

ラット肝灌流モデルにおける肝機能正常時と異常時での lidocaine 代謝の比較

須崎 範子*, 定松 舞子*, 片上 智裕*, 曾我 祐子*
 門林 孝明*, 佐々木 大輔*, 廣谷 芳彦**, 加藤 隆児*
 井尻 好雄*, 田中 一彦*

要 旨

Lidocaine (LID) は抗不整脈薬として用いられる薬物で、重篤な心室性不整脈を起こした緊急時の第一選択薬となっている。このため、緊急時には肝機能評価を行うことなく投与される可能性がある。そこで、ラット肝灌流モデルにおける肝正常時と肝障害時における LID の薬物動態を調べる目的で、灌流液中 LID とその代謝物である monoethylglycinexylidide (MEGX) の薬物動態学的パラメータを測定した。肝機能測定の結果より、灌流開始 30 分を肝正常時、150 分を肝障害時とし、LID 3mg/kg の投与を行った。その結果、AUC_{MEGX} は灌流開始 150 分後の LID 投与において有意な増加が認められたが、それ以外のパラメータに有意な変化は認められなかった。また、灌流液中の MEGX 代謝に関わるエステラーゼ量が灌流開始直後より低下したため、MEGX の代謝・消滅が遅延した可能性も考えられた。これより、肝血流量が一定である場合はある程度の肝障害を起こしている場合でも、LID は通常の投与量で投与可能であることが示唆された。

Key words : lidocaine, 肝灌流, MEGX

はじめに

Lidocaine (LID) は、局所麻酔薬、抗不整脈薬として頻用されている薬物である¹⁾。抗不整脈薬とし

ては、心室性不整脈の緊急治療薬として汎用されており、ジギタリス中毒による心室性不整脈にも有効である¹⁾。また、心室性不整脈を起こした緊急時の第一選択薬となっているため、緊急時の対応として腎・肝機能評価を行うことなく投与される可能性がある。LID はほとんどが肝臓の CYP3A で代謝され、腎臓からの排泄は少ないものと考えられる¹⁾。LID の代謝は肝血流量と酵素活性の両方を反映することが知られており、主要代謝物である monoethylglycinexylidide (MEGX) に代謝される^{2~5)}。

我々が確立したラット肝灌流モデルは肝血流量を一定にコントロールしていることから、LID の代謝は肝代謝酵素のみに反映する⁶⁾。そこで今回、この肝灌流モデルを用い、肝機能正常時と肝機能障害時における LID 代謝について検討を行った。

対象と方法

A. 対 象

Wistar/ST 雄性ラット (8~10 週齢, 体重 240~300g, 日本 SLC 株式会社) を用いた。水および標準固形飼料を自由に摂食させ、12 時間の明暗サイクルで数週間の予備飼育を行った。実験開始 16 時間前に絶食を行い、実験に用いた。全ての動物実験は大阪薬科大学の動物施設使用ガイドラインに従って行った。

B. 肝灌流実験⁷⁾

Pentobarbital sodium (50mg/kg, 大日本住友製薬株式会社) を腹腔内に投与し、麻酔を行った。その後、頸動脈、胆管、肝門脈、大静脈にカニューレーションを行い、灌流を開始した。灌流液には

*大阪薬科大学臨床薬剤学研究室

**大阪大谷大学臨床薬剤学講座

Krebs-Henseleit buffer : 血液 = 43 : 7 (牛血清アルブミン 5%) を用いた。灌流中の肝機能評価として、pH, 灌流圧, 酸素消費量, 逸脱酵素 (Alanine aminotransferase, ALT; Aspartate aminotransferase, AST), 胆汁分泌速度の測定を行った。

C. 薬物投与およびサンプル採取

LID 3mg/kg を用いた。灌流開始後 30 分間安定化を行った。その後、LID 3mg/kg を灌流液中に投与した。これを 1 回目の投与とした。灌流開始前, 3, 10, 20, 30, 45, 60, 90 分に灌流液を門脈側より採取した。その後、30 分間 wash out を行い、同様に LID 3mg/kg を灌流液中に投与した。これを 2 回目の投与とした。1 回目同様、灌流開始前, 3, 10, 20, 30, 45, 60, 90 分に灌流液を門脈側より採取した。

D. 試薬

LID は Sigma-Aldrich 株式会社より購入した。また、MEGX は Astrazeneca 株式会社より供与いただいた。LID および MEGX の各標準液は蒸留水にて 1mg/mL に溶解し、4°C にて保存した。内標準物質である mexiletine (和光純薬工業株式会社) の標準液は後述する移動相にて 1mg/mL に溶解し、4°C にて保存した。その他の試薬は試薬特級または高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用を用いた。

E. 測定試料作成

採取した灌流液は遠心分離 (5,000rpm, 10min, 4°C) 後、その上清を分取し、サンプルとした。サンプル 100 μ L を 1mL マイクロチューブに入れ、さらに内標準物質として mexiletine (10 μ g/mL) 20 μ L, dichloromethane を 1mL 加え、混和 (1min) し、遠心分離 (5,000rpm, 10min, 4°C) 後、下層の dichloromethane 層を別のマイクロチューブに移し替えた。これを濃縮遠心機 (トミー精工株式会社) により 40°C にて蒸発乾固後、残渣に移動相 100 μ L を加えて混和 (1min) し、再溶解した。測定直前に再度混和し、遠心分離 (5,000rpm, 10min, 4°C) 後、HPLC へ 40 μ L を注入し、測定を行った。

検量線はブランク灌流液を遠心分離 (5,000rpm, 10min, 4°C) し、その上清を用い、灌流液中 LID 濃度 (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μ g/mL), MEGX 濃度 (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 μ g/mL) になるように希釈調製した。これらを同様の方法で抽出・測定し、LID および MEGX の検量線を作成し

た。灌流液中 LID および MEGX 濃度は内標準法により、ピーク面積比 (LID ピーク面積比/内標準物質ピーク面積, MEGX ピーク面積/内標準物質ピーク面積) を計算することにより、定量を行った。

F. HPLC 装置および測定条件

HPLC システムは SHIMAZU LC-10 ADvp (島津製作所株式会社) を、分光高度検出器は SPD-M 10 Avp (島津製作所株式会社) を、カラムは STR-ODS 240 \times 4.6mm (信和化学工業株式会社) を用いた。移動相はリン酸緩衝液 (5mM, pH 4.0) : acetonitrile = 85 : 15 を用い、流速は 1.0mL/min, カラム温度は 40°C に設定した。検出波長は 210nm, サンプル注入は 40 μ L とした。

G. 解析方法

灌流液中 LID および MEGX 濃度推移より、台形法を用い、LID クリアランス (CL_{LID}), 灌流液中 LID, および MEGX 濃度時間曲線下面積 AUC_{LID} , AUC_{MEGX} , 消失速度定数 (Ke_{LID}) をそれぞれ算出した。LID および MEGX の灌流液中濃度, AUC_{LID} , AUC_{MEGX} , CL_{LID} , CL_{MEGX} はそれぞれ LID 投与 1 回目と 2 回目を比較し、paired Student *t*-test により検定を行った。両側危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) をもって有意差ありと判定し、数値は mean \pm SD で示した。

結果

A. 灌流肝の評価

本研究で用いた肝灌流モデルにおいて、肝機能評価のため行った pH 測定の結果を図 1 に示した。30 分から 140 分までは pH 7.40 \pm 0.05 の間を推移しており、それ以降 pH は低下した。灌流圧測定の結果を図 2 に示した。灌流時間中、門脈圧は 3~7cmH₂O を、静脈圧は -1~0cmH₂O 内を推移した。酸素消費量の結果を図 3 に示した。酸素消費量は、灌流開始 10 分より灌流終了時の 240 分までの間、10.0 \pm 1.92 μ L/min/g liver を推移し、灌流開始 30 分と比較して有意な差は認められなかった。逸脱酵素 (ALT, AST) の結果を図 4 に示した。灌流開始 120 分以降から灌流終了 240 分までに AST が約 8.6 倍, ALT が約 10 倍に増加した。

B. 灌流液中 LID および MEGX 濃度推移

灌流液中 LID および MEGX 濃度推移の結果を図 5, 6 に示した。灌流液中 LID は 2-コンパートメントモデルに従い消失した。LID 投与 1 回目と 2 回

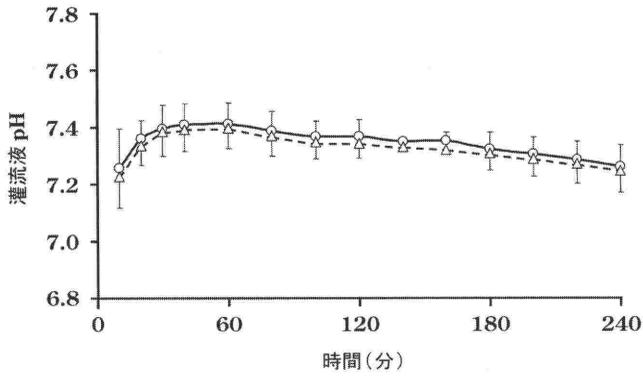


図1 ラット肝灌流中における灌流液 pH 変化
 灌流液速度は 10mL/min で灌流を行った。数値は平均±SD を示す (n=5)。
 ○, 門脈側; △, 静脈側。

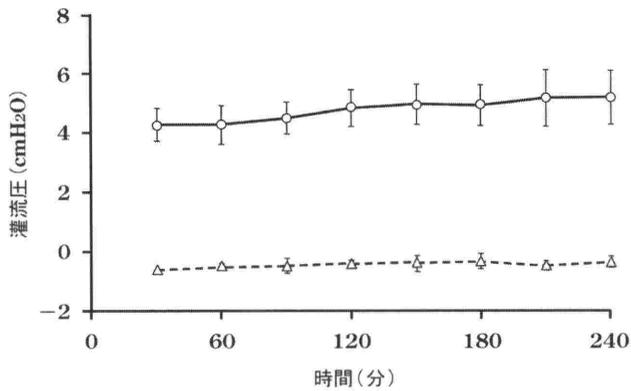


図2 ラット肝灌流中における灌流圧変化
 灌流液速度は 10mL/min で灌流を行った。数値は平均±SD を示す (n=3)。
 ○, 門脈側圧; △, 静脈側圧。

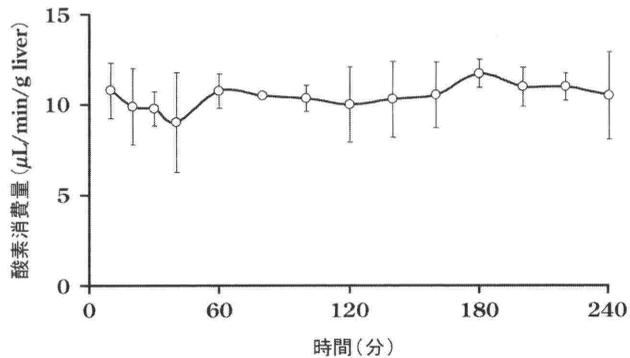


図3 ラット肝灌流中における酸素消費量変化
 灌流液速度は 10mL/min で灌流を行った。数値は平均±SD を示す (n=5)。

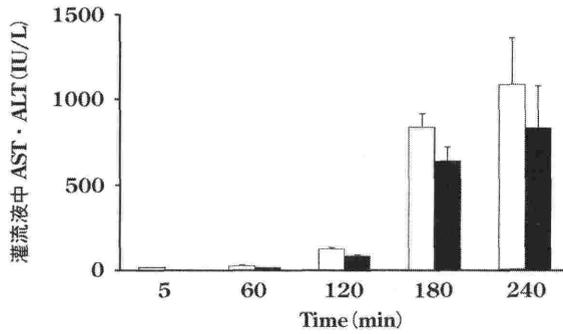


図4 ラット肝灌流中における灌流液中 AST, ALT 変化
 灌流液速度は 10mL/min で灌流を行った。数値は平均±SD を示す (n=4)。
 □, AST; ■ALT. AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase.

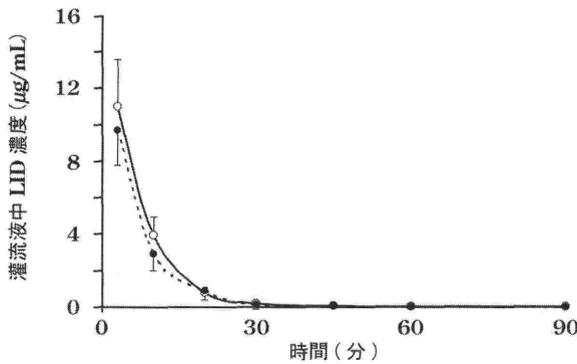


図5 灌流液中 lidocaine (LID) 濃度推移
 灌流液速度は 10mL/min で灌流を行った。数値は平均±SD を示す (n=5)。○, LID 1 回目投与; ●, LID 2 回目投与。

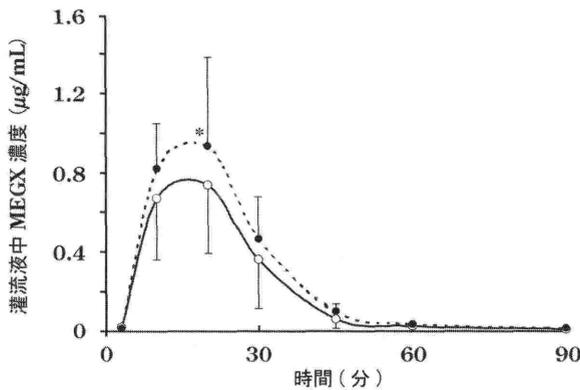


図6 灌流液中 monoethylglycinexylidide (MEGX) 濃度推移
 灌流液速度は 10mL/min で灌流を行った。数値は平均±SD を示す (n=5)。
 *p<0.05, vs LID 1 回目投与。○, LID 1 回目投与; ●, LID 2 回目投与。LID, lidocaine.

目を比較したところ、LID 濃度にはどの時間においても有意な差は認められなかった。MEGX 濃度については、2 回目の LID 投与 20 分後におけるサンプルにおいて灌流中 MEGX 濃度に有意な増加が認められたが、その他の時間においては有意な変

化は認められなかった。

C. LID および MEGX の薬物動態学的パラメータ

LID および MEGX の薬物動態学的パラメータを表1に示した。LID 投与 1 回目と 2 回目を比較したところ、AUC_{LID} は同等であった。しかし、AUC_{MEGX}

表1 ラット肝灌流モデルにおける LID および MEGX 動態パラメータ

	LID 1 回目投与	LID 2 回目投与
CL _{LID} (mL/hr)	0.34±0.03	0.36±0.05
AUC _{LID} (mg/L·hr)	1.69±0.57	1.76±0.44
Kel _{LID} (hr ⁻¹)	2.38±1.29	2.20±0.56
AUC _{MEGX} (mg/L·hr)	0.35±0.13	0.42±0.15*

数値は平均±SD を示す (n=5). *p<0.05, vs LID 1 回目投与. LID, lidocaine; MEGX, monoethylglycinexylidide; CL, clearance; AUC, area under the curve; Kel, elimination rate constant

において 1 回目より 2 回目の方が 28% 有意に増加した. CL_{LID}, Kel_{LID} の薬物動態学的パラメータにおいては有意な変化は認められなかった.

考 察

本研究で用いた肝灌流モデルの肝機能評価について, pH は肝細胞の生存率や薬物の分子型の存在比率に影響を及ぼす可能性があり⁸⁾, 生体の体液中の基準である 7.40±0.05 を灌流中 pH の適切な数値とすると, 本研究において用いた肝灌流モデルの pH が安定に維持されているのは灌流開始 30 分から 140 分までであった. 灌流圧は灌流モデルの流路および灌流肝の状態の良否を判断する重要なパラメータであり, 門脈圧は 12cmH₂O 以下, 静脈圧は -1~0cmH₂O 内が適当とされている⁷⁾. 本研究において, 灌流開始 30 分から 140 分までの灌流時間中は基準値内を推移しており安定していると考えられた. 酸素供給の指標となる酸素分圧は体重 250~300g のラットにおいて 500mmHg 必要とされている⁸⁾. 本研究において, 門脈側の酸素分圧は 500mmHg 以上を維持していた. また, 酸素消費量は灌流液組成, 流速によって変化するため明確な基準はないが, 本研究にて設定した条件では酸素供給は基準を満たしていたことから, 酸素消費においては高い viability が維持されていると考えられた. 逸脱酵素 (ALT, AST) は肝細胞の障害の指標となる酵素である. 灌流開始 120 分以降から灌流終了 240 分までに AST, ALT が急増したことから灌流開始 120 分以降ではある程度の肝障害が起きていると考えられた. これらの結果から, 本研究に用いた灌流肝が正常であると考えられるのは, 灌流開始 30 分から 120 分までの間であり,

灌流開始 150 分後より障害時とした.

MEGX は LID の代謝物であり, 肝障害時には MEGX の形成やさらなる代謝が遅延するため, MEGX 濃度が異なる. LID は人において, 主に脱メチル化により MEGX に変換され, また水酸化により OH-LID に変換される^{2~5)}. その後, MEGX はさらに脱メチル化され glycineyxylidide (GX) に変換, あるいは水酸化により OH-MEGX に変換される. このため, 臨床においては血漿中 MEGX 濃度を測定することにより肝疾患の進行診断基準や肝移植前の評価に用いられている^{2~5)}. ラットでも同様の経路を通り, CYP3A2 により主代謝物である MEGX に代謝され, さらに血中に存在するエステラーゼにより OH-MEGX や脱エチル体である GX に代謝される⁹⁾. 本研究において, 灌流 150 分において MEGX 濃度, AUC_{MEGX} が有意に増加し, 2 回目において LID の代謝率は促進したかに見えた. しかし, 本実験系における灌流液中のエステラーゼ量が灌流開始直後より低下したため, MEGX から GX への代謝が低下し, MEGX の消失が遅延した可能性が考えられた.

本研究の肝灌流モデルにおける肝機能評価により, 灌流開始 120 分以降, 灌流液中 pH の低下, 逸脱酵素の上昇があった. しかし, LID の薬物動態に大きな影響はなかった. 肝障害モデルにおいて CYP 活性低下よりも肝血流量の低下が LID の消失に影響を及ぼすという報告^{9,10)}がある. また, エンドトキシンによる敗血症モデルにおいても肝血流量の低下が LID の消失に影響を及ぼすという報告¹¹⁾があり, LID 代謝は肝血流量に影響を受ける. そのため, 肝血流量が一定であるラット肝灌流モデルにおいて, LID の代謝酵素活性への影響は小さいことが示唆された. 肝血流量が一定であるラット肝灌流モデルにおいて, 灌流開始 30 分から 240 分までは灌流液中 pH の低下やある程度の逸脱酵素の増加は LID 薬物動態に及ぼす影響は小さいことが示唆された.

これらのことより, 肝機能正常時と肝機能障害時における LID 代謝には有意な差は認められないことが分かった. また, ある程度の肝機能異常 (高齢者等) を有する場合でも, 緊急時肝血流量が一定の場合には, LID は通常の投与量で投与可能であることが示唆された.

本研究にあたり，ラット肝灌流モデルについて御指導を頂きました金沢医科大学生理機能制御学 芝本利重教授に感謝申し上げます。また，MEGX を供与頂きましたアストラゼネカ株式会社に感謝申し上げます。

文 献

- 1) アストラゼネカ株式会社: キシロカイン®注射液 インタビューフォーム. 大阪. 2005.
- 2) Oellerich M, Burdelski M, Lautz HU, et al: Lidocaine metabolite formation as a measure of liver function in patients with cirrhosis. *Ther Drug Monit* 1990; 12: 219-26.
- 3) Jochum C, Beste M, Penndorf V, et al: Quantitative liver function tests in donors and recipients of living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 544-9.
- 4) Leclercq I, Saliez A, Wallemacq PE, et al: The monoethylglycinexylidide test does not correctly evaluate lidocaine metabolism after ischemic liver injury in the rat. *Hepatology* 1997; 26: 1182-8.
- 5) Keck H, Bachmann S, Knoop M, et al: The validity of the MEGX test in correlation with histology after orthotopic rat liver transplantation. *Transpl Int* 1994; 7: s208-12.
- 6) Shimadzu K, Nishi S, Kariya N, et al: The pharmacokinetic change of lidocaine by catecholamines using isolated perfused rat liver (IPRL). *Life Sci* 1998; 62: 2399-405.
- 7) Shibamoto T, Ruan Z, Cui S, et al: Anaphylactic hepatic venoconstriction is attenuated by nitric oxide released via shear stress-dependent and -independent mechanisms in Guinea pig. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 288-93.
- 8) Bessems M, 't Hart NA, Tolba R, et al: The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 2006; 40: 236-46.
- 9) Nakamoto T, Oda Y, Imaoka S, et al: Effect of phenobarbital on the pharmacokinetics of lidocaine, monoethylglycinexylidide and 3-hydroxylidocaine in the rat: correlation with P450 isoform levels. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 296-300.
- 10) Kawalek JC, Howard KD, Farrell DE, et al: Effect of oral administration of low doses of pentobarbital on the induction of cytochrome P450 isoforms and cytochrome P450-mediated reactions in immature Beagles. *Am J Vet Res* 2003; 64: 1167-75.
- 11) McKindley DS, Chichester C, Raymond R: Effect of endotoxin shock on the clearance of lidocaine and indocyanine green in the perfused rat liver. *Shock* 1999; 12: 468-72.

The Comparison of Lidocaine Metabolism in Normal- and Dys-Function of Liver on Rat Liver Perfusion Model

Noriko Suzaki*, Maiko Sadamatsu*, Tomohiro Katagami*, Yuko Soga*, Takaaki Kadobayashi*,
Daisuke Sasaki*, Yoshihiko Hirotoni**, Ryuji Kato*, Yoshio Ijiri*, Kazuhiko Tanaka*

*Laboratory of Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacokinetics, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Takatsuki, Japan

**Laboratory of Clinical Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University, Tondabayashi, Japan

Lidocaine (LID), an antiarrhythmic agent, is used as a first-line agent for acute severe ventricular arrhythmias. LID is often used emergently without assessment of liver function. We examined the pharmacokinetic parameters of LID and monoethylglycinexylidide (MEGX) in normal- and dys-function of liver using the perfused rat liver. The liver function was normal range within 30 minutes of starting perfusion, but hepatic dysfunction

was appeared at 150 minutes after starting perfusion. So we used LID (3mg/kg) at 30 and 150 minutes of starting perfusion. AUC_{MEGX} is significantly increased at 150 minutes, except for AUC_{LID}, CL_{LID}, and CL_{MEGX}. These results showed the possibility that the elimination of MEGX may be delayed in hepatic dysfunction. And it is suggested that LID can be injected with the same dose in normal- and dys-function of liver.

Key words : lidocaine, hepatic perfusion, MEGX

(Circ Cont 2009; 30: 82-87.)