Slavin, G.M.Fenton, M.Laundy and E.H.Reynolds: Serum immunoglobulins in epilepsy., *J.Neurol.Sci.* , **23**:353 (1974).
- 61) R.A.Gaillard : Antihistaminic therapy for gingival hyperplasia due to dilantin, *New England J.Med.*, **256**:76 (1957).
- 62) 魚川 正美 : Phenytoinによる歯肉増殖増殖症の発現機序に関する免疫学的検討. 第2編 Phenytoinによるアレルギー反応の発現—遅延型アレルギーを中心として、岡山医会誌, **94**:843 (1982).

- 63) A.L.Southren,S.C.Rappaport,G.C.Gordon and J.Vittek: Specific 5-alpha-dihydrotestosterone receptors in human gingiva, *J.Clin.Endocrin.Metab.* , **47**:1378 (1978).
- 64) D.D.Bonnycastle and A.F.Bradley: Diphenylhydantoin and the release of adrenocorticotrophic hormon in the albino rat, *Endocrinology* , **66**:355 (1960).
- 65) P.Vexiau,J.Fiet,P.Boudou,J.M.Vilette,G.Feutren,N.Hardy,R.Julie,C.Dreux, J.F.Bach and G.Cathelineau: Increase in plasma 5-alpha-androstane-3-alpha, 17-beta-diol glucuronide as a marker of peripheral androgen action in hirsutism:a side effect induced by cyclosporine A, *J.Steroid.Biochem.* , **35**:133 (1990).
- 66) L.Berta,N.Fortunati,A.Fazzari,G.Gaidano and R.Frairia: Hormonal and clinic evaluation of patients with moderate body hair growth, *Contraception* , **48**:47 (1993).
- 67) T.M.Hassel and C.G.Cooper: Phenytoin-induced gingival overgrowth in a mongrel cat model,Phenytoin-induced Teratology and Gingival Pathology. T.M.Hassel, M.C.Johnston, K.H.Dudley (eds), Raven Press,New York,1980,pp.147-162.
- 68) T.M.Hassel and R.C.Page: The major metabolite of phenytoin (Dilantin) induces ginigival-overgrowth in cats, *J.Peridont.Res.* , **13**:280 (1978).
- 69) T.Modeer,G.Dahllof and P.Otteskog: The effect of the phenytoin metabolite p-HPPH on proliferation of gingival fibroblasts in vitro, *Acta.Odontol.Scand.* , **40**:353 (1982).
- 70) T.M.Hassell: Epilepsy and the oral manifestations of phenytoin therapy. Karger Publishers., Basel,1980,pp154-173.
- 71) W.B.Hall: Dilantin hyperplasia, *J.Perisont.Res.* , **4**:36 (1969).
- 72) S.D.Ciancio: Gingival hyperplasia and diphenylhydantoin:A longitudinal study,*J.Dent.Res.* , **49**:Spec Issue A, 65(Abstr), 1970.
- 73) I.Nuki and S.H.Cooper: The role of inflamation in the pathogenesis of gingival enlargement during the administration of Dph in cats, *J.Peridont.Res.* , **7**:102 (1972).

- 74) J.G.Fitchic,R.W.Comer,P.H.Hanes and G.W.Reeves: The reduction of Phenytoin-induced gingival overgrowth in a severely disabled patient:a case report,*Compendium* , **10**:314(1989).
- 75) M.Kantor and T,Hassell: Increased accumulation of sulfated glycosaminoglycan in culture of human fibroblasts from phenytoin-inducedgingival overgrowth, *J.Dent.Res.* , **62**:383 (1983).
- 76) B.K.Hall and C.A.Squire: Ultrastructural quantitation of connective tissue changes in phenytoin-induced gingival overgrowth in the ferret., *J.Dent.Res.* , **61**:9442 (1982).
- 77) T.Hassell and G.Gilbert: Phenytoin sensitivity of fibroblasts as the basis for susceptibility to gingival enlargement, *Am.J.Pathol.* , **112**:218 (1983).
- 78) O.T.Smith,M.J.Hamilton,M.H.Bires and B.L.Pihlstorm: Salivary and plasma IgA of seizure subjects receiving phenytoin. *Epilepsia* , **20**:17 (1979).
- 79) J.A.Setterstorm, S.A.D'Allssandro, R.F.Godat : Immunoglobulins in peridontal tissues: III Concentrations of immunoglobulins in dilantin induced and idiopathic gingival hyperplastic tissues, *J.Peridontol.* , **51**:25 (1980).
- 80) R.S.Brown,W.T.Beaver and W.K.Bottomley: On the mechanism of drug-induced gingival hyperplsia, *J.Oral.Pathol.Med.* , **20**:201 (1991).
- 81) E.J.Bardana,J.D.Gabourel,G.H.Davis and S.Graig: Effects of phenytoin on man's immunity. Evaluation of changes in serum immunoglobulins,complement,and antinuclear antibody, *Am.J.Med.* , **74**:289 (1983).
- 82) P.J.Grob and G.E.Herold: Immunological abnolmalities and hydantoins,*Br.Med.J.* , **2**:561 (1972).
- 83) T.Hassell and E.Stanek III : Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations, *Arch.Oral.Biol.* , **28**:617 (1983).
- 84) T.M.Hassell: Dihenylhydantoin(Dilantin) gingival hyperplasia:Drug-induced abnormality of connective tissuc, *Proc.Natl.Sci.USA* , **73**:2902 (1976).

- 85) A.T.Vernillo and N.B.Schwartz: The effect of phenytoin (5,5-diphenylhydantoin) on human gingival fibroblasts in culture, *J.Periodont.Res.* , **22**:307 (1978).
- 86) L.S.Moy,E.M.L.Tan,R.Holmess and J.Uitto: Phenytoin modulates connective tissue metabolism and cell proliferation in human skin fibroblast cultures, *Arch.Dermat.* , **121**:79 (1985).
- 87) K.Benvenisten and M.Bitari: Effect of phenytoin cultured human gingival fibroblasts, Phenytoin-induced Teratology and Gingival Pathology. T.M.Hassell, M.C.Johnston, K.H.Dudley (eds), Raben Press, New York,1980,pp.199-213.
- 88) W.G.Shafer: Responce of radiated human gingival fibroblast-like cells to dilantin sodium in tissue culture, *J.Dent.Res.* , **44**:671 (1965).
- 89) 出口眞二, 大山 晃, 福野光男, 堀 俊雄, 川瀬俊夫, 青木章子, 鈴木 清, 斉藤 滋 : フェニトイン性歯肉増殖症由来細胞の生化学的特性 -非コラーゲン性タンパク 質合成について-, 日歯周誌, **27**:1047 (1988).
- 90) T.Modeer and G.Andersson: Reguration of epidermal growth factor receptor metabolism in gingival fibroblasts by phenytoin in vitro, *J.Oral.Path.Med.* , **19**:188 (1990).
- 91) T.M.Hassell: In vivo and in vitro studies of the pathogenesis of phenytoin induced connective tissue alterations in the gingivae. Thesis,seattle,Washington.University of Washington,1978.
- 92) R.E.Dill and G.R.Farmer: Phenytoin-induced DNA synthesis and inositol 1,4,5-triphosphate formation in L-929 fibroblasts, *Experientia* , **47**:728 (1991).
- 93) T.Andersson, C.G.Regardh, Y.C.Lou, Y Zhang, M.L.Dahl and L.Bertilsson: Polymorphic hydroxylation of S-mephenytoin and omeprazole metabolism in Caucasian and Chinese subjects, *Pharmacogenetics* , **2**: 32 (1992).
- 94) L.Bertilsson and W.Kalow: Why are diazepam metabolism and polymorphic S-mephenytoin hydroxylation associated with each other in white and Korean populations but not in Chinese

- population ? *Clin.Pharmacol.Ther.* , **53**: 608 (1993).
- 95) E.Skjelbo, K.Brosen, J.Hallas and L.F.Gram: The mephenytoin oxidation polymorphism in partially responsible for the N-demethylation of imipramine, *Clin.Pharmacol.Ther.* , **49**: 18 (1991).
- 96) S.A.Ward, T.Walle, U.K.Walle, G.R.Wilkinson and R.A.Branch: Propranolol's metabolism is determined by both mephenytoin and debrisoquine hydroxylase activities, *Clin.Pharmacol.Ther.* , **45**: 72 (1989).
- 97) M.Jurima, T.Inaba, D.Kadar and W.Kalow: Genetic polymorphism of mephenytoin p(4')-hydroxylation: difference between Orientals and Caucasians, *Br.J.Clin.Pharmacol.* , **19**: 483 (1985).
- 98) K.Nakamura, F.Goto, W.A.Ray, C.B.McAllister, E.Jacqz, G.R.Wilkinson and R.A.Branch: Interethnic differences in genic polymorphism between Japanese and Caucasian population, *Clin.Pharmacol.Ther.* , **38**: 402 (1985).
- 99) G.Tybring and L.Bertilsson: A methodological investigation on the estimation of the S-mephenytoin hydroxylation phenotype using the urinary S/R ratio, *Pharmacogenetics* , **2**:241 (1992)
- 100) Y.Zhang, R.A.Blouin, P.McNamara, J.Steinmetz and P.J.Wedlund: Limitation of the use of the urinary S/R-mephenytoin ratio in pharmacogenetic studies, *Br.J.Clin.Pharmacol.* , **31**:350 (1991)
- 101) C.J.Doecke, M.E.Veronese, S.M.Pond, J.O.Miners, D.J.Birkett, L.N.Sansom and M.E.McManus; Relationship between phenytoin and tolbutamide hydroxylations in human liver microsomes, *Br.J.Clin.Pharmacol.* , **31**: 125 (1991).
- 102) M.E.Veronese, C.J.Doecke, P.I.Mackenzie, M.E.McManus, J.O.Miners, D.L.P.Rees, R.Gasser, U.A.Meyer and D.J.Birkett: Site-directed mutation studies of human liver cytochrome P-450 isoenzymes in the CYP2C subfamily, *Biochem.J.* , **289**:533 (1993).
- 103) S.L.Wang, J.D.Huang, M.D.Lai and J.J.Tsai: Detection of CYP2C9 polymorphism based

- on the polymerase chain reaction in Chinese, *Pharmacogenetics*, **5**:37 (1995).
- 104) M.J.Stubbins, L.W.Harries, G.Smith, M.H.Tarbit and C.R.Wolf: Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus, *Pharmacogenetics*, **6**:429 (1996).
- 105) D.R.Sohn, K.Kobayashi, K.Chiba, K.H.Lee, S.G.Shin and T.Ishizaki; Disposition kinetics and metabolism of omeprazole in extensive and poor metabolizers of S-mephenytoin 4'-hydroxylation recruited from an Oriental population, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **262**: 1195 (1992).
- 106) I.Ieiri, T.Kubota, A.Urae, M.Kimura, Y.Wada, K.Mamiya, S.Yoshioka, S.Irie, T.Amamoto, K.Nakamura, S.Nakano and S.Higuchi; Pharmacokinetics of omeprazole (a substrate of CYP2C19) and comparison with two mutant alleles, CYP2C19m1 in exon 5 and CYP2C19m2 in exon 3, in Japanese, *Clin.Pharmacol.Ther.*, **59**:647 (1996).
- 107) M.Chang, M.L.Dahl, G.Tybring, E.Gotharson and L.Bertilsson: Use of omeprazole as a probe drug for CYP2C19 phenotype in Swedish Caucasians: comparison with S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype, *Pharmacogenetics*, **5**:358 (1995).
- 108) J.D.Balian, N.Sukhova, J.W.Harria, J.Hewett, L.Pickle, J.A.Goldstein, R.L.Woosley and D.A.Flockhart: The hydroxylation of omeprazole correlates with S-mephenytoin metabolism: A population study. *Clin.Pharmacol.Ther.*, **57**: 662 (1995).
- 109) A.Richens: A study of the plasma pharmacokinetics of phenytoin in epileptic patients, and the development of a nomogram for making close increments, *Epilepsia*, **16**: 627 (1975).
- 110) M.Albani, M.Gabriel and P.A.Toseland; The HPPH/phenytoin ratio in urine (phenytoindex) as a parameter for phenytoin requirement prediction in childhood, In: Antiepileptic Therapy: advances in Drug Monitoring, pp. 41-46, S.I.Johannessen, P.L.Morselli, C.E.Pippenger, C.E.Richens, D.Schmidt and H.Meinardi (eds) Raven Press, New York, (1980).
- 111) C.Hoppel, M.Garle, A.Rane and F.Sjoqvist; Plasma concentrations of 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in phenytoin-treated patients, *Clin.Pharmacol.Ther.*, **21**:294 (1977).
- 112) A.J.Glazko, F.E.Peterson, T.Chang, W.A.Dill, T.C.Smith and R.A.Buchanan: Phenytoin metabolism in subjects with long and short plasma half-lives, *Ther.Drug Monit.*, **4**:281 (1982).
- 113) P.Vermeij, D.Ferrari, O.J.S.Buruma, H.Veenema and F.A.de Wolff; Inheritance of poor phenytoin parahydroxylation capacity in a Dutch family, *Clin.Pharmacol.Ther.*, **44**:588 (1988).
- 114) M.Eichelbaum; Genetic polymorphism of sparteine/debrisoquine oxidation, *ISI Atlas Sci.: Pharmac.* **2**: 243 (1988).
- 115) J.R.Idle and R.L.Smith; The debrisoquine hydroxylation gene: a gene of multiple consequence. In: Proceedings of the Second World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, pp. 148-164, L.Lemberger and M.M.Reidenberg (eds) Am.Soc.Pharmacol. Exp.Ther., Bethesda, (1984).
- 116) F.A.de Wolff, P.Vermeij, M.D.Ferrari, O.J.S.Buruma and D.D.Breimer; Impairment of phenytoin parahydroxylation as a cause of severe intoxication, *Ther.Drug Monit.*, **5**:213 (1983).
- 117) E.Steiner, G.Alvan, M.G.J.H.Maguire, M.L.S.-O.Nilson, T.Tomson, J.S.McClanahan, and F.Sjoqvist; The debrisoquine hydroxylation phenotype does not predict the metabolism of phenytoin, *Clin.Pharmacol.Ther.*, **42**: 326 (1987).
- 118) M.E.Veronese, P.I.Mackenzie, C.J.Doecke, M.E.McManus, J.O.Miners and D.J.Birkett; Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver P450 2C9, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **175**: 1112 (1991).
- 119) S.Chen, W.H.Chou, R.A.Blouin, Z.Mao, L.L.Humphries, Q.C.Meek, J.R.Neill, W.L.Martin, L.R.Hays and P.J.Wedlund; The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry, *Clin.Pharmacol.Ther.*, **60**:522 (1996).
- 120) C.Sachse, J.Brockmoller, S.Bauer and I.Roos; Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences,

Am.J.Hum.Genet. ,**60**:284 (1997).

- 121) P.F.Salgucro, S.M.G.Hoffman, S.Cholerton, H.Mohrenweiser, H.Raunio, A.Rautio, O.Pelkonen, J.Haung, W.E.Evans, J.R.Idle and F.J.Gonzalez: A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles, *Am.J.Hum.Genet.* ,**57**:651 (1995).
- 122) A.Rautio, H.Kraul, A.Kojo, E.Salmela and O.Pelkonen: Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers, *Pharmacogenetics* , :227 (1992)
- 123) Y.Caraco, P.Lagerstrom and A.J.J.Wood: Ethnic and genetic determinants of omeprazole disposition and effect, *Clin.Pharmacol.Ther.* ,**60**:157 (1996).
- 124) M.Chang, G.Tybring, M.Dahl, E.Gotharson, M.Sagar, R.Seensalu and L.Bertilsson: Interphenotype differences in disposition and effect on gastrin levels of omeprazole-suitability of omeprazole as a probe for CYP2C19, *Br.J.Clin.Pharmacol.* ,**39**:511 (1995).
- 125) D.B.Smith, S.G.Goldstein and A.Roomet; A comparison of the toxicity effects of the anticonvulsant etobarb and phenobarbital in normal human volunteers, *Epilepsia* , **27**: 149(1986).
- 126) R.J.Sauchuk and L.L.Cartier: Liquid-chromatographic method for simultaneous determination of phenytoin and 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in plasma and urine, *Clin.Chem.* ,**26**:835 (1980).
- 127) R.D.Chelberg, S.Gunawan and D.M.Treiman: Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of carbamazepine and its principal metabolites in human plasma and urine, *Ther Drug Monit.* ,**10**:188 (1988).
- 128) S.Eto, H.Noda, A.Noda: Chiral separation of barbiturates and hydantoins by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a 25 or 50 mm short ODS cartridge column via β -cyclodextrin inclusion complexes, *J.Chromatogr.* ,**579**:253 (1992).
- 129) S.Eto, H.Noda, A.Noda: Simultaneous determination of antiepileptic drugs and their metabolites, including chiral compounds, via β -cyclodextrin inclusion complexes by a

column-switching chromatographic technique, *J.Chromatogr.B* , **658**:385 (1994).

- 130) J.H.Poupaert, R.Cavalier, M.H.Claesen and P.A.Dumont: Absolute configuration of the major metabolite of 5,5-diphenylhydantoin, 5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin. *J.Med.Chem.* ,**18**:1268 (1975).
- 131) T.C.Butler, K.H.Dudley, D.Johnson and S.B.Roberts: Studies of the metabolism of 5,5-diphenylhydantoin relating principally to the stereospecificity of the hydroxylation reactions in man and in the dog, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* ,**199**:82 (1976).

謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜りました九州大学大学院薬学研究科薬物動態学教室 樋口 駿教授に心より深く感謝の意を表します。また、本論文のまとめに際し、御懇切な御鞭撻、御校閲をいただきました九州大学大学院薬学研究科薬物動態学教室 湯川栄二助教授、九州大学薬学部薬剤学教室 澤田康文教授ならびに、九州大学医学部附属病院薬剤部 片岡泰文助教授に謹んで感謝いたします。

本研究の大半は九州大学医学部付属病院にて行われたものであり、遂行にあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました前九州大学医学部付属病院薬剤部長 青山敏信教授、九州大学健康科学センター 山田裕章教授、前九州大学医学部精神科神経科 平田健太郎助教授、九州大学医学部皮膚科講師 今山修平博士に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行に御協力いただきました後藤 涉修士、木村美由紀修士、和田幸子修士に深く感謝いたしますとともに、色々と御助言、御配慮下さいました九州大学医学部附属病院薬剤部ならびに精神科神経科の諸先生方、薬物動態学教室4年生に深く感謝いたします。

また、本研究を通して、薬物の分析に御助言、御指導くださいました産業医科大学病院薬剤部 江藤清二修士、遺伝子診断に御助言、御指導くださいました(株)エスアールエルの諸関係者に深く感謝いたします。

さらに、本研究に多大な御理解をいただき、本研究の実施に御助言、御指導くださいました医療法人相生会臨床薬理センター 浦江明憲センター長、天本敏昭理事長、入江 伸所長に謹んで感謝の意を表します。

最後に、本研究をまとめるに当たり、多くの苦勞をかけた父、家入 亨、家族に感謝致します。

