

《若手研究者紹介》



小児薬物療法の最適化をめざして

守 屋 友 加* Yuka Moriya

立命館大学薬学部分子薬物動態学研究室

1. は じ め に

私が「薬剤学」と出会ったのは、大学の3回生の講義で京都薬科大学教授山本昌先生と講師藤田卓也先生（現、立命館大学薬学部教授）が教授下さった講義でした。当時の印象は、工学部っぽい。医薬品の物理化学的性質や製造工程上の工夫、またDDSの技術、投与経路等の講義は、非常に興味深いものでしたが、どこか遠く手の届かない夢のようなお話で、薬効・薬理に興味が傾いていた私にとっては薬剤師の教養としては必要だけれど、製薬会社等で研究者として働かないのであれば関係ない分野と思っていました。実際この分野が臨床においていかに重要であるのかを知るようになるのは随分と後のことです。

このような私は、3回生後期の研究室配属では教授藤本貞毅先生（京都薬科大学名誉教授）主宰の衛生化学研究室に配属され、アルツハイマー病患者の脳組織におけるCaspaseファミリーの発現量に関する研究に携わりました。学部生の時からヒトの組織を用いた研究に携わらせてもらったのは、非常に恵まれていたと思います。また、研究室は同級生や先輩に恵まれ、毎日楽しく、朝から夕方まで実験をして、データを整理し、時にベランダで談笑や昼寝をしながら過ごしていました。私は、学部卒業と同時に病院で勤務することを希望していましたが、3回生の春季休暇中に病院実務実習へ行き、自分の知識が圧倒的に不足していることや、病院の薬剤師にも疑問を持つこと、そしてそれを解決すること、つまり研究に対するマインドが必要であることを感じ、

学部卒で就職することにためらいが生まれました。また、薬学6年制の話も現実味を帯びてきていたことから、進学について考え始めました。そこで、教授や大学院の長期病院実習に行かれていた先輩に相談し、臨床についての知識を増やし、さらに研究を行うために半年間にわたる病院実務実習がプログラムされている大学院の臨床薬学専攻へと進学することにしました。実習先の希望は臨床も研究も精力的に行われていた神戸大学医学部附属病院にし、教授にわがままを言って、実習後の修士2年を薬剤部に残って共同研究をさせてもらえる形にいただきました。この大学院への進学は私にとって大きな転機になったと思います。大学院の最初の半年間は、朝から夕方まで毎日講義の連続でした。その講義の合間に神戸大学で共同研究をするための基礎的な知識と技術を身につけるために、講師の長澤一樹先生（現、京都薬科大学教授）にご指導いただきながら、腎メサンギウム細胞におけるモノカルボン酸トランスポーターの発現および機能に関する研究に携わりました。

秋から始まった神戸大学医学部附属病院の実務実習では、教授奥村勝彦先生（姫路獨協大学名誉教授、神戸大学名誉教授）、助教授栄田敏之先生（現、京都大学薬学部教授）をはじめ多くの薬剤師の先生方からご指導いただき、非常に充実した日々を送らせてもらいました。調剤はもちろんのこと高カロリー輸液の混注や薬物血中濃度測定とその解析、医師からの問い合わせに対応する医薬品情報室等、今では当たり前のように実務前実習等でも行われていることですが、当時は非常に貴重な経験であり、ひとつひとつの実習がとても魅力的でした。中でも、薬剤管理指導業務は、2か月間午後を1人の指導薬剤師について小児科病棟に行かせていただきました。先生が実施される薬剤管理指導は目から鱗であり、患者

*2000年京都薬科大学大学院修士課程終了、神戸大学医学部附属病院薬剤部入局、2008年博士（薬学）取得、立命館大学薬学部助教、現在に至る。趣味：旅行、映画鑑賞、スポーツ観戦。連絡先：〒525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1 E-mail: tomoka@ph.ritsumei.ac.jp

や患者家族とのコミュニケーションには大きな感銘を受けました。また、大学では抗がん剤について薬理的な面については習っていましたが、薬物治療学的な面について学ぶ機会は少なく、抗がん剤治療については知らないことだらけでした。小児科では急性リンパ性白血病や急性骨髄性白血病などの血液腫瘍、横紋筋肉腫等の小児がんの患児に対し、詳細なプロトコールのもと抗がん剤の併用治療が行われており、そのときに学んだことは今でも私にとって大きな糧となっています。

また、10代後半の患者さんとは歳が近かったこともあり、よく世間話をしたり相談に乗ったりしていました。その中で再発後の治療のために再入院してきた高校生の女の子に、血管外漏出や血管炎等のリスク回避の目的で中心静脈ポート（CVポート）埋め込みの手術をすることに対して、「病気になるって、私の体には4か所も傷跡がついたのに、更に増やさなきゃいけないの?」と言われました。彼女は病気が発覚してから、およそ1年の間に4か所も体にメスを入れられ治療をしていました。彼女にとって、再発の事実を受け入れ治療を再開することも苦痛であった上に、さらなる手術は本当に苦痛だったに違いありません。医学的にも薬学的にも当たり前のように必要と考える処置が患者を苦しめていることを改めて認識した瞬間でした。この小児科病棟での薬剤管理指導の経験は、小児の薬物治療を適切に、そして侵襲性の少ない形で実施するための方法を目指すきっかけとなりました。

今回、このような寄稿の機会を与えていただき感謝申し上げますと共に、私の今までの研究内容について紹介させていただければと思います。

2. シクロスポリンの体内動態に 影響を及ぼす因子の探索

大学院修了後は、神戸大学医学部附属病院薬剤部において薬剤師として勤務させていただき、実務と共に研究にも携わらせていただきました。小児の薬物療法の適正使用に関する研究を行うに当たっては、喜多知子先生（現、理化学研究所研究員）、中村任先生（現、姫路獨協大学薬学部教授）、岡村昇先生（現、武庫川女子大学薬学部教授）にご指導いただき進めてきました。また、先述の小児科病棟でミトコンドリア脳筋症の乳酸アシドーシス・脳卒中様発作

症候群（MELAS）に対して、一般試薬であるジクロロ酢酸ナトリウムを適応外使用された症例を経験したことも影響を受けていると思います。指導薬剤師の先生といかにも試薬といった形の黒い小瓶を医師から受け取り、調剤室で分包した時は、何かいけないことをしているようなためらいがありました。しかし、その時奥村先生が「『Risk Benefit』を考えた時に、Benefitが大きいと判断されれば、患者に投与することもあり、そこに薬剤師としての責任もある。それゆえに、安全性と有効性についての情報をしっかりと集めて評価しないとイケない。」と仰られて、大学で学んできたものは医療のほんの一端だったのだと感じ、薬剤師が科学者でなくてはいけないと言われている本当の意味を知った気がしました。

これは極端な例ですが、小児には未だに適応外使用を余儀なくされる医薬品が数多いのが現状です。現在日本において使用可能な医薬品の中で、成人とは別に、小児に対する用法・用量が設定されているものは、全体の数%に過ぎず、ほとんどの医薬品について小児に対する有効性、安全性は確立していません。従来から、小児を対象とした治験の必要性が強く指摘され、医師主導等により、少しずつ拡大されつつありますが、同意取得の難しさや小児用医薬品の収益性の悪さなど、様々な理由から、依然としてその速度が加速したとは言い難いのが現状です。そのため、小児に対する薬物治療は、ほとんどの場合で、適応外で実施されており、医師の経験に基づくいわば試験的な治療となっています。

2001年にヒトゲノムの解読が終了し、患者個々について遺伝子関連情報に基づき最適な薬物治療計画を構築する医療、いわゆるテーラーメイド医療に対して大きな注目が集まり、現在に至っています。この新規な治療戦略は、患者に対する侵襲性の軽減につながる治療方法であるため、小児に対する薬物療法においてより有用であり、併せて後天的因子の影響がより少ない小児に対して有益な情報を与えると、私は考えました。そこで、遺伝子診断に基づく小児薬物療法の最適化を目的として、難治性ネフローゼ症候群および再生不良性貧血などに対する治療に必要不可欠な免疫抑制剤であるシクロスポリン（CsA）を取り上げ、CsAを基質とする薬物トランスポーターP-glycoprotein/MDR1をコードする遺伝子MDR1の遺伝子診断の有用性について検討を行い

ました。

難治性ネフローゼ症候群の再発予防を目的にCsAが汎用されています。しかし、CsAについては、不可逆的な腎障害の誘発が問題となっており、通常の臨床検査でこれを早期に発見することは困難であることから、診断のために患者への負担が大きく、侵襲性の高い腎生検の施行が余儀なくされているのが実情です。

私は、まずCsAによる腎障害に影響を及ぼす要因の探索を行いました¹⁾。腎生検によって診断された23名のCsA内服中患者をCsAによる慢性腎障害の程度により腎障害なし、可逆的な腎障害あり、不可逆的な腎障害ありの3つの群に分類し、患者特性ならびにCsAの薬物動態について比較検討を行いました。その結果、不可逆的な腎障害が認められた患者において、CsAの投与期間が有意に長いこと、CsA投与4時間後までの全身曝露量(AUC₀₋₄)が高いことを明らかにしました(Table 1)。また、CsAの慢性腎障害の要因についてロジスティック回帰分析を行ったところ、CsAの維持投与量と投与期間から算出される累積投与量が有意な変動要因であることが示され(RR=1.52, 95%CI=(1.03, 2.24), p=0.036)、累積投与量が4,850 mg/kgを超えると50%以上で腎障害が生じることが明らかとなりました。従って、不可逆的な腎障害の発症を回避するためにはCsA投与時のAUC₀₋₄を把握する必要があります。しかし、AUC₀₋₄を算出するに当たっては、1日に頻回の採血を必要とするため、小児薬物療法の実情を勘案すると、CsAの体内動態を把握するためのより簡便な方

法が必要です。そこで、小児科受診患者52名を対象とし、AUC₀₋₄の簡易推定法ならびにCsAの体内動態を規定する因子について検討を行いました²⁾。その結果、AUC₀₋₄は依然より推奨されているCsA投与前の血中濃度(C₀)とも相関を示しました(r=0.488)が、経口投与2時間後の血中濃度(C₂)とより良好な相関(r=0.927)を示し、C₂により推定可能であることを明らかにしました(Fig. 1)。また、CsAの全身曝露に対し影響を及ぼす要因、つまりは日内変動をもたらすステロイドや高血圧治療薬であるニフェジピンの投与、臨床検査値に加えて、性別、年齢、体重、疾患およびMDR1遺伝子型といった先天的要因について、それぞれ検討しました。その結果、ステロイドやニフェジピンの投与は、AUC₀₋₄に強く影響を及ぼすことが明らかになりました(Table 2)。ステロイドを投与されている患者ではステロイドもニフェジピンも投与されていない患者と比較して20%もの高値を示し、さらに両方を投与されている患者では51%もの高値を示しました。また、臨床検査値の中で血清総コレステロールはAUC₀₋₄に影響を及ぼすことが明らかとなりました。さらに遺伝的要因についても注目し、MDR1の3435位にC-alleleを有する患者では、T-alleleのみを有する患者と比較してAUC₀₋₄が29~44%高値を示すことを明らかにしました。このことにより、CsAの体内動態はMDR1の3435位遺伝子型により推定できると考えられました(Table 2)。よって、これらの患者は不可逆的な腎障害が起こりやすく、特に注意が必要であることが明らかになりました。

Table 1. Characteristics and cyclosporine pharmacokinetics in the patients with nephrotoxicity

CsA nephrotoxicity	no n = 11	reversible n = 7	irreversible n = 5
Gender (M/F)	7/4	3/4	3/2
Age (yr)	11.7 ± 3.8	10.4 ± 4.4	16.4 ± 8.0
Total body weight (kg)	43.7 ± 13.2	33.4 ± 13.0	40.8 ± 12.8
Co-administration [§]	6/4/1	3/4/0	1/2/2
Maintenance dose (mg/kg/day)	2.89 ± 0.85	3.53 ± 0.62	3.94 ± 1.33
Duration of CsA treatment (yr)	3.5 ± 1.3	4.9 ± 1.6	8.4 ± 4.3*
C ₀ (ng/ml)	74.5 ± 26.8	78.8 ± 21.2	123.6 ± 20.2*
C ₂ (ng/ml)	499.9 ± 98.5	613.9 ± 326.1	860.6 ± 167.3*
AUC ₀₋₄ (ng·h/ml)	1,511 ± 439	1,625 ± 541	2,534 ± 446*
Dose-adjusted AUC ₀₋₄ (ng·h/ml) [†]	1,759 ± 834	1,370 ± 363	2,029 ± 421

Values are the number of cases or the mean ± SD. *p<0.05, compared with no CsA-induced nephrotoxicity. [§]The ratios of co-administration were those of patients without prednisolone or nifedipine/with prednisolone/with prednisolone and nifedipine. [†]Dose-adjusted AUC₀₋₄ was calculated as AUC₀₋₄ × 3/maintenance dose.

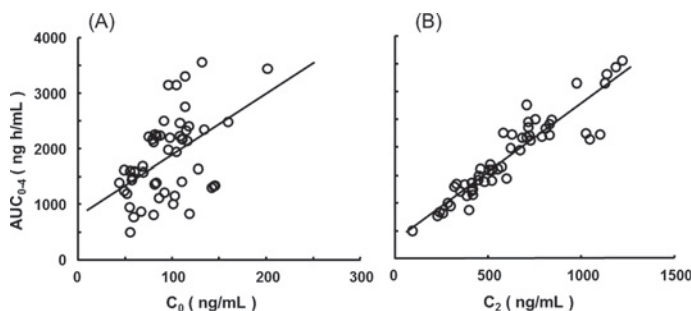


Fig. 1. Relationship between AUC_{0-4} and C_0 (A) or C_2 (B) in 52 Japanese pediatric patients. The subjects consisted of 29 children and 19 young adults. A higher correlation coefficient was obtained for C_2 ($r=0.927$, $p<0.05$) than C_0 ($r=0.488$, $p<0.05$). The exclusion of four slow absorbers resulted in a higher correlation coefficient for C_0 ($r=0.590$), but not for C_2 ($r=0.917$).

Table 2. Effects of age, *MDR1* C3435T and co-administration of steroid and further addition of nifedipine on systemic exposure to cyclosporine, $AUC_{0-4,corr}$ in 48 Japanese pediatric patients.

	N	Dose mg/kg/day	AUC_{0-4} ng*h/mL	$AUC_{0-4,corr}$ ng*h/mL
Total	48	3.33 ± 0.95	1909 ± 708	1792 ± 659
Age	Children (5–15 yr)	29	3.45 ± 1.04	1894 ± 820
	Young adults (16–27 yr)	19	3.14 ± 0.80	1932 ± 513
<i>MDR1</i> C3435T	CC	13	3.22 ± 1.10	1831 ± 818
	CT	27	3.35 ± 1.01	2060 ± 649
	TT	8	3.42 ± 0.48	1526 ± 623
Co-administration	None	12	3.02 ± 0.82	1349 ± 515
	Steroid	25	3.47 ± 0.89	1979 ± 587
	Steroid + Nifedipine	11	3.33 ± 1.22	2367 ± 787

The values are the mean ± SD. The analysis was performed after exclusion of the data on 4 slow absorbers, and dose-normalization of AUC_{0-4} at a dose of 3 mg/kg/day according to the equation: $AUC_{0-4,corr} = AUC_{0-4} \times [3 \text{ (mg/kg/day)}/\text{dose (mg/kg/day)}]$. The factors analyzed in terms of association with $AUC_{0-4,corr}$ included the gender, age, total body weight, indication for CsA and *MDR1* T-129C, C1236T, G2677 (A, T) and C3435T genotype of the patients, as well as co-administration of steroid and further addition of nifedipine and the values of Ht (%), Scr (mg/dL) and T-Chol (mg/dL) on the day of investigation. Other factors than the age, *MDR1* C3435T and co-administration was demonstrated to have no effects on $AUC_{0-4,corr}$.

3. *MDR1* 遺伝子型と *MDR1* mRNA 発現量との 相関解析

小児に対する採血は困難を極めることも多く、侵襲性の少ない方法によってCsAの体内動態を推定することが理想といえます。CsAの体内動態が*MDR1*遺伝子型によって推定できる理由の解明を目的として、ヒト消化管上皮組織における*MDR1* mRNA発現量を定量的に評価し、*MDR1*遺伝子型との相関を解析しました³⁾。小児より消化管上皮を採取することは困難であるため、健常成人男性13名を対象とし、ヒト消化管上皮組織を内視鏡的に採取し、*MDR1* mRNA発現量をリアルタイム定量的RT-PCR法で評価しました。*MDR1*遺伝子型については、*MDR1* mRNA発現量との関係が示唆されている3435位とともに、-129位、2677位についても評価しました。また、併せて、*MDR1*と同じABCトランスポーターであり、CsAの体内動態に少なからず関与す

るとされる multidrug resistance-associated protein (MRP) 1, MRP2 についても同様の解析を行いました。*MDR1* T-129C, G2677A, T および C3435T は、各々2/26, 16/26 および 12/26 であり、また MRP1 および MRP2 については、今回検討した範囲では各々G2168A および C-24Tのみ検出され、1/26 および 6/26 でありました。これらの結果は日本人において以前に報告されている頻度と差はありませんでした。また、組織中の*MDR1* mRNA発現量は、CC³⁴³⁵, CT³⁴³⁵ および TT³⁴³⁵の被験者で、それぞれ 0.38 ± 0.15 , 0.56 ± 0.14 および 1.13 ± 0.42 ($p=0.154$) であり、C-alleleを有する被験者の*MDR1* mRNAの発現量が低いことを明らかにしました (Fig. 2)。これより、先の*MDR1* 3435位にC-alleleを有する小児患者ではCsAの AUC_{0-4} が高値であるという結果は、消化管における*MDR1* mRNA発現量の影響を受けたものであることが示唆されました。併せて、*MDR1* 2677位にA-またはT-alleleを有する被験者

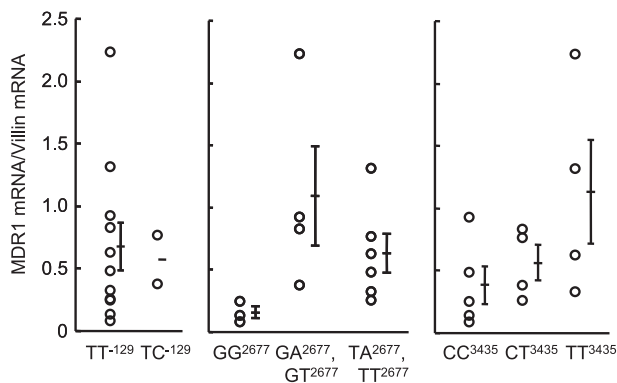


Fig. 2. Relative concentrations of MDR1 mRNA in human duodenal enterocytes for the T-129C, G2677 (A, T) and C3435T genotype groups. Each point represents the mean concentrations of MDR1 mRNA in three or four enterocytes in each subject. Each bar represents the average and standard error of the individual relative concentrations for three genotype groups.

でMDR1 mRNA 発現量が高い傾向にあること ($p = 0.107$) も明らかとなり、これも CsA 体内動態の結果と矛盾しませんでした。なお、MRP1 2168 位遺伝子型および MRP2-24 位遺伝子型の消化管 mRNA 発現量に対する影響は認められず、これらの遺伝子型は消化管吸収過程に対して関与は少ないものと考えられました。

4. メトトレキサートの肝障害の要因に関する研究

続いて、抗がん剤メトトレキサート (MTX) の肝障害を取り上げました。小児急性リンパ性白血病および悪性リンパ腫では MTX を高用量用いる治療が行われますが、肝障害や骨髄抑制はその使用を制限する因子となります。そこで、肝障害の要因を検索する目的で、MTX の代謝に関与する 4 つの因子 glutathione S-transferase (GSTs), reduced folate carrier 1 (RFC1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) および breast cancer resistant protein (BCRP) の遺伝子型の影響について検討を行いました⁴⁾。その結果、高用量の MTX (3 g/m^2) を投与された患者 18 名中 5 名で National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (ver 2.0) において Grade 2/3 の肝障害が認められ、男児が 11 名中 3 名、女児が 7 名中 2 名であり、またその患児の平均年齢は 5.5 ± 4.5 歳と肝障害が認められなかった患児の平均年齢 8.0 ± 4.8 歳と比較すると性別、年齢

が高用量の MTX 投与による肝障害に影響を及ぼすものと考えられました。また、GST 遺伝子のひとつ GSTM1 が陽性で、かつ RFC1 の G80A において AA⁸⁰ である患者で、肝障害が強く認められることが明らかとなりました。同時に、MTHFR の C677T において TT⁶⁷⁷ である患児で、MTX の体内消失が遅いことも明らかにしました。しかしながら、今回の検討では症例数が少ないこともあり、今後より大規模な検討が実施されることが望まれます。この結果は、高用量の MTX を用いた小児急性リンパ性白血病および悪性リンパ腫の治療に対し有益な情報を与えるものと考えられました。

5. 消化管吸収における薬物代謝の寄与に関する研究

2008 年より立命館大学薬学部にて助教の職に就かせていただき、現在に至っています。本学は、2008 年に薬学部が開学し、私と同時に入学した 1 期生も 5 回生となり、研究室に配属されています。また今、学内は研究室選択の時期でもあり、薬学部の 4 回生がそれぞれの思いを馳せながら、研究室見学をしているところを見ると懐かしい気持ちになります。立命館大学では、分子薬物動態学研究室 (藤田卓也教授主宰) に所属させていただき、消化管吸収における薬物代謝の寄与に関する研究に携わらせていただいています。医薬品開発の前臨床段階において、ヒトでの安全性や有効性が検証される必要がありますが、そのためには的確な吸収性評価やヒトのバイオアベイラビリティを予測することが必要となります。しかしながら、化合物によっては使用する動物種により、吸収性またはバイオアベイラビリティが大きく異なる事例も報告されており、どの動物種での結果をヒトでの吸収性予測に反映させて次の開発のステップに進ませるかは非常に重大な問題となります。しかしながら、ヒトと動物との消化管吸収性の種差が、消化管吸収率 (F_a) に起因するものであるのか、消化管代謝に起因するものであるのかについては様々な報告がありますが、いまだ明確な回答は得られていないのが現状です。そこで、我々は消化管吸収性の種差の要因を解明することで、ヒトにおける消化管吸収性を適切に予測するための方法を構築することを目的とし検討を進めています。ヒト、サル、イヌ、ラット、マウスの小腸ミクロソ

ームを用いて各動物種における小腸固有クリアランスを算出した後、生理学的薬物速度論に基づいた Qgut model を用いて各動物種における化合物の小腸代謝回避率 (F_g) を推定したところ、CYP3A の基質ではイヌおよびラットにおいてヒトと比較的良好な相関が得られたのに対し、サル、マウスにおいては、顕著に低値を示す傾向が認められました。また、UGT1A の基質においてはサル、イヌにおいて F_g が低値を示す傾向が認められました。このことから、ヒトにおいて主に CYP3A の基質となる薬物の F_g を予測するためにサル、マウスを、また、UGT1A の基質となる薬物の F_g を予測するためにサル、イヌを用いると過小評価する可能性が示唆されました。このように、ヒトにおける消化管吸収性を予測する際、ある程度の予測として実験動物を用いることは可能であると考えられましたが、決して精度よい予測が出来ているとはいえ、また、近年ヒトの組織や細胞などの入手が容易であることから、ヒト細胞を用いた *in vivo* の段階でのヒト体内動態予測について検討しました。文献情報から算出したヒトにおける F_aF_g と、当研究室における Caco-2 単層膜透過実験の結果から推定した F_a 、およびヒト小腸ミクロソームを用いた代謝実験の結果から推定した F_g により算出した F_aF_g を比較検討しました。CYP3A の基質薬物では両者間で比較的良好な相関を示しました。このことから、少なくともヒトにおいて主に CYP3A で代謝される化合物については、*in vitro* 透過実験および代謝実験により、*in vivo* における F_aF_g を予測できることが示されました。

このように、こちらでは、今までの臨床より少し前の前臨床の段階に関わる研究に従事させていただいていますので、少し畑違いな分野に飛び込んだために戸惑いも大きいですが、少しずつ理解していければと思っています。

6. さ い ご に

以上、私のこれまでの研究内容について書かせていただきました。神戸大学医学部附属病院に在職中は、薬剤管理指導業務にも従事し、耳鼻咽喉頭頸部外科では、口から胃までの間に腫瘍や術直後などの器質的な問題があるために固体や液体等を通過させることができず、経管で直接胃へ薬物投与される患

者さんに対する治療も担当しました。既存の散薬や水薬だけでは治療が行えないために、錠剤を粉碎し、カプセルを開封することも行いました。そのため、粒子径や製剤的性質等によっては管を詰まらせることも多々経験しました。非経口投与、例えば経皮、経粘膜、経腸等の医薬品開発が進むことを願うとともに、薬剤学的重要性について改めて認識させられました。さらに、患者さんによっては、永久気管孔をあけているために発声できない方もおられましたが、いつも私を笑顔で迎え、「ありがとう」と筆談で話してくださいました。この感謝の言葉は私にとって大切な言葉のひとつです。

今後は、今までの研究の継続と共に、臨床における患者ケアの面も含めて実施していきたいと思っています。本当に、多くの先生方や諸先輩方、同僚、後輩、学生、そして何よりも患者さんに恵まれてきました。これからも、笑顔と「ありがとう」の言葉を忘れずに、より良い医療の実践に貢献していきたいと思います。

引用文献

- 1) T. Nakamura, K. Nozu, K. Iijima, N. Yoshikawa, Y. Moriya, M. Yamamori, A. Kako, M. Matsuo, A. Sakurai, N. Okamura, T. Ishikawa, K. Okumura, T. Sakaeda, Association of cumulative cyclosporine dose with its irreversible nephrotoxicity in Japanese patients with pediatric-onset autoimmune diseases, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2371–2375 (2007).
- 2) T. Sakaeda, K. Iijima, K. Nozu, T. Nakamura, Y. Moriya, M. Nishikawa, A. Wada, N. Okamura, M. Matsuo, K. Okumura, Prediction of systemic exposure to cyclosporine in Japanese pediatric patients, *J. Hum. Genet.*, **51**, 969–976 (2006).
- 3) Y. Moriya, T. Nakamura, M. Horinouchi, T. Sakaeda, T. Tamura, N. Aoyama, T. Shirakawa, A. Gotoh, S. Fujimoto, M. Matsuo, M. Kasuga, K. Okumura, Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1356–1359 (2002).
- 4) H. Imanishi, N. Okamura, M. Yagi, Y. Noro, Y. Moriya, T. Nakamura, A. Hayakawa, Y. Takekuma, T. Sakaeda, M. Matsuo, K. Okumura, Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma, *J. Hum. Genet.*, **52**, 166–171 (2007).