

**Caffeine 呼気試験による caffeine 代謝関連
single nucleotide polymorphism の同定**

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系薬理学専攻

石井 倫子

修了年 2021 年

指導教員 浅井 聡

**Caffeine 呼気試験による caffeine 代謝関連
single nucleotide polymorphism の同定**

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系薬理学専攻

石井 倫子

修了年 2021 年

指導教員 浅井 聡

目次

1.	概要	1
2.	緒言	6
—Caffeine-N-3-methyl- ¹³ C breath test (N3CBT)—		
3.	対象と方法	12
4.	結果	18
5.	考察	21
—Caffeine-trimethyl- ¹³ C breath test (TriCBT)—		
6.	Caffeine-trimethyl- ¹³ C breath test 施行の背景と目的	26
7.	対象と方法	27
8.	結果	31
9.	N3CBT と TriCBT の比較結果	34
10.	考察	36
11.	まとめ	44
12.	謝辞	45
13.	表	46
14.	図	61
15.	図説	71

1 6. 引用文献	7 6
1 7. 研究業績	8 4

1. 概要

【背景】

Caffeine の代謝の約 90% は肝臓にある代謝酵素 cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) によるものである。CYP1A2 には single nucleotide polymorphism (SNP) が存在し、rs2472297 および rs762551 は caffeine 代謝に影響している。rs2472297 の T allele はアジア人には存在しないが、rs762551 の genotype では caffeine 代謝に違いがあり、genotype A/A は extensive metabolizer、A/C は intermediate metabolizer、C/C は poor metabolizer と報告されている。

CYP1A2 の酵素量の増加には aryl hydrocarbon receptor (AhR) の活性化が必要である。AHR の SNP である rs4410790 にも caffeine 消費量や代謝との関連が報告されている。Caffeine の中枢神経興奮作用は adenosine A2a receptor (ADORA2A) が重要な役割を担う。ADORA2A の SNP である rs5751876 にも caffeine 代謝やコーヒー消費量との関連が報告されている。

¹³C-caffeine breath test (CBT) は 1980 年代から行われ始め、caffeine 代謝が CYP1A2 で代謝されることから肝機能評価や CYP1A2 活性評価方法として用いられ有用性が報告されている。Caffeine 代謝は主に N-脱メチル化と 8 位炭素の酸化である。これまでに報告されている CBT は caffeine のメチル基に ¹³C を標

識しており、caffeine 代謝関連 SNP が N-脱メチル化に影響していれば CBT の結果に影響する。今回我々は、caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT) および caffeine-trimethyl-¹³C breath test (TriCBT) で caffeine 代謝関連 SNPs が同定可能であるかを検討した。

【目的】

Caffeine-N-3-methyl-¹³C および caffeine-trimethyl-¹³C を利用した CBT で caffeine 代謝関連 SNPs (*CYP1A2* SNPs : rs762551 および rs2472297、*AHR* SNP : rs4410790) と caffeine 感受性に関連する SNP (*ADORA2A* SNP : rs5751876) の同定が可能であるかを検討する。

【対象と方法】

N3CBT では若年健康成人 130 例 (平均年齢 21.9 歳、男性 97 例、女性 33 例) を対象とし、TriCBT では若年健康成人 132 例 (平均年齢 21.8 歳、男性 101 例、女性 31 例) を対象とした。呼気試験施行前に Oragene®・DNA OG-500 Kit に唾液を採取した。コントロール呼気を採取した後に caffeine-N-3-methyl-¹³C または、caffeine-trimethyl-¹³C 100 mg を蒸留水 100 ml に溶解して内服した。内服後は安静座位とし 10 分間隔で呼気を 90 分まで採取し、赤外分光分析装置で呼気中 ¹³CO₂

の変化を測定した ($\Delta^{13}\text{CO}_2$)。測定結果は 90 分までの $\Delta^{13}\text{CO}_2$ の総和 (S^{90m}) で検討し、受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic : ROC) 解析により曲線下面積 (area under the curve : AUC) で検討した。 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ に影響する因子は一般化線形混合モデル (generalized linear mixed model : GLMM) で検討した。

Oragene®・DNA OG-500 Kit で採取した唾液から DNA を抽出し、caffeine 代謝に関わる *CYP1A2* SNPs : rs762551 および rs2472297、*AHR* SNP : rs4410790、および caffeine 感受性に関わる *ADORA2A* SNP : rs5751876 を TaqMan® SNP Genotyping Assay で解析した。

【結果】

N3CBT、TriCBT の被験者の rs2472297 は全例が genotype C/C であった。N3CBT の S^{90m} では、性別、喫煙の有無、caffeine 消費量、rs762551 および rs5751876 に有意差を認めなかった。rs4410790 の genotype C/C と T/C 間、T/C と T/T 間では有意差を認めなかったが、C/C と T/T 間に有意差を認めた。さらに genotype C/C と T allele キャリア (T/T+T/C) 間にも有意差を認め、C/C が有意に高値であった。Genotype C/C を陽性とした AUC は 0.768 であった。 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ に影響する因子は rs4410790 の genotype と caffeine 消費量であった。

TriCBT の S^{90m} では、性別、caffeine 消費量、rs762551 および rs5751876 に有意差を認めなかった。喫煙者と非喫煙者の比較では喫煙者は有意に高値であった。また rs4410790 の genotype 間に有意差を認めた。Genotype C/C は T/T および T/C に対して有意に高値であり、T/C は T/T に比べ高値であった。rs4410790 の genotype C/C と T allele キャリア (T/T + T/C) 間にも有意差を認め、C/C が有意に高値であった。Genotype C/C を陽性とした AUC は 0.758、T/T の AUC は 0.715 であった。 $\Delta^{13}CO_2$ に影響する因子は rs4410790 の genotype と喫煙の有無であった。

【結語】

Caffeine 代謝の N-脱メチル化は *CYP1A2* の SNP である rs762551 の genotype では無く、*CYP1A2* の遺伝子発現を調節する *AHR* の SNP である rs4410790 の genotype に依存しており、N3CBT では caffeine 消費量、TriCBT では喫煙の有無に影響されることを示した。若年健康成人であれば、caffeine-N-3-methyl- ^{13}C および caffeine-trimethyl- ^{13}C を利用した CBT で *AHR* の SNP である rs4410790 の genotype が同定可能であり、同定には N3CBT より TriCBT が有用であることが示唆された。

略語

CBT : ^{13}C -caffeine breath test, ^{13}C -caffeine 呼気試験

N3CBT : caffeine-N-3-methyl- ^{13}C breath test, 3 メチル ^{13}C -caffeine 呼気試験

TriCBT : caffeine-trimethyl- ^{13}C breath test, トリメチル ^{13}C -caffeine 呼気試験

SNP : single nucleotide polymorphism, 一塩基多型

CYP1A2 : cytochrome P450 1A2, チトクローム P450 1A2

AhR : aryl hydrocarbon receptor, アリル炭化水素受容体

AhRR : aryl hydrocarbon receptor repressor, アリル炭化水素受容体抑制因子

ADORA2A : adenosine A_{2A} receptor, アデノシン A_{2A} 受容体

GLMM : generalized linear mixed model, 一般化線形混合モデル

ROC : receiver operating characteristic, 受信者動作特性

AUC : area under the curve, 曲線下面積

2. 緒言

2-1 呼気中炭酸ガスの分析

1940年代に放射性同位元素 ^{14}C の利用が開始され、 ^{14}C 標識化合物を経口や静脈内投与し、代謝最終産物として呼気中に排出される $^{14}\text{CO}_2$ を測定していた。1960年代に呼気パターン分析器 (respiration pattern analyzer) が開発され、この装置を用いて1960年代前半に多くの臨床研究が行われた。この装置は被検者の頭部全体を容器で覆い、呼気を連続的に測定器に導き、 ^{14}C の放射能を赤外分光計で $^{14}\text{CO}_2$ 濃度として連続測定していた (Tolbert型呼吸パターン分析器)。

Tolbert型呼吸パターン分析器によりブドウ糖、アミノ酸、その他の物質の代謝動態の研究や、消化吸収、内分泌、代謝疾患の診断に応用された。しかし、装置が大掛かりで高価なこと、比較的少量 (370-3700kBq) の放射性標識化合物の投与が必要であり、広く普及はしなかった[1]。

2-2 呼気検査の変遷

^{13}C 呼気検査は、炭素の安定同位体 ^{13}C (自然存在率約1.1%) を標識した化合物を投与後、呼気中に現れる $^{13}\text{CO}_2$ を経時的にモニターすることによって、その化合

物の消化・吸収・代謝を診断する方法である。従来は放射性同位体 ^{14}C (半減期約5600年： β 崩壊)を用いて行われてきたが、安定同位体 ^{13}C に代えることで、放射線障害の危険がなくなり、新生児、乳児、妊婦等にも適用範囲が広がった。1970年代にKlein、Schoellerらによる呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ 分析方法の研究から始まり、臨床研究では、Watkinらの報告が最初である[2-6]。

2-3 ^{13}C 呼気試験の原理

^{13}C は、自然界に存在する炭素原子の約1.1%を占める。この1.1%という値は、化合物の生成する条件により、1.06%から1.12%のさまざまな化合物固有の値を示す。自然存在率1.1%の ^{13}C を濃縮して存在率99%にまで高めて ^{13}C で標識した化合物を体内に投与すると、呼気中の CO_2 の $^{13}\text{CO}_2$ 存在率は経時的に上昇し、ピーク値に達して下降する。この $^{13}\text{CO}_2$ の出現パターンを解析して、被検者の体内における消化・吸収・代謝の状況がわかる。これが ^{13}C 呼気試験の原理である[1]。

特徴としては、1) 安定同位体を用いるため、放射線被爆を伴わない、2) 非侵襲または低侵襲であること、3) 使用する化合物によっては、生体内の特定の酵素活性が測定可能であることがあげられる。近年 $^{13}\text{CO}_2$ の測定技術の発達により

$^{13}\text{CO}_2$ が簡便に測定可能となり、2000年には胃炎、胃・十二指腸潰瘍の原因であるヘリコバクター・ピロリの感染が ^{13}C 標識ウレアーゼ呼気試験で簡便に診断できることから注目を集めた。

2-4 $^{13}\text{CO}_2$ 測定方法

$^{13}\text{CO}_2$ 測定には、古くから用いられている方法にガスクロマトグラフ質量分析(GC-Mas)を使った測定法がある。現在最も簡便に測定できる方法の一つに赤外分光光度計を用いた方法があり、今回の測定はすべて赤外分光測定器である $^{13}\text{CO}_2$ アナライザーを用いた。

2000年に保険適応となったヘリコバクター・ピロリの感染診断に用いられ ^{13}C 標識ウレアーゼ呼気試験のために販売された赤外分光分析装置であるPOCone (Fukuda Denshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) は呼気中 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ を10分程度で測定可能にした。現在、多くの病院の臨床検査室に常設されており、極めて容易に呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ が測定可能となった。

2-5 ^{13}C -caffeine breath test (CBT) のこれまでの位置づけ

呼気試験は、呼気を採取しガス分析を行うことにより生体機能や臓器障害等を調べる方法である。安定同位体 ^{13}C で標識した種々の化合物の合成が可能となり応用範囲が広がり、 ^{13}C -caffeine breath test (CBT) は 1980 年代から行われ始めた。

N-3 メチル基に ^{13}C を標識した caffeine-N-3-methyl- ^{13}C (Figure 1a) と N-1、N-3 および N-7 メチル基のすべてに ^{13}C を標識した caffeine-trimethyl- ^{13}C を使用した CBT がこれまでに報告されている (Figure 1b)。CBT は caffeine の代謝が肝臓マイクロゾームにある cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) で代謝されることから肝機能評価を目的に使用され[7-13]、さらに、CYP1A2 の活性評価にも用いられている[14-20]。

2-6 Caffeine 代謝と Single nucleotide polymorphism (SNP)

Caffeine は世界で最も広く使われている精神刺激剤である。Caffeine は中枢神経を覚醒させ、疲労や眠気を軽減する[21]。日本では厚生労働省が caffeine の過剰摂取について注意喚起を促している[22]。また、European Food Safety Authority

(EFSA) は一度の摂取量を 200 mg とし[23]、カナダ保健省は健康成人では最大 400 mg/day としている[24]。

近年、Caffeine 消費と中枢神経系疾患[25-29]、心血管系疾患[30,31]、さらには癌との関連が報告されている[32,33]。これらの報告では caffeine 代謝や感受性に関連した single nucleotide polymorphism (SNP) の影響が示唆されている。

Caffeine 代謝の約 90%は代謝酵素 CYP1A2 によるものである。CYP1A2 活性はコーヒー摂取常習者では非常習者に比べて高く、喫煙者は非喫煙者に比べ高いと報告されている[14,34-37]。

CYP1A2 には遺伝子多型があり、caffeine 代謝の速度に影響を与える[38]。特に CYP1A2 の SNPs である rs2472297 と rs762551 (Figure 2a) は caffeine 消費習慣や代謝に深く関係していることが示されている[39,40]。rs762551 は A allele を有するのは 67.3%、C allele の 2 コピーが 32.7%と報告され、rs762551 の genotype により caffeine 代謝に違いがあり、genotype A/A は extensive metabolizer、A/C は intermediate metabolizer、C/C は poor metabolizer である[38,41]。

Caffeine 代謝の増加には CYP1A2 の酵素量の増加が必要であり、CYP1A2 の酵素量の増加には aryl hydrocarbon receptor (AhR) の活性化が必要である。AhR をコ

ードする遺伝子は 7q21 に存在し、*CYP1A2* と同様に遺伝子多型が存在する (*AHR* SNPs : rs4410790 および rs6968865)。 *AHR* はコーヒー消費習慣と関連が深く、特に rs4410790 (Figure 2b) は *caffeine* 消費量や代謝との関連が報告され、C allele を有している人は T allele を有している人より *caffeine* 消費量が多いことが報告されている[35,40-43]。

Caffeine の中枢神経興奮作用は adenosine A2a receptor (*ADORA2A*) が重要な役割を担う[44,45]。 *ADORA2A* の SNP である rs5751876 (Figure 2c) は、*caffeine* 代謝やコーヒー消費量との関連が報告されている[40,44-46]。

Caffeine の代謝は主に N-脱メチル化と 8 位炭素の酸化である。これまでに報告されている CBT は *caffeine* のメチル基に ¹³C を標識しており、*caffeine* 代謝関連 SNP が N-脱メチル化に影響していれば CBT の結果に影響する。今回、CBT を若年健康成人に施行し、*caffeine* 代謝に関与する SNPs (rs762551、rs2472297 および rs4410790) と *caffeine* 感受性に関与する SNP (rs5751876) が同定可能であるかを検討した。

Caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT)

3. 対象と方法

3-1 対象

Caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT) は若年健康成人 130 名 (平均 21.9 歳、男性 97 例、女性 33 例) で施行した。すべての被検者は 6 ヶ月以内に通院・入院治療の既往歴が無く、内服加療を必要とする疾患が無く、特定のサプリメントの摂取習慣が無く、B 型肝炎ウイルス抗原陰性、C 型肝炎ウイルス抗体陰性であることを確認し参加していただいた。N3CBT 施行前に喫煙の有無、コーヒー、紅茶、緑茶を含む caffeine 含有飲料摂取状況、身長、体重、body mass index (BMI) を調査用紙に記入していただいた。さらに、血圧測定も行い血圧に異常が無いことを確認した。

Caffeine 消費量はコーヒー、紅茶、緑茶、caffeine 含有飲料を含めて量・頻度を調査した。内閣府・食品安全委員会の資料を参考にして[47]、コーヒー1杯 (150 ml) は caffeine 80 mg とし、紅茶・緑茶・烏龍茶は 30 mg/100 ml とした。1日の消費量、1週間の摂取頻度を調査し、 $\{(1 \text{ 日の消費量} \times 1 \text{ 週間の摂取頻度})/7\}$ を算出し、caffeine 消費量 mg/day とした。

カナダ保健省が2010年にcaffeine消費について注意喚起した基準に従い[24]、caffeine消費量200 mg/day未満をlow consumption (消費量L)、200 mg/day以上399 mg/dayをnormal consumption (消費量N)、400 mg/day以上をheavy consumption (消費量H)と定義した。

3-2 Caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT)

N3CBT施行24時間前からcaffeine含有飲料およびアルコール飲料の摂取を禁止した。喫煙者はN3CBT施行前24時間を禁煙とした。呼気試験当日は禁食とし、施行1時間前まで水分摂取はフリーとした。

N3CBT施行前にOragene®・DNA OG-500 Kit (DNA Genotek, Inc., Ottawa, Ontario, Canada) に唾液を2 ml採取した。

試薬内服前にコントロール呼気 (1,800 ml) を採取し、caffeine-N-3-methyl-¹³C (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., MA, US, chemical purity specification $\geq 98\%$, molecular weight 195.18 g/mol, GC/MS for chemical purity 100%, GC/MS for isotope enrichment 99%) 100 mg を蒸留水 100 ml に溶解し内服した。内服後、安静座位とし10分間隔で呼気を90分まで採取した。呼気中¹³CO₂は赤外分光分析装置

(POCone, Fukuda Denshi Co., Ltd.) で測定した。結果は以下の式を用いて $\Delta^{13}\text{CO}_2$

(‰)として表した。

$$\Delta\text{‰ calculated} : \Delta^{13}\text{CO}_2 (\text{‰}) = \{({}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2_{\text{tmin}} - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2_{\text{0min}}) / {}^{13}\text{CO}_2_{\text{std}}\} \times 10^3$$

さらに、90分間の $\Delta^{13}\text{CO}_2$ (‰) の合計を以下のように計算し $S^{90\text{m}}$ とした。

$S^{90\text{m}}$: The sum of $\Delta^{13}\text{CO}_2$ during a specific period (S^T) was calculated as follows.

$$S^T = \sum_{i=0}^{N-1} \Delta^{13}\text{CO}_2(\Delta t \cdot i)$$

$$\Delta t = 10 \text{ min}, N = T/10 \text{ min}$$

3-3 Genotyping

SNP 解析では caffeine 代謝に関連する SNPs (rs762551、rs2472297 および rs4410790) および caffeine 感受性に関連する SNP (rs5751876) を選択した。Minor allele frequency (MAF) と各 SNP 周辺のヌクレオチド配列を Table 1 に示す。

DNA は Oragene®・DNA OG-500 Kit (DNA Genotek, Inc.) によって採取した唾液から抽出した。分光光度計を使用し、DNA の濃度を 1 ng/ μl に調整した。TaqMan® PCR with TaqMan SNP Genotyping Assays、Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, US) を使用して genotype を同定した。

プライマーとして、2 μg の DNA、2.5 μl の TaqMan® Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.)、2.375 μl の蒸留水を加え、プローブとして、0.125 μl の TaqMan® SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を混合し反応液とした。それぞれの PCR 反応は、2720 Thermal cycler (Thermo Fisher Scientific, Inc.) の 96-well plate で行った。Thermal cycling を 95°C で 10 分間、次に 92°C で 15 秒間、60°C で 1 分間のサイクルを 50 回行い、4°C で保持した[48]。

TaqMan® PCR のエンドポイントを読み取るため、蛍光検出器として ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用し、得られたデータは Detector v. 1.7 alias (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用して分析した。

3-4 統計解析

2 群間は χ^2 検定および Mann-Whitney's U 検定を用いて、3 群間の検定には Kruskal-Wallis 検定を用いて検討した。正確検定には Fisher の検定を用いた。3 群間の多重比較には Steel-Dwass 法を用いた。必要に応じて非喫煙者を 0、喫煙者を 1、caffeine 消費量 L を 1、消費量 N を 2、消費量 H を 3 としてダミー変数に

変換した。さらに、受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic : ROC)

解析を行い、曲線下面積 (area under the curve : AUC) 0.7 以上を有効とした。

得られた $\Delta^{13}\text{CO}_2$ の値は正規性を確認できず、変数変換しても正規性は確認できなかった。ゆえに、次の条件で一般化線形混合モデル (generalized linear mixed model : GLMM) で解析を行った。

- 1) 目的変数 : $\Delta^{13}\text{CO}_2\%$ (baseline, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分値)
- 2) 説明変数 : 性別、年齢、BMI、喫煙の有無、caffeine 消費量 (L, N, H)、*CYP1A2* SNP (rs762551)、*AHR* SNP (rs4410790)、*ADORA2A* SNP (rs5751876)、経時時間 (baseline, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分値)
- 3) 測定時間内の被検者の経時的代謝変動を考慮し、被検者と経過時間は変量効果変数とし、その他は固定効果変数とした。

すべての統計解析は JMP Pro ver14 (SAS Institute Inc., North Carolina, US) を用いて行った。

3-5 倫理

すべての研究は日本大学医学部倫理委員会の許可を得ておこなった (承認番号 : 29-5-0,1,2. 246-0,1)、(www.umin.ac.jp/identification no. 000036735)。被検者には目的を口頭で説明し、**caffeine** アレルギーが無いことを確認し、書面による同意書を得た。

4. 結果

4-1 被検者背景

Table 2 に被検者背景 (性別、年齢、BMI、喫煙の有無、caffeine 消費量、対象とした SNPs の保有者数) を示した。BMI と喫煙に男女間で有意差を認めた。Caffeine 消費量には男女間に有意差を認めなかった。rs2472297 は全例が genotype C/C であった。

4-2 Caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT)

すべての呼気グラフの結果を平均 ± 標準誤差で示した。男女別呼気グラフでは $\Delta^{13}\text{CO}_2$ が 30-40 分まで急速に上昇し、40 分以後は平坦に推移した (Figure 3a)。喫煙者と非喫煙者の間では、喫煙者は非喫煙者に比べ、30 分までは急峻な上昇を示したが、40 分以後は非喫煙者と同様にほぼ平坦な推移を示した (Figure 3b)。Caffeine 消費量別では消費量 H は消費量 L に比べ急峻な上昇を示したが、40 分以後は消費量 N や消費量 L と同様な変化を示した (Figure 3c)。rs762551、rs5751876 の genotype 別のグラフでは、すべてが 30 分まで急速に上昇し、以後

平坦な推移を示した (Figure 3d,f)。rs4410790 では genotype C/C が T/T に比べ急峻に上昇し、40 分以後は平坦な推移を示した (Figure 3e)。

4-3 N3CBT 被検者背景と SNP

Table 3 に被検者背景と各 SNP との関係を示した。rs4410790 の喫煙者と非喫煙者間に有意差を認めた。他の SNPs では有意差を認めなかった。

4-4 S^{90m}

S^{90m} は性別、喫煙の有無、caffeine 消費量、rs762551 および rs5751876 に有意差を認めなかった (Table 4)。しかし rs4410790 の genotype 間に有意差を認めた。

さらに、rs4410790 では genotype C/C と T/C 間、T/C と T/T 間では有意差を認めなかったが、C/C と T/T 間に有意差を認めた (Figure 4a)。さらに genotype C/C と T allele キャリア (T/T + T/C) 間にも有意差を認め、C/C が有意に高値であった (Figure 4b)。

得られた結果は S^{90m} を含めすべてに正規性を確認できなかった。変数変換しても正規性は確認できなかった。

4-5 一般化線形混合モデル解析結果 (GLMM 解析)

$\Delta^{13}\text{CO}_2$ に影響を及ぼす有意な因子は caffeine 消費量と rs4410790 の genotype であった (Table 5)。Caffeine 消費量 L は消費量 N より有意に低く ($P = 0.013$)、消費量 H は消費量 N より有意に高値であった ($P = 0.047$)。rs4410790 の genotype C/C は T/T に対して有意に高値であった ($P = 0.003$)。しかし、T/C と T/T 間に有意差は認めなかった。年齢、性別、喫煙の有無、BMI、rs762551 および rs5751876 に有意性は認めなかった。

4-6 受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic : ROC) 解析

rs4410790 の genotype C/C を陽性とする genotype 別の ROC 曲線を Figure 5a に示した。Genotype C/C のみが AUC 0.768 で 0.7 以上であった (Figure 5a,b) (Table 6)。Genotype C/C を陽性とする S^{90m} のカットオフ値を 20.7%とした時、感度は 75.0%、特異度は 83.0%であった (Table 7)。

5. 考察

経口摂取した caffeine は 99%が 45 分以内に吸収される。多くは小腸で吸収されるが、胃でも 20%が吸収される[49]。吸収された caffeine は健康成人であれば 30 分程度で最大血漿濃度に達する[50]。従って、測定時間内に内服した caffeine は胃や小腸から吸収され、最大血漿濃度に到達していると考えられる。

吸収した caffeine の約 90%は肝臓の CYP1A2 で代謝される[51]。Caffeine は CYP1A2 活性の *in vivo* プローブ試薬として使用され報告されてきた[52-54]。Caffeine は CYP1A2 触媒作用により N-7 脱メチル化により約 4%が theophylline、N-3 脱メチル化により約 84%が paraxanthine、N-1 脱メチル化により約 12%が theobromine となることが報告されている[55]。

Caffeine 代謝は年齢、性別、喫煙習慣、コーヒー消費習慣などの要因に影響される[35-39,56]。今回の検討では年齢がほぼ同一の集団であるため年齢による影響は極めて少ない。Caffeine 代謝の主な酵素である CYP1A2 は女性に比べ男性が高いが、尿中代謝産物を指標とした caffeine 代謝には男女差が無いことが報告されている[51]。N3CBT による検討では S^{90m} に男女差を認めなかった。女性被験者が少ないので、caffeine の N-3 脱メチル化に男女差が無いとは断定できない

が、N3CBT では rs4410790 の genotype が大きな役割を担っており、性差は低い可能性がある。

Caffeine 代謝と喫煙の関係は多くの報告がある。これらの報告では喫煙が caffeine 代謝を促進することを指摘している[35,36,56]。喫煙により多環式芳香族炭化水素で aryl hydrocarbon hydroxylase 活性が誘導され、CYP1A2 活性が高くなり、caffeine 代謝を促進する[55,57,58]。しかし、我々の検討では喫煙者と非喫煙者間の S^{90m} に有意差は認めなかった。今回の検討では喫煙者が 12 例と少なく、若年成人を対象としているため喫煙歴も短い。しかし、caffeine の N-3 脱メチル化が喫煙者と非喫煙者では差が無いとはいいがたい。なぜなら、喫煙者の $\Delta^{13}CO_2$ は非喫煙者に比べ 30 分まで急峻な形状を示した。この点は被検者数を増やすと共に喫煙本数や年数を含め検討する必要がある。さらに、N-1、N-3、および N-7 メチル基すべてに ^{13}C を標識した caffeine-trimethyl- ^{13}C を用いた caffeine-trimethyl- ^{13}C breath test (TriCBT) による検討を行い、喫煙が caffeine の N-脱メチル化に及ぼす影響が少ないのかを検討する必要性が生じた。

コーヒー、紅茶、緑茶など caffeine を含む飲み物は caffeine 代謝に影響する。今回は N3CBT を行う 24 時間前から caffeine 含有飲料の摂取を禁止した。日常的

な caffeine 消費量により S^{90m} に相違が生じると考えたが、有意差を認めなかった。Caffeine 消費量が 400 mg/day 以上の消費量 H が 10 例と少ないことが原因となっている可能性がある。しかし、GLMM を用いた解析結果では、caffeine 消費量が $\Delta^{13}\text{CO}_2$ に影響していた。Caffeine 消費量 200 mg/day 未満の消費量 L は 200 mg/day 以上 399 mg/day の消費量 N に比べ $\Delta^{13}\text{CO}_2$ が有意に低下していた。

Caffeine 含有飲料をあまり飲まない caffeine 消費量 L は消費量 H より低い CYP1A2 活性を示し、N-3 脱メチル化が減少していることが報告されており [38]、我々の結果はこれらの報告を支持する結果であった。しかし、N3CBT は N-3 メチル基のみに ^{13}C が標識されており、この点も TriCBT で確認すべきであろう。

CYP1A2 には遺伝子多型である SNP が存在する。rs2472297 の T allele キャリアはアジア人にはないとされており、N3CBT の被験者は全例が genotype C/C であった。*CYP1A2* 遺伝子の 163 位の A が C へ置換する rs762551 は、caffeine 摂取後の血漿または尿中 caffeine/代謝産物比に影響する [38]。Genotype A/A は extensive metabolizer、A/C は intermediate metabolizer、C/C は poor metabolizer と報告されている [41]。N3CBT で rs762551 の genotype が同定できる可能性があると仮説を立て検討したが、 S^{90m} に有意差を認めず、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ にも影響していなか

った。この結果は *caffeine* 代謝の N-3 脱メチル化は rs762551 では無く、rs4410790 の *genotype* が重要な役割を担っていることを示唆する。

AhR をコードする遺伝子は 7q21 に存在し、*CYP1A2* と同様に遺伝子多型があり *caffeine* 代謝に影響する[55]。大規模ゲノム解析により *CYP1A2* と *AHR* の遺伝子多型はコーヒー消費量との関連が報告され、日本人を対象としたワイドゲノム研究においてもコーヒー消費習慣との関連性が指摘されている[59]。しかし、*caffeine* 代謝のどの部位に影響をあたえているかを検討した報告は無い。今回の結果は *caffeine* の N-3 脱メチル化は rs4410790 の *genotype* が最も強く影響している可能性を示唆した。

AhR は多環性芳香族化合物の受容体として働く転写因子であり、リガンドの非存在下では不活化状態で heat shock protein90 (Hsp90) などと複合体を形成し細胞質に存在している。細胞外から多環性芳香族化合物が入ると構造変化を起こし核へ移行する。核内に移行すると Hsp90 を解離し AhR nuclear translocator (ARNT) とヘテロ二量体を形成し xenobiotic responsive element (XRE) に結合する。AhR/ARNT の二量体が XRE に結合すると *CYP1A2* 等の標的遺伝子の転写活性が引き起こされる。転写活性は aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) が

ARNT に結合し競合することで活性が抑制される (Figure 6)[60]。しかし、この過程における rs4410790 の役割は不明である。

Caffeine は adenosine A₁ receptor および ADORA2A に対して同等の結合親和性を持ち、これらの受容体の作用を阻害する。Caffeine 摂取により眠気が減少するのは ADORA2A が関与していることに起因する[45,61]。

ADORA2A の SNP である rs5751876 のヌクレオチド位置 1083 で T が C に置換している genotype C/C では caffeine の薬理効果が高く、T/T より caffeine 消費後の不安経験が多いと報告されている[44]。しかし、S^{90m} は rs5751876 の genotype 間に有意差は無く、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ にも有意性は認めなかった。この結果は rs5751876 が caffeine の薬力学的な感受性には影響するが、N-3 脱メチル化には影響が少ない事を示唆する。

今回の結果は caffeine の N-3 脱メチル化は CYP1A2 の SNP である rs762551 では無く、CYP1A2 の遺伝子発現を調節する AHR の SNP である rs4410790 に依存度が高い事を示した。そして、N3CBT で rs4410790 の genotype が同定できる可能性を示した。今後、TriCBT においても同様な結果が得られるかを検討する必要がある。

Caffeine-trimethyl-¹³C breath test (Tri CBT)

6. Caffeine-trimethyl-¹³C breath test 施行の背景と目的

N3CBT の $\Delta^{13}\text{CO}_2$ や $S^{90\text{m}}$ は rs4410790 の依存度が高く、得られた結果から、rs4410790 の genotype が同定できる可能性を示した[62]。そして、喫煙の有無より日常の caffeine 消費量が $\Delta^{13}\text{CO}_2$ に影響していた[62]。今回の目的は Tri CBT においても同様な結果が得られるかを検討し、異なる場合にはその原因を検討することである。

7. 対象と方法

7-1 対象

N3CBT 被検者と同様な条件を設定した。すなわち、すべての被検者は6ヶ月以内に通院・入院治療の既往歴が無く、内服加療を必要とする疾患が無く、特定のサプリメントの摂取習慣が無く、B型肝炎ウイルス抗原陰性、C型肝炎ウイルス抗体陰性であることを確認した。TriCBT 施行前にN3CBTと同様に喫煙の有無、コーヒー、紅茶、緑茶を含む **caffeine** 含有飲料摂取状況、身長、体重、BMI を調査用紙に記入し参加していただいた。さらに、血圧測定も行い血圧に異常が無いことを確認した。被検者は若年成人 132 名 (平均 21.8 歳：男性 101 例、女性 31 例) であった。

Caffeine 消費量は N3CBT と同様に調査し、定義した[24,47]。

7-2 Caffeine-trimethyl-¹³C breath test (Tri CBT)

TriCBT 施行 24 時間前から **caffeine** 含有飲料およびアルコール飲料の摂取を禁止した。喫煙者は TriCBT 施行前 24 時間を禁煙とした。呼気試験当日は禁食とし、施行 1 時間前まで水分摂取はフリーとした。

TriCBT 施行前に Oragene®・DNA OG-500 Kit (DNA Genotek, Inc.) に唾液を 2 ml 採取した。

試薬内服前にコントロール呼気 (1,800 ml) を採取し、caffeine-trimethyl-¹³C (ISOTEC Laboratories, Inc., IL, US, chemical purity specification $\geq 99.2\%$, molecular weight 197.17 g/mol, HPLC for chemical purity 100%, isotope enrichment 99.2%) 100 mg を蒸留水 100 ml に溶解し内服した。内服後、安静座位とし 10 分間隔で呼気を 90 分まで採取した。

N3CBT と同様の方法で測定し、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ および $\text{S}^{90\text{m}}$ を表した。

7-3 Genotyping

N3CBT と同様な方法で施行した。Oragene®・DNA OG-500 Kit (DNA Genotek, Inc.) によって採取した唾液から DNA を抽出し、TaqMan® PCR with TaqMan SNP Genotyping Assays、Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用して genotype を同定した。プライマー、PCR 反応条件、TaqMan® PCR のエンドポイントを読み取るため、蛍光検出器、データ解析は N3CBT と同様な方法で施行した (Table 1)[48]。

7-4 統計解析

N3CBT と同様の方法で施行した。2 群間は χ^2 検定および Mann-Whitney's U 検定、3 群間の検定には Kruskal-Wallis 検定、正確検定には Fishers の検定、3 群間の多重比較には Steel-Dwass 法を用いた。必要に応じて非喫煙者を 0、喫煙者を 1、caffeine 消費量 L を 1、消費量 N を 2、消費量 H を 3 としてダミー変数に変換した。ROC 曲線の解析は AUC 0.7 以上を有効とした。

GLMM 解析は N3CBT と同様に以下の条件で行った。

- 1) 目的変数 : $\Delta^{13}\text{CO}_2\%$ (baseline, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分値)
- 2) 説明変数 : 性別、年齢、BMI、喫煙の有無、caffeine 消費量 (L, N, H)、*CYP1A2* SNP (rs762551)、*AHR* SNP (rs4410790)、*ADORA2A* SNP (rs5751876)、経時時間 (baseline, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分値)
- 3) 測定時間内の被検者の経時的代謝変動を考慮し、被検者と経過時間は変量効果変数とし、その他は固定効果変数とした。

すべての統計解析は JMP Pro ver14 (SAS Institute Inc.) を用いて行った。

7-5 倫理

すべての研究は日本大学医学部倫理委員会の許可を得ておこなった（承認番号：29-5-0,1,2. 246-0,1）、(www.umin.ac.jp/identification no. 000036735)。被検者には目的を口頭で説明し、**caffeine** アレルギーが無いことを確認し、書面による同意書を得た。

8. 結果

8-1 被検者背景

Table 8 に被検者背景 (性別、年齢、BMI、喫煙の有無、caffeine 消費量、対象とした SNPs の保有者数) を示した。BMI と caffeine 消費量に男女間で有意差を認めた。rs2472297 は全例が genotype C/C であった。

8-2 Caffeine-trimethyl-¹³C breath test (TriCBT)

すべての呼気グラフの結果を平均 ± 標準誤差で示した。男女別呼気グラフでは $\Delta^{13}\text{CO}_2$ が 30-40 分までの上昇および 40 分以後の推移でも同様な傾向を示した (Figure 7a)。喫煙者と非喫煙者の間では、喫煙者は非喫煙者に比べ、30 分までは急峻な上昇を示し、40 分以後も非喫煙者に比べ高値で推移を示した (Figure 7b)。Caffeine 消費量別では、消費量 H と消費量 N は消費量 L に比べ急峻な上昇を示したが、40 分以後は消費量 L と同様な変化を示した (Figure 7c)。

rs762551 の genotype 別の呼気グラフでは、すべてが 30 分まで急速に上昇し、以後平坦な推移を示した。Genotype C/C は A/A および A/C に比べやや低値で推移した (Figure 7d)。rs4410790 では genotype C/C は T/C および T/T に比べ急峻に

上昇し、40分以後は平坦な推移を示し、C/CはT/CおよびT/Tに比べ高値で推移した (Figure 7e)。rs5751876は genotype C/C、T/C および T/T が重なり合うような推移を示した (Figure 7f)。

8-3 TriCBT 被検者背景と SNP

Table 9 に被検者背景と各 SNP との関係を示した。すべての SNPs の被検者数、年齢、BMI、性別、喫煙の有無、caffeine 消費量に有意差を認めなかった。

8-4 S^{90m}

S^{90m} は性別、caffeine 消費量、rs762551 および rs5751876 に有意差を認めなかった (Table 10)。しかし、喫煙者と非喫煙者の比較では喫煙者が有意に高値であった。また rs4410790 の genotype 間に有意差を認めた。Genotype C/C は T/T および T/C に対して有意に高値であり、T/C は T/T に比べ高値であった (Figure 8a)。さらに genotype C/C と T allele キャリア (T/T + T/C) 間に有意差を認め、C/C が有意に高値であった (Figure 8b)。

得られた結果は S^{90m} を含めすべてに正規性を確認できなかった。変数変換しても正規性は確認できなかった。

8-5 一般化線形混合モデル解析結果 (GLMM 解析)

$\Delta^{13}CO_2$ に影響を及ぼす有意な因子は喫煙と rs4410790 の genotype であった (Table 11)。非喫煙者は喫煙者より有意に低かった ($P = 0.039$)。rs4410790 の genotype C/C は T/T に対して有意に高値であった ($P < 0.001$)。しかし、T/C と T/T 間に有意差は認めなかった。年齢、性別、caffeine 消費量、BMI、rs762551 および rs5751786 には有意性は認めなかった。

8-6 受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic : ROC) 解析

rs4410790 の genotype C/C を陽性とする genotype 別の ROC 曲線を Figure 9a に示した。Genotype C/C と T/T の AUC は 0.7 以上であった (Figure 9a,b)(Table 12)。Genotype C/C を陽性とする S^{90m} のカットオフ値を 23.4%とした時、感度は 71.4%、特異度は 72.1%であった (Table 13)。

N3CBT vs. TriCBT

9. N3CBT と TriCBT の比較結果

9-1 N3CBT と TriCBT の被検者背景

N3CBT と TriCBT の被検者背景の比較を Table 14 に示した。性別、年齢、BMI、喫煙の有無、caffeine 消費量、rs762551、rs4410790 および rs5751876 に有意差を認めなかった。さらに、N3CBT と TriCBT の被検者を喫煙者と非喫煙者に分けて検討した (Table 15,16)。N3CBT では喫煙者と非喫煙者の間で男女および rs4410790 の genotype に有意差を認め (Table 15)、TriCBT では caffeine 消費量に有意差を認めた (Table 16)。

9-2 N3CBT と TriCBT の喫煙の有無別呼気グラフ

N3CBT と TriCBT の被検者の caffeine 消費量 N を喫煙の有無別に比較検討した。N3CBT の消費量 N では、喫煙者と非喫煙者の間でほぼ同様な推移を示した (Figure 10a)。TriCBT の消費量 N では、喫煙者は非喫煙者に比べ高値で推移していた (Figure 10b)。

9-3 N3CBT と TriCBT の一般化線形混合モデル解析 (GLMM 解析)

N3CBT と TriCBT の被検者を喫煙者と非喫煙者に分けて $\Delta^{13}\text{CO}_2$ の GLMM 解析を行った (Table 17,18)。被検者と経過時間は変量効果変数とし、rs762551、rs4410790、caffeine 消費量を固定効果変数とした。

N3CBT の非喫煙者では caffeine 消費量 L と rs4410790 の genotype C/C が独立因子であり、喫煙者では rs4410790 の C/C のみが独立因子であった (Table 17)。

TriCBT では非喫煙者と喫煙者ともに rs4410790 の genotype C/C のみが独立因子であった (Table 18)。

10. 考察

CBT では N-3 メチル基に ^{13}C を標識した N3CBT か、N-1、N-3 および N-7 メチル基のすべてに ^{13}C を標識した TriCBT を用いている。CBT は肝機能評価や CYP1A2 活性を測定する目的に使用され、報告されている[8-20]。しかし、これらの報告は *AHR* の遺伝子多型は検討していない。N3CBT の結果は *caffeine* 消費量と rs4410790 の genotype に影響されることを示した[62]。TriCBT は N3CBT と異なり、喫煙習慣が影響し、N3CBT と同様に rs4410790 の genotype が影響していることを示した (Table 10,11)。

Caffeine 代謝は年齢、性別、喫煙習慣、*caffeine* 消費習慣などの要因に影響される[35-39,56]。TriCBT の被検者においても年齢がほぼ同一の集団であるため年齢による影響は少ない。S^{90m} は N3CBT 同様に男女差を認めなかった。この結果は CBT においては N3CBT、TriCBT とともに性差を考慮せずに施行できることを示唆している。しかし、男女ともに限定的な年齢で検討しており、今後幅広い年齢で検討する必要がある。さらに、*caffeine* 代謝は性周期で変動するとの報告がある[63]。今回の CBT 施行前の事前調査では性周期は調査していない。若年女性を対象とした CBT 施行時に性周期を考慮すべきであるかは不明のままである。

Caffeine 代謝と喫煙の関係は多くの報告があり、これらの報告では喫煙が caffeine 代謝を促進すると指摘している[34,35]。

TriCBT では喫煙の有無で S^{90m} に有意差を認め、GLMM 解析による検討でも $\Delta^{13}CO_2$ に影響を与えていた。しかし、N3CBT では喫煙では無く caffeine 消費量が影響していた。この相違を検討する目的で TriCBT と N3CBT の被験者を喫煙者と非喫煙者に分けて検討した。

N3CBT では喫煙者と非喫煙者の rs4410790 の genotype に有意差があり (Table 15)、GLMM 解析では非喫煙者は rs4410790 の genotype C/C と caffeine 消費量、喫煙者は rs4410790 の genotype C/C のみで caffeine 消費量は影響していなかった (Table 17)。そこで caffeine 消費量を一定とした消費量 N で喫煙者と非喫煙者を比較検討した。Caffeine 消費量 N を対象とした喫煙者と非喫煙者の $\Delta^{13}CO_2$ の値は喫煙者と非喫煙者の間でほぼ同様な推移を示した (Figure 10a)。N3CBT では、喫煙者と非喫煙者間で rs4410790 の genotype に有意差を認めることから、喫煙の有無より、rs4410790 の genotype が $\Delta^{13}CO_2$ に強く影響している可能性がある。さらに、非喫煙者の GLMM 解析では消費量 L が有意に低値であり (Table 17)、被験者の多数を占める非喫煙者では caffeine 消費量が影響するため caffeine

消費量が独立因子となった可能性がある。しかし、喫煙被験者が少数であり N3CBT における喫煙の影響は更なる検討が必要である。

TriCBT では喫煙者と非喫煙者の rs4410790 の genotype に有意差はないが、caffeine 消費量に有意差があり (Table 16)、GLMM 解析では喫煙者、非喫煙者ともに独立因子が rs4410790 の genotype C/C のみであった (Table 18)。また喫煙者に caffeine 消費量 L は存在せず、消費量 N を対象とした喫煙者と非喫煙者の $\Delta^{13}\text{CO}_2$ の値は喫煙者が高値で推移した (Figure 10b)。そのため喫煙者の caffeine 代謝が高くなり、その結果 TriCBT の $\Delta^{13}\text{CO}_2$ では喫煙の有無と rs4410790 の genotype が独立因子となった可能性がある。

今回の結果は TriCBT では、caffeine 消費量を考慮する必要は無いが、喫煙の有無と rs4410790 の genotype は考慮する必要があり、N3CBT では caffeine 消費量と rs4410790 の genotype を考慮して結果を検討する必要がある。しかし、喫煙者が少数であり、今後は喫煙歴の長さ、1 日の喫煙本数、人種の違いで同様の結果が得られるかを検討すべきである。さらに、Figure 1 に示したように N3CBT では 1 箇所 ^{13}C が標識され、TriCBT では 3 箇所に ^{13}C が標識されている。N-

1、N-7に標識された脱メチルには CYP2E1 が関与することが示唆されており[55]、これらの CYP が CBT に影響している可能性もあり検討する必要がある。

15q24 上の *CYP1A1* と *CYP1A2* の間に位置する rs2472297 の T allele はアジア人にはないとされている。*CYP1A2* 遺伝子の 163 位の A が C へ置換した rs762551 は caffeine 代謝に影響することが報告されている[38,39]。rs2472297 は N3CBT と同様に TriCBT においても全例が genotype C/C であった。rs762551 は caffeine 摂取後の血漿または尿中 caffeine/代謝産物比に影響し、genotype A/A は extensive metabolizer、A/C は intermediate metabolizer、C/C は poor metabolizer と報告されている。しかし、これらの報告は *AHR* の SNP を考慮していない[38,41]。

S^{90m} や $\Delta^{13}CO_2$ は rs762551 の genotype C/C が A/A や A/C に比べやや低値となるが (Figure 7d)、rs762551 の genotype 間に有意差を認めなかった (Table 10,11)。

この結果は N3CBT 同様に TriCBT でも rs762551 の影響は少ない可能性を示唆する。Sachse らは caffeine 100 mg 内服後の [(尿中 1,7-ジメチルキサンチン+1,7-ジメチル尿酸)/尿中カフェイン] 比率が rs762551 の genotype 間に有意差が無いと報告している[38]。彼らの報告では *AHR* の SNP を検討していない。Caffeine

の N-脱メチル化が rs4410790 の genotype に依存しているためにこのような結果となった可能性がある。

Caffeine 代謝は主に N-脱メチル化と 8 位炭素の酸化である。N-脱メチル化を測定している CBT は rs4410790 の genotype が最も影響している。この結果は caffeine の血漿や尿中代謝産物の検討では rs762551 のみならず rs4410790 を考慮して検討する必要性を示した。

CYP1A2 活性化には細胞質に存在する AhR を必要とする。CYP1A2 の酵素量の増加には、mRNA 量の増加が必要である。遺伝子の活性化は、受容体型転写因子 (AhR) が芳香族炭化水素と結合して、DNA に結合できるようになり、CYP1 ファミリーの遺伝子の転写調節領域に結合して転写量が増加する[60]。AHR 遺伝子は 7q21 に存在し CYP1A2 と同様に遺伝子多型があり (AHR SNPs : rs4410790 および rs6968865)、AHR の遺伝子多型は CYP 遺伝子の誘導能に影響する[60]。

TriCBT と N3CBT の結果は、caffeine の N-脱メチル化は rs4410790 が強く影響していることを示した (Table 4,10)。さらに、S^{90m}の検討では、N3CBT では rs4410790 の genotype C/C と T/T 間と C/C と T allele キャリア (T/T + T/C) 間に有意差を認め (Figure 4a,b)、TriCBT では rs4410790 のすべての genotype 間と C/C と T

allele キャリア間で有意差を認めた (Figure 8a,b)。しかし、rs4410790 の genotype が AhR の発現や機能にどのような過程を経て影響しているかを検討した報告は無い。rs4410790 の genotype が caffeine の脱メチル化に影響している可能性を否定できない結果であり、今後詳細な検討が必要である。

これまで報告されている CBT による肝機能評価は正常肝機能症例をコントロールとして報告し、*AHR* の遺伝子多型は検討していない。また、*CYP1A2* 活性の評価においても同様である。今後 CBT で肝機能評価や *CYP1A2* 活性を評価するには *AHR* の SNP である rs4410790 の genotype を考慮して報告する必要がある。

TriCBT の S^{90m} による rs4410790 の genotype 別 ROC 曲線の AUC が genotype C/C は 0.758、T/T は 0.715 と 0.7 以上を認め、C/C を陽性とする S^{90m} のカットオフ値を 23.4%とした時に感度と特異度がともに 70%以上を示した (Table 13)。この結果から TriCBT は N3CBT より的確に rs4410790 の genotype を同定できる可能性を示唆している。

rs5751876 の genotype C/C は T/T より caffeine 摂取後の不安経験が多く、caffeine 摂取を避けることが報告されている[44]。しかし、N3CBT、TriCBT とともに、

caffeine 消費量に差が無く (Table 4,5,10,11)、さらに、 S^{90m} は rs5751876 の genotype 間に有意差を認めなかった。rs5751876 が caffeine の薬力学的な感受性には影響するが、caffeine の N-脱メチル化には影響が無く、CBT 施行時には rs5751876 を考慮する必要は無いといえる。

CBT の結果は rs4410790 の依存度が高いことを明らかにし、rs4410790 の genotype が同定できる可能性を示した。しかし、これまでの検討は日本人の若年健康成人を対象にした極めて限定的な集団における検討であり、今後、様々な年齢、人種、喫煙習慣、caffeine 消費量で確認する必要がある。さらに、caffeine 代謝に関連する他の SNP との関係も検討する必要がある。

生体内には AhR の発現を制御するために AhRR が存在している[64]。AHRR にも遺伝子多型が報告されており、AHR の遺伝子多型と AHRR の遺伝子多型との関連性は未だ不明な点が多い。CBT における AHRR の遺伝子多型の役割を含めて検討する必要も生じてきた。

Söderberg らは CYP1A2 で代謝される非定型抗精神病薬オランザピンが rs762551 に影響されず、オランザピン代謝に有用な遺伝的マーカーが rs4410790 の genotype であると報告している[65]。オランザピンはその構造にメチル基を有

しており、CYP1A2 が代謝の主体となる薬剤にはメチル基を有している薬剤も多い。CBT と薬物代謝に関連する SNP との関連を検討することで、CBT があらたな遺伝的マーカーを評価する検査方法となる可能性もあり、CBT と薬物代謝との関連性の検討は CBT の存在意義を大きく変化させる可能性を有している。

1 1. まとめ

Caffeine 代謝の N-脱メチル化は *CYP1A2* の SNP である rs762551 の genotype では無く、*CYP1A2* の遺伝子発現を調節する *AHR* の SNP である rs4410790 の genotype に依存しており、N3CBT では caffeine 消費量、TriCBT では喫煙の有無に影響されることを示した。若年健康成人であれば、caffeine-N-3-methyl-¹³C および caffeine-trimethyl-¹³C を利用した CBT で *AHR* の SNP である rs4410790 の genotype が同定可能であり、同定には N3CBT より TriCBT が有用であることが示唆された。

1 2. 謝辞

本研究において、研究ならびに学位論文のご指導、ご鞭撻、ご校閲を賜りました日本大学医学部生体機能医学系薬理学分野 浅井聰先生、医学研究企画・推進室 石井敬基先生に深謝申し上げます。また本研究に関し、ご指導、ご協力いただきました日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野 中山智祥先生、臨床試験研究センター 高橋泰夫先生また医局員の皆様に厚く御礼申し上げます。

1 3 . 表

Table 1 : The minor allele frequency (MAF) and the nucleotide sequences around each SNPs

SNPs	MAF
rs762551	(C) = 0.21, 5'-TGCTCAAAGGGTGAGCTCTGTGGGC[C/A]CAGGACGCATGGTAGATGGAGCTTA-3'
rs2472297	(T) = 0.00, 5'-ACACTCTGTTTCCAAGTTAGTAATG[C/T]CTCTTTACATATAAACACTGATGTT-3'
rs4410790	(C) = 0.32, 5'-AAATGTTTTCTTATTTTATTACAT[C/T]AGCAGGGACCTTGAGTTAAAAGTTA-3'
rs5751876	(C) = 0.47, 5'-ACCCTGAGCGGAGGCCCAATGGCTA[T/C]GCCCTGGGGCTGGTGAGTGGAGGGA-3'.

Table 2 : Characteristics of the study N3CBT subjects

Characteristic	N3CBT	p
Number of cases	130	
Male:Female [n] ¹	97:33	
Age (year) ²	21.9 ± 1.9	
Male	22.0 ± 2.0	0.491
Female	21.6 ± 1.6	
BMI (kg/m ²) ³	22.2 ± 3.1	
Male	22.6 ± 3.3	0.003*
Female	20.8 ± 2.2	
Smoking y:n [n] ⁴	12:118	
Male	12:85	0.036*
Female	0:33	
Caffeine consumption		
L:N:H [n] ⁵	15:105:10	
Male	11:81:5	0.188
Female	4:24:5	
rs762551 (A/A:A/C:C/C) [n] ⁶	54:57:19	
rs2472297 (C/C:T/C:T/T)	130:0:0	
rs4410790 (C/C:T/C:T/T)	12:65:53	
rs5751876 (C/C:T/C:T/T)	27:68:35	

[n]¹: number of cases. ^{2,3}: values are means ± SD.

[n]^{4,5,6}: number of cases. Smoking y:n – smoker:non-smoker.

Caffeine consumption L:< 200 mg/day, N:200-399 mg/day, H:≥ 400 mg/day.

p:p-value. * :p < 0.05.

Table 3 : Characteristics of the study N3CBT subjects and types of SNPs
(rs762551, rs4410790 and rs5751876)

rs762551		A/A	A/C	C/C	p
N ¹		54	57	19	
Age (year) ²		21.0 ± 1.6	22.0 ± 2.1	21.0 ± 1.4	0.260
BMI (kg/m ²) ³		22.0 ± 3.0	22.3 ± 3.4	22.1 ± 2.6	0.986
Gender [n] ⁴	Male	35	47	15	0.103
	Female	19	10	4	
Smoking [n] ⁵	No	50	52	16	0.544
	Yes	4	5	3	
Caffeine consumption [n] ⁶	L	4	8	3	0.574
	N	47	43	15	
	H	3	6	1	
rs4410790		C/C	T/C	T/T	p
N		12	65	53	
Age (year)		22.6 ± 2.7	21.7 ± 1.6	21.9 ± 2.0	0.675
BMI (kg/m ²)		22.6 ± 3.1	22.3 ± 3.1	21.9 ± 3.1	0.566
Gender [n]	Male	10	46	41	0.629
	Female	2	19	12	
Smoking [n]	No	9	63	46	0.018*
	Yes	3	2	7	
Caffeine consumption [n]	L	3	8	4	0.216
	N	7	53	45	
	H	2	4	4	
rs5751876		C/C	T/C	T/T	p
N		27	68	35	
Age (year)		21.2 ± 1.3	22.0 ± 1.9	22.1 ± 2.1	0.110
BMI (kg/m ²)		22.2 ± 3.7	21.9 ± 2.9	22.5 ± 3.0	0.582
Gender [n]	Male	21	48	28	0.574
	Female	6	20	7	
Smoking [n]	No	23	63	32	0.519
	Yes	4	5	3	
Caffeine consumption [n]	L	4	8	3	0.927
	N	21	54	30	
	H	2	6	2	

N¹ : number of cases. ^{2,3} : values are means ± SD. [n]^{4,5,6} : number of cases.

Caffeine consumption L: < 200 mg/day, N: 200-399 mg/day, H: ≥ 400 mg/day.

p: p-value. * : p < 0.05.

Table 4: Results of N3CBT S^T at time 90 minutes (S^{90m})

	S ^{90m} (‰)	p
Gender		
Male	16.5 ± 7.6	0.925
Female	16.2 ± 6.5	
Smoking		
y	19.0 ± 9.1	0.378
n	16.0 ± 6.5	
Caffeine consumption		
L	13.6 ± 6.9	0.505
N	16.4 ± 6.3	
H	19.7 ± 10.8	
rs762551		
A/A	17.4 ± 6.6	0.301
A/C	15.6 ± 6.9	
C/C	15.3 ± 6.7	
rs4410790		
C/C	22.0 ± 7.1	< 0.001*
T/C	17.2 ± 7.2	
T/T	13.8 ± 4.9	
rs5751876		
C/C	14.9 ± 4.4	0.710
T/C	16.4 ± 6.9	
T/T	17.1 ± 7.9	

Values have been presented as means ± SD. Smoking y: smoker, n: non-smoker. Caffeine consumption L: < 200 mg/day, N: 200-399 mg/day, H: ≥ 400 mg/day. p: p-value. * : p < 0.05.

Table 5 : Results of the generalized linear mixed model N3CBT

		Estimate value	Standard error	95% CI	p
Intercept		27.151	7.741	11.783 – 42.448	0.000
Age		-0.226	1.031	-0.843 – 0.391	0.469
Gender	Female	-0.188	0.695	-1.566 – 1.188	0.786
Smoking	n	-1.654	1.031	-3.696 – 0.387	0.111
Caffeine consumption	L	-3.312	1.315	-5.916 – -0.707	0.013*
	H	3.001	1.497	0.035 – 5.967	0.047*
BMI		-0.171	0.185	-0.542 – 0.198	0.359
Genotypes					
rs762551	A/A	1.181	0.829	-0.461 – 2.824	0.157
	A/C	-0.284	0.824	-1.917 – 1.349	0.731
rs4410790	C/C	4.108	1.328	1.477 – 6.739	0.003*
	T/C	-0.102	0.895	-1.874 – 1.670	0.909
rs5751876	C/C	-1.258	0.958	-3.157 – 0.639	0.191
	T/C	0.551	0.774	-0.982 – 2.084	0.477

Smoking n : non-smoker. Caffeine consumption L : < 200 mg/day, H : ≥ 400 mg/day. p : p-value. * : p < 0.05.

Table 6: Area under the curve

	Genotypes	AUC
rs4410790	C/C	0.768
	T/T	0.656
	T/C	0.555

Table 7: Sensitivity and Specificity

Genotype C/C positive	
S^{90m} : Cut off value 20.7 %	
Sensitivity (%)	75.0
Specificity (%)	83.0

Table 8 : Characteristics of the study TriCBT subjects

Characteristic	Tri CBT	p
Number of cases	132	
Male : Female [n] ¹	101 : 31	
Age (year) ²	21.8 ± 2.3	
Male	22.3 ± 1.7	0.113
Female	21.0 ± 2.4	
BMI (kg/m ²) ³	22.0 ± 0.2	
Male	22.4 ± 3.1	0.010*
Female	20.9 ± 2.4	
Smoking y : n [n] ⁴	13 : 119	
Male	12 : 89	0.298
Female	1 : 30	
Caffeine consumption		
L : N : H [n] ⁵	20 : 102 : 10	
Male	11 : 83 : 7	0.030*
Female	9 : 19 : 3	
rs762551 (A/A : A/C : C/C) [n] ⁶	41 : 76 : 15	
rs2472297 (C/C : T/C : T/T)	132 : 0 : 0	
rs4410790 (C/C : T/C : T/T)	21 : 64 : 47	
rs5751876 (C/C : T/C : T/T)	33 : 63 : 36	

[n]¹ : number of cases. ^{2,3} : values are means ± SD.

[n]^{4,5,6} : number of cases. Smoking y : n – smoker : non-smoker.

Caffeine consumption L : < 200 mg/day, N : 200-399 mg/day, H : ≥ 400 mg/day.

p : p-value. * : p < 0.05.

Table 9: Characteristics of the study TriCBT subjects and types of SNPs
(rs762551, rs4410790 and rs5751876)

rs762551		A/A	A/C	C/C	p
N ¹		41	76	15	
Age (year) ²		21.0 ± 2.0	22.1 ± 2.5	21.4 ± 1.1	0.292
BMI (kg/m ²) ³		21.7 ± 3.0	22.2 ± 3.1	22.2 ± 2.5	0.614
Gender [n] ⁴	Male	31	57	13	0.693
	Female	10	19	2	
Smoking [n] ⁵	No	36	70	13	0.626
	Yes	5	6	2	
Caffeine consumption [n] ⁶	L	4	12	4	0.227
	N	36	56	10	
	H	1	8	1	
rs4410790		C/C	T/C	T/T	p
N		21	64	47	
Age (year)		22.2 ± 2.2	21.6 ± 2.0	22.0 ± 2.6	0.541
BMI (kg/m ²)		21.6 ± 3.4	22.2 ± 2.8	22.1 ± 3.1	0.604
Gender [n]	Male	15	52	34	0.435
	Female	6	12	13	
Smoking [n]	No	16	59	44	0.086
	Yes	5	5	3	
Caffeine consumption [n]	L	2	9	9	0.654
	N	16	51	35	
	H	3	4	3	
rs5751876		C/C	T/C	T/T	p
N		33	65	34	
Age (year)		21.4 ± 2.0	21.9 ± 2.5	22.1 ± 1.9	0.157
BMI (kg/m ²)		22.0 ± 2.8	21.9 ± 3.1	22.4 ± 2.9	0.609
Gender [n]	Male	25	48	28	0.722
	Female	8	17	6	
Smoking [n]	No	30	61	28	0.174
	Yes	3	4	6	
Caffeine consumption [n]	L	8	10	2	0.170
	N	22	52	28	
	H	3	3	4	

N¹: number of cases. ^{2,3}: values are means ± SD. [n]^{4,5,6}: number of cases.

Caffeine consumption L: < 200 mg/day, N: 200-399 mg/day, H: ≥ 400 mg/day.

p: p-value. *: p < 0.05.

Table 10: Results of TriCBT S^T at time 90 minutes (S^{90m})

	S ^{90m} (‰)	p
Gender		
Male	22.3 ± 8.3	0.325
Female	20.1 ± 8.8	
Smoking		
y	29.1 ± 13.7	0.031*
n	21.0 ± 9.2	
Caffeine consumption		
L	19.0 ± 8.0	0.351
N	22.2 ± 10.0	
H	23.3 ± 12.3	
rs762551		
A/A	21.5 ± 10.2	0.121
A/C	22.7 ± 9.8	
C/C	17.8 ± 9.4	
rs4410790		
C/C	30.8 ± 12.5	< 0.001*
T/C	22.3 ± 8.8	
T/T	17.1 ± 6.9	
rs5751876		
C/C	22.5 ± 8.1	0.649
T/C	21.3 ± 10.1	
T/T	22.2 ± 11.4	

Values have been presented as means ± SD. Smoking y: smoker, n: non-smoker. Caffeine consumption L: < 200 mg/day, N: 200-399 mg/day, H: ≥ 400 mg/day. p: p-value. * : p < 0.05.

Table 11 : Results of the generalized linear mixed model TriCBT

		Estimate value	Standard error	95% CI	p
Intercept		2.579	1.066	0.470 – 4.689	0.016
Age		0.024	0.036	-0.047 – 0.095	0.501
Gender	Female	-0.110	0.097	-0.304 – 0.083	0.261
Smoking	n	-0.292	0.140	-0.570 – -0.014	0.039*
Caffeine consumption	L	0.042	0.178	-0.310 – 0.395	0.812
	H	-0.138	0.216	-0.567 – 0.289	0.522
BMI		-0.035	0.026	-0.086 – 0.016	0.183
Genotypes					
rs762551	A/A	0.091	0.126	-0.159 – 0.343	0.470
	A/C	0.183	0.117	-0.049 – 0.416	0.121
rs4410790	C/C	0.677	0.144	0.391 – 0.963	< 0.001*
	T/C	-0.120	0.110	-0.339 – 0.099	0.281
rs5751876	C/C	0.044	0.124	-0.196 – 0.295	0.295
	T/C	-0.055	0.106	-0.266 – 0.154	0.154

Smoking n : non-smoker. Caffeine consumption L : < 200 mg/day, H : ≥ 400 mg/day. p : p-value. * : p < 0.05.

Table 12: Area under the curve

	Genotypes	AUC
rs4410790	C/C	0.758
	T/T	0.715
	T/C	0.621

Table 13: Sensitivity and specificity

Genotype C/C positive	
S ^{90m} : Cut off value 23.4 %	
Sensitivity (%)	71.4
Specificity (%)	72.1

Table 14 : Characteristics of the study N3CBT and TriCBT subjects

Characteristic	N3CBT	Tri CBT	p
Number of cases	130	132	
Male : Female [n] ¹	97:33	101:31	0.744
Age (year) ²	21.9 ± 1.9	21.8 ± 2.3	0.819
BMI (kg/m ²) ³	22.2 ± 3.1	22.0 ± 0.2	0.905
Smoking y : n [n] ⁴	12 : 118	13 : 119	1.000
Caffeine consumption			
L : N : H [n] ⁵	15 : 105 : 10	20 : 102 : 10	0.725
rs762551 (A/A : A/C : C/C) [n] ⁶	54 : 57 : 19	41 : 76 : 15	0.088
rs2472297 (C/C : T/C : T/T)	130 : 0 : 0	132 : 0 : 0	1.000
rs4410790 (C/C : T/C : T/T)	12 : 65 : 53	21 : 64 : 47	0.259
rs5751876 (C/C : T/C : T/T)	27 : 68 : 35	33 : 63 : 36	0.718

[n]¹ : number of cases. ^{2,3} : values are means ± SD. [n]^{4,5,6} : number of cases.

Smoking y : n – smoker : non-smoker.

Caffeine consumption L : < 200 mg/day, N : 200-399 mg/day, H : ≥ 400 mg/day

p : p-value.

Table 15: Characteristics of the study N3CBT - Smoker vs. Non-smoker

Characteristic	N3CBT (130 cases)		p
	Smoker	Non-smoker	
Number of cases	12	118	
Male:Female [n] ¹	12:0	85:33	0.036*
Age (year) ²	23.0 ± 2.3	21.8 ± 1.8	0.052
BMI (kg/m ²) ³	22.3 ± 3.7	22.1 ± 3.0	0.867
Caffeine consumption			
L:N:H [n] ⁴	1:9:2	14:96:8	0.419
Genotype [n] ⁵			
rs762551 (A/A:A/C:C/C)	4:5:3	50:52:16	0.544
rs4410790 (C/C:T/C:T/T)	3:2:7	9:63:46	0.018*

[n]¹: number of cases. ^{2,3}: values are means ± SD, ^{4,5}[n]: number of cases.

Caffeine consumption L: < 200 mg/day, N: 200-399 mg/day, H: ≥ 400 mg/day.

p: p-value. *: p < 0.05.

Table 16: Characteristics of the study TriCBT - Smoker vs. Non-smoker

Characteristic	TriCBT (132 cases)		p
	Smoker	Non-smoker	
Number of cases	13	119	
Male:Female [n] ¹	12:1	89:30	0.298
Age (year) ²	22.7 ± 2.2	21.7 ± 2.3	0.057
BMI (kg/m ²) ³	22.7 ± 3.6	22.0 ± 2.9	0.508
Caffeine consumption			
L:N:H [n] ⁴	0:9:4	20:93:6	0.005*
Genotype [n] ⁵			
rs762551 (A/A:A/C:C/C)	5:6:2	36:70:13	0.626
rs4410790 (C/C:T/C:T/T)	5:5:3	16:59:44	0.086

[n]¹: number of cases. ^{2,3}: values are means ± SD, ^{4,5}[n]: number of cases.

Caffeine consumption L: < 200 mg/day, N: 200-399 mg/day, H: ≥ 400 mg/day.

p: p-value. *: p < 0.05.

Table 17: Results of the generalized linear mixed model N3CBT - Smoker vs. Non-smoker

N3CBT							
Non-smoker				Smoker			
	Estimate value	Standard error	p		Estimate value	Standard error	p
Intercept	1.649	0.229	< 0.001*	Intercept	2.165	0.342	< 0.001*
rs762551 A/A	0.124	0.083	0.140	rs762551 A/A	-0.109	0.276	0.708
rs762551 A/C	-0.075	0.082	0.360	rs762551 A/C	0.153	0.247	0.563
rs4410790 C/C	0.308	0.143	0.034*	rs4410790 C/C	0.713	0.343	0.013*
rs4410790 T/C	0.002	0.091	0.976	rs4410790 T/C	0.305	0.329	0.396
Caffeine consumption H	0.199	0.157	0.206	Caffeine consumption H	0.589	0.378	0.180
Caffeine consumption L	-0.267	0.134	0.049*	Caffeine consumption L	-0.649	0.439	0.199

Caffeine consumption L: < 200 mg/day, H: \geq 400 mg/day. p: p-value. * : p < 0.05.

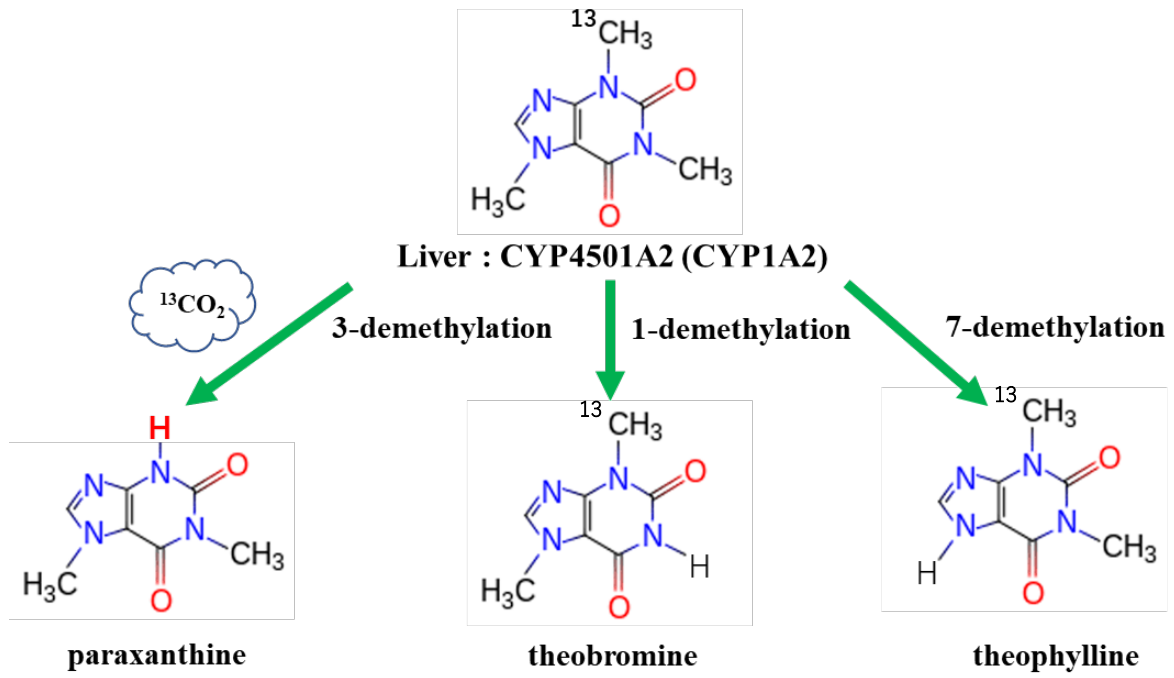
Table 18: Results of the generalized linear mixed model TriCBT - Smoker vs. Non-smoker

TriCBT							
Non-smoker				Smoker			
	Estimate value	Standard error	p		Estimate value	Standard error	p
Intercept	2.100	0.315	< 0.001*	Intercept	2.522	0.500	< 0.001*
rs762551 A/A	0.092	0.133	0.489	rs762551 A/A	-0.222	0.395	0.591
rs762551 A/C	0.182	0.119	0.129	rs762551 A/C	0.417	0.479	0.413
rs4410790 C/C	0.526	0.157	0.001*	rs4410790 C/C	1.487	0.395	0.007*
rs4410790 T/C	-0.073	0.114	0.521	rs4410790 T/C	-0.107	0.434	0.812
				Caffeine consumption H	-0.253	0.313	0.445
Caffeine consumption L	-0.084	0.179	0.639				
Caffeine consumption N	0.060	0.151	0.689				

Caffeine consumption L: < 200 mg/day, N: 200-399 mg/day, H: \geq 400 mg/day. p: p-value. *: p < 0.05

1 4. ☒

Figure 1: ¹³C-labeled caffeine breath test principle
 (a) Caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT)



(b) Caffeine-trimethyl-¹³C breath test (TriCBT)

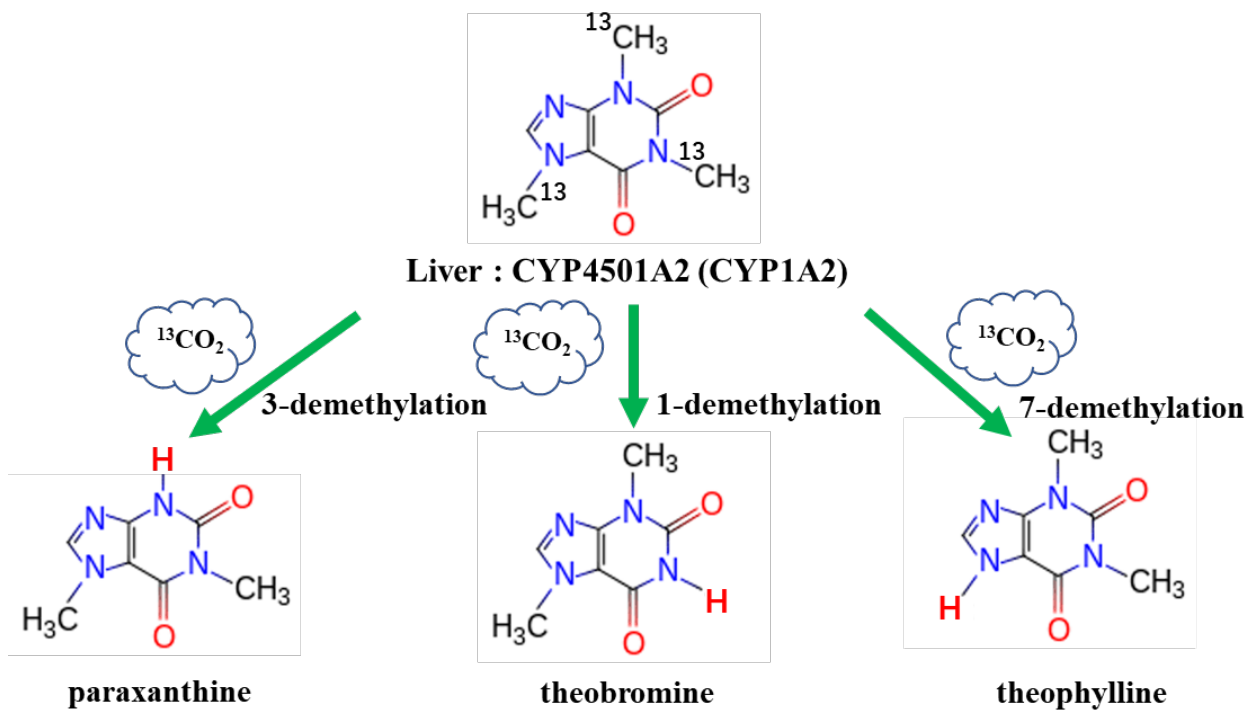
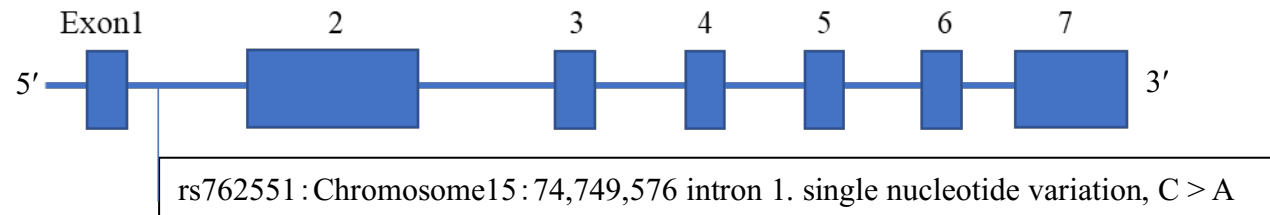


Figure 2: Location of the rs762551, rs4410790 and rs5751876 genes

(a) rs762551 *Gene: CYP1A2*

Name: cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2

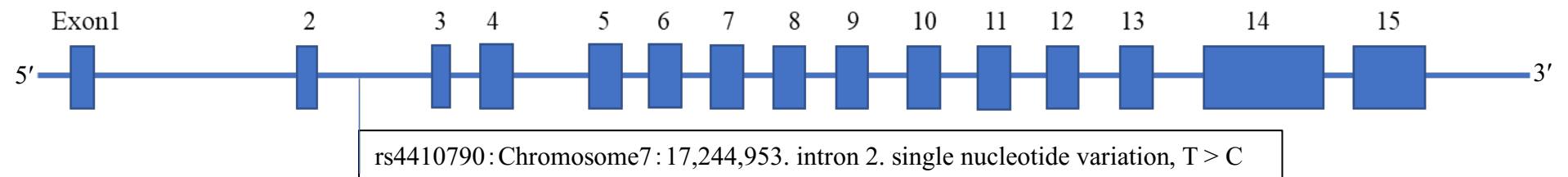
Location: Chromosome15: 74,748,845 – 74,756,607. Length: 7,763nt



(b) rs4410790 *Gene: ENSG00000106546*

Name: AHR

Location: Chromosome7: 16,916,359 – 17,346,152. Length: 429,794nt



(c) rs5751876 *Gene: ADORA2A*

Name: adenosine A2a receptor

Location: Chromosome22: 24,423,597 – 24,442,357. Length: 18,761nt

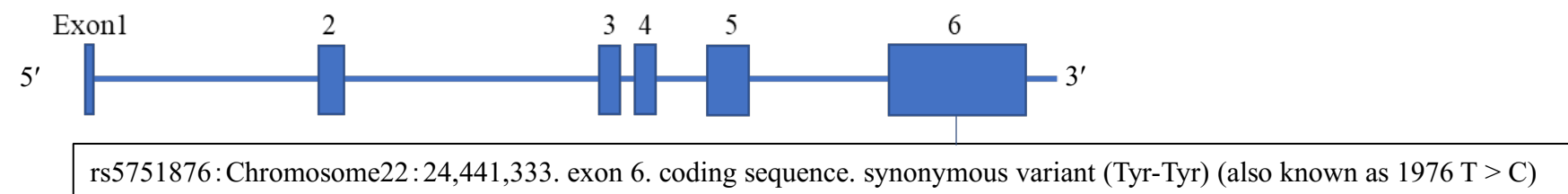


Figure 3 : Results of the caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT)

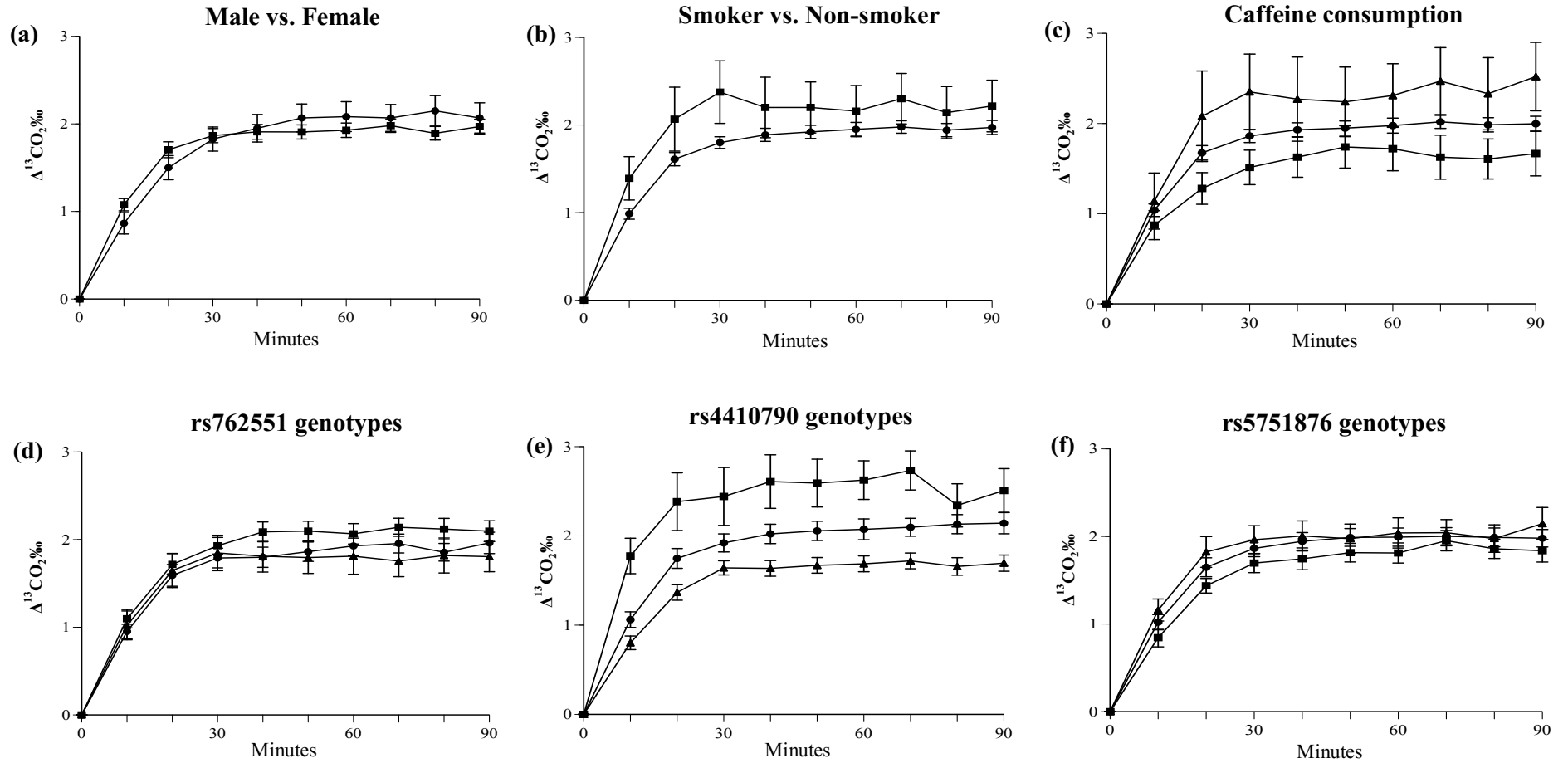
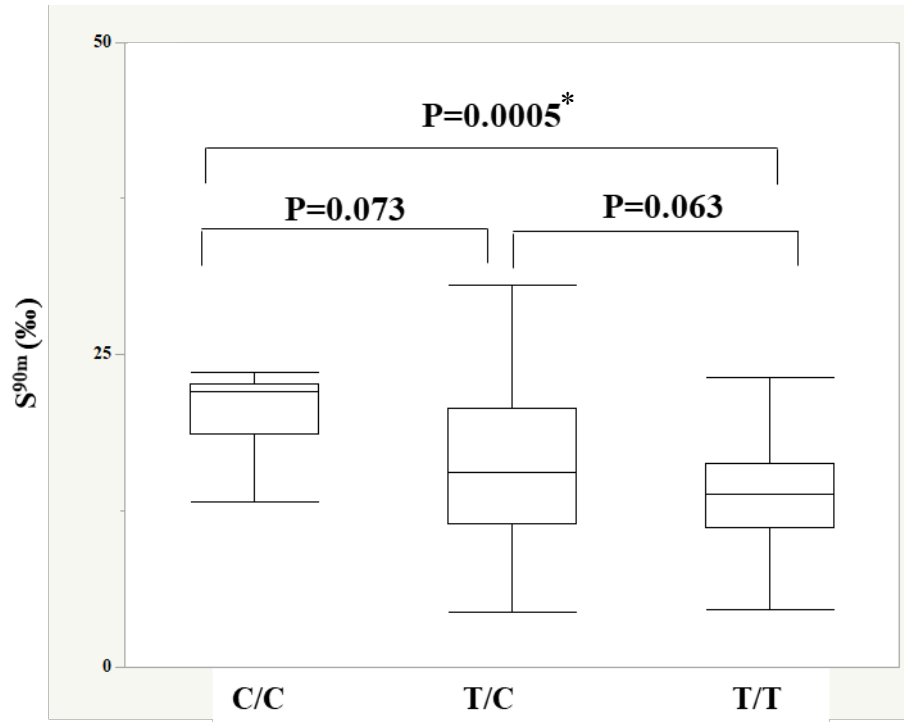


Figure 4: N3CBT - S^{90m} : rs4410790
(a) rs4410790 genotypes



(b) rs4410790 genotype C/C vs. T allele carriers

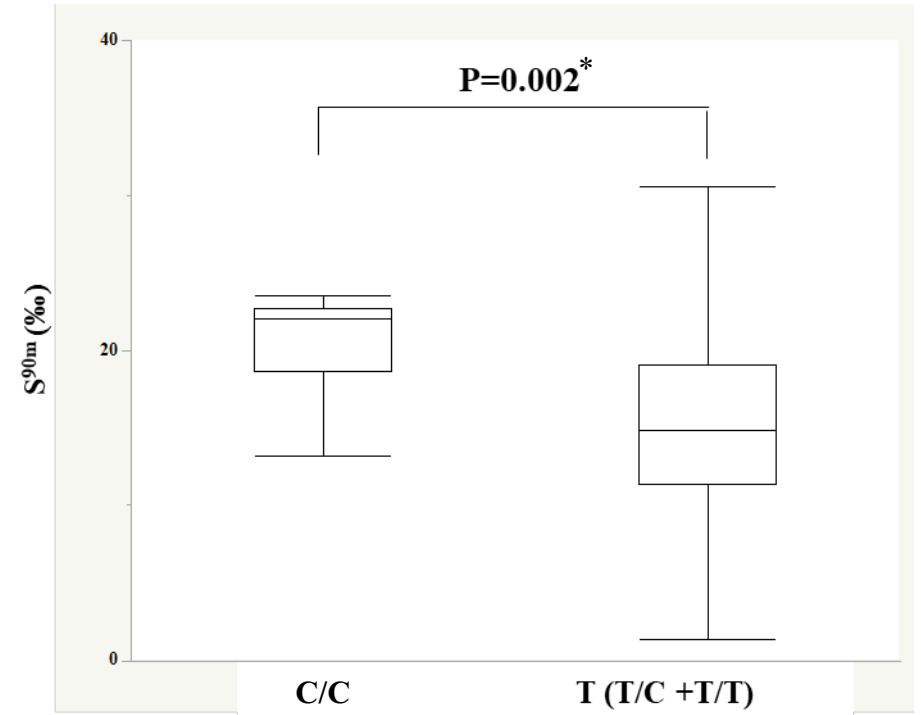
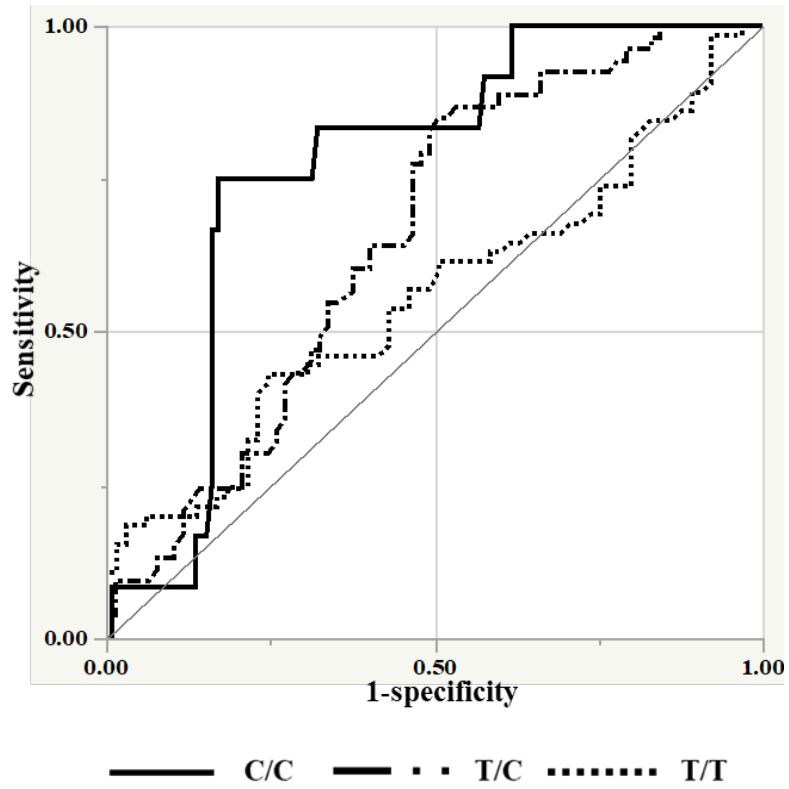


Figure 5: The ROC curve for N3CBT S^{90m} of rs4410790
(a) rs4410790 genotypes



(b) Genotype C/C positive

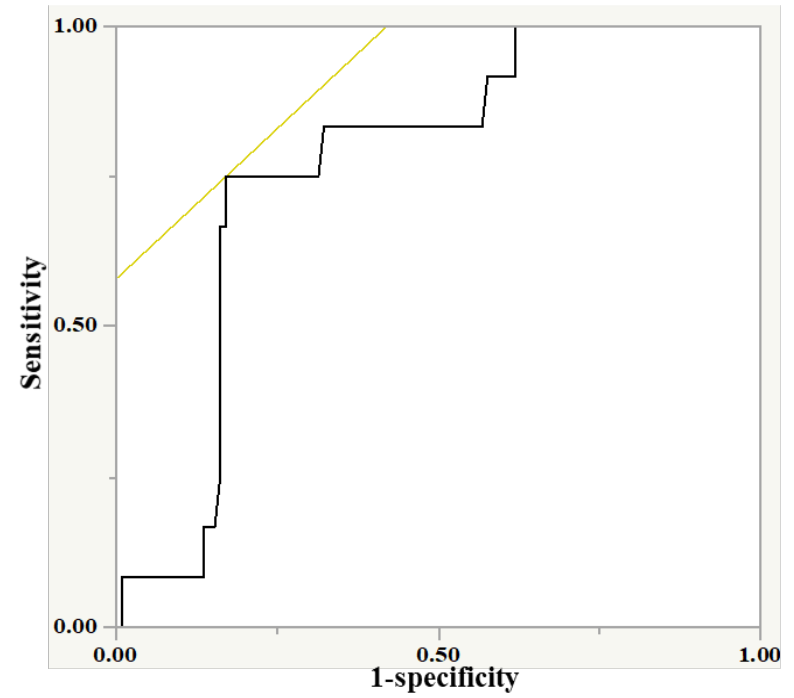
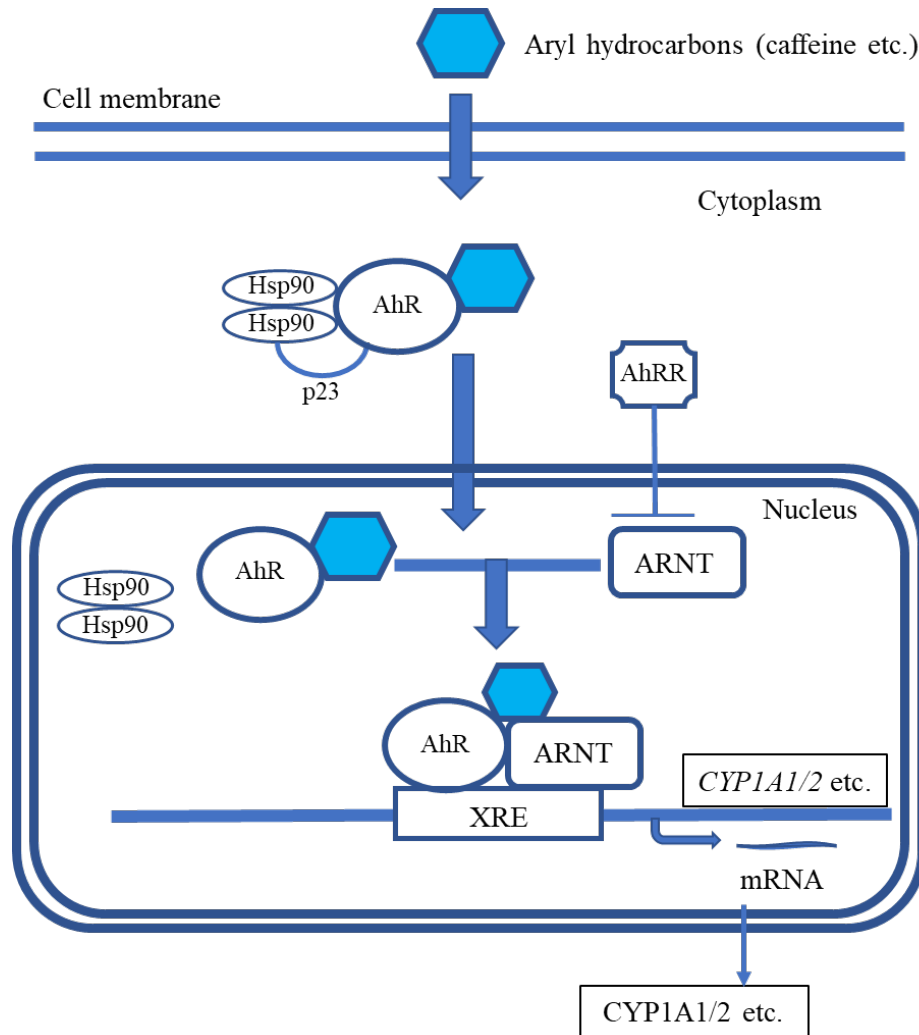


Figure 6: Model of AhR signal transduction pathway



AhR: aryl hydrocarbon receptor

Hsp90: heat shock protein90

ARNT: AhR nuclear translocator

XRE: xenobiotic responsive element

AhRR: aryl hydrocarbon receptor repressor

Figure 7: Results of the caffeine-trimethyl-¹³C breath test (TriCBT)

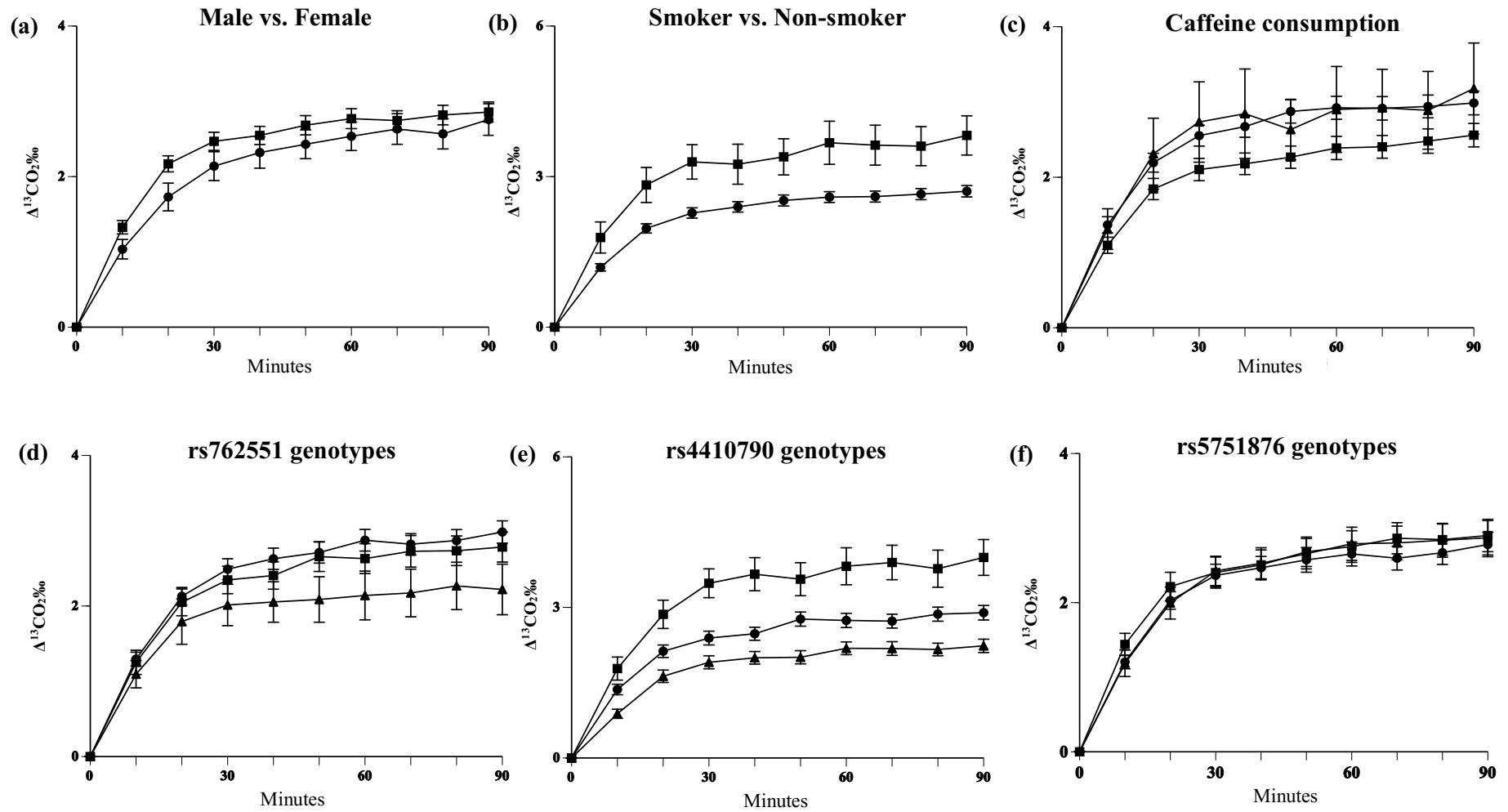
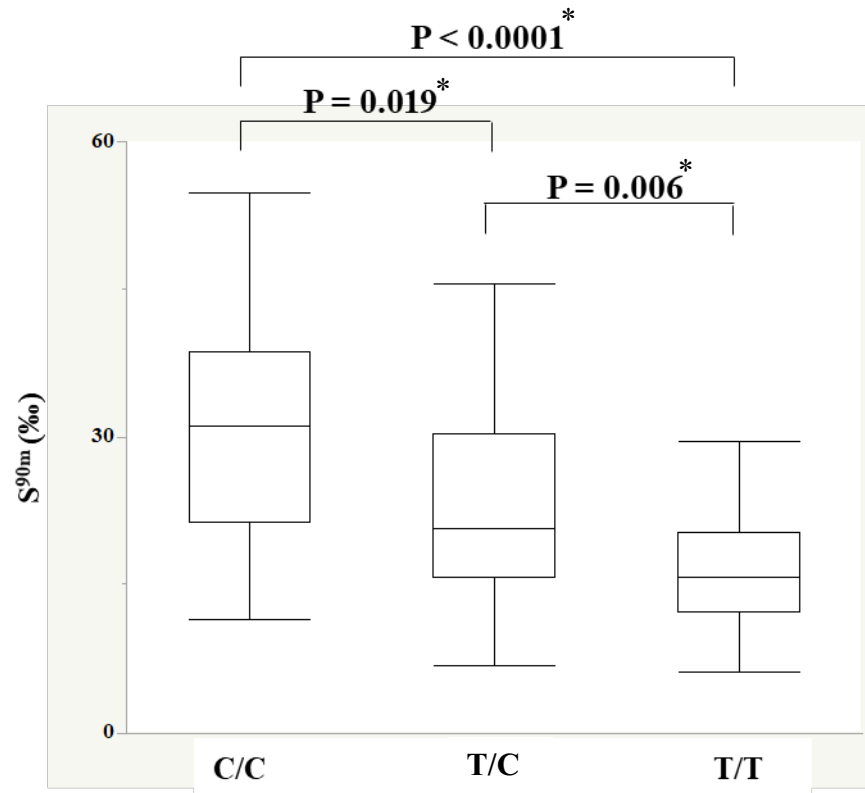


Figure 8: TriCBT - S^{90m}: rs4410790

(a) rs4410790 genotypes



(b) rs4410790 genotype C/C vs. T allele carriers

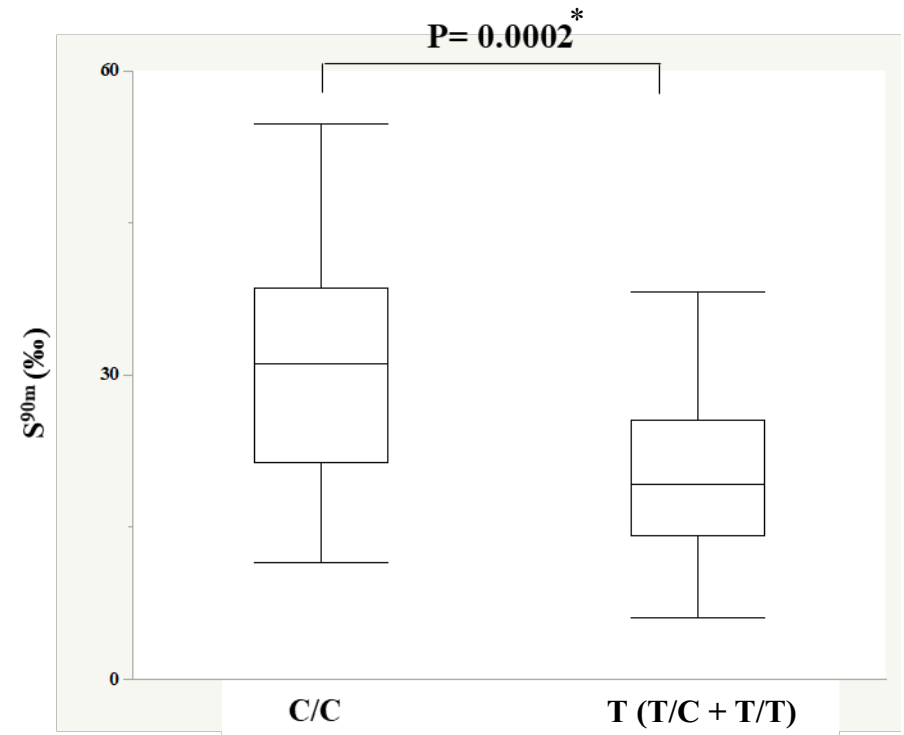
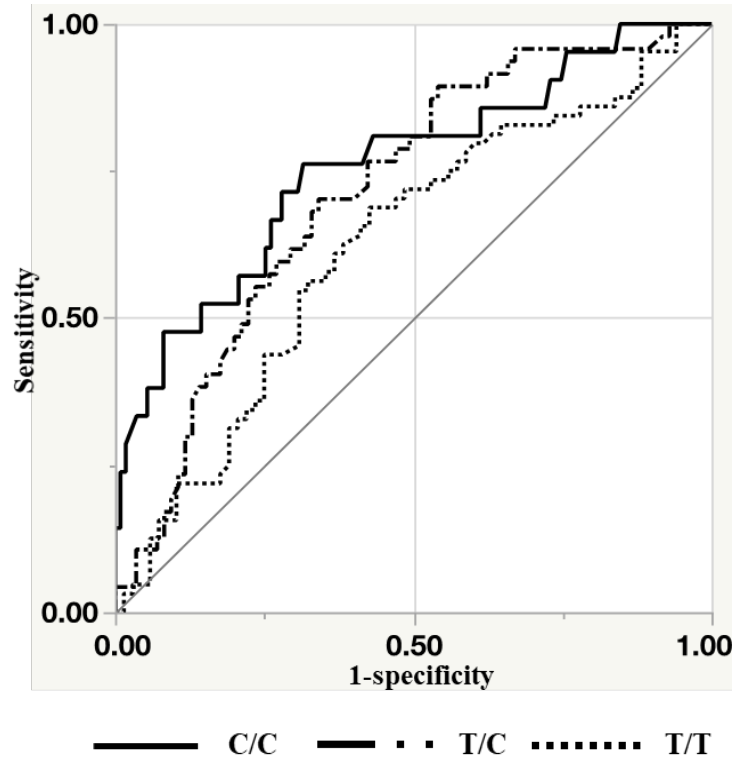


Figure 9: The ROC curve for TriCBT S^{90m} of rs4410790
(a) rs4410790 genotypes



(b) Genotype C/C positive

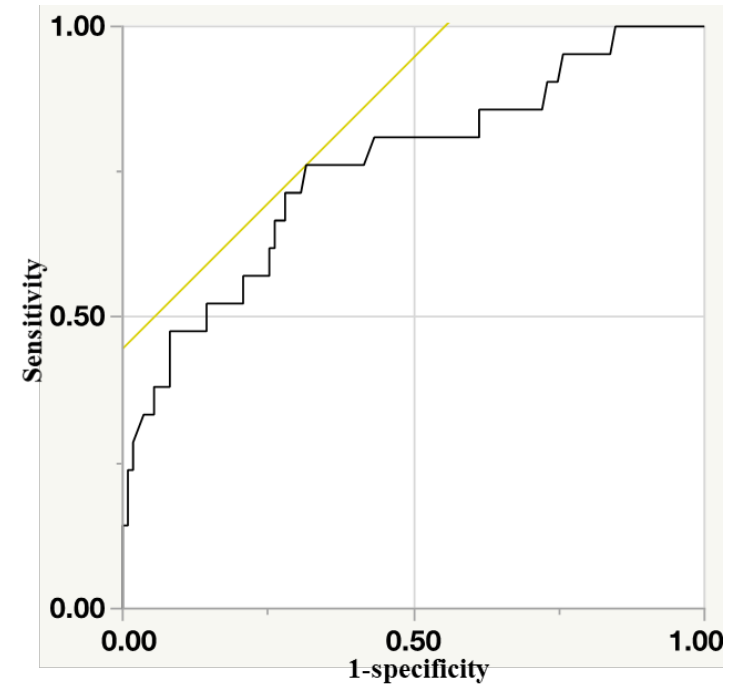
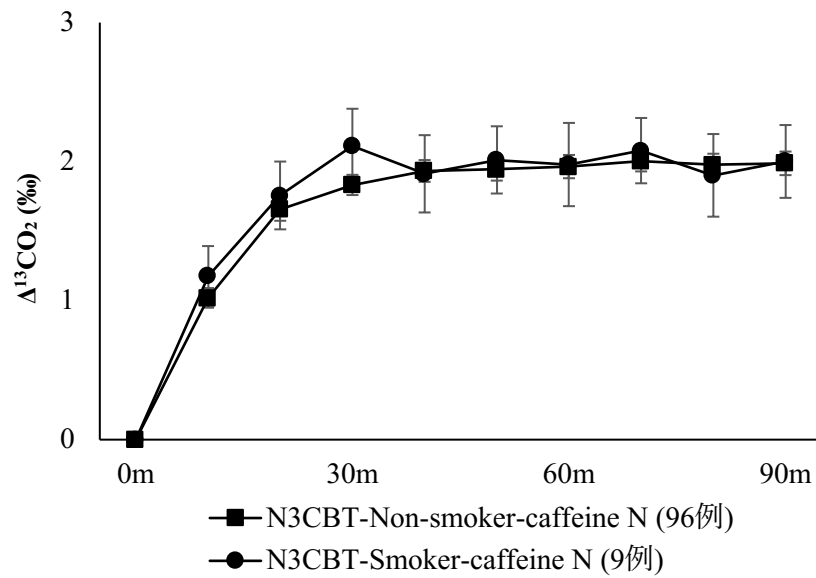
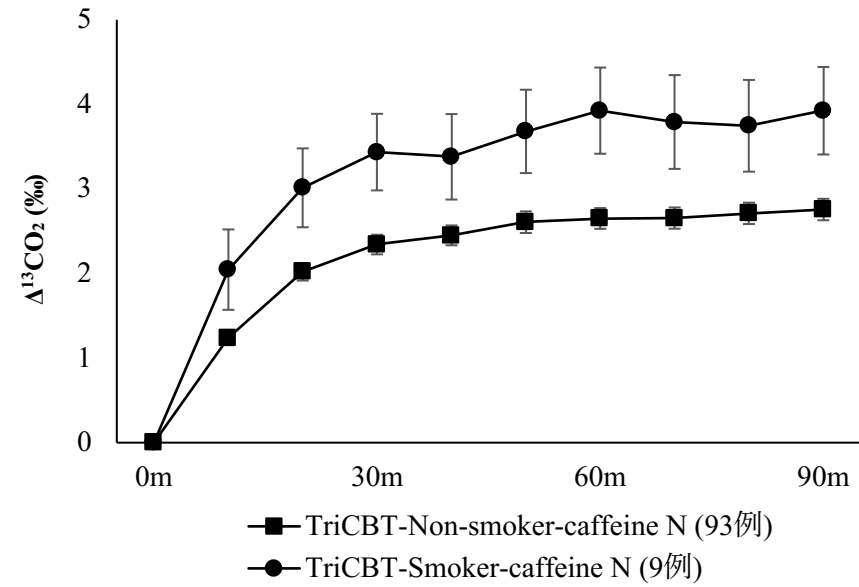


Figure 10: Smoker vs. Non-smoker : Results of the caffeine breath test N3CBT and TriCBT caffeine consumption N

(a) N3CBT - caffeine consumption N
(Smoker vs. Non-smoker)



(b) TriCBT - caffeine consumption N
(Smoker vs. Non-smoker)



1 5. 図説

Figure 1 : ¹³C-labeled caffeine breath test principle

(a) Caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT)

(b) Caffeine-trimethyl-¹³C breath test (TriCBT)

Figure 2 : Location of the rs762551, rs4410790 and rs5751876 genes

Source : National Center for Biotechnology Information dbSNP

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

Figure 3 : Results of the caffeine-N-3-methyl-¹³C breath test (N3CBT)

$$\Delta^{13}\text{CO}_2 (\text{‰}) = \{({}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2_{\text{tmin}} - {}^{13}\text{CO}_2/{}^{12}\text{CO}_2_{0\text{min}}) / {}^{13}\text{CO}_2_{\text{std}}\} \times 10^3$$

(a) ■ Male vs. ● Female

(b) ■ Smoker vs. ● Non-smoker

(c) Caffeine consumption, ■ Low (caffeine < 200 mg/day) vs. ● Normal (caffeine 200 mg/day-399 mg/day) vs. ▲ Heavy (caffeine ≥ 400 mg/day)

(d) rs762551 genotypes ■ A/A ● A/C ▲ C/C

(e) rs4410790 genotypes ■ C/C ● T/C ▲ T/T

(f) rs5751876 genotypes ■ C/C ● T/C ▲ T/T

(means ± SE)

*すべての呼気グラフの結果を平均 ± 標準誤差で示した。

Figure 3a : 男女別呼気グラフでは $\Delta^{13}\text{CO}_2$ が 30-40 分まで急速に上昇し、40 分以後は平坦に推移した。

Figure 3b : 喫煙者と非喫煙者の間では、喫煙者は非喫煙者に比べ、30分までは急峻な上昇を示したが、40分以後は非喫煙者と同様にほぼ平坦な推移を示した。

Figure 3c : Caffeine 消費量別では消費量 H は消費量 L に比べ急峻な上昇を示したが、40分以後は消費量 N や消費量 L と同様な変化を示した。

Figure 3d, f : rs762551 および rs5751876 の genotype 別のグラフでは、すべてが30分まで急速に上昇し、以後平坦な推移を示した。

Figure 3e : rs4410790 では genotype C/C が T/T に比べ急峻に上昇し、40分以後は平坦な推移を示した。

Figure 4 : N3CBT - S^{90m}: rs4410790

S^{90m} : The sum of $\Delta^{13}\text{CO}_2$ during a specific period was calculated as follows.

$$S^T = \sum_{i=0}^{N-1} \Delta^{13}\text{CO}_2(\Delta t \cdot i).$$

$\Delta t = 10 \text{ min}$, $N = T/10 \text{ min}$

Box-and-whisker diagram (箱ひげ図) で示した。

Figure 4a : rs4410790 genotypes

Genotype C/C と T/T の間に有意差を認め、C/C は高値であった。

Figure 4b : rs4410790 genotype C/C vs. T allele carriers

Genotype C/C と T allele キャリア (T/T + T/C) の間に有意差を認め、C/C が有意に高値であった。

Figure 5 : The ROC curve for N3CBT S^{90m} of rs4410790

Figure 5a : rs4410790 genotypes

Genotype 別 AUC。Genotype C/C のみが AUC 0.768 で 0.7 以上であった。

Figure 5b : Genotype C/C positive

Genotype C/C vs. T allele キャリア (T/T+T/C) の AUC (0.768)。

Figure 6 : Model of AhR signal transduction pathway

See text page 24-25.

Figure 7 : Results of the caffeine-trimethyl-¹³C breath test (TriCBT)

(a) ■ Male vs. ● Female

(b) ■ Smoker vs. ● Non-smoker

(c) Caffeine consumption, ■ Low (caffeine < 200 mg/day) vs. ● Normal (caffeine 200 mg/day-399 mg/day) vs. ▲ Heavy (caffeine ≥ 400 mg/day)

(d) rs762551 genotypes ■ A/A ● A/C ▲ C/C

(e) rs4410790 genotypes ■ C/C ● T/C ▲ T/T

(f) rs5751876 genotypes ■ C/C ● T/C ▲ T/T

(means ± SE)

*すべての呼気グラフの結果を平均 ± 標準誤差で示した。

Figure 7a : 男女別呼気グラフでは $\Delta^{13}\text{CO}_2$ が 30-40 分までの上昇および 40 分以後の推移でも同様な傾向を示した。

Figure 7b : 煙者と非喫煙者の間では、喫煙者は非喫煙者に比べ、30分までは急峻な上昇を示し、40分以後も非喫煙者に比べ高値で推移を示した。

Figure 7c : Caffeine 消費量別では、消費量 H と消費量 N は消費量 L に比べ急峻な上昇を示したが、40分以後は消費量 L と同様な変化を示した。

Figure 7d : rs762551 の genotype 別の呼気グラフでは、すべてが30分まで急速に上昇し、以後平坦な推移を示した。Genotype C/C は A/A および A/C に比べやや低値で推移した。

Figure 7e : rs4410790 では genotype C/C は T/C および T/T に比べ急峻に上昇し、40分以後は平坦な推移を示し、C/C は T/C および T/T に比べ高値で推移した。

Figure 7f : rs5751876 は genotype C/C、T/C および T/C と重なり合うような推移を示した。

Figure 8 : TriCBT - S^{90m}: rs4410790

Box-and-whisker diagram (箱ひげ図) で示した。

Figure 8a : rs4410790 genotypes

Genotype C/C は T/T および T/C に対して有意に高値であり、T/C は T/T に比べ高値であった。

Figure 8b : rs4410790 genotype C/C vs. T allele carriers

Genotype C/C と T allele キャリア (T/T + T/C) の間に有意差を認め、C/C が有意に高値であった。

Figure 9 : The ROC curve for TriCBT S^{90m} of rs4410790

Figure 9a : rs4410790 genotypes

Genotype 別 AUC。 Genotype C/C (AUC : 0.758) と T/T (AUC : 0.715) の AUC が 0.7 以上であった。

Figure 9b : Genotype C/C positive

Genotype C/C vs. T allele キャリア (T/T + T/C) の AUC (0.758)。

Figure 10 : Smoker vs. Non-smoker : Results of the caffeine breath test N3CBT and TriCBT caffeine consumption N

Figure 10a : N3CBT - caffeine consumption N: Smoker vs. Non-smoker (means ± SE)

N3CBT の caffeine 消費量 N では、喫煙者の $\Delta^{13}\text{CO}_2$ は非喫煙者と同様な値で推移した。

Figure 10b : TriCBT - caffeine consumption N: Smoker vs. Non-smoker (means ± SE)

TriCBT の caffeine 消費量 N では、喫煙者の $\Delta^{13}\text{CO}_2$ は非喫煙者に比べ高値で推移した。

16. 引用文献

- [1] 佐々木康人. 呼気中 CO₂ 測定による診断法I: わが国での炭素同位体呼気検査の進歩. RADIOISOTOPES 1991;40:475–84.
- [2] Schoeller DA, Schneider JF, Solomons NW, Watkins JB, Klein PD. Clinical diagnosis with the stable isotope ¹³C in CO₂ breath tests: methodology and fundamental considerations. J Lab Clin Med 1977;90:412–21.
- [3] Solomons NW, Schoeller DA, Wagonfeld JB, Ott D, Rosenberg IH, Klein PD. Application of a stable isotope (¹³C)-labeled glycocholate breath test to diagnosis of bacterial overgrowth and ileal dysfunction. J Lab Clin Med 1977;90:431–9.
- [4] Watkins JB, Schoeller DA, Klein PD, Ott DG, Newcomer AD, Hofmann AF. ¹³C-trioctanoin: a nonradioactive breath test to detect fat malabsorption. J Lab Clin Med 1977;90:422–30.
- [5] Schoeller DA, Klein PD. A microprocessor controlled mass spectrometer for the fully automated purification and isotopic analysis of breath carbon dioxide. Biomed Mass Spectrom 1979;6:350–5.
- [6] Watkins JB, Klein PD, Schoeller DA, Kirschner BS, Park R, Perman JA. Diagnosis and differentiation of fat malabsorption in children using ¹³C-labeled lipids: trioctanoin, triolein, and palmitic acid breath tests. Gastroenterology 1982;82:911–7.
- [7] Arnaud MJ, Thelin-Doerner A, Ravussin E, Acheson KJ. Study of the demethylation of [1,3,7-Me-¹³C] caffeine in man using respiratory exchange measurements. Biomed Mass Spectrom 1980;7:521–4.

- [8] Park G, Katelaris PH, Jones DB, Seow F, Lin BPC, Le Couteur DG. Validity of the ¹³C-caffeine breath test as a noninvasive, quantitative test of liver function. *Hepatology* 2003;38:1227–36.
- [9] Park GJ-H, Katelaris PH, Jones DB, Seow F, Lin BPC, Le Couteur DG, et al. The C-caffeine breath test distinguishes significant fibrosis in chronic hepatitis B and reflects response to lamivudine therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:395–403.
- [10] Schmilovitz-Weiss H, Niv Y, Pappo O, Halpern M, Sulkes J, Braun M, et al. The ¹³C-caffeine breath test detects significant fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:408–12.
- [11] Park GJ-H, Wiseman E, George J, Katelaris PH, Seow F, Fung C, et al. Non-invasive estimation of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using the ¹³C-caffeine breath test. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:1411–6.
- [12] Konstantinou D, Margariti E, Hadziyannis E, Pectasides D, Papatheodoridis GV. Significance of the ¹³C-caffeine breath test for patients with cirrhosis. *Ann Gastroenterol* 2014;27:53–9.
- [13] Pijls KE, de Vries H, Nikkessen S, Bast A, Wodzig WKWH, Koek GH. Critical appraisal of ¹³C breath tests for microsomal liver function: aminopyrine revisited. *Liver Int* 2014;34:487–94.
- [14] Kotake AN, Schoeller DA, Lambert GH, Baker AL, Schaffer DD, Josephs H. The caffeine CO₂ breath test: Dose response and route of N-demethylation in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* 1982;32:261–9.
- [15] Gorowska-Kowolik K, Chobot A, Kwiecien J. ¹³C Methacetin Breath Test for Assessment of Microsomal Liver Function: Methodology and Clinical Application. *Gastroenterol Res Pract* 2017;2017:7397840.

- [16] Rost KL, Brösicke H, Brockmöller J, Scheffler M, Helge H, Roots I. Increase of cytochrome P450IA2 activity by omeprazole: evidence by the ¹³C-[N-3-methyl]-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 1992;52:170–80.
- [17] Fuhr U, Rost KL. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* 1994;4:109–16.
- [18] Rost KL, Brösicke H, Heinemeyer G, Roots I. Specific and dose-dependent enzyme induction by omeprazole in human beings. *Hepatology* 1994;20:1204–12.
- [19] Rost KL, Roots I. Accelerated caffeine metabolism after omeprazole treatment is indicated by urinary metabolite ratios: coincidence with plasma clearance and breath test. *Clin Pharmacol Ther* 1994;55:402–11.
- [20] Oshikoya KA, Smith K, Sammons H, Choonara I. Decreased metabolism of ¹³C-caffeine via hepatic CYP1A2 in marasmus and kwashiorkor based on breath test. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2015;26:105–13.
- [21] Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev* 1992;17:139–70.
- [22] Ministry of Health, Labour and Welfare. n.d. <https://www.mhlw.go.jp/english/>
- [23] European Food Safety Authority | Trusted science for safe food. n.d. <http://www.efsa.europa.eu/>
- [24] Health Canada - Canada.ca. n.d. <https://www.canada.ca/en/health-canada.html>

- [25] Popat RA, Van Den Eeden SK, Tanner CM, Kamel F, Umbach DM, Marder K, et al. Coffee, ADORA2A, and CYP1A2: the caffeine connection in Parkinson's disease: ADORA2A and CYP1A2 variants and PD risk. *European Journal of Neurology* 2011;18:756–65.
- [26] Chuang Y-H, Lill CM, Lee P-C, Hansen J, Lassen CF, Bertram L, et al. Gene-Environment Interaction in Parkinson's Disease: Coffee, ADORA2A, and CYP1A2. *Neuroepidemiology* 2016;47:192–200.
- [27] Facheris MF, Schneider NK, Lesnick TG, de Andrade M, Cunningham JM, Rocca WA, et al. Coffee, caffeine-related genes, and Parkinson's disease: A case-control study. *Mov Disord* 2008;23:2033–40.
- [28] Yamada-Fowler N, Fredrikson M, Söderkvist P. Caffeine interaction with glutamate receptor gene GRIN2A: Parkinson's disease in Swedish population. *PLoS ONE* 2014;9:e99294.
- [29] Yamada-Fowler N, Söderkvist P. Coffee, Genetic Variants, and Parkinson's Disease: Gene-Environment Interactions. *Journal of Caffeine Research* 2015;5:3–10.
- [30] Nordestgaard AT, Nordestgaard BG. Coffee intake, cardiovascular disease and all-cause mortality: observational and Mendelian randomization analyses in 95 000-223 000 individuals. *Int J Epidemiol* 2016;45:1938–52.
- [31] Zhou A, Hyppönen E. Long-term coffee consumption, caffeine metabolism genetics, and risk of cardiovascular disease: a prospective analysis of up to 347,077 individuals and 8368 cases. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2019;109:509–16.

- [32] Inoue M, Tsugane S. Coffee Drinking and Reduced Risk of Liver Cancer: Update on Epidemiological Findings and Potential Mechanisms. *Curr Nutr Rep* 2019;8:182–6.
- [33] Sartini M, Bragazzi N, Spagnolo A, Schinca E, Ottria G, Dupont C, et al. Coffee Consumption and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Nutrients* 2019;11:694.
- [34] Rodenburg EM, Eijgelsheim M, Geleijnse JM, Amin N, van Duijn CM, Hofman A, et al. CYP1A2 and coffee intake and the modifying effect of sex, age, and smoking. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2012;96:182–7.
- [35] Bjørngaard JH, Nordestgaard AT, Taylor AE, Treur JL, Gabrielsen ME, Munafò MR, et al. Heavier smoking increases coffee consumption: findings from a Mendelian randomization analysis. *International Journal of Epidemiology* 2017;46:1958–67.
- [36] Tantcheva-Poór I, Zaigler M, Rietbrock S, Fuhr U. Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. *Pharmacogenetics* 1999;9:131–44.
- [37] Djordjevic N, Ghotbi R, Bertilsson L, Jankovic S, Aklillu E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:381–5.
- [38] Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47:445–9.
- [39] Cornelis MC, Monda KL, Yu K, Paynter N, Azzato EM, Bennett SN, et al. Genome-wide meta-analysis identifies regions on 7p21 (AHR) and 15q24 (CYP1A2) as determinants of habitual caffeine consumption. *PLoS Genet* 2011;7:e1002033.

- [40] National Center for Biotechnology Information dbSNP. n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
- [41] Denden S, Bouden B, Haj Khelil A, Ben Chibani J, Hamdaoui MH. Gender and ethnicity modify the association between the CYP1A2 rs762551 polymorphism and habitual coffee intake: evidence from a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2016;15.
- [42] Sulem P, Gudbjartsson DF, Geller F, Prokopenko I, Feenstra B, Aben KKH, et al. Sequence variants at CYP1A1-CYP1A2 and AHR associate with coffee consumption. *Hum Mol Genet* 2011;20:2071–7.
- [43] Josse AR, Da Costa LA, Campos H, El-Sohemy A. Associations between polymorphisms in the AHR and CYP1A1-CYP1A2 gene regions and habitual caffeine consumption. *Am J Clin Nutr* 2012;96:665–71.
- [44] Rogers PJ, Hohoff C, Heatherley SV, Mullings EL, Maxfield PJ, Evershed RP, et al. Association of the anxiogenic and alerting effects of caffeine with ADORA2A and ADORA1 polymorphisms and habitual level of caffeine consumption. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:1973–83.
- [45] Childs E, Hohoff C, Deckert J, Xu K, Badner J, de Wit H. Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:2791–800.
- [46] Cornelis MC, El-Sohemy A, Campos H. Genetic polymorphism of the adenosine A2A receptor is associated with habitual caffeine consumption. *Am J Clin Nutr* 2007;86:240–4.
- [47] Cabinet Office Food Safety Commission of Japan. n.d. <https://www.fsc.go.jp/>

- [48] Shinya K, Nakayama T, Nakayama T, Yamamoto T. A case-control study between the STIM1 gene and hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res* 2018;41:39–44.
- [49] Chvasta TE, Cooke AR. Emptying and absorption of caffeine from the human stomach. *Gastroenterology* 1971;61:838–43.
- [50] Blanchard J, Sawers SJ. The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1983;24:93–8.
- [51] Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb Exp Pharmacol* 2011:33–91.
- [52] Zhu B, Ou-Yang DS, Chen XP, Huang SL, Tan ZR, He N, et al. Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:455–61.
- [53] Turpault S, Brian W, Van Horn R, Santoni A, Poitiers F, Donazzolo Y, et al. Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:928–35.
- [54] Kalow W, Tang BK. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther* 1991;50:508–19.
- [55] Nehlig A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacol Rev* 2018;70:384–411.
- [56] Carrillo JA, Benitez J. CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1996;41:605–8.
- [57] Johansson G, Gillner M, Högberg B, Gustafsson JA. The TCDD receptor in rat intestinal mucosa and its possible dietary ligands. *Nutr Cancer* 1982;3:134–44.

- [58] Carlstedt-Duke JM, Elfström G, Högberg B, Gustafsson JA. Ontogeny of the rat hepatic receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its endocrine independence. *Cancer Res* 1979;39:4653–6.
- [59] Nakagawa-Senda H, Hachiya T, Shimizu A, Hosono S, Oze I, Watanabe M, et al. A genome-wide association study in the Japanese population identifies the 12q24 locus for habitual coffee consumption: The J-MICC Study. *Sci Rep* 2018;8:1493.
- [60] Harper PA, Wong J m Y, Lam MSM, Okey AB. Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact* 2002;141:161–87.
- [61] Vaugeois J-M. Signal transduction: positive feedback from coffee. *Nature* 2002;418:734–6.
- [62] Ishii M, Ishii Y, Nakayama T, Takahashi Y, Asai S. 13C-caffeine breath test identifies single nucleotide polymorphisms associated with caffeine metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* 2020;35:321–8.
- [63] Lane JD, Steege JF, Rupp SL, Kuhn CM. Menstrual cycle effects on caffeine elimination in the human female. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:543–6.
- [64] Fujita H, Kosaki R, Yoshihashi H, Ogata T, Tomita M, Hasegawa T, et al. Characterization of the aryl hydrocarbon receptor repressor gene and association of its Pro185Ala polymorphism with micropenis. *Teratology* 2002;65:10–8.
- [65] Söderberg MM, Haslemo T, Molden E, Dahl M-L. Influence of CYP1A1/CYP1A2 and AHR polymorphisms on systemic olanzapine exposure. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23:279–85.

17. 研究業績

研究業績

氏名 石井 倫子

I	発表	①一般発表	5	
		②特別発表	なし	
II	論文	①原著論文	1	(共 1)
		②症例発表	なし	
		③総説	なし	
III	著書		なし	

以上

I 発表

①一般発表

1. 石井倫子, 山崎文恵, 伊藤 耕, 早川美佳, 大橋好偉, 佐藤慶太郎, 近藤壽郎, 瀬尾芳輝: 金属冠による咬合偏位マウスの作製および顎関節への影響の検討, 第 93 回日本生理学会, 札幌, 2016.3.
2. 山崎文恵, 石井倫子, 伊藤 耕, 早川美佳, 大橋好偉, 佐藤慶太郎, 近藤壽郎, 瀬尾芳輝: MRI によるコラーゲン抗体関節炎モデルマウス顎関節滑膜における血管透過性の評価, 第 93 回日本生理学会, 札幌, 2016.3.
3. 伊藤 耕, 河島 睦, 阿久津美和, 服部俊夫, 渡邊 駿, 矢野照雄, 石井倫子, 高橋康輔, 小倉直美, 近藤壽郎: 顎関節鏡視下洗浄療法非奏効例に対する鏡視下剥離授動術, 第 60 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 名古屋, 2015.10.
4. 河島 睦, 伊藤 耕, 阿久津美和, 服部俊夫, 渡邊 駿, 矢野照雄, 石井倫子, 高橋康輔, 小倉直美, 近藤壽郎: MRI と関節鏡初見との間に異同がみとめられた顎関節内障の 1 例, 第 60 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 名古屋, 2015.10.
5. Yukimoto Ishii, Michiko Ishii, Yasuo Takahashi, Satoshi Asai : ¹³C-caffeine breath test for the identification of Single nucleotide polymorphisms associated with caffeine metabolism, Digestive Disease Week 2019, San Diego, 2019.5.

②特別発表 なし

II 論文

①原著論文

1. Michiko Ishii, Yukimoto Ishii, Tomohiro Nakayama, Yasuo Takahashi, Satoshi Asai :
¹³C-caffeine breath test identifies single nucleotide polymorphisms associated with
caffeine metabolism, Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 35:321–328, 2020.

②症例報告 なし

③総説 なし

III 著書 なし

以上