

特発性大腿骨頭壊死症の発生と肝 CYP3A 活性の 相関に関する研究

大阪市立大学大学院医学研究科整形外科学

岩城啓好・金城養典
 岩切健太郎・高岡邦夫

ステロイド剤は肝薬物代謝酵素であるCYP3Aにより不活化され、代謝されなかった部分が標的細胞に至り薬理作用する。この酵素活性は個体差が大きいことが知られており、その活性低下はステロイド剤の過度の薬理効果をもたらし、ステロイド性大腿骨頭壊死症 (ION) 発生の素因となっている可能性がある。そこで我々は、ステロイド性ION患者24例、アルコール性ION患者28例、健常人72例を対象として、CYP3A活性を測定し、解析を行った。

その結果、ステロイド性ION患者の肝CYP3A活性は健常人のCYP3A活性の分布の中で低値域に集積していた。また、肝CYP3A活性低値はステロイド性ION発生のリスクを約10.1倍高め、attributable fractionは90%であった。midazolam投与後60分の1'-OH midazolam ratioはCYP3A活性と良い相関を示し($R=0.72$, $p < 0.0001$)、簡便なリスク予知検査の可能性が示された。これらの結果より、ステロイド性ION患者は肝CYP3A活性低値のために、ステロイド剤の薬理効果が過剰になり、中毒効果としてステロイド性IONを発生したと考察した。

これらのハイリスク患者を同定するために、低侵襲的な1回採血によるsingle point 1'-OH midazolam ratioは有用であると考えられる。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ION)は青壮年期に好発し、その罹患によって股関節が破壊され起立歩行障害によりQOLが著しく侵される疾患である。病理組織学的には大腿骨頭の無反応性壊死像を特徴とし、従来から骨微小循環障害による阻血性壊死とされてきた。しかし、いまだに正確な病態が不明である。

これまでの多くの疫学的研究によって、ステロイド剤使用やアルコール愛飲がION発生に関わっていることが明らかにされている^{1,2}。最近の報告の結果によれば、ION

患者の約半数にステロイド使用歴があり、特に女性患者の約70%にステロイド剤投与歴があるとされている。このような事情を考慮すれば、ステロイド剤に関連したIONの発生機序の解明は、ION発生を予防する観点からも最も重要な課題であろう。

一方臨床的観察結果によれば、高容量のステロイド剤を投与された患者の全てにステロイド誘発IONが発生するわけではないことが明らかであり(15-45%)、ステロイド剤に対する感受性、または骨壊死発生傾向に個体差(素因)が存在していることが伺われる³⁻⁵。

生体内でステロイド剤は主に肝臓の薬物代謝酵素であるCYP3Aにより代謝を受け、代謝を受けなかった未変化体のみが標的細胞に至り作用する^{6,7}。CYP3AはCytochrome P450 familyであり、肝臓に含まれるCytochrome P450のおよそ30%を占める。現在使用されている全薬物の50%以上を代謝し、肝臓でのmRNAの発現量は50倍以上、その生体内機能は5-20倍の個体差があるとされ、薬物反応性の個体差を説明する酵素の一つとされている^{8,9}。

これらの事実より、我々は、このCYP3A活性の低い患者はステロイド剤の代謝が悪く、その過剰な薬理効果のためにステロイド性IONを発生したと仮説し、検索を行った。

また、ステロイド剤によって誘発されるION発生の予防を考慮するとき、ION発生のリスクが高い患者のスクリーニングが重要な問題となる。我々は、ION発生防止方法の確立を目標として、ステロイド性ION発生高リスク患者の同定のためのスクリーニングテストについても検索を行っている。この方法が可能となれば、ステロイド剤投与開始時の用量調節などによって予防が可能となる。

2. 研究方法

(対象)

対象は、整形外科入院手術を受けたステロイド性ION患者24例、アルコール性ION患者28例、整形外科入院手術を受けた健常人72人をnormal controlとした。IONの診断には厚生労働省大腿骨頭壊死症研究班診断基準を用いた^{10,11}。高度の肝・腎機能障害、CYP3A機能に影響する薬物投与を受けている場合、極端な肥満を除外基準とした。

(方法)

CYP3A活性定量はmidazolam clearanceを計測することにより定量した¹²。

整形外科手術麻酔導入をmidazolam 0.25mg/kgにて導入し、静注後経時的に採血を行った(5,10,15,20,30,45,60,90,120,180,240,360分。1回2.5cc)。採血後、2時間以内に遠心分離(15000rpm×2分)し、上清液を-80℃にて保存。後日、その上清液から血中midazolam濃度、および1'-OH midazolam濃度をHPLCにて定量した。得られた値より濃度曲線を作成し血中濃度曲線下面積(AUC; Area under the concentration curve)を測定し、midazolam clearance値($CL = \text{Dose} / \text{AUC}$)を算出し、CYP3A活性とした。低侵襲なスクリーニングテストとしてsingle point 1'-OH'MDZ/MDZ ratioを候補とした。

5,10,15,20,30,45,60,90,120,180,240,360分の1'-OH'MDZ/MDZ ratioを算出し、ステロイド性ION発生高リスク患者の同定の可能性、CYP3A活性との相関性について検索を行った。

(統計学的解析)

CYP3A活性とION発生との関連をunconditional logistic regression modelを用いてodds ratio (OR)・95%信頼区間(95%CI)を算出することにより評価した(SAS software)。

(倫理面への配慮)本研究の実施にあたっては大阪市立大学医学部倫理委員会の承認を受け、指針に沿って行った。

3. 研究結果

Table 1にcharacteristicsを示す。ステロイド性ION群とcontrol群の間に、性・年齢・肝機能・腎機能に有意差は認めなかった。アルコール性ION群control群間では、アルコール性ION群に有意に男性が多く(**p < 0.01 in Wilcoxon's rank

sum test (vs. controls), また肝トランスアミナーゼの上昇を認めた(* $p < 0.05$ in Wilcoxon's rank sum test(vs. controls))

Table 1

Comparison of selected characteristics			
Characteristics	steroid-induced ONFH (n=24)	alcohol-related ONFH (n=28)	controls (n=72)
Sex, male-no. (%)	14 (58)	21 (75) **	30 (42)
Age (yr)	45 ± 14	45 ± 13	44 ± 15
AST † (IU/l)-no. (%)			
≤ 40	21 (88)	23 (82)	66 (92)
40 +	3 (12)	5 (18)	6 (8)
ALT † (IU/l)-no. (%)			
≤ 45 a)	22 (92)	20 (71)	66 (92)
45 +	2 (8)	8 (29) *	6 (8)
BUN † (mg/dl)-no. (%)			
≤ 18	19 (79)	27 (96)	67 (93)
18 +	5 (20)	1 (4)	5 (7)
Cre † (mg/dl)-no. (%)			
≤ 1.2	24 (100)	28 (100)	72 (100)
1.2 +	0 (0)	0 (0)	0 (0)

The continuous variables expressed as mean ± SD.
† normal range.
* $p < 0.05$ compared to controls. ** $p < 0.01$ compared to controls.

ステロイド性ION群とnormal controlをfigure. 1-aに示す。CYP3A活性が低い部分に分布していた。

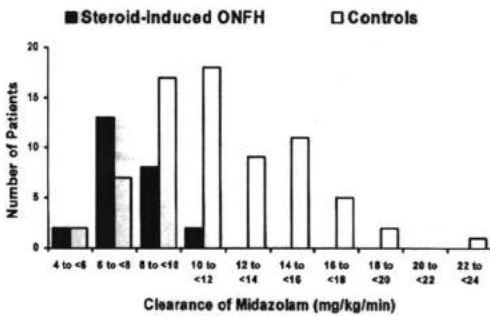


fig.1-a

アルコール性ION群とnormal control群のhistogramをfigure. 1-bに示す。ステロイド性ION群とは異なり、アルコール性ION群は健常人のCYP3Aの分布のなかでCYP3A

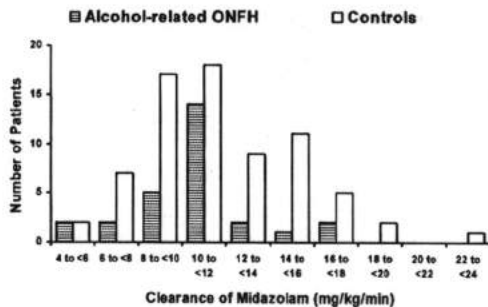


fig.1-b

活性に特別な傾向を認めなかった。

平均値で比較すると(fig.2)、ステロイド性ION群はnormal controlと比較して統計学的有意にCYP3A活性が低く($p < 0.001$)、一方アルコール性ION群はnormal controlと比較して統計学的有意差を認めなかった。さらに、同じION群の中でもステロイド性ION群はアルコール性ION群と比較して統計学的有意にCYP3A活性が低かった($p < 0.05$)。

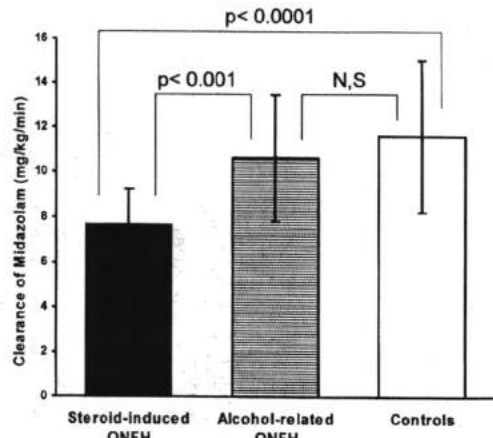


fig.2

次に、CYP3A活性低値がステロイド性IONの発生に関与しているか検索するために unconditional logistic regression modelを用いて多変量解析を行った(table.2)。normal control群のmidazolam clearanceの下位4分位である9.1mg/kg/min以下を肝CYP3A活性低値とした。単変量解析ではCYP3A活性のみがステロイド性ION発生のリスクを高めており(Crude OR 11.4 [95%CI 3.72-34.9], $p < 0.0001$)、性・年齢・肝機能・腎機能はステロイド性ION発生に関与してはいなかった。性・年齢・肝機能・腎機能の影響を調整した結果、最終的にCYP3A活性低値はステロイド性ION発生のリスクを10.1倍上昇させていた(adjusted OR 10.1 [95% CI 3.21-32.0], $p < 0.0001$, Table 2)。

table 2

Characteristics	Distribution of subjects (%)		Crude		Multivariate*	
	Steroid-induced ONFH	Controls	OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)	p value
MDZ CL † (mg/kg/min)						
9.1 +	5 (21)	54 (75)	1		1	
≤ 9.1	19 (79)	16 (22)	11.4 (3.72-34.9)	<0.0001	10.1 (3.21-32.0)	<0.0001
SEX						
Male	14 (58)	30 (42)	1		1	
Female	10 (42)	42 (58)	0.51 (0.20-1.30)	0.159	0.63 (0.20-1.97)	0.428
AGE (yr)						
per one year	24	72	1.00 (0.97-1.03)	0.980	1.00 (0.96-1.04)	0.855
AST ‡ (IU/L)						
≤ 43	21 (88)	86 (92)	1		1	
43 +	3 (12)	6 (8)	1.57 (0.36-6.83)	0.547	1.70 (0.29-10.8)	0.540
ALT ‡ (IU/L)						
≤ 43	22 (92)	86 (92)	1		1	
43 +	2 (8)	6 (8)	1.00 (0.18-5.32)	1.000	0.55 (0.07-4.13)	0.565
BUN ‡ (mg/dl)						
≤ 18	16 (79)	67 (93)	1		1	
18 +	6 (21)	6 (7)	3.53 (0.92-13.5)	0.065	1.92 (0.30-9.52)	0.420
Cre ‡ (mg/dl)						
≤ 1.2	24	72				
1.2 +	0	0				

† Cut-off point: † lowest quartile in the controls, ‡ normal range
* The model includes MDZ CL, sex, age, AST, ALT, and BUN

また、Attributable fraction を算出すると90%であり、肝CYP3A活性低値はステロイド性IONの主要な原因であることが明らかになった。

midazolam投与後5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360分それぞれの1-OH' MDZ/MDZ ratioを算出し、肝CYP3A活性との相関性について検索を行った。その結果、midazolam投与後60分時のsingle point 1-OH' MDZ/MDZ ratioはmidazolam clearance値(CYP3A活性)と強い相関を示し(R=0.72, p<0.0001)肝CYP3A活性をよく反映するスクリーニング法であった(fig4)。

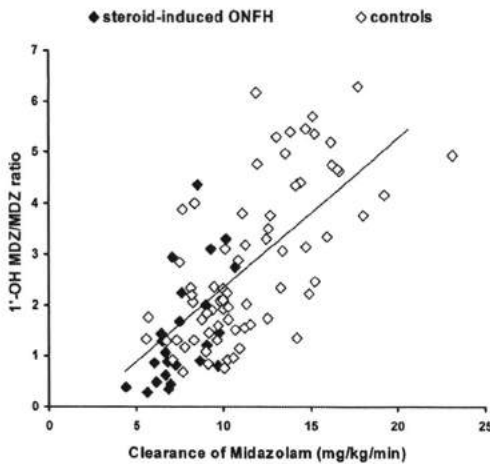


fig4

4. 考察

midazolam clearance を用いた研究結果より、ステロイド性ION患者の肝CYP3A活性は健常人の分布を参照すると、低値に分布していた。また、ステロイド性ION患者群の肝CYP3A活性の平均値は、健常人と比較すると統計学的有意に低値であった。そして、肝CYP3A活性低値はステロイド性ION発生リスクを10.1倍高めていた。一方アルコール性ION患者はそのような分布は示さず、CYP3A活性の平均値も健常人と有意な差を認めなかった。また、多変量解析の結果でも肝CYP3A活性はアルコール性ION発生リスクには関与していなかった(data not shown)。

また、同じION群であっても、ステロイド性ION患者の肝CYP3A活性の平均値はアルコール性ION患者よりも統計学的有意に低値であった。

これらの結果より、ステロイド性ION患者は肝CYP3A活性が低い為に(Poor metabolizer)、体内にステロイド剤が長時間蓄積する傾向にあり、ステロイド剤の薬理効果が過剰になった為にステロイド性IONを発生したと考察した。

肝CYP3A活性の低下がステロイド性IONの発生の原因であるとするならば、できるだけ簡便かつ低侵襲な方法で個々の患者の肝CYP3A活性を把握し、その活性に基づき投与ステロイド量を調整することでステロイド性ION発生の予防が可能になると考えられる。

患者の肝CYP3A4活性をステロイド剤投与時に把握する方法としてはmidazolam clearance法は実際的ではない。今回single point 1'-OH MDZ/MDZ ratioをスクリーニング検査として使用できるか検討した結果、肝CYP3A活性とよい相関性を示した。よって、実際のスクリーニング検査としてはmidazolam経口投与後60分での1回採血によるsingle point 1'-OH MDZ/MDZ ratioがより望ましい方法であると

考察した¹³。

このような方法でステロイド剤投与前に肝CYP3A活性を把握し、その活性に応じたステロイド剤の投与量調節によって、ステロイド性ION発生の予防が可能になると考えられる。

5. 結 論

1. ステロイド性ION患者はCYP3A活性が低く、肝CYP3A活性低値はステロイド性ION発生のリスクを10.1倍高めていた。この結果より、ステロイド性IONは肝CYP3A活性低値がその主要な原因の一つと考えられた。
2. midazolam投与後1回採血法によるsingle point 1'-OH MDZ/MDZ ratioを求めることにより肝CYP3A活性を簡便に把握する事ができ、この活性に基づいたステロイド剤投与量調節(テーラーメイド化)によりステロイド性ION発生の予防ができる可能性がある。

6. 参考文献

1. Hirota Y, Hirohata T, Fukuda K, et al. Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 530-8.
2. Hirota Y, Hotokebuchi T, Sugioka Y. Idiopathic Osteonecrosis of the femoral head : Nationwide Epidemiologic Studies in Japan. *Osteonecrosis Etiology, Diagnosis, and treatment* 1997:51-58.
3. Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, et al. Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. *Lupus* 2005; 14:385-90.
4. Oinuma K, Harada Y, Nawata Y, et al. Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 1145-8.
5. Ono K, Tohjima T, Komazawa T. Risk factors of avascular necrosis of the femoral head in patients with systemic lupus erythematosus under high-dose corticosteroid therapy. *Clin Orthop* 1992:89-97.
6. Abel SM, Maggs JL, Back DJ, Park BK. Cortisol metabolism by human liver in vitro-1. Metabolite identification and inter-individual variability. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43:713-9.
7. Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP, Lapenson DP. Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1988; 263: 424-36.
8. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 2005; 352:2211-21.
9. Eichelbaum M, Burk O. CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 2001; 7: 285-7.
10. Sugano N, Kubo T, Takaoka K, et al. Diagnostic criteria for non-traumatic osteonecrosis of the femoral head. A multicentre study. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81:590-5.
11. Sugano N, Atsumi T, Ohzono K, Kubo T, Hotokebuchi T, Takaoka K. The 2001 revised criteria for diagnosis classification, and staging of idiopathic

- osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Sci* 2002; 7:601-5.
12. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:549-56.
13. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:557-66.