

肝硬変例に対するカフェインを用いた 肝ミクロゾーム (P4501A2) 機能の測定

筑波大学臨床医学系外科, 同 社会医学系*, つくばセントラル病院**

山本 祐二 石川 詔雄 長田 明 辻 勝久**
大塚 雅昭 田中栄之介* 渋谷 進 轟 健
高瀬 靖廣 竹島 徹** 深尾 立

肝 microsome の cytochrome P450系のうち, 肝小葉中心性に局在する1A2で脱メチル化される caffeine (CA) を, 2mg/kg 経口投与することで, 肝硬変32例, 対照として胆石症10例の肝機能を検討した. 健康成人男性 5 例の検討で, CA の血中濃度は, 経口投与後, 直線的に減少, 代謝産物は 4~6 時間で最高値となり, paraxanthine (PX) が優位であることより, CA 投与後 4 時間の血清 PX/CA 値を代表値とした. この PX/CA 値と CA clearance (CL) とは, $r=0.852$ の有意 ($p<0.0001$) の高い相関を示した. PX/CA 値は, 肝硬変例では, 0.17 ± 0.16 で, 対照例の 0.44 ± 0.13 と比較して, 有意に低下していた ($p<0.0001$). PX/CA 値は, albumin (ALB), choline esterase (CHE), indocyanine green retention in 15 minutes (ICGR15) と高い相関を示した. 肝 microsome 機能を反映する CA 負荷試験は肝機能の定量的評価に有用である.

Key words: caffeine, cytochrome P450, hepatic functional reserve, hepatectomy, liver cirrhosis

緒 言

肝細胞癌 (以下, 肝癌と略記) は肝硬変や慢性肝炎などの慢性肝障害に併存しており, その肝癌患者に対する肝切除術は切除後の肝再生を見込んで, 適応と切除術式が決定されている. しかしながら, 各病態下の肝障害を判定する肝予備能評価法は少ない.

従来より, aminopyrine (以下, AM と略記), antipyrine (以下, AP と略記), lidocaine, trimethadione (以下, TMO と略記) および, caffeine (以下, CA と略記) といった薬物の代謝が, 肝障害患者で遅延することが報告されている¹⁾²⁾. これらの薬物は肝ミクロゾームの cytochrome P450系で代謝されることが知られており, それぞれの代謝酵素の肝小葉内での局在も, 近年明らかになってきた³⁾. その局在の確認されている P450系で代謝される薬物を用いた負荷試験を行うことにより, 各病態下での, 肝小葉内の障害部位と障害の程度を推測できると考えられる.

P4501A2で代謝される caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) は肝細胞のミクロゾームで脱メチ

ル化され, theophylline (1,3-dimethylxanthine; 以下, TP と略記) paraxanthine (1,7-dimethylxanthine; 以下, PX と略記), および theobromine (3,7-dimethylxanthine; 以下, TB と略記) となる. 薬物動態の変化, 特に clearance (以下, CL と略記) は肝機能障害をほぼ正確に反映するが, その算出には頻回の採血を必要とし, 患者の負担も多い. 一般に CL は 3 回の採血で算出できる. しかし, 薬物投与後 1 回の採血による, 投与薬剤とその代謝産物の血中濃度比から肝機能を評価することが可能なら, 臨床上の有用性は高まり, 採血による患者の負担も少なくなる. このような考えから我々は, 肝硬変患者の肝機能評価が, CA の経口投与後 1 回の採血による CA 負荷試験で可能か否かを検討した.

症例と方法

1. 症例

1991年8月より1993年3月までに筑波大学附属病院およびその関連病院に入院した42例を対象とした. 内訳は臨床的または病理学的に肝硬変と診断した32例 (男性25例, 女性7例, 年齢43~76歳, 平均 56 ± 12 歳) と, 対照として肝の器質的異常や急性炎症のない胆石症10例 (男性7例, 女性3例, 年齢33~65歳, 平均56±

<1993年7月7日受理> 別刷請求先: 石川 詔雄
〒305 つくば市天王台1-1-1 筑波大学臨床医学系

9歳)である。肝硬変例は全例に肝細胞癌または食道静脈瘤を併存している。なお、CAの薬物動態を解析する目的で、健康成人男性5例(24~45歳、平均31±7歳)を対象に加えた。

2. CA 負荷試験の方法

早朝空腹時に3ml採血後、無水カフェイン粉末(和光純薬)2mg/kg(体重)を経口投与した。その1, 2, 4時間後におのおの3mlずつ採血した。検査前夜より絶飲食とし、CA投与後2時間からCAを含まない食品のみの摂取を許可した。健康成人に対してはさらに6, 8, 10, 12および24時間後におのおの3mlずつ採血した。

検体は血清に分離し、高速液体クロマトグラフィーによりCAおよびその代謝産物;TP, PXおよびTBの血中濃度を測定した⁴⁾。その結果より、薬物動態を解析し、半減期(以下、 $t_{1/2}$ と略記)、分布容量(以下、Vdと略記)およびクリアランス(CB)を求めた。

3. 一般肝機能検査

血清 albumin(g/dl, 以下、ALBと略記)、総 bilirubin(mg/dl, 以下、BILと略記)、glutamate oxaloacetate transaminase(IU/l, 以下GOTと略記)、glutamate pyruvate transaminase(IU/l, 以下、GPTと略記)、choline esterase(IU/l, 以下CHEと略記)、prothrombin時間(%、以下、PTと略記)、alkaline phosphatase(IU/l, 以下、ALPと略記)、indocyanine green(以下、ICGと略記)負荷試験の生化学的検査を行った。ICG負荷試験の値は、ICG静注後15分の消失率(%、以下、ICGR15と略記)で示した。なお、各検査値は平均値と標準偏差(M±SD)で表し、Statistical Analysis System(以下、SASと略記、SASソフトウェア社)を用いて、Student t-testで統計学的有意差を検定した。検査値間の相関は、相関係数(r)で示し、SASを用いて相関の有意差を検定した。

成 績

健康成人でのCA経口投与後24時間の、CAおよび3種の代謝産物の血中濃度の経時変化を示す(Fig. 1)。CAは投与後0.5時間の3.07μg/mlから、24時間の0.108μg/mlまで、時間とともにほぼ直線的に減少した。PXは投与後0.5時間の0.303μg/mlから6時間に0.943μg/mlと最高値に達したのち、24時間の0.143μg/mlまで漸減した。TBとTPはPXと同様の経時変化を示したが、最高値で0.07μg/mlと、その血中濃度は低値であった。3種の代謝産物のうち90%以上をPXが占めており、CAからPXへの代謝系は最も優位

Fig. 1 The mean serum concentration-time curves of caffeine and its primary metabolites in normal volunteers. CA : caffeine, PX : paraxanthine, TB : theobromine, TP : theophylline

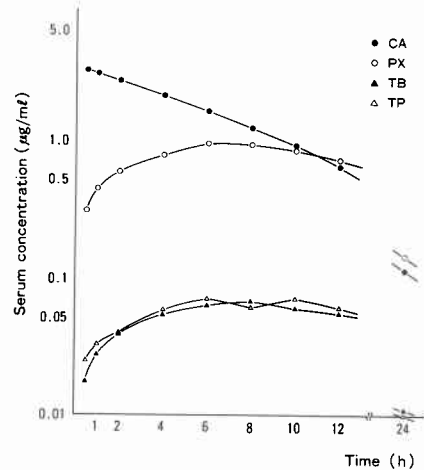


Table 1 Pharmacokinetic parameters following oral administration of caffeine (2mg/kg) in patients

Parameter	control (n=10)	liver cirrhosis (n=32)
$t_{1/2}$ (h)	5.2±1.4	14.4±10.8*
Vd (ml/kg)	596±69	608±123
CL (ml/min/kg)	1.40±0.40	0.72±0.51*

$t_{1/2}$ =elimination half life,
Vd=apparent volume of distribution,
CL=total body clearance,
*= $p < 0.01$

であった。

肝硬変群と対照群の薬物動態パラメーターを示す(Table 1)。 $t_{1/2}$ は、肝硬変群では14.4±10.8hで、対照群の5.2±1.5hに比較して有意に延長していた($p < 0.025$)。CLは、肝硬変群では0.72±0.51ml/min/kgで、対照群の1.40±0.40に比べ、有意に低下していた($p < 0.01$)。Vdは両群間で有意差を認めなかった。

CA投与後4時間のPX/CA値は、肝硬変群では0.17±0.16であり、対照群の0.44±0.13と比較して有意に低下していた(Fig. 2, $p < 0.0001$)。CA投与後4時間のPX/CA値とCLとは、 $r = 0.757$ ($p < 0.0001$)と有意の高い相関を示した(Fig. 3)。

一般肝機能検査値はALB, GOT, GPT, CHE, PT, BILおよびICGR15で、肝硬変群と対照群との間に有

Fig. 2 Serum PX/CA ratio at 4h after oral administration of CA in patients with liver cirrhosis and in control subjects.

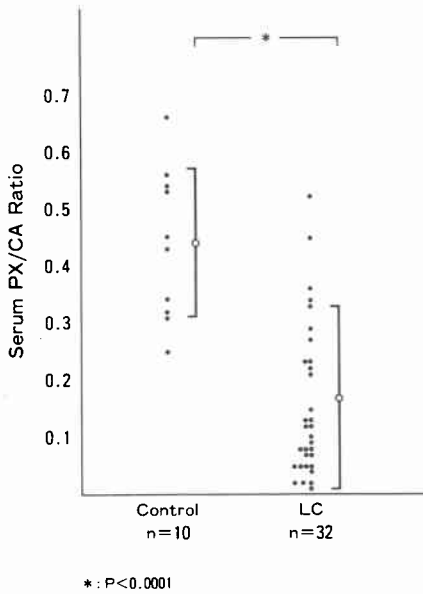
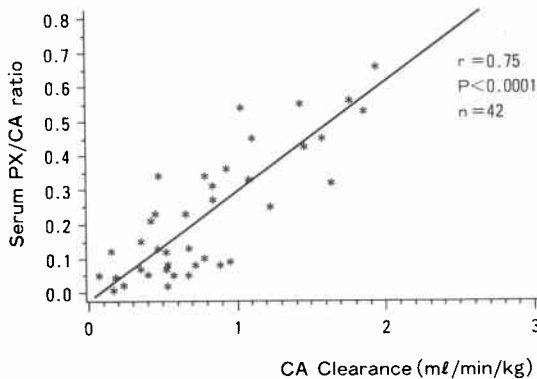


Fig. 3 Relationship between serum PX/CA ratio at 4h of CA and CA clearance after oral administration.



意差を認めた (Table 2).

PX/CA 値と、これらの一般肝機能検査値との相関係数を見ると、ALB とは $r=0.72$ 、CHE とは $r=0.65$ (それぞれ $p<0.0001$)、ICGR15 とは、 $r=-0.57$ ($p<0.001$) のように、有意の相関を示した。GOT とは $r=-0.42$ 、GPT とは -0.38 、ALP とは $r=-0.08$ 、PT とは $r=0.02$ 、BIL とは $r=-0.21$ であり、いずれも有意な相関は見られなかった。

Table 2 Clinical and liver function characteristics in control subjects and in patients with liver cirrhosis

Parameter	control (n=10)	liver cirrhosis (n=32)
Alb (g/dl)	4.3±0.2	3.3±0.6**
GOT (IU/l)	34±18	87±50*
GPT (IU/l)	36±20	70±52*
ALP (IU/l)	235±159	222±91
CHE (IU/l)	329±63	135±61**
PT (%)	97±13	77±13*
T-Bil (mg/dl)	0.8±0.2	1.2±0.8*
ICGR15 (%)	8±2	28±17**

* $p<0.01$, ** $p<0.001$

考 察

肝機能評価に用いられる薬物について、Branch はその薬物に酵素誘導による毒性や不都合な薬理作用がなく、速やかに吸収されること、薬物の投与量のほとんどすべてが肝で代謝されて肝疾患以外の条件に影響されないこと、投与薬物とその代謝物が血液、尿、唾液あるいは呼気中に検出されて蛋白と結合する割合が少なく、測定方法も容易であることなどをあげている⁹⁾。CA は、人種、民族を越えて広く世界的に飲用されている飲料に含まれる安全な物質で、以上の条件のすべてを満たしている⁶⁾⁷⁾。

肝細胞の microsome に存在する、cytochrome P450 系は family および subfamily に分類されており、この CA は P4501A2 で代謝される⁸⁾。そのほか、AM は P4501A、AP は P4501A、2A および 3A、lidocaine は P4501A、3A family で、それぞれ代謝される⁸⁾。一方、我々が用いている TMO 負荷試験は肝切除術の際の残存肝機能を術前に定量的に評価できた⁹⁾。また肝細胞総数との相関も検討されている。しかしながら、TMO を代謝する P450 系の subfamily は 2B1 あるいは 2C11 の可能性が示されているのみで、詳細はまだまだ検討段階にある¹⁰⁾。最近、肝 P450 の組織内分布の検討により、P4501A2 は肝小葉の中でも小葉中心性に局在することが分かってきた⁹⁾。P4503A も同様に小葉中心性に局在するが、tolbutamide の代謝に関与する P4502C は小葉内全体の肝細胞に分布する⁹⁾。

肝小葉内に分布する肝細胞のうち、さまざまな肝細胞の病態で障害を受ける肝細胞には局在がある^{11)~13)}。そこで肝小葉の P450 family の局在と、その部位で代謝される薬物との関係が明らかになれば、肝

障害の重症度やその予後、肝再生との関係などを各病態に応じて、組織学的所見をも推測しながら詳細に評価することが可能となる。

本検討に用いたCAは代謝酵素とその局在が明らかな薬物のひとつで、CA負荷試験は肝実質の障害部位と病態の関係を知るうえで非常に有益と考えられる。

肝のcytochrome P450系の機能はまず初めにAPやAMを用いて検討されてきた¹⁴⁾¹⁵⁾。APの代謝過程は薬物の酸化による第1相反応と抱合による第2相反応からなり、我々の検討によると、肝硬変例ではAPの第1相反応のみが障害を受けており、TMOもAPと同様にこの酸化過程が障害されていた¹⁶⁾。APを用いた肝機能評価にはCLの算出という、煩雑な薬物動態の解析が不可欠である。またAM負荷試験においては、呼気中に含まれるAMの最終代謝物のCO₂濃度を¹⁴Cの量より測定する必要があり、煩雑で実用性にも問題がある。

肝の薬物代謝能は $t_{1/2}$ やCLを求めて薬物動態を解析して評価することが望ましいが、そのためには頻回の採血が必要であり、労力を要する上、患者の負担も多い。

CA投与後のCAの主要3代謝のうち、血中のPX量も多かった。またCA投与後の1回の採血より求めたPX/CA値は、薬物動態の重要なパラメーターであるCLと非常に高い相関を示した。

このPX/CA値は肝硬変例で 0.17 ± 0.16 であり、対照群の 0.44 ± 0.13 と比較して有意に低下していた。

ALBやBIL、PTは肝硬変のChild-Pugh重症度分類の項目に用いられており、ALBとPTはともに肝の蛋白合成能の指標である¹⁷⁾¹⁸⁾。ALBは、血中半減期が2~3週間と比較的長く、肝硬変に代表される慢性肝障害の評価に適しているが、一方、PTはturnover rateの高い血清蛋白合成能を反映しており、急性期の肝障害評価に有用である。さらにICGR15は古くから肝予備能検査法のひとつとして用いられてきた。我々が検討した、PX/CA値は一般肝機能検査であるALB、CHE、およびICGR15と有意な高い相関を示した。PTやBILとは有意な相関は得られなかった。PX/CA値は肝固有の機能を反映しており、それは慢性肝障害における肝のいかなる病理学的所見と対応するかは今後の検討が必要である。

JostらはCA経口投与後の唾液中へのCAとCLは、軽度肝障害例より重度肝障害例で低下しており、CAのCL測定は低侵襲で、かつ肝予備能の定量的評

価に有用であると述べている¹⁹⁾。

以上のように、CAを用いた負荷試験はCA投与後1回の採血で、臨床例における肝ミクロゾーム機能の評価に有用と思われる。今後、症例を重ね、肝実質の障害部位と病態との関係について検討していきたい。

文 献

- 1) Barstow L, Ralph E: Clinical research articles: Liver function assessment by drug metabolism. *Pharmacotherapy* 10: 280-288, 1990
- 2) Farrell GC, Cooksley WGE, Hart P et al: Drug metabolism in liver disease. Identification of patients with impaired hepatic drug metabolism. *Gastroenterology* 75: 580-588, 1978
- 3) Ratanasavanh D, Beaune P, Morel F et al: Intralobular distribution and quantitation of cytochrome P-450 enzymes in human liver as a function of age. *Hepatology* 13: 1142-1151, 1991
- 4) Tanaka E: Simultaneous determination of caffeine and its demethylated metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 575: 311-314, 1992
- 5) Branch RA: Drug as indicators of hepatic function. *Hepatology* 2: 97-105, 1982
- 6) Renner E, Wietholtz H, Huguenin P et al: Caffeine: A model compound for measuring liver function. *Hepatology* 4: 38-46, 1984
- 7) Blanchard J, Sawers SJA: The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 24: 93-98, 1983
- 8) Simada T: Human liver cytochrome P-450 enzymes and their implications to oxidation of drugs, toxic chemicals and carcinogens. *Jpn J Toxicol Environ Health* 38: 209-227, 1992
- 9) Ishikawa A, Fukao K, Tanaka E et al: Trimethadione tolerance test for the quantitative assessment of liver function in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 6: 363-367, 1991
- 10) Kohno M, Imaoka S, Tanaka E et al: Trimethadione metabolism by hepatic P-450s purified from rats and humans. *J Toxicol Sci* 16: 270, 1991
- 11) Poulsen H, Christoffersen P: Histological changes in liver biopsies from patients with surgical bile duct disorders. *Acta Pathol Microbiol Scand Section A* 78: 571-579, 1970
- 12) Prescott LF, Wright N, Roscoe P et al: Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. *Lancet* i: 519-522, 1971

- 13) International Group: Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet* ii: 914—919, 1977
- 14) Branch RA, Herbert CM, Read AE: Determination of serum antipyrine half-lives in patients with liver disease. *Gut* 14: 569—573, 1973
- 15) Schneider JF, Baker AL, Haines NW et al: Aminopyrin N-demethylation: A prognostic test of liver function in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 79: 1145—1150, 1980
- 16) Tanaka E, Ishikawa A, Etoh H et al: The impact of liver cirrhosis and cholelithiasis on phase I and II reactions using antipyrine and trimethadione as a model substrate. *Jpn J Clin Pharmacol Ther* 23: 635—639, 1991
- 17) Child CG, Turcotte JG: Surgery and portal hypertension. Edited by Child CG. The liver and portal hypertension. Saunders, Philadelphia, 1964, p50
- 18) Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL et al: Transection of oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Brit J Surg* 60: 646—649, 1973
- 19) Jost G, Wahllander A, von Mandach U et al: Overnight salivary caffeine clearance: A liver function test suitable for routine use. *Hepatology* 7: 338—344, 1987

An Estimation of the Function of Hepatic Microsome (Cytochrome P4501A2) in Liver Cirrhosis using Caffeine

Yuji Yamamoto, Akio Ishikawa, Akira Osada, Katsushisa Tsuji**, Masaaki Ohtsuka, Einosuke Tanaka*,
Susumu Shibuya, Takeshi Todoroki, Yashuhiro Takase,
Tohru Takeshima** and Katashi Fukao
Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine and Institute of Community Medicine*,
University of Tsukuba, and Tsukuba Central Hospital**

We investigated hepatic functional reserve by using caffeine (CA), which is demethylated by centrilobularly distributed cytochrome P4501A2 in hepatic microsomes, in 32 patients with liver cirrhosis, 10 patients with cholecystolithiasis without liver cirrhosis and 5 healthy volunteers who served as controls. After an overnight fast, CA was administered orally at a dose of 2 mg/kg body weight. The serum concentration of CA decreased proportionately after oral administration of CA in volunteers. Among three primary metabolites of CA, the serum concentration of paraxanthine (PX) was higher than those of the other two metabolites, theobromine (TB) and theophylline (TP). Ninety percent of the metabolites of CA were PX. They reached maximum levels 4 to 6 hours after administration. Therefore was considered that this test should be performed 4 hours after the oral administration of CA to obtain the optimum ratio of PX/CA. The serum PX/CA ratio was significantly correlated with CA clearance (CL) in all patients ($r=0.75$, $p<0.0001$). The PX/CA ratio in patients with liver cirrhosis (0.17 ± 0.16) was significantly lower than that in patients with cholecystolithiasis (0.44 ± 0.13). Furthermore, a significant correlation between the serum PX/CA ratio and serum albumin, cholinesterase and IGCR15 was observed. The CA clearance test may be useful to estimate hepatic functional reserve and severity of liver disease.

Reprint requests: Akio Ishikawa Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba
1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, 305 JAPAN