

肝切除術後における血清胆汁酸と血中ケトン体比の 相関関係に関する臨床的研究

和歌山県立医科大学消化器外科

内山 和久 谷村 弘

京都大学第2外科

小澤 和恵

CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE CORELATION BETWEEN SERUM BILE ACID LEVEL AND BLOOD KETONE BODY RATIO AFTER HEPATECTOMY

Kazuhisa UCHIYAMA and Hiroshi TANIMURA

Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical Colledge

Kazue OZAWA

Secod Department of Surgery, Kyto University School of Medicine

肝切除術を施行した32例について、術直後より2週間~2か月間、動脈血を採取し、血中ケトン体比 (acetoacetate / β -hydroxybutyrate) および血清胆汁酸を分画別に測定し、肝ミトコンドリア活性状態と血清胆汁酸分画の関連性について検討した。その結果、chenodeoxy cholic acid (以下 CDCA) の total bile acid (以下 TBA) に対する割合 (CDCA/TBA 比) が、血中ケトン体比と $\gamma = -0.78$ ($p < 0.01$) で相関することが判明した。血中に CDCA が増加してくると、その細胞障害性のため、肝細胞ミトコンドリア、ミクロゾームを障害してケトン体比も低下すると考えられ、CDCA/TBA 比は肝ミトコンドリア活性状態を的確に示すことが判明した。

索引用語：血清胆汁酸、血中ケトン体比、肝ミトコンドリア、肝切除術

はじめに

胆汁酸は肝臓でコレステロールから生合成され、アミノ酸抱合された後胆汁中に分泌され、脂肪とミセル形成して主として回腸末端で再吸収されるという腸肝循環を行っている。この胆汁酸の動態を血中で把握することは、肝臓のみならず他の消化器疾患の病態を推定する上で、重要な臨床病理学的意義を有することが指摘されている¹⁾。最近、肝切除の臨床例において血清総胆汁酸の経日的変動と他の血中指標との相関を追求した成績や²⁾、詳細に血清胆汁酸分画との関連を検討した報告も増加してきた^{3)~5)}。しかし、いずれも血中指標との比較に止まり、胆汁酸分画から肝細胞活性状態を推定したものはない。そこで、肝切除術後の血清胆

汁酸分画の変化と、それに対応するミトコンドリア活性状態について検討した。

肝細胞では、各種代謝に必要なエネルギーがミトコンドリアを中心に生成され、健康人においては常に一定に維持されているが、各種疾患や外的損傷を受けた場合には、エネルギー合成能が低下するとともに、全体的な肝機能も低下する。胆汁酸の合成は肝ミトコンドリアとミクロゾームにて行われ、さらに、胆汁酸を門脈血中から細胞内へ取り込む際のエネルギー源がミトコンドリア由来の ATP であることから、肝ミトコンドリア活性の指標である血中ケトン体比は、肝障害の程度により、血中胆汁酸と密接に関連していることが推測される。

対象と方法

対象は肝癌または胆嚢癌に対して肝切除を施行した32例 (男23例, 女9例) で、術式は肝右葉切除11例、

拡大右葉切除12例, 左葉切除6例, 部分切除3例であった。このうち, 11例は肝硬変を合併していた。いずれの症例も術前から中心静脈栄養法で栄養管理されていたが, インスリンやステロイドなどのホルモン製剤の投与, および胆汁酸製剤の投与は行わなかった。術直後より2週間~2か月間, 動脈血を採取し, ケトン体比および胆汁酸の測定を行った。ケトン体比の測定については, 既報のとおりである⁶⁾。

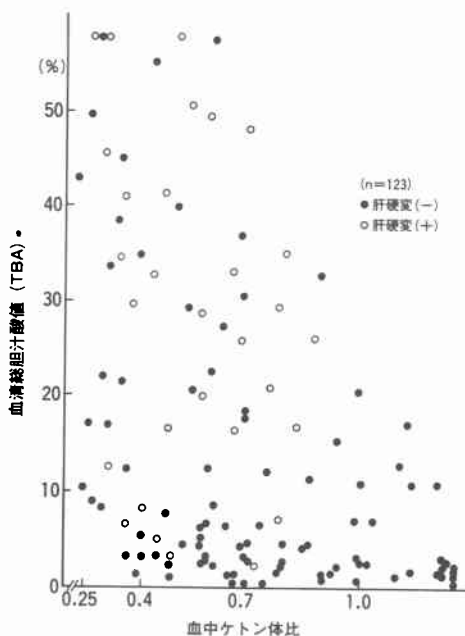
胆汁酸の測定は, 血清1mlをSep-Pak C18処理にて抽出後, PHP-LH20Gelで遊離型(F), グリシン抱合型(G), タウリン抱合型(T), および硫酸抱合型(S)の4グループに分別し, 後者はさらに solvolysis を行った後, それぞれを50 μ lのメタノールに溶解し, その10~20 μ lをHPLCに注入し, Ursodeoxy cholic acid(UDCA), Cholic acid(CA), Chenodeoxy cholic acid(CDCA), Deoxy cholic acid(DCA), Litho cholic acid(LCA)の各5種, 計20分画に分離定量した。HPLCの分析には, 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase(3 α -HSD)固定化酵素カラムと逆相分離カラム(Zorbax C8)を装着した島津LC5A型ポンプおよびRF530型蛍光検出器を用いた。その分析条件の詳細については, 既報の通りである⁷⁾。なお添加回収率は, 遊離型98.6%, グリシン抱合型94.6%, タウリン抱合型97.8%ときわめてすぐれており, 硫酸抱合型も78.2%であった。

この測定法では, 健常人(12例)の空腹時における血清総胆汁酸値(serum total bile acid: TBA)は, 2.42 \pm 1.22 μ mol/lで, その分画は, 一次胆汁酸であるCAとCDCAが60~80%を占め, その比CA/CDCA比は0.76 \pm 0.22, CDCAのTBAに対する割合(CDCA/TBA比)は, 0.56 \pm 0.12であった。また, 大部分が抱合型として存在し, なかでも, グリシン抱合型が主で, タウリン抱合型との比(G/T比)は, 3.42 \pm 1.26であった。なお, データはmean \pm SDで示し, 統計学的検討はStudentのt検定を用いた。

結 果

1) 血中ケトン体比(blood ketone body ratio: KBR)と血清総胆汁酸(TBA)の相関々係を示すと, 術後経過が良好なものは肝ミトコンドリア機能もよく保持されているものが多く, KBRも0.7以上の高値をとる。しかし, KBRが0.4以下に低下する例では, 予後はきわめて不良であり, 多くは多臓器障害を来す。この値とTBAの関係を見ると, KBRが低値をとればほどTBAは増加する傾向を認めるが, KBRが

図1 血清総胆汁酸と血中ケトン体比の相関関係



0.25以下でもTBAが10 μ mol/lを越えない症例もあり, TBAとKBRとの間に明らかな相関性は認めなかった。肝硬変併存の術後例は, 経過中にややKBRが低くTBAが高い傾向を認めたが, 特徴的な所見は見い出せなかった(図1)。

2) 従来より胆汁うっ滞や肝硬変において, 血清胆汁酸の指標の1つとされてきたCA/CDCA比については, 確かに肝硬変の術後にはCA/CDCA比は低値を示した。KBRとの関係を見ると, $\gamma=0.63$ の相関を認め, CA/CDCA比が小さくなるとKBRは低値をとり, 肝機能低下を示唆する傾向があるとはいえ, CA/CDCA比自体0.3~2.0と狭い範囲内を変動することが多く, KBRとの相関性は確実なものとはいえない(図2)。

3) そこで, CDCAのTBAに対する比率(CDCA/TBA比)とKBRを比較した。その結果, $r=-0.78$ とより密接な負の相関を認め, CDCA/TBA比が大きくなるほど, すなわち血中にCDCAが増加するほどKBRは低値をとり, 肝ミトコンドリア機能が低下していることが判明した。とくに肝硬変におけるCDCA/TBA比は術後は40%以上を示す症例が大部分を占め, KBRも比較的低値をとることが多いため, 術後リスクの高いことを裏付けた(図3)。

4) 具体的に経過良好例で経日的に術後推移を追跡してみると, 術直後はKBR 0.68, CDCA/TBA比

図2 血清 CA/CDCA 比と血中ケトン体比の相関関係

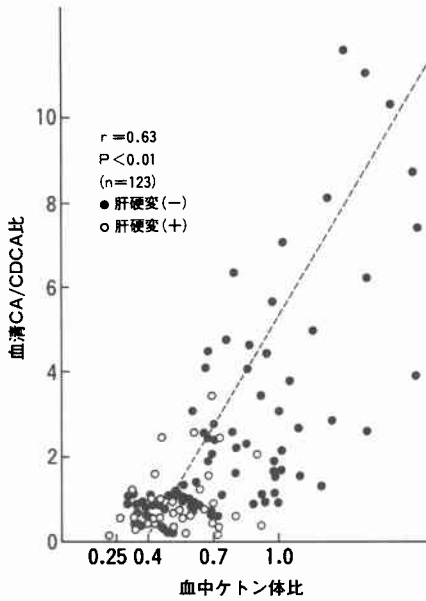


図3 血清 CDCA/OBA 比と血中ケトン体比の相関関係

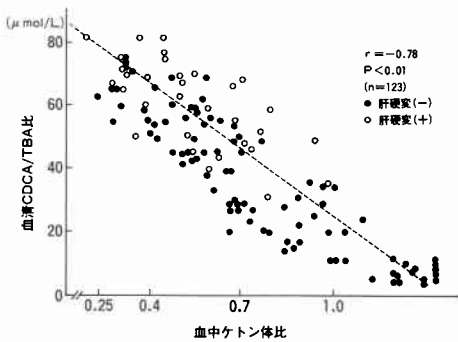


図4 経過良好例における血清 CDCA/TBA 比, 血中ケトン体比の変動図

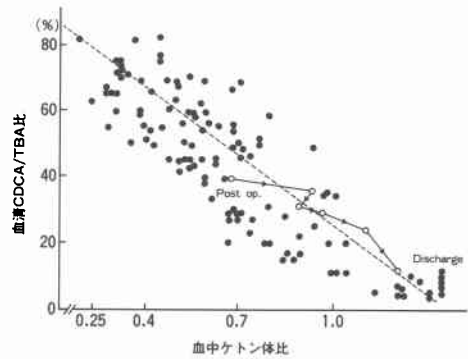
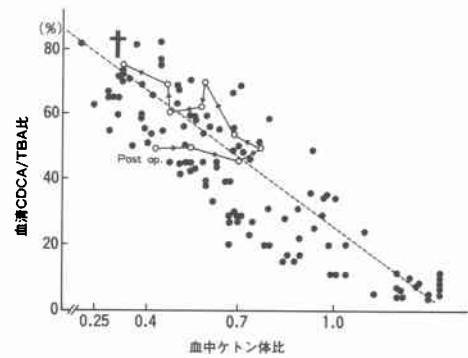


図5 経過不良例における血清 CDCA/TBA 比, 血中ケトン体比の変動図



39%であったが、術後3日目には、KBR 0.88, CDCA/TBA 比 36%で、10日目には、KBR 1.21, CDCA/TBA 比 26%となり、KBR 1.35, CDCA/TBA 比 12%となって退院した。ほぼ回帰直線に沿って良好な経過をたどっていることが判明した(図4)。

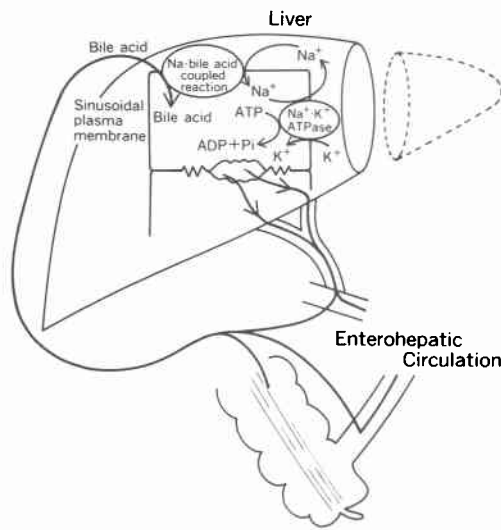
5) 一方、術後経過不良例を経日的にこの2つの指標の関係を追跡してみると、術直後はKBR 0.42, CDCA/TBA 比 46%であったが、術後10日目にはKBR 0.72, CDCA/TBA 比 49%となり、いったん軽快すると思われたが、術後13日目に腹腔内出血を起こし、それ以後はKBRは減少しつづけ、CDCA/TBA 比

は逆に増加し、術後46日目にKBR 0.32, CDCA/TBA 比 74%となり死亡した。すなわち、経過不良例では、回帰直線上を悪化の方向へ変動している(図5)。

考 察

胆汁酸の合成は、Cholesterol 7 α -hydroxylase がコレステロールを修飾することから始まり、ステロイド母核が12-hydroxylaseにより変換完了後、ミトコンドリア分画の26-hydroxylaseにより側鎖が酸化切断され、一次胆汁酸とよばれるCAまたはCDCAが生成される。これらはただちに肝ミクロゾームにてグリシンまたはタウリンと抱合され、毛細胆管内に分泌後、肝胆汁の主成分となる。このように胆汁酸合成には、ミトコンドリア分画に存在するNAD⁺, NADH, NADPH, およびcytochrome P450を含む電子伝達系が関与している。腸管内に排泄された抱合型一次胆汁酸は、腸内常在菌により脱抱合され、一部はステロイド環の7 α -hydroxylationを受けて、CAはDCAへ、CDCAはLCAへとそれぞれ二次胆汁酸に変換され

図6 肝細胞における胆汁酸摂取モデル



る。これらは70~80%が回腸末端にて能動輸送で、10~20%が大腸より受動輸送で効率より再吸収され、門脈を經由して再び肝に取り込まれるという半閉鎖的な腸肝循環を行っている⁹⁾。

胆汁酸の肝細胞内への摂取機構については、Schwarzらの分離肝細胞およびラット灌流肝を用いた実験成績に示されているように、肝ミトコンドリアから供給されるATPにより、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが賦活化され、その作用により肝細胞膜外に放出された Na^+ と陰イオンに荷電した胆汁酸が結合し、担体を介した共役反応で肝細胞内に能動的に摂取される¹⁰⁾。つまり、これらを図式化するとミトコンドリアから肝細胞膜へのエネルギー供給能が血清胆汁酸上昇の律速段階と考えられる(図6)。Alanらは、劇症肝炎時の血清総胆汁酸の上昇機序について、ミトコンドリア活性の低下により、ATP供給能が低くなると、 Na ポンプが機能不全になり、胆汁酸の肝細胞内摂取が不能になるためのportal-systemic shunt形成がその原因と説明している¹¹⁾。

肝機能が低下し、血清胆汁酸が増加すると胆汁酸自体が持つ細胞障害性により、各種臓器に対し、強度な侵襲作用を示すことが知られている。Keaneらのリンパ球を用いた実験では、遊離胆汁酸を添加すると、リンパ球内のミトコンドリアのcristaの破壊をはじめとする細胞内小器官に著しい変化が観察され、その作用はCDCAが最も強かったという¹²⁾。ラット摘出灌流肝を用いたFischerらの実験成績では、CDCAを灌流

液中に添加すると、ミクロゾームやミトコンドリアが腫大し、やがて空胞変性から壊死に陥り、肝内ATP量が著しく減少したが、CAを同時に灌流液に加えると、CDCAによる肝障害は阻止されたという¹³⁾。このように総胆汁酸中に、CDCAの占める割合(CDCA/TBA比)が血中で増加すればするほど、その細胞障害性は強くなり、ミトコンドリアやミクロゾームなどの細胞内小器官にも機能低下が認められるようになる。

肝硬変では、胆汁酸プールが縮小し、胆汁酸の合成低下を認め、胆汁うっ滞時とは逆に胆汁中および血中ともにCDCA優位となる¹³⁾。われわれの検索では、健康成人に対して、腸肝循環を遮断する目的でコレステラミンを投与し、胆汁酸プールを減少させると、GCAを主とする胆汁酸の合成が亢進し、CA/CDCA比が2.0~3.0と上昇したが、肝硬変例で同じ操作を施行しても、胆汁酸の合成亢進がないため、胆汁中胆汁酸の濃度は低いままであり、しかも、CDCA優位の胆汁のままであった。このことは、フィードバック機構に関与する7 α -hydroxylase活性の低下、およびCA合成に必要な12 α -hydroxylase活性の低下を示唆し、広範な組織の繊維化のため、肝ミクロゾームやミトコンドリア機能が低下しているものと考えられ、これらの活性度の把握が必要となる¹⁴⁾。

肝切除術などの外的傷害時には、肝ミトコンドリアとミクロゾームが常に共役して機能しており、肝ミトコンドリアの状態が把握できれば、ミクロゾーム、さらには肝細胞全体の活性状態が予想できる⁶⁾。Atkisonの提唱したEnergy chargeの概念により、実験動物では肝組織を凍結採取してミトコンドリアのみを分離し、そのATP生成能の測定が可能であるが¹⁵⁾、臨床的にその経過を経時的に把握することは不可能である。肝ミトコンドリアの活性は、その酸化還元状態(NAD^+/NADH)を示すmitochondrial redox stateによってあらわされ、通常十分な酸素と糖存在下に1.0以上の高値を保つが、TCAサイクルの回転が阻害され、肝ミトコンドリア内にNADHが蓄積すると、ATP生成能低下のため0.4以下の低値をとる。Williamsonらにより、このredox state(NAD^+/NADH)は、ミトコンドリア内のケトン体比(acetoacetate/ β -hydroxybutylate)と比例することが証明されている¹⁶⁾。さらに実験動物を用いた肝切除術後、黄疸肝、ショック肝モデルにおいても、血中ケトン体比と肝ミトコンドリアにおけるATP生成能が相関することが

証明されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

すなわち、血中ケトン体比が低値をとるということは、肝ミトコンドリアの機能低下を示し、肝ミトコンドリアやミクロゾーム活性が減少すると、胆汁酸代謝は trihydroxy bile acid である CA より、ミクロゾームの 12 α -hydroxylase の修飾を受けない dihydroxy bile acid である CDCA 合成に流れが傾き、CDCA の TBA に占める割合が高くなる¹⁹⁾。さらにグリシン、タウリンの抱合能力が低下すると、胆汁中に遊離型 CDCA が主成分となった胆汁酸量が増加し、腸肝循環にて門脈血中を介して肝に戻ってきても、ミトコンドリア機能の低下に伴う ATP 生成能の低下により、肝細胞膜での胆汁酸の能動的な摂取が不能になり、portal-systemic shunt を通して、末梢血中に CDCA 優位な胆汁酸が漏出することになる。この遊離型を主とする CDCA は、その細胞障害性により、細胞内ミトコンドリアやミクロゾームなどの小器官の障害を惹起し、多臓器障害の原因となり、一種の悪性サイクルを形成することになる²⁰⁾²¹⁾。つまり、CDCA/TBA 比で示される肝を中心とする細胞障害の程度は、肝ミトコンドリアの障害の程度を示す血中ケトン体比と相関することになるといえる。

結 語

肝切除術後早期における血清胆汁酸および血中ケトン体比の変動を検討した結果、CDCA の TBA に対する割合 (CDCA/TBA 比) と血中ケトン体比との間に密接な負の相関関係 ($\gamma = -0.78$) を認めた。とくに肝硬変併存例における肝切除の術後には、ケトン体比が低くて CDCA/TBA 比が高い症例が多く、術後リスクが高いことを裏付けた。

本論文の要旨は、第29回日本消化器外科学会総会および第87回日本外科学会総会にて発表した。

また本研究の一部は、昭和62年度郵政省研究補助金によって行われたことを付記し、深謝します。

文 献

- Hofmann AF, Milanese M, Bilforte G: Description and simulation of a physiological pharmacokinetic mode for the metabolism and enterohepatic circulation of bile acids in man. *J Clin Invest* 71: 1003-1022, 1983
- 久保正二, 酒井克治, 木下博明ほか: 肝切除前後における末梢および門脈血中総胆汁酸測定の意義. *日消外会誌* 18: 82-88, 1985
- Harada M, Komada M, Funagaki K et al: Postoperative changes of serum bile acids levels in a case with massive hepatic resection. *Hiroshima J Med Sci* 18: 383-387, 1983
- 中越完平: 肝切除後の予後判定の指標としての血清胆汁酸測定の意義. *久留米医誌* 49: 1311-1321, 1985
- 谷村 弘, 内山和久, 石本喜和男ほか: 胆汁酸分画からみた病態の解析. *肝胆膵* 17: 303-310, 1988
- Asano M, Ozawa K, Tobe T: Postoperative prognosis as related to blood ketone body ratios in hepatectomized patients. *Eur Surg* 15: 302-311, 1983
- Maruyama K, Tanimura H, Hikasa Y: Analysis of conjugated bile acids in bile by high-pressure liquid chromatography. *Clin Chem Acta* 100: 47-54, 1980
- Saito T, Tanimura H: The preventive effect of vitamin E on gallstone formation. *Arch Jpn Chir* 56: 247-261, 1987
- Donald MS, Rovers HD, Richard N et al: The enterohepatic circulation of bile salts. *Arch Int Med* 130: 552-573, 1972
- Schwarz LR, Burr R, Schwenk M et al: Uptake of taurocholic acid isolated rat-liver cells. *Eur J Biochem* 55: 617-623, 1975
- Alan AN, Wilkinson SP, Poston L et al: Intracellular electrolyte abnormalities in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 72: 914-917, 1977
- Keane RM, Gadacz TR, Munster AM et al: Impairment of human lymphocyte function by bile salts. *Surgery* 95: 439-443, 1984
- Fisher MM, Bloxam DL, Phillips NJ et al: Characterization of rat liver cell plasma membranes. *Proc Soc Exper Biol Med* 150: 177-184, 1975
- Vlahcevic ZR, Buhac I, Farrar JT et al: Bile acid metabolism in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 60: 491-498, 1971
- Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter, interaction with feed back modifiers. *Biochemistry* 7: 4030-4034, 1968
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA: The redox state of free incootinamide adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria or rat liver. *Biochem J* 103: 514-527, 1967
- Ozawa K, Fujimoto T, Nakatani T et al: Changes in hepatic energy change, blood ketone body ratio, and indocyanine green clearance in relation to DNA synthesis after hepatectomy. *Life Sci* 31: 647-653, 1982
- Tanaka J, Ozawa K, Tobe T: Significance of blood ketone body ratio as an indicator of hepatic energy status in jaundiced rabbits. *Gastroenterology* 76: 691-696, 1979
- 内山和久, 谷村 弘, 小澤和恵: 閉塞性肝障害と胆汁酸代謝. *通信医* 39: 737-740, 1987
- 内山和久, 谷村 弘, 小澤和恵: 術後重症肝障害における遊離型胆汁酸測定の意義. *日外宝* 57: 293-301, 1988
- 内山和久, 谷村 弘, 小澤和恵ほか: 肝切除術後早期における予後判定のための血中硫酸抱合型胆汁酸測定の意義. *医のあゆみ* 147: 131-132, 1988