

学位論文

メトトレキサート大量療法時における
肝機能障害発症要因の検討および対策に関する研究

2022年3月

阿部 健太郎

目次

	項
略語表	1
序論	3
第一章 骨肉腫患者を対象としたメトトレキサート大量療法における 肝機能障害発現因子の検討	
1. 緒言	7
2. 方法	7
3. 結果	11
4. 考察	21
第二章 メトトレキサート大量療法時におけるグリチルリチンとの 薬物動態学的相互作用に関する評価	
1. 緒言	26
2. 方法	26
3. 結果	29
4. 考察	33
総括	39
謝辞	43
論文目録	44
参考文献	46

略語表

ADR	Adriamycin: アドリアマイシン
ALT	Alanine aminotransferase: アラニンアミノトランスフェラーゼ
ANOVA	Analysis of variance: 分散分析
AST	Aspartate aminotransferase: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the concentration-time curve at infinity : 血中濃度時間曲線下面積
BCRP1	Breast cancer resistance protein 1: 乳癌耐性タンパク質
BUN	Blood urea nitrogen: 血清尿素窒素
C ₀	Drug concentration at time 0: 血中初期薬物濃度
CDDP	Cisplatin: シスプラチン
Cl _{cr}	Creatinine clearance: クレアチニンクリアランス
CTCAE	Common terminology criteria for adverse event: 有害事象共通用語規準
GZ	Glycyrrhizin: グリチルリチン
GA	Glycyrrhetic acid: グリチルレチン酸
HD-MTX	High-dose methotrexate: 大量メトトレキサート
HPLC	High performance liquid chromatography: 高速液体クロマトグラム
LDH	Lactate dehydrogenase: 乳酸脱水素酵素
MAP	Methotrexate-adriamycin-cisplatin
MTX	Methotrexate: メトトレキサート
MRP2	Multi-drug resistance protein 2: 多剤耐性関連タンパク質
PK	Pharmacokinetics: 薬物動態
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein: 副甲状腺ホルモン関連蛋白
ROC	Receiver operating characteristic: 受信者動作特性曲線
T-Bil	Total bilirubin: 総ビリルビン
t _{1/2α}	Half-life of α phase: α 相における半減期
t _{1/2β}	Half-life of β phase: β 相における半減期
V _β	Apparent volume of distribution in the post-distributional phase : β 相における分布容積
V _c	Volume of the central compartment or the initial volume of distribution :

中央区画の分布容積

V_{ss} Steady-state volume of distribution: 定常状態における分布容積

序 論

骨肉腫は、組織学的に腫瘍性の類骨、骨を形成する悪性腫瘍と定義される。日本整形外科学会による全国骨腫瘍登録では年間登録患者数が約 200 人であることから、本邦における発生頻度は人口 100 万人あたり 1~1.5 人程度である¹⁾。また、米国における発生頻度は 20 歳未満の小児・青年 100 万人あたり 4.8 人である²⁾。これらの発生頻度から、骨肉腫は希少がん（人口 10 万人あたり 6 人未満）の一つとされている。

最初から骨に発生する腫瘍は原発性骨腫瘍と呼ばれる。骨肉腫は、原発性悪性骨腫瘍の中で約 20%と最も発生頻度が高い。罹患者は若年層に多く、10 代で全体の約 50-60%を占め、好発年齢分布では、10 代後半にピークがある。10 歳未満は 5%未満と少なく、40 歳以上が約 30%を占める。性差があり、1.3-1.6 : 1 で男性に多い。好発部位は、長管骨の骨幹端であり、大腿骨遠位、脛骨近位、上腕骨近位の順に多く、これら 3 つの部位で約 60-70%を占める³⁾。

骨肉腫の発生原因は不明である。急速な発育途上にある小児や高身長の人に好発することにより、急激な骨の成長が何らかの影響を及ぼしていると考えられている⁴⁾。一方で、近年、Rb 遺伝子や p53 遺伝子を含む染色体上にヘテロ接合性の消失（loss of heterozygosity）が認められることが明らかになっている⁵⁾。

骨肉腫の転移好発部位は肺である。骨肉腫と診断された患者の約 20 %が初診時に肺転移を有していると報告されている⁶⁾。骨肉腫の遠隔転移は、85~90%が肺に生じ、次いで 20%が原発性骨以外の骨とされている⁷⁾。転移のある骨肉腫患者の予後は、転移のない場合より明らかに不良であることから、骨肉腫と診断されてから、早期からの治療と治療スケジュールの延期を避けることが望まれる⁶⁾。

現在、骨肉腫に対して最も広く用いられている治療は、術前化学療法、手術、術後化学療法である。化学療法はアドリアマイシン（Adriamycin: ADR）、シスプラチン（Cisplatin: CDDP）、メトトレキサート（Methotrexate: MTX）の 3 剤からなる多剤併用（Methotrexate-adriamycin-cisplatin: MAP）療法が用いられている。MAP 療法の導入に伴い、約 3 分の 2 の患者が治癒することが報告されている⁸⁾。ADR、CDDP、MTX のいずれの薬剤も、骨肉腫に対して適応が承認され保険適用されている。中でも MTX は高用量であり、大量メトトレキサート（High-dose methotrexate HD-MTX）による治療

法が行われている。

HD-MTX は、500mg/m²以上の投与量と定義され、骨肉腫、急性白血病及び悪性リンパ腫等に適応がある⁹⁾。作用機序としては、核酸合成に必要な活性葉酸を産生させるテトラヒドロ葉酸の生成を妨げ、チミジル酸合成およびプリン合成系を阻害して、細胞増殖を抑制すると言われている(Fig.1)¹⁰⁾。骨肉腫における用量は 8-12g/m²/day である^{11,12)}。骨肉腫における HD-MTX の副作用は骨髄抑制、腎機能障害、口腔粘膜障害、肝機能障害など様々なものが報告されている。それらの副作用の発現率は高く、抗がん剤治療を中止することもあるため、副作用の発現は治療効果の低下に繋がる(Table.1)¹³⁾。

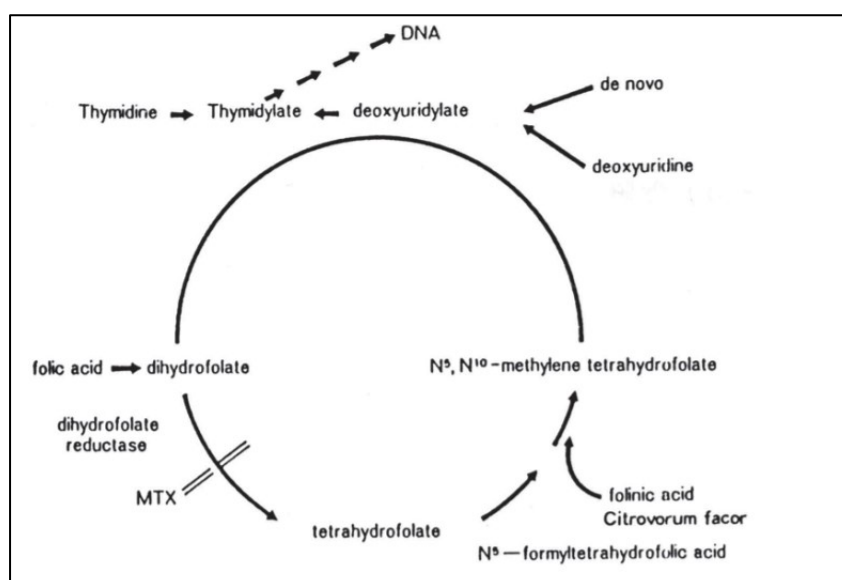


Fig.1 MTX の作用機序

(メソトレキセート®点滴静注液 200mg,1,000mg のインタビューフォームより抜粋)

Table.1 骨肉腫の術前・術後療法に関する第 II 相試験 (NECO95J 試験) における HD-MTX (500 コース) の副作用¹³⁾。

Grade	1	2	3	4	% of G3-4
Haematological toxicity	6.6%	11.8%	8.6%	2.2%	10.8%
Gastrointestinal toxicity	23.4%	24.2%	3.0%	0.0%	3.0%
Hepatic dysfunction	18.2%	18.2%	21.6%	1.6%	23.2%
Renal dysfunction	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Electrolyte abnormalities	0.8%	0.4%	0.2%	0.0%	0.2%
Infection	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%
Fever	1.8%	0.4%	0.2%	0.0%	0.2%
Neurological symptoms	1.2%	0.6%	0.4%	0.2%	0.6%
Alopecia	3.0%	3.0%	0.0%	0.0%	0.0%

これら副作用の予防、軽減のために、血漿中 MTX 濃度のモニター、水分補給 (50~100 mL/m²)、7%炭酸水素ナトリウム、アセタゾラミドによる尿のアルカリ化、ロイコボリンの救援療法 (MTX 投与開始後 24 時間の MTX 濃度が 10 μ M、48 時間の濃度: 1 μ M、72 時間の濃度:0.1 μ M 以上の時、重篤な副作用が発現する危険性が高いので、ロイコボリンの増量投与または投与期間延長) などが行われている⁹⁾。中でも HD-MTX に関連した肝機能障害の発生率は高く、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (Aspartate aminotransferase: AST) やアラニンアミノトランスフェラーゼ (Alanine aminotransferase: ALT) などの肝トランスアミナーゼ濃度が上昇する^{14,15)}。これらの肝機能検査値は一過性に上昇し、慢性肝疾患を引き起こすことはほとんどなく、重症例は稀である¹⁶⁾。しかし、肝機能障害に伴い、MTX の投与量の減量や中止、予定していた化学療法の遅延、手術の延期などが必要となり、治療スケジュールの大きな障害に繋がる¹⁷⁾。MTX の肝機能障害の危険因子としては、低~中等用量の MTX (毎日または隔日の維持療法) において、MTX の累積投与量であることが報告されている¹⁸⁾。しかし、低用量の毎週投与の場合においては明らかになっていない。このように MTX の肝障害は投与量の増加により出現する可能性が示唆されているが、HD-MTX の肝障害と MTX の投与量や血中濃度との関連については殆ど明らかになっていない。また、関節リウマチ患者に使用される低用量 MTX の長期経口投与については、アルコール、B 型および C 型肝炎感染などが肝機能障害の危険因子として挙げられている¹⁹⁻²¹⁾。しかし、骨肉腫の患者を対象とした HD-MTX 時における肝機能障害の危険因子を調査した研究はほとんどない。HD-MTX 投与の安全性を向上させるためには、肝機能障害の潜在的な危険因子を検討する必要がある。

一方、HD-MTX による肝機能障害の治療には、肝庇護剤としてグリチルリチン (Glycyrrhizin :GZ) (強力ネオミノファーゲンシー® (注射製剤) やグリチロン®配合錠) が経験的に使用される。GZ には、抗炎症作用や抗アレルギー作用があり²²⁾、肝機能の改善を目的とした肝臓疾患の治療や、そう痒症や蕁麻疹などの他の疾患の治療にも広く用いられている²³⁻²⁴⁾。また、*in vivo* 研究において、肝機能障害の治療目的に投与した GZ により MTX の血中濃度に影響を及ぼすことが報告されているがその詳細は明らかになっていない²⁵⁾。

そこで、本論文では、骨肉腫患者を対象とした HD-MTX による肝機能障害の予防お

よび副作用軽減を目的として、以下に示す全二章で構成される検討を行った。第一章では、病院診療録を用い、骨肉腫患者における HD-MTX の肝機能障害発現因子について検討した。第二章では、HD-MTX と肝機能障害時に予防薬または治療薬として使用される GZ との薬物動態学的相互作用を明らかにするために、ラットを用いた GZ の MTX への体内動態への影響を検討した。

第一章

骨肉腫患者を対象としたメトトレキサート大量療法における肝機能障害発現因子の検討

1. 緒言

HD-MTX 療法は、骨肉腫、急性白血病、悪性リンパ腫等に有効な治療法である¹⁸⁾。HD-MTX の主要な副作用は、骨髄抑制、腎機能障害、口内炎、肝機能障害である²²⁾。肝機能障害の重症な例は、まれであるが、発症率が 10-30%と高く、化学療法の変更や手術時期の変更などにより、治療スケジュールの進行に大きな障害となっている¹⁸⁾。しかし、骨肉腫の患者を対象とした HD-MTX の肝機能障害の危険因子や MTX 血中濃度と肝機能障害の関係を明らかにする研究は殆どない。更に、*in vivo* 研究において、肝機能障害の治療目的に投与した GZ により MTX の血中濃度に影響を及ぼすことが報告されているが、臨床において MTX と GZ の併用の実態や血中濃度の影響を明らかにした報告は殆どない³⁴⁾。HD-MTX 投与の安全性を向上させるため、肝機能障害を起こしやすい患者の危険因子や MTX 血中濃度と肝機能障害の関係、MTX と GZ の併用状況を明らかにすることは重要である。本研究では、国立がん研究センター中央病院で HD-MTX 療法を実施した骨肉腫患者を対象に、肝機能障害の危険因子を特定するための後方視的調査を行った。

2. 方法

2-1. 研究対象者

本研究は、骨肉腫患者を対象とした HD-MTX による肝機能障害の危険因子を評価した単施設の後方視的な観察研究である。2014 年 1 月から 2020 年 6 月の間に、国立がん研究センター中央病院の電子診療録を用いて、HD-MTX による治療を受けた骨肉腫患者 36 名のデータを収集した。解析対象コースは、HD-MTX 治療の術前化学療法 1 コース目から 4 コース目までとした。HD-MTX 投与前後の肝機能検査データが欠損していたコース、および HD-MTX 投与前に有害事象共通用語規準 (Common terminology criteria for adverse events: CTCAE) ver 4.0 に基づいて Grade 付けされた

Grade3 以上の肝機能障害があったコースは除外した。

2-2. 化学療法

骨肉腫患者は、JCOG0905（骨肉腫術後補助化学療法における Ifosfamide 併用の効果に関するランダム化比較試験実施計画書）プロトコールに基づいた MAP 療法レジメンに準じて投与が行われた²⁶⁾。Table.1-1 に MAP 療法の術前化学療法を示す。MTX は、各サイクルの 1 日目（day1）に投与した。MTX の標準投与量は、19 歳以下の患者では 12 g/m²、20 歳以上 39 歳以下の患者では 10 g/m²、40 歳以上の患者では 8 g/m²とした。MTX の投与は 4～6 時間かけて点滴し、MTX の点滴開始から 24 時間後にロイコボリンのレスキューを 15 mg、6 時間ごとに開始した。シスプラチンの標準投与量は、29 歳以下の患者では 120 mg/m²、30 歳以上の患者では 100 mg/m²であった。アドリアマイシンの標準投与量は 30 mg/m²（39 歳以下）×2、25 mg/m²×2（40 歳以上）とした。すべての患者に十分な水分補給を行い、尿の pH が 7 以下の場合は 7%炭酸水素ナトリウムによる尿アルカリ化を追加した。

Table 1-1 MAP 療法の術前化学療法

Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Total cycle		1		2	3		4		5	6
Methotrexate cycle				1	2				3	4
Regimen		A ^a , P ^b		M ^c	M ^c		A ^a , P ^b		M ^c	M ^c

^aAdriamycin; ^bCisplatin; ^cMethotrexate

2-3. 肝機能障害の定義

各コースにおいて、MTX 投与後 day2 から day6 まで血液検査を行った。HD-MTX 療法の各コースにおいて、AST、ALT、総ビリルビン（Total bilirubin: T-Bil）のデータを収集し、最も重篤なものを評価した。肝機能障害は CTCAE version 4.0 に基づいて評価した。投与後のこれらの肝機能レベルが Grade3 以上となったコースを「肝機能障害群」、それ以外のコースを「非肝機能障害群」と定義した。

2-4. データ収集

患者背景因子として、基本情報および投与直前の血液検査値の臨床データを収集した。さらに、投与後の臨床データを収集した。

2-4-1. 基本情報

患者の性別、年齢、BMI、腫瘍の大きさ、Stage、体表面積のデータを収集した。

2-4-2. 投与直前の血液検査値

血清中のクロライド、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルカリホスファターゼ、AST、ALT、乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase: LDH)、T-Bil、血清尿素窒素 (Blood urea nitrogen: BUN)、血清クレアチニン値、白血球数、血小板数、単球数、好中球数、好酸球数、ヘモグロビン濃度を収集した。また、MTX、CDDP、ADR の投与量、MTX 投与日の尿量および MTX 投与当日までの GZ などの肝庇護剤の投与状況を調査した。年齢、体重、血清クレアチニン値からクレアチニンクリアランス (Creatinine clearance: Clcr) を算出した。Clcr の算出には、12 歳以上の患者には Cockcroft-Gault 式を、11 歳以下の患者には Schwartz 式を用いた。

・ Cockcroft-Gault の Clcr 計算式

男性 : $Clcr = \{(140 - \text{年齢}) \times \text{体重(kg)}\} / \{72 \times \text{血清クレアチニン値(mg/dL)}\}$

女性 : $Clcr = 0.85 \times \{(140 - \text{年齢}) \times \text{体重(kg)}\} / \{72 \times \text{血清クレアチニン値(mg/dL)}\}$

・ Schwartz の Clcr 計算式

$Clcr = 0.55 \times \text{身長(cm)} / \{\text{血清クレアチニン値(mg/dL)} + 0.2\}$

2-4-3. 投与後の臨床データ

投与後の臨床データとして、HD-MTX 投与後 24、48、72 時間後の MTX 血中濃度と、その時点における AST、ALT を収集した。

2-5. HD-MTX 療法後の肝機能障害の危険因子の解析

単変量解析および多変量ロジスティック回帰分析により、HD-MTX に伴う肝機能障害の危険因子を同定した。まず、肝機能障害群と非肝機能障害群の患者特性を比較するために、単変量解析にて両群間で有意差があった項目を抽出した。連続変数は、Mann-Whitney U 検定または t 検定を用いて解析した。カテゴリーデータの解析には、ピアソンのカイ二乗検定を用いた。多重共線性を避けるため、抽出された因子間の関

係については、スピアマンの相関係数の推定と有意差検定を行った。因子間に強い相関が有意に見られた場合（スピアマンの相関係数： $|\rho| > 0.7$ ）、臨床的に重要な因子を1つ選択した。これらの項目を用いて多変量ロジスティック回帰分析を行い、肝機能障害に関連する独立した危険因子を特定した。多変量のロジスティック回帰分析におけるモデルの妥当性は、Hosmer-Lemeshow 検定を行った。また、多変量ロジスティック回帰分析で抽出された独立因子については、受信者動作特性曲線（Receiver operating characteristic: ROC）分析を行い、連続変数のカットオフ値を決定した。ROC分析は、左上隅との距離が最小となる点を求める方法を用いた。最後に、危険因子の数と肝機能障害の発生割合との関連について分析した。これらの関係の分析には、ピアソンのカイ二乗検定を用いた。すべての統計解析は、R ソフトウェアバージョン 3.6.3（The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）を用いて行い、多重代入法の欠損値の補完には、mice パッケージを使用した²⁷⁾。また、ROC 曲線の作成には、ROCR パッケージを用いた²⁸⁾。統計学的有意水準は 0.05 未満および 0.01 未満とした。

2-6. HD-MTX 投与量、血中濃度および肝機能検査値との関連性

HD-MTX 療法後の肝機能障害と HD-MTX 投与量や血中濃度との関連について明らかにするため、まず、HD-MTX 投与量と投与後 24、48、72 時間後の MTX 血中濃度の関連性を評価した。次に投与後 24、48、72 時間後の MTX 血中濃度とその時点における AST および ALT の肝機能検査値をプロットし、関連性を評価した。相関係数や相関係数の有意性を評価するため、スピアマンの相関係数を用いた。統計的有意水準は、0.05 未満および 0.01 未満とした。

2-7. 肝機能障害の有無と MTX 血中濃度の比較

肝機能障害群と非肝機能障害群における HD-MTX 投与後 24、48、72 時間後の MTX 血中濃度の比較を行った。また、両群において、各時間での排泄遅延を起こした割合についても比較を行った。なお、MTX 投与後 24、48、72 時間において、それぞれ、10 μM 、1.0 μM 、0.1 μM の基準値より高い血中濃度が得られた場合、「排泄遅延」と定義した³⁷⁾。両群間における血中濃度の比較は t 検定、排泄遅延を起こした割合の比較は、ピアソンのカイ二乗検定を用いた。統計的有意水準は、0.05 未満および 0.01 未満とした。

2-8. MTX と GZ の併用調査、血中濃度および肝機能検査値の比較

臨床における HD-MTX と GZ の併用の実態や併用による MTX 血中濃度の影響について明らかにするために、まず HD-MTX と GZ の併用状況について調査した。HD-MTX が投与される day1 に注射薬および経口薬の GZ 製剤が投与された場合を併用投与と定義した。次に、MTX 単独投与または GZ 併用において、24、48、72 時間後の MTX 血中濃度および肝機能検査値（AST、ALT、T-Bil）について比較検定を行った。Mann-Whitney U 検定または *t* 検定を用いて解析した。統計的有意水準は、0.05 未満および 0.01 未満とした。

2-9. 倫理的配慮

本研究は、世界医師会によるヘルシンキ宣言および臨床研究の倫理原則に基づいて実施された。本プロトコールは、国立がん研究センター研究倫理委員会 (No.2019-115) および東京理科大学の研究倫理委員会 (No.19018) で承認を得て実施された。研究期間は、2019 年 8 月 22 日から 2022 年 3 月 31 日までとした。

3. 結 果

3-1. 患者背景

調査期間中に 36 人の骨肉腫患者の合計 119 コースに HD-MTX 療法を実施した。そのうち、HD-MTX 投与前後の肝機能データが欠損していた 5 コースと、HD-MTX 投与前に Grade3 以上の肝機能障害があった 26 コースの合計 31 コースを除外した。したがって、36 名の患者の合計 88 コースが対象となった (Fig.1-1)。投与前のベースラインは、年齢の中央値は 18 歳で、88 コース中、男性が 57 コース、女性が 31 コースであった。臨床検査値では、アルカリホスファターゼ中央値 334U/L (範囲 132-2013) が高値を示したが、その他に異常値を示すものは見られなかった。

HD-MTX 投与後の肝機能障害の発生状況では、ALT、AST および T-Bil の上昇を伴う Grade3 以上の肝機能障害が発生したコースは、それぞれ 51 (58.0%)、34 (38.6%)、0 (0%) であった。ALT、AST および T-Bil の上昇を伴う Grade3 以上の肝機能障害が

発生した人数は、それぞれ 27 名、27 名および 0 名であった。したがって、HD-MTX の肝機能障害は、トランスアミナーゼ濃度の上昇と関連しており、Grade3 を超える ALT の上昇で判断されることが多かった。

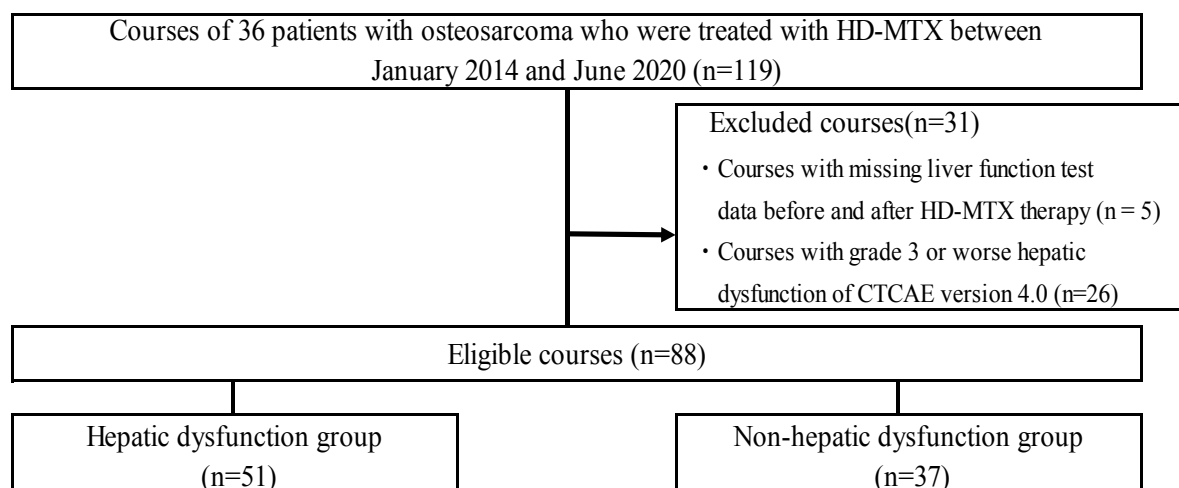


Fig.1-1 研究のフローチャート

3-2. 肝機能障害の危険因子の解析

肝機能障害群と非肝機能障害群のベースライン特性の比較を以下に示す。単変量解析の結果、年齢（肝機能障害群 17.0±7.41 歳、非肝機能障害群 23.7±8.56 歳 $p < 0.001$ ）、体表面積（肝機能障害群 1.45±0.267 m²、非肝機能障害群 1.63±0.215 m² $p < 0.001$ ）、血清クレアチニン濃度（肝機能障害群 0.505±0.164 mg/dL、非肝機能障害群 0.600±0.133 mg/dL, $p = 0.005$ ）は、非肝機能障害群に比べて肝機能障害群で有意に低かった。性別は、肝機能障害群では非肝機能障害群に比べて女性が有意に多かった（それぞれ 26 コース（49.0%）、5 コース（13.5%）, $p < 0.001$ ）。腫瘍サイズ（肝機能障害群 8.3（2.8-18） cm、非肝機能障害群 7（5-17） cm, $p = 0.023$ ）、CDDP 投与量（肝機能障害群 118.5（69.2-199） g/m²、非肝機能障害群 108.6（60.0-159） g/m², $p = 0.009$ ）、MTX 投与量（肝機能障害群 11.8（9.76-12.5） g/m²、非肝機能障害群 9.90（8.00-12.2） g/m², $p < 0.001$ ）、血清カリウム濃度（肝機能障害群 4.15±0.348 mmol/L、非肝機能障害群

4.00±0.303 mmol/L, $p = 0.033$)、血清カルシウム濃度 (肝機能障害群 9.31±0.364 mg/dL、非肝機能障害群 9.04±0.356 mg/dL, $p < 0.001$)、LDH (肝機能障害群 239±87.0 U/L、非肝機能障害群 203±45.7 U/L, $p = 0.025$)、血小板数 (肝機能障害群 $33.8 \pm 10.3 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、非肝機能障害群 $28.9 \pm 12.3 \times 10^4/\mu\text{L}$, $p = 0.044$) および好酸球数 (肝機能障害群 $0.1 (0-5.4) \times 10^3/\mu\text{L}$ 、非肝機能障害群 $0 (0-3) \times 10^3/\mu\text{L}$, $p = 0.033$) は、非肝機能障害群に比べ肝機能障害群で有意に高かった。以上より、単変量解析で両群に有意差が認められた、これら 12 個の項目が危険因子の候補として抽出された。次に多重共線性を考慮するために、これら 12 個の項目について相関関係を分析した。年齢、体表面積および血清クレアチニン濃度は、互いに相関を認めた (年齢と体表面積: $\rho = 0.743$ 、年齢と血清クレアチニン: $\rho = 0.713$ 、体表面積と血清クレアチニン: $\rho = 0.754$)。年齢と血清クレアチニン濃度は、小児において相関があることが報告されている²⁹⁾。そこで、これらの結果を踏まえて、3 つの項目の中では年齢を選択した。また、年齢と MTX 投与量には負の相関を認めたが ($\rho = 0.723$)、臨床的判断に基づいてどちらの因子も選択した。最終的には、年齢、性別、腫瘍の大きさ、シスプラチン投与量、MTX 投与量、カリウム濃度、カルシウム濃度、LDH、好酸球数を用いて多変量ロジスティック回帰分析を行った。

次に、多変量ロジスティック回帰分析の結果を示す。女性、高用量の MTX 投与量及び高い血清カルシウム濃度が HD-MTX による肝機能障害の独立した危険因子として抽出された (女性: 調整オッズ比 17.0, 95%信頼区間 (3.65-79.6) $p < 0.001$ 、MTX 投与量 (g/m^2): 調整オッズ比 3.48, 95%信頼区間 (1.65-7.34) $p = 0.001$ 、血清 Ca (mg/dL): 調整オッズ比: 118, 95%信頼区間 (11.2-1249) $p < 0.001$)、なお、Hosmer-Lemeshow 検定によるモデルの適合度は、0.752 であり、多変量ロジスティック回帰分析のモデルの妥当性が示された。

3-3. 肝機能障害の危険因子の数と肝機能障害の発生割合の関係

血清カルシウムおよび MTX 投与量のカットオフ値を決定するために ROC 曲線分析を行った。血清カルシウム濃度と MTX 投与量の最適なカットオフ値は、それぞれ 9.30 mg/dL と 10.2 g/m^2 であった。その結果、血清カルシウム濃度が 9.3 mg/dL より高いこと、MTX 用量が 10.2 g/m^2 より高用量であることが、肝機能障害の独立した危険

因子として抽出された。危険因子の数と肝機能障害の発生割合の関連では、肝機能障害の発生割合は、危険因子のない患者 ($Ca \leq 9.3$ mg/dL、MTX 用量が 10.2 g/m² 以下の男性) では 0%、危険因子が 1 つの患者 ($Ca > 9.3$ mg/dL、MTX 用量が 10.2 g/m² 以下または Ca が 9.3 mg/dL 以下の男性、MTX 用量が > 10.2 g/m² または Ca が 9.3 以下の女性、MTX 用量が > 10.2 g/m² の女性) では 54.8%であった。危険因子が 2 つの患者では 82.9%、3 つの患者では 100%であった。3 つの危険因子を持つ患者は、危険因子を持たない患者や 1 つの危険因子を持つ患者に比べて、肝機能障害の発生割合が有意に高かった。

3-4.MTX 血中濃度と MTX 投与量および肝機能検査値(AST、ALT)の相関関係

MTX 血中濃度と MTX 投与量の相関関係を Fig.1-2 に示す。MTX 投与量と MTX 投与後の 24 時間、48 時間および 72 時間の血中濃度は、それぞれ有意な正の相関関係を示した (相関係数 $\rho=0.286, p=0.012$ 、 $\rho=0.307, p < 0.01$ 、 $\rho=0.264, p = 0.04$)。

次に、MTX 投与後の 24 時間、48 時間および 72 時間の MTX 血中濃度とその時点における AST 値および ALT 値をプロットした相関関係を Fig.1-3 に示す。MTX 血中濃度の上昇に伴い、AST 値および ALT 値の上昇が認められ、それぞれ有意な正の相関関係を示した (相関係数 $\rho=0.540, p < 0.01$ 、 $\rho=0.345, p < 0.01$)。

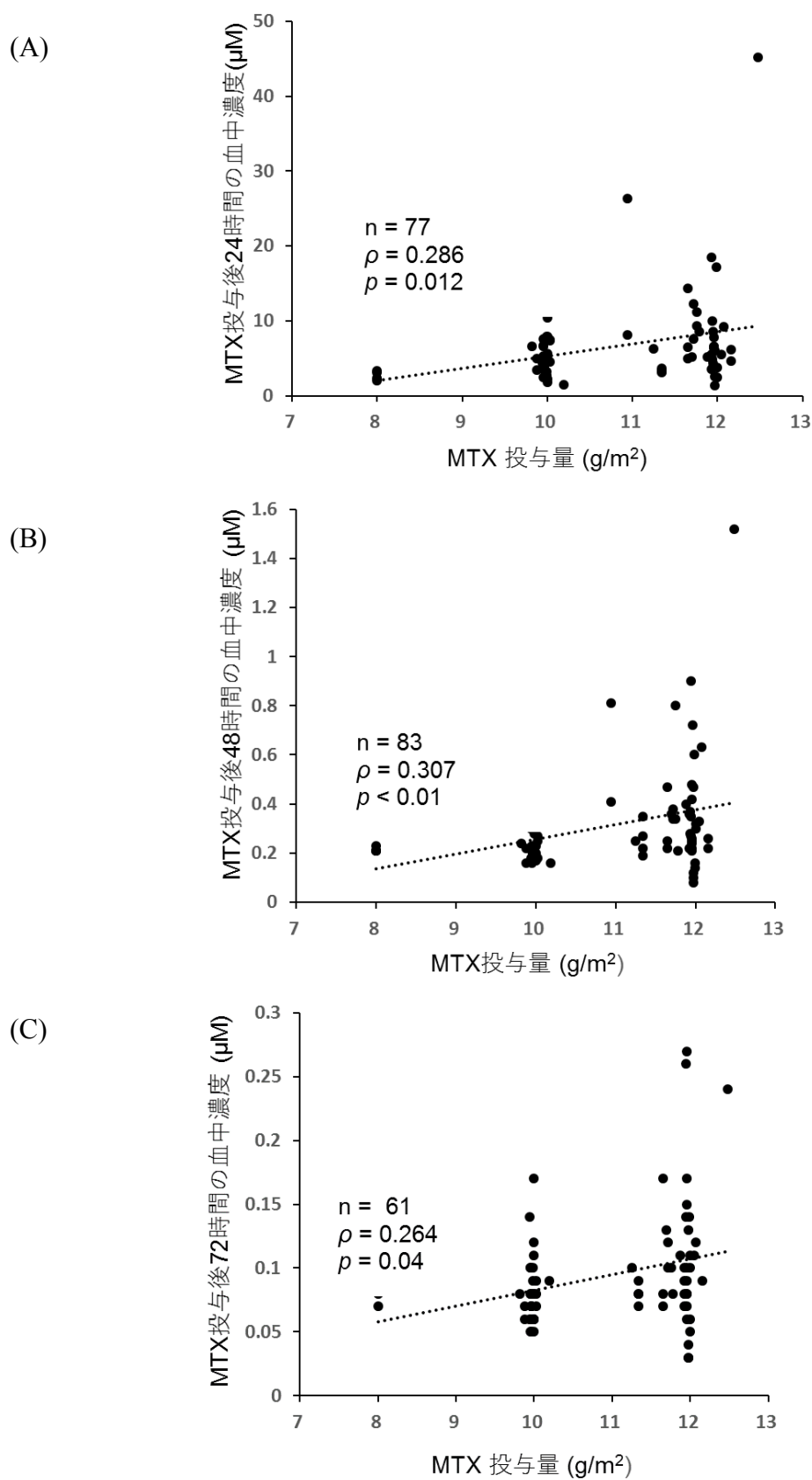


Fig.1-2 HD-MTX 投与後 24 時間 (A), 48 時間 (B), 72 時間 (C) における MTX 投与量と MTX 血中濃度の相関関係

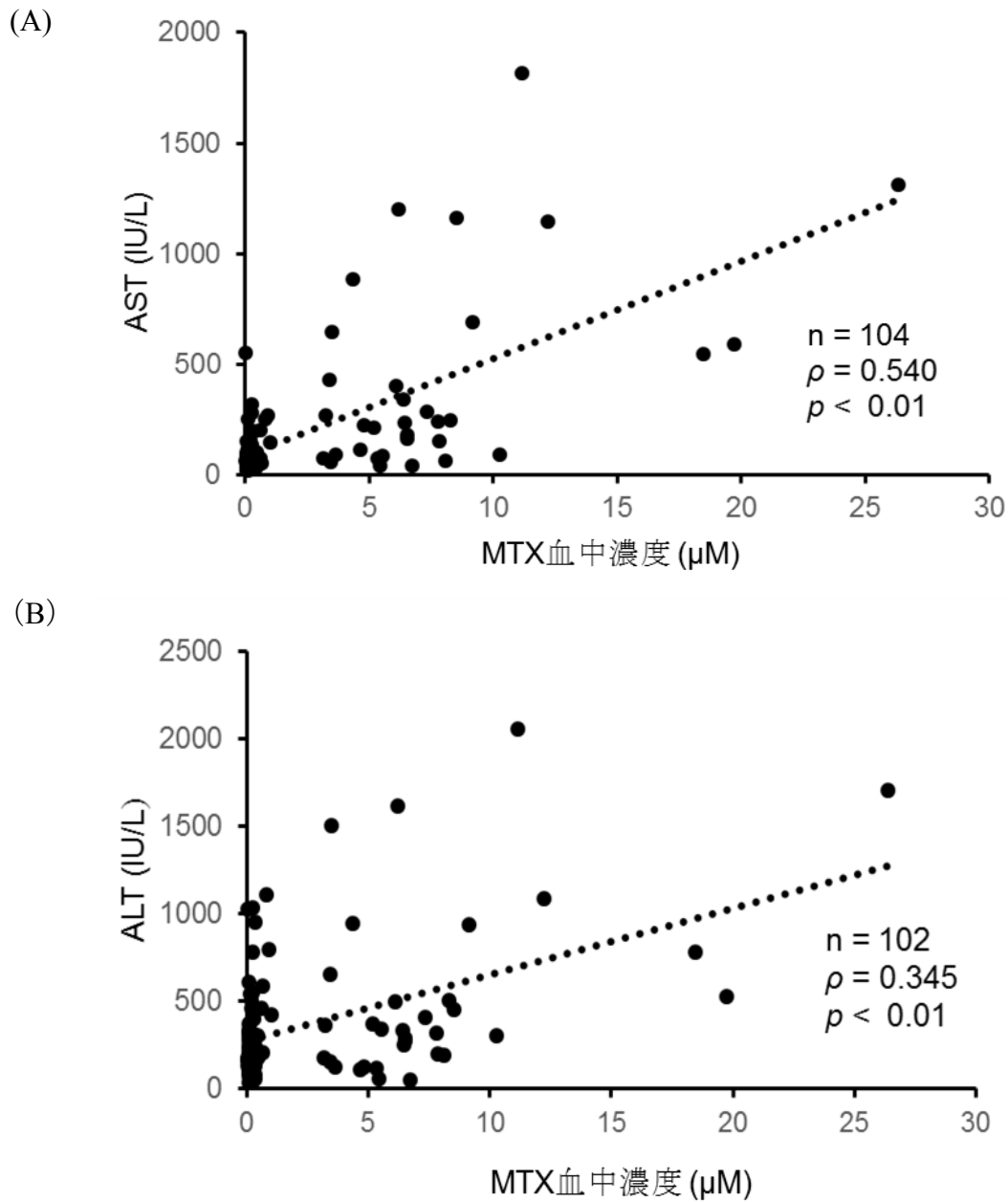


Fig.1-3 MTX の血中濃度と AST (A) および ALT (B) との相関関係

3-5. 肝機能障害群と非肝機能障害群における MTX 血中濃度及び排泄遅延の比較

肝機能障害群と非肝機能障害群における MTX 血中濃度 (MTX 投与後 24 時間、48 時間後、72 時間後) の比較について、Table.1-2 および Fig.1-4 に示す。投与後 24 時間、48 時間の MTX 血中濃度について、肝機能障害群は非肝機能障害に比べて、それぞれ有意に高いことが認められた (投与後 24 時間; $8.73 \pm 8.13 \mu\text{M}$ vs $5.04 \pm 2.45 \mu\text{M}$, $p <$

0.01、投与後 48 時間; $0.37 \pm 0.26 \mu\text{M}$ vs $0.24 \pm 0.07 \mu\text{M}$, $p < 0.01$)。MTX の排泄遅延を起こした割合については、投与後 24 時間において、肝機能障害群が非肝機能障害群に比べて有意に多かった ($p < 0.01$)。投与 48 時間および 72 時間のそれぞれにおいて、両群間で有意な違いが見られなかった (Table.1-2)。

Table 1-2 MTX 投与後 24, 48 および 72 時間における肝機能障害発現群と非肝機能障害発現群の MTX 血中濃度および排泄遅延の比較

	肝機能障害群	非肝機能障害群	<i>p</i> 値	
MTX血中濃度				
コース数	45	33		
24h ^a (μM)	8.73 ± 8.13^b	5.04 ± 2.45^b	<0.01	^t **
コース数	48	34		
48h ^a (μM)	0.37 ± 0.26^b	0.24 ± 0.07^b	<0.01	^t **
コース数	44	40		
72h ^a (μM)	0.10 ± 0.05^b	0.08 ± 0.02^b	0.06	^t
排泄遅延(+/-)				
24h ^a				
コース数(+)	12	1	<0.01	^k **
コース数 (-)	33	32		
48h ^a				
コース数(+)	1	0	—	
コース数(-)	47	34		
72h ^a				
コース数 (+)	16	9	0.62	^k
コース数 (-)	28	21		

^a MTX 投与後 24, 48, 72 時間の血中 MTX 濃度

^b 各数値は中央値 (範囲) または平均値±標準偏差

^{**} $p < 0.01$; ^{*} $p < 0.05$; ^kPearson's chi-squared test, ^tt-test

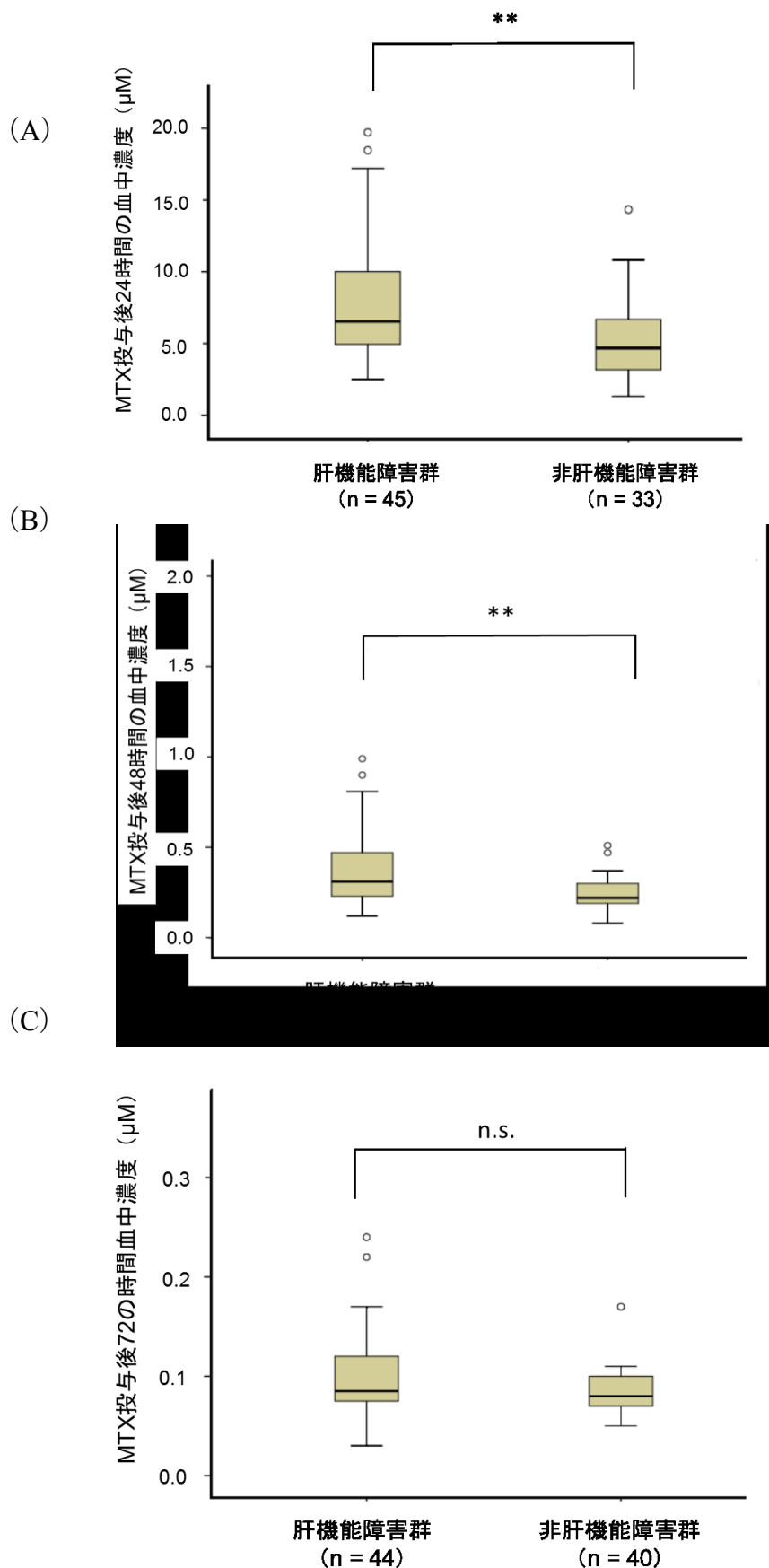


Fig.1-4 HD-MTX 投与後 24 時間 (A) , 48 時間 (B) および 72 時間 (C) における肝機能障害発現群と非肝機能障害発現群の MTX 血中濃度の比較

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s.; not significant (t -test)

3-6. MTX と GZ の併用調査、血中濃度および肝機能検査値の比較

MTX と GZ の併用状況を調査した。その結果、解析対象 88 コースのうち、GZ と併用していないコース (MTX 単独投与) は 75 コース、GZ と併用していたコース (MTX と GZ の併用) は 13 コースであった。GZ を併用しているコースは全体の 14.8%であった。

MTX 単独投与と MTX と GZ の併用における MTX 血中濃度と肝機能検査値 (AST,ALT,T-Bil) の比較について Table.1-3 に示す。MTX 単独投与と MTX と GZ の併用における MTX 血中濃度については、MTX 投与後 24 時間、48 時間および 72 時間において有意な差が認められなかった。

MTX 単独投与と MTX と GZ の併用における肝機能検査値 (AST,ALT,T-Bil) の比較については、72 時間の AST に関して、MTX と GZ の併用が MTX 単独投与に比べて高い傾向を示した (71.10 ± 66.34 IU/L vs 103.64 ± 149.72 , $P=0.06$)。ALT に関しては、両者で各時間において差が認められなかった。T-Bil に関しては、投与 24 時間において、MTX と GX の併用が MTX 単独投与に比べて、有意に高いことが認められた (0.93 ± 0.41 mg/dL vs 1.60 ± 0.77 mg/dL, $p = 0.03$)。

Table 1-3 MTX と GZ の併用調査、血中濃度および肝機能検査値の比較

	MTX単独投与 (n=75)	MTX + GZ併用 (n=13)	<i>p</i> 値	
MTX血中濃度 (μM)				
24h ^a	6.58 ± 5.92	7.11 ± 6.76	0.85	^t
48h ^a	0.31 ± 0.20	0.31 ± 0.18	0.94	^t
72h ^a	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.62	^t
肝機能検査値				
AST (IU/L)				
24h	451.19 ± 455.23	450.78 ± 416.83	0.571	^m
48h	90.00 ± 70.20	103.20 ± 71.31	0.791	^m
72h	71.10 ± 66.34	103.64 ± 149.72	0.06	^m
ALT (IU/L)				
24h	515.88 ± 524.16	604.56 ± 488.63	0.442	^m
48h	312.59 ± 264.58	351.60 ± 301.59	0.56	^m
72h	226.24 ± 172.00	316.55 ± 281.48	0.303	^m
T-Bil (mg/dL)				
24h	0.93 ± 0.41	1.60 ± 0.77	0.03	^{m*}
48h	0.71 ± 0.41	0.5	-	
72h	0.67 ± 0.27	0.85 ± 0.32	0.06	^m

^a MTX 投与後 24, 48, 72 時間の血中 MTX 濃度

***p* < 0.01; **p* < 0.05; ^mMann-Whitney U-test; ^t t-test

4. 考 察

本章では、後方視的な観察研究により、骨肉腫患者を対象とした HD-MTX 療法後の肝機能障害の独立した危険因子として、女性、MTX 投与量、血清カルシウム濃度が抽出された。また、ROC 解析により MTX 投与量、血清カルシウム濃度についてカットオフ値を算出し、危険因子の数と肝機能障害の発生割合について解析した。その結果、HD-MTX 療法開始時に、9.3 mg/dL より高い血清カルシウム濃度、10.2 g/m² より多い MTX 投与量、女性といった危険因子の数が増えるほど、肝機能障害の発生割合が高くなることが明らかになった。骨肉腫患者の HD-MTX における肝機能障害の危険因子を特定したのは、我々の今回の研究が初めてだと思われる。これらの結果から、HD-MTX 療法開始前に、女性であること、MTX 投与量が 10.2 g/m² より多いこと、血清カルシウム濃度が 9.3 mg/dL より高いことが、HD-MTX 療法後の肝機能障害のリスク増加と関連していることが示唆された。これらの結果より、骨肉腫患者の HD-MTX 治療開始前においては、危険因子を持っているか否かによって肝機能障害発生の予測に役立てることができ、また、治療中に既に危険因子をもつ患者に対しては、十分にモニタリングする必要があると考えられる。さらに、骨肉腫患者を対象とした HD-MTX における肝機能障害の発現因子を明らかにしたことで、HD-MTX の安全性と治療マネジメントの改善に貢献できる可能性があることが示唆された。

本章の研究では、88 コースのうち 51 コース (58.0%) で Grade3 以上の肝機能障害が発現した。骨肉腫患者に対して HD-MTX の投与量が同様の研究では、113 名の患者の 882 コースにおいて、Grade3 および 4 の肝機能障害の発生割合が 14.3%であったという報告がある¹³⁾。我々の研究と上記の研究では肝機能障害の発生割合に違いがみられた。このことは、我々の研究では術前化学療法期間中のコースのみを研究対象としているが、上記の研究では術後化学療法を実施したコースも研究対象としているためと考えられる。また、Tsurusawa らは、HD-MTX において初回の薬剤投与後に肝機能障害が高かったことを報告している³⁰⁾。このことは、コース数が増えて治療が進んでいくと、ロイコボリンの投与回数や投与量増加などの適切な支持療法が実施されることで、肝機能障害が軽減されたのではないかと考えられている³¹⁾。これらのことから、術前化学療法の HD-MTX 療法においては、肝機能障害が起こりやすいということを認識し注意する必要があることが示唆された。本研究では、術前化学療法のデータを

用いて解析を行った。術後化学療法データのデータを加えて解析しなかった理由としては、術後化学療法データのデータを含めると、術後感染症予防のための抗生剤投与等を含めた薬剤の影響や、手術そのものによる術後炎症等といった臓器への影響がある可能性がある。そのため、HD-MTXによる純粋な化学療法の肝障害を正しく評価できないと考えられる。そのため、本研究では、術前化学療法に絞って検討を行った

多変量ロジスティック回帰分析の結果、女性が HD-MTX による肝機能障害の独立した危険因子であることが示された。この結果は、骨肉腫に対して HD-MTX を投与した場合と¹⁴⁾、若年性特発性関節炎に対して低用量 MTX を投与した場合に、女性患者が MTX の肝機能障害に影響を受けることを示した過去の研究と一致する³²⁾。女性が MTX の肝機能障害を発現しやすい要因としては、女性ホルモンの影響や性別による薬物動態の違いが関与していると考えられている³²⁾。骨肉腫は、性差があり男性に多く発生する³³⁾。そのため、今回、限られた症例数の中での研究ではあるが、HD-MTX 療法後の肝機能障害の危険因子として、女性が抽出されたことは重要であると考ええる。

骨肉腫患者を対象とした HD-MTX 療法における肝機能障害の危険因子として、HD-MTX の投与量が抽出された。これらの知見は、肝機能障害の発生に MTX の曝露が影響を及ぼしているという過去の報告と一致した³⁴⁾。本研究では、HD-MTX 投与後 24 時間、48 時間、72 時間の MTX 血中濃度と MTX 投与量との間に有意な正の相関関係を認めた。さらに、MTX 血中濃度と肝機能検査値 (AST、ALT) において有意な正の相関関係を認めた。これらのことから、MTX 濃度の投与量が増えると MTX 血中濃度が上昇し、それに伴い、肝機能障害の発現を招く可能性が示唆された。実際に、肝機能障害群と非肝機能障害群の MTX の血中濃度を比較した結果、投与後 24 時間と 48 時間では、肝機能障害群が非肝機能障害群に比べて有意に血中濃度が高かった。MTX の肝機能障害の原因が MTX の曝露量に比例した肝細胞への直接的な細胞毒性作用による可能性を示しているという報告³⁴⁾ もあることから、HD-MTX 療法における肝機能障害の危険因子として、HD-MTX の投与量が抽出されたことは妥当であると考ええる。一方、MTX は主に腎臓から排泄される^{35,36)}。したがって、血漿中の MTX 濃度は腎機能の影響を受ける³⁷⁾。本研究では、両群間でクレアチニンクリアランスに有意な差が認められなかったことから、MTX の血漿中濃度の違いは腎機能の変化によるものではないことが示唆された。MTX 投与量の最適なカットオフ値は 10.2 g/m² であり、MTX 投与量が 10.2g/m² より大きいことが独立した危険因子であることが明らかになった。

このことは、JCOG0905（骨肉腫術後補助化学療法における Ifosfamide 併用の効果に関するランダム化比較試験実施計画書）プロトコールの HD-MTX レジメンの 19 歳以下の投与量に相当する。MTX の血中濃度が高い患者ほど予後が良好であることが報告されているが³⁸⁾、肝機能障害の発生には十分な注意を払う必要があると考える。

また、血清カルシウム濃度が骨肉腫患者の HD-MTX による肝機能障害の独立した危険因子であることが判明した。血清カルシウム濃度のカットオフ値は 9.3 mg/dL で、正常範囲内であったが、肝機能障害群では非肝機能障害群に比べて有意に高かった。骨肉腫の患者は正常範囲内ではあるものの、他の腫瘍の患者よりも血清カルシウム濃度が高いことが報告されている³⁹⁾。骨肉腫では、副甲状腺ホルモン関連蛋白（Parathyroid hormone-related protein: PTHrP）とその受容体（PTHR1）の過剰発現が、腫瘍の成長、進行、転移につながることを報告されているが、これは、乳がんや肺がん、軟骨肉腫、扁平上皮がん、メラノーマでも発現することが報告されている⁴⁰⁾。さらに、PTHrP は血清カルシウム濃度を上昇させ、尿中のカルシウムを排泄して骨吸収を促進することが報告されている⁴¹⁾。メラノーマの研究では、補正された血清カルシウム濃度は、進行した腫瘍ステージと正の相関があることを報告している⁴²⁾。また、補正カルシウム濃度が高いことについては、基準値を超えていた患者はわずかで（約 2%）、残りは正常範囲内で濃度が上昇していた（13%）ことが報告されている⁴²⁾。以上のことから、がんの進行に伴い血清カルシウム濃度が上昇し、正常範囲内高値である可能性が考えられる。本研究では、単変量解析において、肝機能障害群は非肝機能障害群に比べて、腫瘍のサイズが有意に大きかった。これらの結果から、肝機能障害群では進行したがん患者が多く、血清カルシウム濃度は高いが正常範囲内であった可能性が示唆される。一方、血清カルシウム濃度については、女性ホルモンであるエストロジオールが骨吸収を抑制し、血中のカルシウム濃度を上昇させることが知られている⁴³⁾。しかし、血清カルシウム濃度に関しては、性差がないという報告がある⁴⁴⁾。また、本研究対象の 88 コースについて男女による血清カルシウム濃度の違いについて調査した結果、血清カルシウム濃度については性差が認められなかった（結果、示さず）。以上のことから、危険因子として抽出されたカルシウム濃度は、女性ホルモンと関連している可能性は低いと考える。

本研究の限界として、第 1 に、後方視的な観察研究であることから、他の未知の因子がある可能性が挙げられる。第 2 に、本研究の結果は単一の施設に限られているた

め、結果の妥当性を確認するためには、さらなる大規模な研究が必要であると考え。第3に、本研究は術前化学療法に焦点を当てたものであり、術後化学療法についても検討する必要がある。最後に、肝臓に特異的に発現する有機アニオントランスポーターである OATP1B1 (Organic anion transporting polypeptide 1B1) をコードする *SLCO1B1* 遺伝子上の一塩基多型が MTX の薬物動態に影響を与えるという報告がある⁴⁵⁾。HD-MTX の体内動態に関する一塩基多型と肝機能障害との関係については、さらなる検討が必要であると考え。

以上のことから、HD-MTX 療法を受けている骨肉腫患者においては、女性、MTX 投与量 (10.2 g/m² より多いこと)、血清カルシウム濃度 (9.3 mg/dL より高いこと) が肝機能障害の危険因子であることが明らかになった。治療の際にこれらの因子を持っているかどうかを調査することにより、肝機能障害を予測できる可能性がある。また、これらの因子を既に持つ患者に対しては、HD-MTX による骨肉腫患者の肝機能障害を軽減するために、注意深くモニターする必要があると考えられる。本研究により、HD-MTX による骨肉腫患者の肝機能障害を予防し、肝機能障害の重症化を軽減するための重要な示唆を与えることができたと考え。これらの知見は、HD-MTX の安全性と治療マネジメントの改善に貢献できる可能性があることが示唆された。

一方、本研究では、GZ により MTX の血中濃度に影響を及ぼすという近年の *in vivo* での研究結果²⁵⁾をうけて、臨床における HD-MTX と GZ の併用の実態と併用による MTX 血中濃度の影響についての検証を行った。まず、併用の定義を検討した。HD-MTX は通常 day1 において 4~6 時間の点滴静注を行う。この点滴静注の間に、GZ を投与した例はわずかであった。また、GZ の経口薬が処方されている場合、MTX 点滴静注時に服用しているか不明であった。内服薬については患者自身が自己管理していることが多いため、GZ 含有製剤の内服薬であるグリチロン配合錠®を投与する場合は、患者自身のタイミングで内服しているため、正確な内服時間は評価できない。従って、day1 に GZ の処方歴がある場合については、服用時間の特定が困難であったため、その日の中で服用したものと仮定した。以上より、HD-MTX の投与日 day1 において GZ を注射製剤および経口製剤にて投与した例を併用投与とした。その結果、解析対象コース 88 コース中、GZ を併用していないコース (MTX 単独投与) は 75 コース、GZ と併用していたコース (MTX と GZ の併用) は 13 コースで全体の 14.8%であった。MTX 単独投与と MTX と GZ の併用において、MTX の血中濃度 (MTX 投与後 24 時間、48

時間、72 時間) に差が認められなかった。しかし、肝機能検査値において、72 時間後の AST 値に関して、MTX と GX の併用が MTX 単独に比べて高い傾向を示し、T-Bil 値においては投与 24 時間後で有意に高いことが認められた。以上、臨床における実態調査の結果、GX の併用により MTX の血中濃度に影響を及ぼしている可能性が低い
が、肝機能に影響を与える可能性が示唆された。上述のように、本調査において GZ の併用については MTX 投与との間隔が一律でないことも影響しているものと思われる。従って、GZ の併用が肝機能障害にどのように影響を与えているかについて、さらなる検討が必要である。

第二章

メトトレキサート大量療法時におけるグリチルリチンとの薬物動態学的相互作用に関する評価

1. 緒言

第一章では、骨肉腫患者を対象とした HD-MTX における肝機能障害発現要因の検討を行った結果、HD-MTX の投与量、女性、血清カルシウム値が危険因子である可能性が示唆された。一方、肝機能障害に対しては、治療目的に肝庇護剤としてグリチルリチン (GZ) [注射剤である強力ネオミノファーゲンシー[®]や経口剤であるグリチロン[®]配合錠]の投与を行っている場合が多い。GZ には、抗炎症作用や抗アレルギー作用があり²²⁾、肝機能の改善を目的とした肝臓疾患の治療や、そう痒症や蕁麻疹などの他の疾患の治療にも広く用いられている^{23,24)}。近年 *in vivo* 研究において、肝機能障害の治療目的に投与した GZ により MTX の血中濃度が上昇することが報告されている²⁵⁾。これらの報告を受け、第一章では、臨床における HD-MTX と GZ の併用の実態と併用による MTX 血中濃度の影響についての検証を行った。その結果、MTX の血中濃度に差が認められなかったが、肝機能検査値において影響を及ぼす可能性が示唆された。しかし、GZ と MTX との併用間隔が一律でないこともあり、GZ の併用が肝機能障害にどのように影響を与えているかについて、さらなる検討が必要である。GZ と MTX の薬物動態学的相互作用を研究した報告は上記の *in vivo* 研究があるが、MTX の投与量および投与経路が臨床での使用を反映していない²⁵⁾。さらに、MTX と GZ の併用間隔と MTX 血中濃度の関係、また、肝機能検査値にどのように影響を及ぼすかについては明らかとなっていない。

そこで、本章では臨床での使用状況を鑑み、HD-MTX における GZ との薬物動態学的相互作用についてラットを用いて検証した。またその上で、最適な GZ の投与方法について検討を行った。

2. 方法

2-1. 試薬

アセトニトリル、イソフルラン、クロロホルム、0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液は和光純薬株式会社より購入した。メトトレキサート水和物、グリチルリチンは東京化成工業株式会社より購入した。生理食塩液は株式会社 大塚製薬より購入した。

2-2. 動物及び薬物投与

Wistar 系雄性ラット (9 週齢) は三共ラボ株式会社より購入し、実験の前にラットを一晩絶食させたが、飲料水を自由に与えた。

薬物投与と群分けは以下のように行った。

2-2-1. HD-MTX の GZ との同時投与における薬物動態学的相互作用の検討

ラットをコントロール群、MTX 単独投与群および MTX と GZ の同時投与群に群分けした。イソフルラン麻酔下、コントロール群では生理食塩液を急速静脈内投与後、生理食塩液+少量の 0.5 M NaOH (pH 7.06 に調製) を翼状針を用いて 10 分間静脈内投与した。MTX 単独投与群では生理食塩液を急速静脈内投与後、MTX (500 mg/kg、1,000 mg/kg) を翼状針を用いて 10 分間静脈内投与した。MTX と GZ の同時投与群では GZ 100 mg/kg を急速静脈内投与後、MTX (500 mg/kg、1,000 mg/kg) を翼状針を用いて 10 分間静脈内投与した。

2-2-2. HD-MTX の GZ との投与間隔と薬物動態学的相互作用の検討

ラットをコントロール群、MTX 単独投与群、GZ+MTX 同時投与群及び GZ+MTX 併用投与群 (GZ3 h 前投与群、GZ6 h 前投与群、GZ24 h 前投与群) に群分けした。イソフルラン麻酔下、コントロール群では生理食塩液を急速静脈内投与後、生理食塩液を 10 分間かけて静脈内投与した。MTX 単独投与群、GZ+MTX 同時投与群では生理食塩液、GZ (100 mg/kg) をそれぞれ急速静脈内投与後、MTX (2,000 mg/kg) を 10 分間かけて静脈内投与した。GZ+MTX 併用投与群では、MTX 投与 3, 6, 24 時間前にそれぞれ GZ を急速静脈内投与した。

2-3. 血漿サンプル採取

血中濃度測定時には、頸静脈から約 0.35 mL ずつ経時的に採血を行った (MTX 投与 1 分、30 分、1 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間後)。肝機能測定時には、頸静

脈から約 0.80 mL ずつ採血を行った (MTX 投与前、MTX 投与 4 時間、6 時間、8 時間、24 時間後)。採取した血液試料を遠心分離 (4°C、11,000×g、10 分)後、血漿を採取し、-30°Cで保存した。

2-4. 血漿中の MTX の定量

採取した血漿 150 μ L にアセトニトリル 300 μ L を加えた。混合物を 30 秒 vortex した後、遠心分離 (4°C、11,000×g、3 分)し、上清を 350 μ L 分取した。分取した上清にクロロホルムを 300 μ L 加え、液-液抽出を行った。上層 50 μ L を高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography:HPLC) に注入した。

2-5. HPLC 分析

HPLC は、送液ポンプに JASCO PU-4180、オートサンプラーに AS-4050 およびカラムオーブンに CO-4060 を使用した (いずれも日本分光製)。分離カラムは Poroshell 120 EC-C18 (3.0 mm×75 mm, 2.7 μ m)、ガードカラムは ODS-HG (4.0×10 mm guard column NOMURA CHEMICAL) を用いた。移動相は 80 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) : アセトニトリル=88.8 : 11.2 v/v を用いた。カラム温度は 25 °C、流速 0.4 mL/min、注入量 20 μ L とし、紫外検出器 (UV 波長 305 nm) にて検出を行った。これらの設定は ChromNAV で行った。

2-6. 肝機能検査

得られた血漿から、血液学的検査 (AST、ALT、T-Bil)) を実施した。血液学的検査は、SRL 株式会社に依頼した。

2-7. データ解析

HPLC 測定によって得られた検量線から MTX 血中濃度を算出し、血中濃度曲線を作成した。また、2-コンパートメントモデルに従って以下の薬物動態 (Pharmacokinetics : PK) パラメータを算出した。血中初期薬物濃度 (Drug concentration at time 0: C_0)、中央区画の分布容積 (Volume of the central compartment : V_c)、 β 相における分布容積 (Volume of distribution at β phase : V_β)、定常状態における分布容積 (Volume of distribution at steady-state : V_{ss})、 α 相における半減期 (Elimination half-life of α phase :

$t_{1/2\alpha}$)、 β 相における半減期 (Elimination half-life of β phase: $t_{1/2\beta}$)、血中濃度時間曲線下面積 (Area under the concentration-time curve : AUC)、全身クリアランス (Total clearance : CL_t)。

統計解析は、HD-MTX の GZ との同時投与における薬物動態学的相互作用の検討においては、コントロール群、MTX 単独投与群および MTX と GZ の同時投与群における各種パラメータ (血中濃度、PK パラメータ、肝機能検査値) の比較を行った。パラメータの比較は、 t 検定にて実施した。HD-MTX の GZ との投与間隔と薬物動態学的相互作用の検討においては、一元配置の分散分析 (Analysis of variance : ANOVA) 後、Dunnnett 検定を実施し、各群における各種パラメータの比較を行った。有意水準は 0.05 および 0.01 未満とした。

3. 結果

3-1. HD-MTX の GZ との同時投与における薬物動態学的相互作用の検討

3-1-1. MTX 血中濃度推移および PK パラメータの比較

MTX 単独投与群 (500 mg/kg) および MTX (500 mg/kg) と GZ 100 mg/kg の同時投与群の血中濃度推移について下記に示す。同時投与群は単独投与群と比べて、投与 1、4 時間後において血中濃度の有意な上昇 (10 倍以上) が認められた (投与 1 時間後 : MTX 単独投与群 $116 \pm 18 \mu\text{M}$ 、同時投与群 $299 \pm 67 \mu\text{M}$, $p < 0.05$ 、投与 4 時間後 : MTX 単独投与群 $1.49 \pm 0.44 \mu\text{M}$ 、同時投与群 $38 \pm 6.2 \mu\text{M}$, $p < 0.05$)。PK パラメータについては、同時投与群は単独投与群と比べて、 V_β (MTX 単独投与群 $2130 \pm 225 \text{ mL/kg}$ 、同時投与群 $998 \pm 404 \text{ mL/kg}$, $p = 0.01$) と CL_t (MTX 単独投与群 $26 \pm 3.32 \text{ mL/min} \cdot \text{kg}$ 、同時投与群 $13.1 \pm 4.5 \text{ mL/min} \cdot \text{kg}$, $p = 0.01$) の有意な低下が認められた。同時投与群は、MTX 単独投与群に比べて、有意差はないが $t_{1/2\alpha}$ が長い傾向にあった (MTX 単独投与群 12 ± 1.6 分、同時投与群 23 ± 21.1 分, $p = 0.37$)。

MTX 単独投与群 (1000 mg/kg) および MTX (1000 mg/kg) と GZ 100 mg/kg の同時投与群の血中濃度推移について下記に示す。同時投与群は単独投与群と比較して、投与 1、4、6 時間投与後において血中濃度の有意な上昇が認められた (投与 1 時間後 : MTX 単独投与群 $411 \pm 96 \mu\text{M}$ 、同時投与群 $634 \pm 89 \mu\text{M}$, $p < 0.05$ 、投与 4 時間後 :

MTX 単独投与群 $4.16 \pm 2.48 \mu\text{M}$ 、同時投与群 $109 \pm 27 \mu\text{M}$, $p < 0.05$ 、投与 6 時間後 :
MTX 単独投与群 $1.24 \pm 0.85 \mu\text{M}$ 、同時投与群 $65 \pm 37 \mu\text{M}$, $p < 0.05$)。PK パラメータ
については、同時投与群は単独投与群と比べて、 CL_t が有意に低下し (MTX 単独投
与群 $20 \pm 1.3 \text{ mL/min} \cdot \text{kg}$ 、同時投与群 $12 \pm 0.4 \text{ mL/min} \cdot \text{kg}$, $p < 0.01$)、 AUC_∞ が有
意に上昇した (MTX 単独投与群 $826 \pm 52 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 、同時投与群 $1437 \pm 54 \mu\text{g} \cdot$
 h/mL , $p < 0.01$)。

3-1-2. 肝機能検査値 (AST、ALT、T-Bil) の比較

MTX (500 mg/kg、1,000 mg/kg) 単独投与群及び MTX (500 mg/kg、1,000 mg/kg) と
GZ 100 mg/kg 同時投与群の肝機能検査値の推移について下記に示す。MTX 500 mg/kg
において、同時投与群は単独投与群と比べて、AST 値は 4、6、8 時間後 (投与 4 時間
後 : $84 \pm 4.4 \text{ U/L}$ vs $376 \pm 99.9 \text{ U/L}$, $p < 0.05$ 、投与 6 時間後 : $79 \pm 4.4 \text{ U/L}$ vs $542 \pm 280 \text{ U/L}$,
 $p < 0.05$ 、投与 8 時間後 $76 \pm 5.2 \text{ U/L}$ vs $427 \pm 201 \text{ U/L}$, $p < 0.05$)、ALT 値は 4、6、8、24
時間後 (投与 4 時間後 : $55 \pm 5.0 \text{ U/L}$ vs $243 \pm 31.9 \text{ U/L}$, $p < 0.05$ 、投与 6 時間後 : $48 \pm$
 2.4 U/L vs $331 \pm 54.7 \text{ U/L}$, $p < 0.05$ 、投与 8 時間後 : $43 \pm 2.4 \text{ U/L}$ vs $258 \pm 43.2 \text{ U/L}$, $p <$
 0.05 、投与 24 投与後 : $43 \pm 7.0 \text{ U/L}$ vs $72 \pm 15.4 \text{ U/L}$, $p < 0.05$)、T-Bil 値は投与 4、6 時間
後 (投与 4 時間後 : $0.04 \pm 0.01 \text{ mg/dL}$ vs $0.28 \pm 0.12 \text{ mg/dL}$, $p < 0.05$ 、投与 6 時間後 : 0.02
 $\pm 0.01 \text{ mg/dL}$ vs $0.09 \pm 0.04 \text{ mg/dL}$, $p < 0.05$) に有意な上昇が認められた。また、MTX
1,000 mg/kg において、AST 値は 6、8 時間後 (投与 6 時間後 : $88 \pm 7.7 \text{ U/L}$ vs $1301 \pm$
 705.5 U/L , $p < 0.05$ 、投与 8 時間後 : $86 \pm 9.3 \text{ U/L}$ vs $1157 \pm 623.8 \text{ U/L}$, $p < 0.05$)、ALT 値
は投与 4、6、8 時間後 (投与 4 時間後 : $59 \pm 4.5 \text{ U/L}$ vs $595 \pm 243 \text{ U/L}$, $p < 0.05$ 、投与 6
時間後 : $52 \pm 3.6 \text{ U/L}$ vs $743 \pm 329 \text{ U/L}$, $p < 0.05$ 、投与 8 時間後 : $46 \pm 2.7 \text{ U/L}$ vs 684 ± 334
 U/L , $p < 0.05$)、T-Bil 値は投与 4、24 時間後 (投与 4 時間後 : $0.03 \pm 0.01 \text{ mg/dL}$ vs $0.47 \pm$
 0.10 mg/dL , $p < 0.05$ 、投与 24 時間後 : $0.03 \pm 0.001 \text{ mg/dL}$ vs $0.07 \pm 0.01 \text{ mg/dL}$, $p < 0.05$)
に有意な上昇が認められた。

どちらの用量においても、同時投与群における MTX の血中濃度上昇とほぼ同時間
に、AST 値、ALT 値、T-Bil 値の上昇が認められた。また、同時投与群における AST
値、ALT 値及び T-Bil 値は、1,000 mg/kg が 500 mg/kg と比べてそれぞれ約 2.5 倍、約 2
倍、約 1.5 倍に上昇した。

3-2. HD-MTX の GZ との投与間隔と薬物動態学的相互作用の検討

3-2-1. MTX 血中濃度推移および PK パラメータの比較

MTX (2000 mg/kg) と GZ (100 mg/kg) の同時投与群は MTX 単独投与群 (2000 mg/kg) と比べ、投与 4 時間後以降の MTX 血中濃度において、有意な上昇が認められた (投与 4 時間後 : MTX 単独投与群 $25.5 \pm 30.9 \mu\text{M}$ 、同時投与群 $182.5 \pm 21.3 \mu\text{M}$, $p < 0.01$ 、投与 6 時間後 : MTX 単独投与群 $5.01 \pm 3.49 \mu\text{M}$ 、同時投与群 $90.0 \pm 5.09 \mu\text{M}$, $p < 0.01$ 、投与 8 時間後 : MTX 単独投与群 $3.25 \pm 2.07 \mu\text{M}$ 、同時投与群 $54.0 \pm 8.97 \mu\text{M}$, $p < 0.01$)。また、GZ+MTX 併用投与群においては、MTX 単独投与群と比較した際、GZ3 h 前投与群のみ、投与 4, 6 時間後の MTX 血中濃度に有意な上昇が認められた (投与 4 時間後 : MTX 単独投与群 $25.5 \pm 30.9 \mu\text{M}$ 、併用投与群 $60.0 \pm 5.22 \mu\text{M}$, $p < 0.01$ 、投与 6 時間後 : MTX 単独投与群 $5.01 \pm 3.49 \mu\text{M}$ 、併用投与群 $11.0 \pm 2.334 \mu\text{M}$, $p < 0.01$)。GZ6 h 前投与群、GZ24 h 前投与群においては、MTX 単独投与群と比較した際、有意な差は認められなかった。

PK パラメータについては、GZ+MTX 同時投与群は単独投与群と比べて、 $t_{1/2\beta}$ の有意な延長 (MTX 単独投与群 44.47 ± 3.808 分、同時投与群 84.33 ± 2.250 分, $p < 0.01$)、 CL_t の有意な低下 (MTX 単独投与群 $18.16 \pm 4.984 \text{ mL/min} \cdot \text{kg}$ 、同時投与群 $10.94 \pm 0.542 \text{ mL/min} \cdot \text{kg}$, $p < 0.05$)、及び AUC の有意な上昇 (MTX 単独投与群 $1929 \pm 517.9 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 、同時投与群 $3053 \pm 155.5 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$, $p < 0.01$) が認められた。また、MTX 単独投与群と比較し、GZ3 h 前投与群では $t_{1/2\beta}$ の有意な延長が認められた (MTX 単独投与群 44.47 ± 3.808 分、併用投与群 60.64 ± 2.595 分, $p < 0.01$)。血中濃度推移同様、GZ6 h 前投与群と GZ24 h 前投与群においては、MTX 単独投与群との有意差は認められなかった。

3-2-2. 肝機能検査値 (AST、ALT、T-Bil) の比較

MTX (2,000 mg/kg) 単独投与群、MTX (2,000 mg/kg) と GZ (100 mg/kg) 同時投与群および MTX (2,000 mg/kg) と GZ (100 mg/kg) 併用投与群 (GZ を 3 時間前投与、GZ を 6 時間前投与、GZ を 24 時間前投与) における肝機能検査値の推移について

下記に示す。

各群の肝機能検査値（AST、ALT、T-Bil）の時間推移について、MTX 単独投与群において、AST、ALT 値は、投与 4 時間後に一過性の上昇が認められ、コントロール群に比べそれぞれ約 2.7 倍、2.8 倍上昇した。

また、GZ+MTX 同時投与群と GZ3 h 前投与群は MTX 単独投与群と比較した際、全肝機能検査値（AST、ALT、T-Bil）の有意な上昇が認められた。AST 値においては、両群とも MTX 投与 8 時間後に最も高い値を示し、MTX 単独投与群と比較した際、GZ+MTX 同時投与群では約 90 倍、GZ3 h 前投与群では約 65 倍上昇した。ALT 値においては、両群とも MTX 投与 6 時間後に最も高い値を示し、MTX 単独投与群と比較した際、GZ+MTX 同時投与群では約 70 倍、GZ3 h 前投与群では約 55 倍上昇した。T-Bil 値においては、両群とも MTX 投与 8 時間後に最も高い値を示し、MTX 単独投与群と比較した際、GZ+MTX 同時投与群では約 40 倍、GZ3 h 前投与群では約 35 倍上昇した。

一方、GZ6 h 前投与群と GZ24 h 前投与群においては、MTX 誘発性肝機能障害を軽減させる傾向が示された。実際に MTX 投与 4 時間後の肝機能検査値（AST、ALT）を MTX 単独投与群と比較した際、GZ6 h 前投与群においては、それぞれ約 0.6 倍、0.4 倍に低下した。GZ24 h 前投与群においては、両値とも約 0.6 倍に低下した。

4. 考 察

本章では、ヒトでの HD-MTX に相当する投与量および投与経路に鑑み、HD-MTX における GZ との薬物動態学的相互作用の評価についてラットを用いて検討した。その結果、GZ の同時投与により、MTX の血中濃度の上昇と、それに伴い、肝機能検査値の上昇が認められた。本来肝機能障害の治療目的で投与される GZ により、むしろ肝機能障害の悪化を引き起こしてしまう可能性が示唆された。一方、GZ と MTX を適切な投与間隔で投与することで、相互作用を回避し、GZ 本来の肝保護作用を示すことが確認された。

GZ と MTX の薬物動態学的相互作用に関する *in vivo* 研究の報告²⁵⁾はある。しかし、この報告では、経口投与でありかつ MTX の投与量が 5 mg/kg と低用量(5~25 mg/週)あることから、関節リウマチの臨床使用を想定していた^{46,47)}。そこで、本研究では、とくに、ヒトでの HD-MTX に相当する投与量および投与経路を反映するように実験を行った。HD-MTX のヒトでの臨床用量は、8~12 g / m² である。言い換ると、MTX の投与量は、骨肉腫患者における HD-MTX の臨床用量は週に 100~300 mg/kg となる^{48,49)}。今回のラットへの投与量は、ヒトとラットの投与量を換算する式である以下のアロメトリック式(※)を用いて算出した⁵⁰⁾。

※ヒト等価用量 (Human equivalent dose: HED) (mg/kg) = animal dose (mg/kg) ÷ 6.2
MTX の臨床用量である 100~300 mg/kg をヒト等価用量 (HED) に代入すると、animal dose は 620~1860 mg/kg となる。また、臨床において 315 mg/kg の用量で用いられている症例があることを考慮すると、今回ラットに投与した MTX 用量 (500mg/kg, 1,000 mg/kg と 2,000 mg/kg) が算出した用量範囲にほぼ含まれた。今回の MTX 投与量はヒトでの HD-MTX に概ね相当する用量であることと言える⁵¹⁾。また、GZ (100 mg/kg) の投与量についても臨床での用量に相当する報告がある⁵²⁾。従って、今回用いた HD-MTX および GZ の投与量は妥当であると考ええる。

まず、HD-MTX の GZ との同時投与における薬物動態学的相互作用について検討を行った。MTX 500 mg/kg において、同時投与群は、MTX 単独投与群に比べて、V_β と CL_t が有意に低かった。MTX 1,000 mg/kg において、同時投与群は単独投与群と比べて、CL_t が有意に低下し、AUC_∞が有意に上昇した。これらの結果から、GZ が MTX の薬物動態に影響を及ぼし、MTX の排泄が遅延している可能性が示唆された。さらに、

同時投与群においては、MTX の血中濃度上昇とほぼ同時に、肝機能検査値 AST、ALT、T-Bil の上昇が認められた。このことは、本来、肝機能障害の治癒目的で投与された GZ により、むしろ肝障害の悪化を引き起こす可能性が示唆された。この研究は、HD-MTX の臨床での投用量を反映した、ラットにおける MTX と GZ の薬物動学的相互作用を検証した初めての研究である。第一章では、臨床における HD-MTX と GZ の併用の実態と併用による MTX 血中濃度の影響についての検証を行った。その結果、MTX の血中濃度に差が認められなかったが、肝機能検査値において影響を及ぼす可能性が示唆された。しかし、診療録を用いた後方視的調査により、GZ 含有の強力ネオミノファーゲンシー®と HD-MTX の併用により MTX の排泄遅延に関連することが報告されている⁵³⁾。今回のラットを用いた薬物動態相互作用の結果は、過去の報告を支持するものと言える。

GZ との同時投与により MTX の血中濃度上昇が認められた。MTX は肝臓ではほとんど代謝されず、主な排泄経路は腎排泄であり、わずかに胆汁中に排泄される。MTX の排泄には ABC トランスポーターファミリーに属する Breast cancer resistance protein 1 (BCRP1) や、Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) などの複数のトランスポーター関与が示唆されている^{54,55)}。また、HD-MTX における胆汁排泄率は 7%であり、胆汁排泄トランスポーターである MRP2 を介して排泄されると報告されている⁵⁶⁾。さらに、GZ は MRP2 を阻害することが報告されており、その結果、MTX の排泄を阻害している可能性が示唆される²⁵⁾。これらのことから、MTX の投与量増加に伴って胆汁排泄が低下し、GZ との相互作用が顕著に発現したと考えられる。さらに、GZ の代謝物であるグリチルレチン酸 (Glycyrrhizic acid : GA) は BCRP1 と MRP2 を阻害することが報告されている²⁵⁾。そのため GZ のみならず、GA が MTX の胆汁排泄を阻害し、毒性を高める可能性があると考えられる。上述の HD-MTX における胆汁排泄率の 7%についてはヒトでのデータであるが、ラットにおける MTX の胆汁排泄率は約 50%と報告している先行研究もある^{56,57)}。そのため、MTX の薬物動態においてはヒトとラットにて種差がある可能性が考えられる。したがって、本研究において、ラットを用いた動物モデルがヒトの状況を反映しているとは限らないことに留意する必要がある。

AST、ALT、T-Bil などの肝機能検査値の増加は、MTX と GZ の併用による MTX の血中濃度の上昇とほぼ同時期に認められた。MTX と GZ の同時併用投与により、MTX

の CL_t の減少と AUC_{∞} の増加をもたらし、その結果として、MTX の曝露量と平均滞留時間を増加させ、肝機能障害が顕著に引き起こされる可能性が示唆された。高濃度の MTX が、毒性のリスク増加と関連することが報告されている⁵⁸⁾。MTX による肝機能障害において、AST および ALT の上昇は AUC に相関することが報告されている⁵⁹⁾。また、過去の報告では、MTX の肝機能障害は、MTX の曝露量に相関があることが報告されている^{34,60)}。本研究において、同時投与群における AST 値、ALT 値及び総ビリルビン値は、1,000 mg/kg が 500 mg/kg と比べてそれぞれ約 2.5 倍、約 2 倍、約 1.5 倍に上昇した。これらの結果から、MTX の曝露量が肝機能検査値の上昇に関与していることが示唆され、過去の研究結果と一致した。しかし、MTX の曝露量である AUC の上昇と肝機能検査値の上昇の関連については、MTX の投与量が 500 mg/kg から 1,000 mg/kg では相関がみられる見られる傾向であるが、1,000 mg/kg から 2,000 mg/kg の MTX 投与量においては、AUC の上昇幅以上に AST 等の肝機能検査値の上昇がみられ、相関は見られなかった。以上より、MTX 曝露量の増大といった薬物動態学的な原因以外に、他の原因が存在する可能性が示唆された。

同時投与の研究において、MTX の濃度推移は投与後 8 時間まで経過を追ったが、肝機能検査値は投与後 24 時間まで経過を追った。肝機能検査値の経過を長く観察することで、興味深いことに、肝機能検査値の上昇は一時的で可逆的な結果であることが示された。これらの結果は、臨床における所見と一致しており、肝機能検査値の上昇があったとしても MTX の用量変更や中止により改善し、慢性的な肝疾患を引き起こさないことを示唆している^{17,18)}。

次に、HD-MTX の GZ との投与間隔と薬物動態学的相互作用について検討を行った。この実験においては、ラットをコントロール群、MTX 単独投与群、GZ+MTX 同時投与群及び GZ+MTX 併用投与群 (GZ3 h 前投与群、GZ6 h 前投与群、GZ24 h 前投与群) に群分けした。MTX の投与量は 2,000 mg/kg と設定し、同時投与の投与量である 500 mg/kg や 1,000 mg/kg よりも増やした。その理由としては、本来の GZ の肝保護作用を検証するために、MTX 単独投与にて肝機能障害が起こるような投与量設定とした。なお、MTX の投与量、2,000 mg/kg については、上述のように、ヒトでの HD-MTX に概ね相当する用量であることと言える。

MTX 単独投与群と比較した際、GZ+MTX 同時投与群と GZ3 h 前投与群において、MTX の血中濃度が有意に上昇し、それに伴い肝機能検査値の上昇が認められた。GZ3

h 前投与群においても、本来肝障害の治療目的で投与される GZ により、むしろ肝障害の悪化を引き起こす可能性が示された。また、この結果から MTX の高い血中濃度が肝障害の危険因子になり得ることが示唆される。

一方で、GZ6 h 前投与群と GZ24 h 前投与群においては、MTX の排泄遅延は確認されず、MTX 誘発性肝機能障害を軽減させる傾向が示された。このことから、GZ と MTX は適切な投与間隔で投与することで相互作用を回避し、GZ 本来の肝保護作用を示すことが確認された。

GZ の薬理活性の本体は代謝物である GA とされている。本研究の投与量同様の GZ (100 mg/kg) をラットへ単独で静脈内投与した際、GA は GZ に比べ極めて低い濃度であるが GZ 投与 30 分後から検出され、その後は腸肝循環を受けながら GZ 投与 50 時間後まで、概ね一定の濃度を保つことが報告されている⁶¹⁾。本研究結果より、GZ 投与 3 時間以内は、GZ の血中濃度が高く GA の肝細胞膜保護作用よりも GZ と MTX の相互作用が強く現れ、一方で GZ 投与 6 時間後以降は、GZ の血中濃度の低下により、GZ と MTX の相互作用よりも GA による肝細胞膜保護作用が強く働くと考えられる (Fig. 2-1)。また、ラットに GZ (100 mg/kg) を単独で静脈内投与した際の GZ の半減期は 4.68 時間と報告されている⁶²⁾。GZ の半減期経過前に MTX が投与された GZ3 h 前投与群では相互作用が生じたが、GZ の半減期経過後に MTX が投与された GZ6 h 前投与群や GZ24 h 前投与群では相互作用が回避された。このことから GZ の半減期は両薬物の最適な投与間隔を決める際の一つの指標になり得ると示唆される。

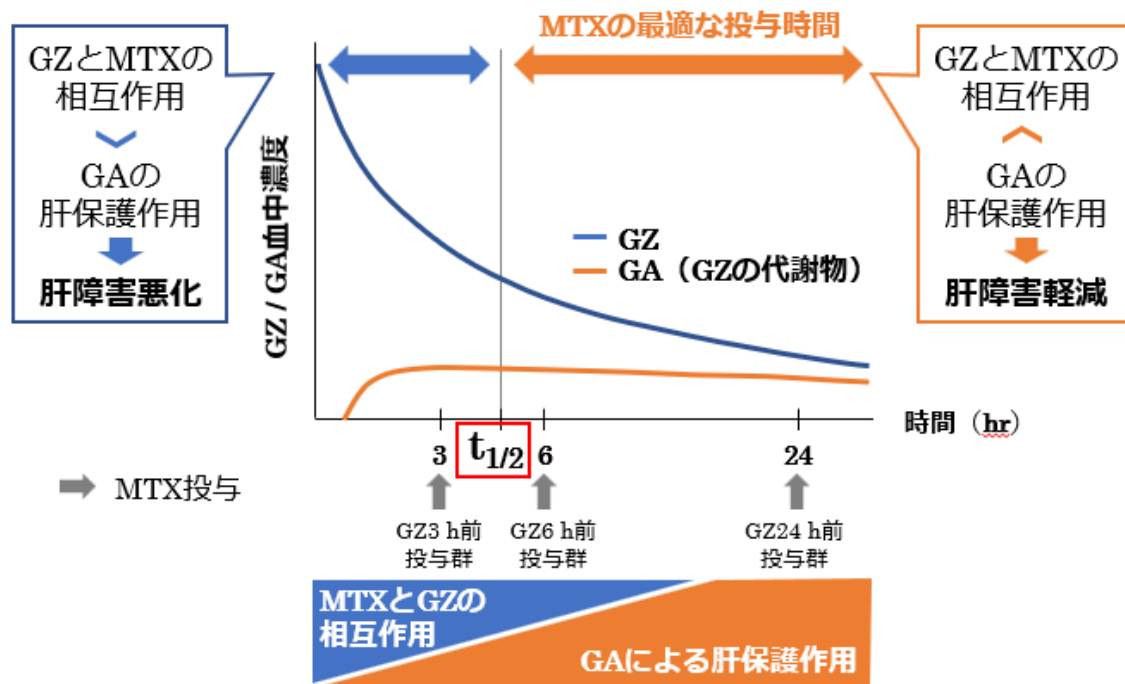


Fig. 2-1 GZ (100 mg/kg) 静脈内投与後の GZ および代謝物のグリチルレチン酸 (GA) における血漿中濃度-時間推移の模式図

上記の仮説を元に、臨床への適応について検討する。ヒトへ強力ネオミノファーゲンシー (GZ80 mg 含有) 投与時の GZ と GA の血中濃度推移を Fig. 2-2 に示す。ヒトへ GZ (80 mg) を投与した際の半減期は約 8-10 時間と報告されている。また、GA は GZ 投与後約 6 時間後に血中に出現し、約 24 時間後にピークに達した後、48 時間後にはほとんど消失することが報告されている⁶³⁾。これらの報告を踏まえ、臨床では、MTX 投与 10-24 時間前に GZ を投与することで、相互作用の回避と肝保護効果が期待できるのではないかと考える。

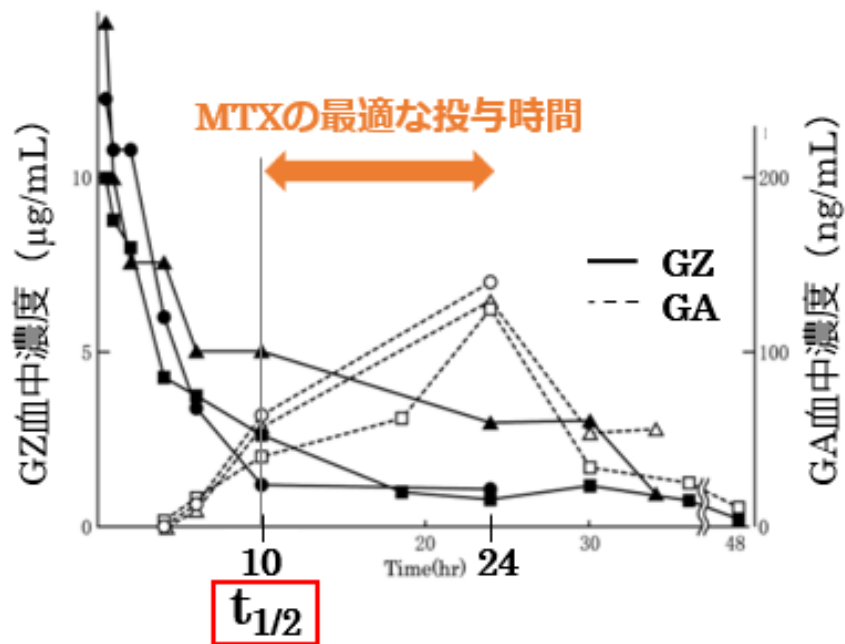


Fig. 2-2 グリチルリチン含有製剤「強力ネオミノファーゲン C」40mL (GZ 80mg 含有) 静脈内投与後のヒトにおけるグリチルリチン (GZ) およびグリチルレチン酸 (GA) の血漿中濃度-時間推移

(強力ネオミノファーゲンシー®のインタビューフォームより引用し一部改変)

以上のことから、骨肉腫患者において、GZ と MTX を併用する際は、投与間隔によっては肝障害がさらに悪化する可能性があるため、肝機能検査値の変動をより注視する必要があると考える。また、相互作用を回避し、GZ 本来の肝保護作用を期待するためには、GZ と MTX は適正な投与間隔で投与する必要があると考える。本研究は、臨床における GZ と MTX の適正な投与間隔を検討するための一助となると考える。

総 括

本論文では、骨肉腫患者を対象とした HD-MTX による肝機能障害の予防および副作用軽減を目的として、骨肉腫患者における HD-MTX の肝機能障害の危険因子の解明と HD-MTX における GZ との薬物動態学的相互作用から、GZ の適切な使用方法を検証した。

第一章では、病院診療録を用いた肝機能障害発現の危険因子の探索として、骨肉腫患者を対象に HD-MTX における肝機能障害の危険因子について検討した。その結果、HD-MTX 療法を受けている骨肉腫患者においては、女性、MTX 投与量 (10.2g/m^2 より多い)、血清カルシウム濃度 (9.3mg/dL より高い) が肝機能障害の危険因子であることが明らかになった。また、これら危険因子の数が増えるほど、肝機能障害の発生割合が高くなることが明らかになった。

第二章では、HD-MTX と肝機能障害時に予防薬または治療薬として使用される GZ との薬物動態学的相互作用を明らかにするために、ラットを用いた GZ の MTX への体内動態への影響を検討した。その結果、MTX 単独投与群と比較した際、GZ+MTX 同時投与群と GZ3 h 前投与群において、MTX の血中濃度が有意に上昇し、それに伴い肝機能検査値の上昇が認められた。このことから本来肝機能障害の治療目的で投与される GZ により、むしろ肝機能障害の悪化を引き起こす可能性が示された。一方で GZ6 h 前投与群と GZ24 h 前投与群においては、MTX の排泄遅延は確認されず、MTX 誘発性肝機能障害を軽減させる傾向が示された。このことから、GZ と MTX は適切な投与間隔で投与することで相互作用を回避し、GZ 本来の肝保護作用を示すことが確認された。

本論文では、骨肉腫患者における HD-MTX の肝機能障害の危険因子および HD-MTX による肝機能障害で使用される GZ の適切な投与方法を明らかとした。Fig.1 に HD-MTX における肝機能障害発症要因の検討および対策に関する研究の成果を示す。

今後の検討課題として、骨肉腫患者における HD-MTX の肝機能障害の危険因子の結果では、術前化学療法に焦点を当てたものであり、術後化学療法についても検討する必要がある。また、HD-MTX と肝機能障害時に予防薬または治療薬として使用される GZ との併用における薬物動態作用の結果については、臨床のデータにおいて GZ の適切な投与間隔が HD-MTX における肝機能障害を軽減するか検証する必要がある。

本研究結果を踏まえて、HD-MTX 療法時における肝機能障害軽減に向けた対策を Fig.2 に示す。現在までに、HD-MTX 投与後の肝機能障害の発現は予測不可能であり、GZ を予防的あるいは肝障害発現後に投与を行っている。GZ 投与方法が定まっていないため、MTX と GZ の薬物動態学的相互作用に影響し、肝機能障害の悪化の可能性が考えられる。そこで、本研究成果により、骨肉腫患者が HD-MTX 療法を施行する際は、第 1 に①HD-MTX の初回投与前に肝機能障害の危険因子を確認することが大切である。このことにより肝機能障害が発現する可能性のある患者を事前に把握することができる。次に、②GZ の投与方法を検討する。まず、危険因子をもつ患者では、GZ を MTX と 10 時間以上（半減期以上）の間隔をあけて予防投与する。一方、危険因子をもたない患者では、HD-MTX 投与後の肝機能をモニターし、肝機能障害が発現した際は、GZ を MTX と 10 時間以上（半減期以上）あけて治療投与することを推奨する。

肝機能障害発現の把握及び GZ の適切な投与方法である上記対策を今後提案し、症例の蓄積及び検証後、院内レジメン（投与計画書）に反映させ HD-MTX の安全性と治療マネジメント向上を目指していきたい。

以上により、本研究成果により、骨肉腫患者における HD-MTX の肝機能障害を予測し、これらの危険因子を持つ患者に対しては、十分なモニタリングによる対策が可能となった。また、HD-MTX の肝機能障害時に使用される GZ を適切な時間に予防的投与することで MTX の肝機能障害の発現を阻止できる可能性が明らかとなった。これらの成果は、HD-MTX の安全性と治療マネジメントの改善に貢献できると考える。

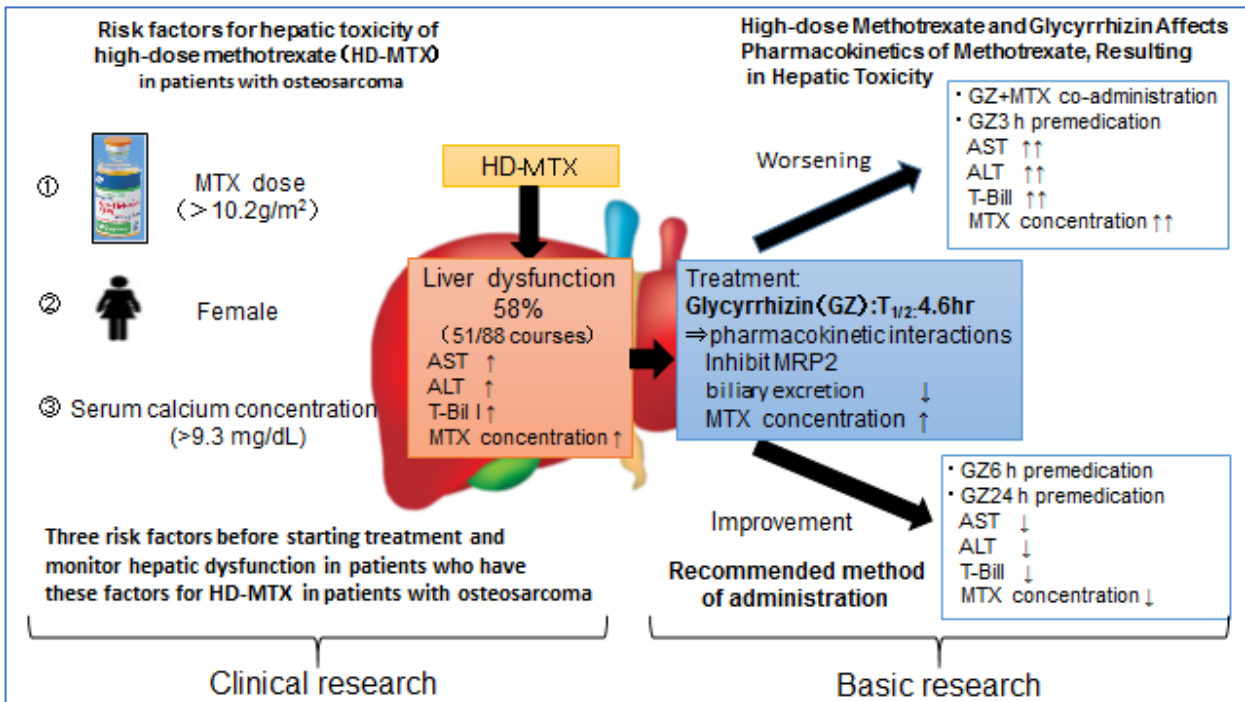
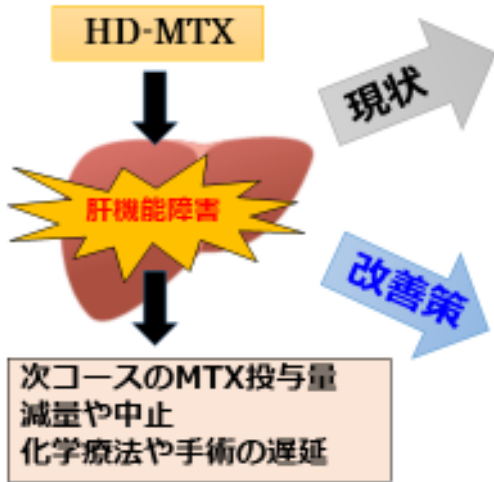


Fig.1 メトトレキサート大量療法時における肝機能障害発症要因の検討および対策に関する研究

HD-MTX療法時における肝機能障害軽減に向けた対策



- ① HD-MTX投与後の肝障害発現は予測不可能
- ② 予防的あるいは肝障害発現後GZ投与
しかし、GZ投与方法が定まっていない
MTXとGZの相互作用に影響し、
肝障害の悪化の可能性もある
A施設：MTX投与24時間後の採血で
肝機能障害を確認後、GZを投与
B施設：MTX点滴終了後にGZを同時投与

- ① 初回投与前に肝機能障害の危険因子を確認
⇒発現可能性のある患者を把握できる
- ② GZの投与方法を設定する
⇒MTXとGZの相互作用を回避できる
- 1) 危険因子をもつ患者
GZをMTXと10時間以上（半減期以上）の
間隔をあけて予防投与
- 2) 危険因子をもたない患者
HD-MTX投与後の肝機能をモニターし、
肝機能障害が発現した際は、GZをMTXと
10時間以上（半減期以上）あけて治療投与

本対策『肝機能障害発現の把握及びGZの適切な投与方法』を今後提案し、症例の蓄積及び検証後、院内レジメン(投与計画書)に反映させHD-MTXの安全性と治療マネジメント向上を目指す

Fig.2 メトトレキサート大量療法時における肝機能障害軽減に向けた対策

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、東京理科大学薬学部 宮崎智教授に深甚なる感謝の意を表しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究に関する有益なご指導とご助言をいただきました、東京理科大学薬学部 真野泰成准教授、河野洋平嘱託特別講師、前田絢子助教に謹んで感謝の意を表します。

研究の遂行にあたりまして、多大なご指導とご助力をいただきました、国立がん研究センター中央病院骨軟部腫瘍科 岩田慎太郎先生、小林英介先生、国立がん研究センター中央病院腫瘍内科 下井辰徳先生に厚く御礼申し上げます。

本論文作成にあたり、有益なるご助言ならびにご校閲を賜りました、東京理科大学薬学部 秋本和憲教授、西川元也教授、横山英志准教授に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、丁寧なご助言および多大なご協力をいただきました、国立がん研究センター中央病院薬剤部 古川哲也薬剤部長、橋本浩伸副薬剤部長、がん研有明病院薬剤部 山口正和薬剤部長に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究を遂行するにあたり、ご助言、ご協力を頂きました東京理科大学薬学部臨床薬剤情報学研究室 日暮司氏、石津拓氏、高橋実央氏および学生の皆様に心から感謝の意を表します。

また、公私にわたり温かいご指導、ご助言、ご協力を頂きました国立がん研究センター中央病院薬剤部の諸先生方に深く感謝致します。

最後に、温かく見守ってくれた諸先輩、後輩の皆様方、ならびにいつも支えとなってくれた家族に心から感謝致します。

論文目録

メトトレキサート大量療法時における肝機能障害発症要因の検討および対策に関する研究

主論文を構成する論文

1. Concomitant Use of High-dose Methotrexate and Glycyrrhizin Affects

Pharmacokinetics of Methotrexate, Resulting in Hepatic Toxicity

(メトトレキサート大量療法とグリチルリチン併用時の薬物動態および肝機能障害の影響)

KENTARO ABE, TSUKASA HIGURASHI, MIO TAKAHASHI,

AYAKO MAEDA-MINAMI, YOHEI KAWANO,

SATORU MIYAZAKI and YASUNARI MANO

In Vivo, Vol.35, No.4, pp.2163-2169 (2021年7月)

DOI: 10.21873/invivo.12487

2. Risk factors for hepatic toxicity of high-dose methotrexate in patients

with osteosarcoma

(メトトレキサート大量療法時における肝機能障害発症因子の検討)

KENTARO ABE, AYAKO MAEDA-MINAMI, TAKU ISHIZU,

SHINTARO IWATA, EISUKE KOBAYASHI, TATSUNORI SHIMOI,

YOHEI KAWANO, HIRONOBU HASHIMOTO,

MASAKAZU YAMAGUCHI, TETSUYA FURUKAWA,

SATORU MIYAZAKI and YASUNARI MANO

Anticancer Research, Vol.42, No.2, pp.1043-1050 (2022年2月)

DOI: 10.21873/anticanres.15565

<参考論文>

1. 進行がん患者の遺族が経験する多剤併用および内服薬に関する体験や認識
に関する調査

阿部健太郎、三浦 智史、藤城 法子、沖崎 歩、吉野名穂子、青木 茂、
内藤 明美、真野 泰成、齊藤真一郎、山口 正和、森田 達也

Palliative Care Research 第16巻 第1号 85-91頁(2021年3月)

DOI: 10.2512/jspm.16.85

参考文献

- 1) 日本整形外科学会骨軟部腫瘍委員会. 全国骨腫瘍登録一覧表 (令和元年度) 2019.
- 2) Gurney JG, Swensen AR, Bulterys M. Malignant Bone Tumors. In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, et al., editors. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1999, National Cancer Institute, SEER Program. Bethesda: NIH Pub.1999.
- 3) Unni KK, Inwards CY, Bridge JA, Kindblom LG, Wold LE. Osteosarcoma of Bone. In. Tumors of the Bones and Joints (AFIP Atlas of Tumor Pathology, Fourth Series, Fascicle 2). Silver Spring, Maryland: ARP PRESS; 2005:135-192.
- 4) 柴佳奈子,種市洋, 骨肉腫の治療の現状. Dokkyo Journal of Medical Sciences.2019; 46(3): 187-192.
- 5) Fuchs N, Winkler K, Osteosarcoma, Curr Opin Oncol. 1993; 5(4): 667-671.
- 6) Kager L, Zoubek A, Potschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. J Clin Oncol. 2003; 21(10):2011-2018.
- 7) Hegyi M, Semsei AF, Jakab Z, Antal I, Kiss J, Szendroi M, Csoka M and Kovacs G: Good prognosis of localized osteosarcoma in young patients treated with limb-salvage surgery and chemotherapy. Pediatr Blood Cancer. 2011 ; 57(3): 415-422.
- 8) Isacoff WH, Eilber F, Tabbarah H, Klein P, Dollinger M, Lemkin S, et al. Cancer Treat Rep. 1978 ; 62(9): 1295-1304.
- 9) Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK and Harvey RD: Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate. Oncologist. 2016; 21(12): 1471-1482.
- 10) ファイザー株式会社. メソトレキセート®点滴静注液 1,000mg
インタビューフォーム.第19版,2020年12月改定
- 11) Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, Kleinerman ES, Betcher D, Bernstein ML, et al. Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. J Clin Oncol. 2005; 23(9): 2004-2011.
- 12) Baum ES, Gaynon P, Greenberg L, Krivit W, Hammond D. Phase II study of cis-

- dichlorodiammineplatinum(II) in childhood osteosarcoma: Children's Cancer Study Group Report. *Cancer Treat Rep.* 1979; 63(9-10):1621-1627.
- 13) Iwamoto Y, Tanaka K, Isu K, Kawai A, Tatezaki S, Ishii T, et al. Multiinstitutional phase II study of neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma (NECO study) in Japan: NECO-93J and NECO-95J. *J Orthop Sci.* 2009; 14(4): 397-404.
 - 14) Holmboe L, Andersen AM, Mørkrid L, Slørdal L and Hall KS: High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2012; 73(1): 106-114.
 - 15) Cheng KK: Association of plasma methotrexate, neutropenia, hepatic dysfunction, nausea/vomiting and oral mucositis in children with cancer. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2008; 17(3):306-311.
 - 16) Weber BL, Tanyer G, Poplack DG, Reaman GH, Feusner JH, Miser JS and Bleyer WA: Transient acute hepatotoxicity of high-dose methotrexate therapy during childhood. *NCI Monogr.* 1987; (5): 207-212.
 - 17) Hegyi M, Gulácsi A, Cságoly E, Csordás K, Eipel OT, Erdélyi DJ, Müller J, Nemes K, Lautner-Csorba O and Kovács GT: Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. *Toxicol Sci.* 2014; 142(1): 45–55.
 - 18) Bath RK, Brar NK, Forouhar FA and Wu GY: A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. *J Dig Dis.* 2014; 15(10): 517- 524.
 - 19) Nyfors A: Liver biopsies from psoriatics related to methotrexate therapy. 3. Findings in post-methotrexate liver biopsies from 160 psoriatics. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1997; 85(4): 511-518.
 - 20) Watson WA, Litovitz TL, Rodgers Jr GC, Klein-Schwartz W, Reid N, Youniss J, Flanagan A, Wruk KM: 2004 Annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am J Emerg Med.* 2005; 23(5): 589-666..
 - 21) Kremer JM, Alarcón GS, Lightfoot Jr RW, Willkens RF, Furst DE, Williams HJ, Dent PB and Weinblatt ME: Methotrexate for rheumatoid arthritis. Suggested guidelines for monitoring liver toxicity. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum.* 1994; 37(3): 316-328.
 - 22) Li JY, Cao HY, Liu P, Cheng GH and Sun MY: Glycyrrhizic acid in the treatment of liver

- diseases: literature review. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 872139.
- 23) Kiso Y, Tohkin M, Hikino H, Hattori M, Sakamoto T and Namba T: Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin. I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med.* 1984; 50(4): 298-302.
 - 24) Deng S, May BH, Zhang AL, Lu C and Xue CC: Topical herbal medicine combined with pharmacotherapy for psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dermatol Res.* 2013; 305(3): 179-189.
 - 25) Lin SP, Tsai SY, Hou YC and Chao PD: Glycyrrhizin and licorice significantly affect the pharmacokinetics of methotrexate in rats. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(5): 1854-1859.
 - 26) Marina NM, Smeland S, Bielack SS, Bernstein M, Jovic G, Krailo MD, Hook JM, Arndt C, van den Berg H, Brennan B, Brichard B, Brown KLB, Butterfass-Bahloul T, Calaminus G, Daldrup-Link HE, Eriksson M, Gebhardt MC, Gelderblom H, Gerss J, Goldsby R, Goorin A, Gorlick R, Grier HE, Hale JP, Hall KS, Hardes J, Hawkins DS, Helmke K, Hogendoorn PCW, Isakoff MS, Janeway KA, Jürgens H, Kager L, Kühne T, Lau CC, Leavey PJ, Lessnick SL, Mascarenhas L, Meyers PA, Mottl H, Nathrath M, Papai Z, Randall RL, Reichardt P, Renard M, Safwat AA, Schwartz CL, Stevens MCG, Strauss SJ, Teot L, Werner M, Sydes MR and Whelan JS: Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17(10): 1396-1408.
 - 27) Buuren SV, Groothuis-Oudshoorn K, Vink G, Schouten R, Robitzsch A, Rockenschaub P, Doove L, Jolani S, Moreno-Betancur M, White I, Gaffert P, Meinfelder F, Gray B and Arel-Bundock V: Package 'mice'. Available at <https://cran.r-project.org/web/packages/mice/mice.pdf>. Last accessed on 3rd October 2021.
 - 28) Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T and Unterthiner T: Package 'ROCR'. Available at <https://cran.r-project.org/web/packages/ROCR/ROCR.pdf>. Last accessed on 3rd October 2021.
 - 29) Uemura O, Honda M, Takeshi Matsuyama T, Ishikura K, Hataya H, Yata N, Nagai T, Ikezumi Y, Fujita N, Ito S, Iijima K and Kitagawa T: Age, gender, and body length effects on reference serum creatinine levels determined by an enzymatic method in Japanese

- children: A multicenter study .*Clin Exp Nephrol*.2011; 15(5): 694–699.
- 30) Tsurusawa M, Gosho M, Mori T, Mitsui T, Sunami S, Kobayashi R, Fukano R, Tanaka F, Fujita N, Inada H, Koh K, Takimoto T, Saito A, Fujimoto J, Nakazawa A and Horibe K: Lymphoma committee of the Japanese Pediatric Leukemia/lymphoma Study Group. Statistical analysis of the relationship between plasma methotrexate concentration and toxicity in high-dose methotrexate therapy of childhood nonHodgkin lymphoma.*Pediatr Blood Cancer*. 2015; 62(2): 279-284.
 - 31) Sterba J, Dusek L, Demlova R and Valik D: Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: "folate overrescue" concept revisited. *Clin Chem*. 2006; 52(4): 692-700.
 - 32) Becker ML, Rosé CD, Cron RQ, Sherry DD, Bilker WB and Lautenbach E: Effectiveness and toxicity of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis: Comparison of 2 initial dosing regimens. *J Rheumatol*. 2010; 37(4) 870–875.
 - 33) Ottaviani G and Jaffe N: The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009; 152: 3-13.
 - 34) Joerger M, Huitema ADR, Krähenbühl S, Schellens JHM, Cerny T, Reni M, Zucca E, Cavalli F and Ferreri AJM: Methotrexate area under the curve is an important outcome predictor in patients with primary CNS lymphoma: A pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis from the IELSG no. 20 trial. *Br J Cancer*. 2010; 102(4): 673-677.
 - 35) Fukuhara K, Ikawa K, Morikawa N and Kumagai K: Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in Japanese adult patients with malignancies: a concurrent analysis of the serum and urine concentration data. *J Clin Pharm Ther*. 2008; 33(6): 677-684.
 - 36) Shen DD and Azarnoff DL: Clinical pharmacokinetics of methotrexate. *Clin Pharmacokinet*. 1978; 3(1): 1-13.
 - 37) Xu WQ, Zhang LY, Chen XY, Pan BH, Mao JQ, Song H, Li JY and Tang YM: Serum creatinine and creatinine clearance for predicting plasma methotrexate concentrations after high-dose methotrexate chemotherapy for the treatment for childhood lymphoblastic malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014; 73(1): 79-86.
 - 38) Graf N, Winkler K, Betlemovic M, Fuchs N and Bode U: Methotrexate pharmacokinetics

- and prognosis in osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1994; 12(7): 1443–1451.
- 39) Sandhu R, Lal H, Kundu ZS and Kharb S: Serum fluoride and sialic acid levels in osteosarcoma. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 144(1-3): 1–5.
- 40) Al-Khan AA, al Balushi NR, Richardson SJ and Danks JA: Roles of parathyroid hormone-related protein (pThrp) and its receptor (pThr1) in normal and tumor tissues: focus on their roles in osteosarcoma. *Front Vet Sci*. 2021; 8: 637614.
- 41) Baird GS: Ionized calcium. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412(9-10) 696–701.
- 42) Datta M, Savage P, Lovato J and Schwartz GG: Serum calcium, albumin and tumor stage in cutaneous malignant melanoma. *Future Oncology*. 2016; 12(19): 2205–2214.
- 43) Katarina T: Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women: interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. *Sports medicine*. 2005; 35(9), 779-830.
- 44) Koke W, Campos-Obando N, Eerden B, Rijke Y, Ikram M, Uitterlinden A, Leeuwen J, Zillilens M: Age-dependent sex differences in calcium and phosphate homeostasis. *Endocr connec*. 2021; 10(3), 273-282.
- 45) Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, Yang W, Fan Y, Winick NJ, Martin PL, Cheng C, Devidas M, Pui CH, Evans WE, Hunger SP, Loh M and Relling MV: Genomewide study of methotrexate clearance replicates *SLCO1B1*. *Blood*. 2013; 121(6): 898–904.
- 46) Cegiela U, Sliwiński L, Kaczmarczyk-Sedlak I and Folwarczna J: In vivo effects of high-dose methotrexate on bone remodeling in rats. *Free Radic Res*. 2018; 52(6): 698-711.
- 47) De S, Kundu S, Chatterjee U, Chattopadhyay S and Chatterjee M: Allylpyrocatechol attenuates methotrexate-induced hepatotoxicity in a collagen-induced model of arthritis. *Ann Pharmacother*. 2020; 54(1): 29-35.
- 48) Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, Longhi A, Casadei R, Fabbri N, Forni C, Versari M and Campanacci M: Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol*. 2000; 18(24): 4016-4027.
- 49) Winkler K, Beron G, Delling G, Heise U, Kabisch H, Purfürst C, Berger J, Ritter J, Jürgens H and Gerein V: Neoadjuvant chemotherapy of osteosarcoma: results of a randomized

- cooperative trial (COSS-82) with salvage chemotherapy based on histological tumor response. *J Clin Oncol.*1998; 6(2): 329-337.
- 50) Anroop B, Shery Jacob. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy.* 2016; 7(2):27-31.
- 51) Bremnes RM, Slørdal L, Wist E and Aarbakke J: Dosedependent pharmacokinetics of methotrexate and 7- hydroxymethotrexate in the rat in vivo. *Cancer Res.*1989; 49(22):6359-6364.
- 52) Wang Z, Okamoto M, Kurosaki Y, Nakayama T and Kimura T: Pharmacokinetics of glycyrrhizin in rats with D-galactosamineinduced hepatic disease. *Biol Pharm Bull.*1996; 19(6): 901-904.
- 53) Ishizaki J, Nakano C, Kitagawa K, Suga Y and Sai Y: A previously unknown drug-drug interaction is suspected in delayed elimination of plasma methotrexate in high-dose methotrexate therapy. *Pharmacol Rep.* 2005; 57(4): 504-514.
- 54) VanWert AL and Sweet DH: Impaired clearance of methotrexate in organic anion transporter 3 (Slc22a8) knockout mice: a gender specific impact of reduced folates. *Pharm Res.* 2008; 25(2): 453-462.
- 55) Vlaming ML, Pala Z, van Esch A, Wagenaar E, de Waart DR, van de Wetering K, van der Kruijssen CM, Oude Elferink RP, van Tellingen O and Schinkel AH: Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(9): 3084-3093.
- 56) Schumacher GE, Madden T and Eaton VE: Methotrexate. In: *Therapeutic Drug Monitoring.* Schumacher GE (eds.). Connecticut, Appleton & Lange, pp. 527-552, 1995.
- 57) Bremnes RM, Slørdal L, Wist E, Aarbakke J: Formation and Elimination of 7-Hydroxymethotrexate in the Rat in Vivo after Methotrexate Administration. *Cancer Res.* 1989; 49(9), 2460-2464.
- 58) Abelson HT, Fosburg MT, Beardsley GP, Goorin AM, Gorka C, Link M and Link D: Methotrexate-induced renal impairment: clinical studies and rescue from systemic toxicity with high-dose leucovorin and thymidine. *J Clin Oncol.* 1983; 1(3): 208-216.
- 59) Exadaktylos P, Reiss T, Schobess R, Hommann M, Höhne S and Beck A: Acute

- hepatotoxicity with intermediate-dose methotrexate in children with leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Klin Padiatr.* 1994; 206(4): 315-318.
- 60) Hegyi M, Gulácsi A, Cságoly E, Csordás K, Eipel OT, Erdélyi DJ, Müller J, Nemes K, Lautner-Csorba O and Kovács GT: Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. *J Cancer Res J Clin Oncol.* 2012; 138(10): 1697-1702.
- 61) Ishida S, Sakiya Y, Ichikawa T, Awazu S. Pharmacokinetics of Glycyrrhetic Acid, a Major Metabolite of Glycyrrhizin, in Rats. *Chem. Pharm. Bull.* 1989; 37(9), 2509-2513.
- 62) Tung-Hu Tsai, Jyh-Fei Liao, Andrew Yau-Chik Shum, Chieh-Fu Chen. Pharmacokinetics of Glycyrrhizin after Intravenous Administration to Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1992; 81(9):961-963.
- 63) 中野直子, 加藤弘巳, 鈴木英彦, 中尾院英, 矢野三郎, 金岡又雄. グリチルレチン酸およびグリチルリチンの酵素免疫測定法 (第2報), 血中グリチルレチン酸, グリチルリチンの測定, *薬理と治療.* 1980; 8(11): 4171-4174.