

尿毒症血清中の蛋白結合阻害因子の影響について

(平成十二年度日本透析医会研究助成報告書)

辻本雅之* 平田純生** 和泉 智** 太田美由希** 安達真美** 高良恒史* 大西憲明*
横山照由* 田中一彦***

要 約

抗てんかん薬として繁用されているバルプロ酸 (VPA) は、透析患者においてその蛋白結合率 (PBR) が低下していることが報告されており、VPA の有効性および毒性の直接的な指標になる遊離型 VPA 濃度を把握することは重要である。そこでわれわれは、透析患者の PBR 低下原因について検討した。

血清総 VPA 濃度および遊離型 VPA 濃度の測定を行った透析患者 8 例において VPA の PBR と生化学データの相関を見たところ、血清アルブミン (Alb) 値と強い相関 ($r=0.870$, $P<0.005$) が示されたのに対して、血清クレアチニン (Cre) 値とは相関が認められなかった。また、同様に健常人プール血清 (NS) および透析患者プール血清 (US) に VPA を添加した *in vitro* 実験においても血清 Alb 値と強い相関 (NS; $r=0.944$, $P<0.0005$; US; $r=0.805$, $P<0.05$) が認められ、血清 Cre 値とは相関が認められなかった。しかし、同じ Alb 濃度にしても NS と US の PBR に有意な差異が認められたことから、透析患者における PBR 低下の原因が低 Alb 血症以外にも、なんらかの蛋白結合阻害因子が存在することがわかった。そこで、吸着炭である AST-120 の前処置や、透析患者血清中に蓄積しており腎不全の進行に関与しているインドキシル硫酸の添加による PBR への影響について調べた。その結果、低 Alb 血症以外の蛋白結合低下の一因は、インドキシル硫酸の蓄積によることがわかった。

以上より、透析患者における VPA の PBR 低下は低 Alb 血症、蛋白結合競合物質の存在などにより生

じているが、特に、低 Alb 血症による影響が大きく、血清 Alb 値から PBR の予測が可能であることが示唆された。

はじめに

薬物の直接的な有効性および毒性の指標としては遊離型薬物濃度を測定することが重要である。バルプロ酸 (VPA) は有効血中濃度内において、アルブミン (Alb) との蛋白結合飽和現象が知られており¹⁾、透析患者でその遊離型薬物濃度が上昇していること²⁾や、血液透析前後の蛋白結合率 (PBR) が大きく変動することが報告されている^{3,4)}。VPA の PBR が低下すると血中濃度が有効治療域に入っているにもかかわらず中毒を起しやすくなるため要注意である。また、一般的に透析患者においては、食事摂取不良や低蛋白食、或いは、血液透析 (HD) 中のアミノ酸喪失などに起因する低 Alb 血症を呈していることが知られており⁵⁾、血清 Alb 濃度の低下が直接的に薬物の PBR を低下させていることが考えられる²⁾。一方、クレアチニン (Cre) などの腎排泄型内因性物質が透析患者血清中に蓄積されており、このうち Alb と親和性の高い尿毒症物質が薬物と Alb の蛋白結合を競合的に阻害している可能性も考えられる⁶⁻⁹⁾。しかし、透析患者の VPA の蛋白結合を変動させる因子としてなにが最も重要なのかについてはまだ解明されていない。

そこでわれわれは、VPA 服用透析患者 8 例、また、透析患者プール血清 (US) と健常人プール血清 (NS) とにおいて、VPA の PBR に影響を与える諸因子について検討したので報告する。

1 対象と方法

過去2年間(1999.1~2001.1)で白鷺病院にて遊離型 VPA (f-VPA) 濃度および総 VPA (t-VPA) 濃度を測定しており、なおかつ採血時点での血清 Alb 濃度および血清 Cre 濃度が判明している8症例(全症例男性; 平均年齢 64.3 ± 2.5 歳) および US として、HD 施行患者 150 名の HD 直前の血液から得られた血清をプールしたもの、また、NS は 9 人の健常人から得られたものを用い、以下の検討を行った。

検討 I : 透析患者の PBR と血清 Alb 値および血清 Cre 値との相関について

透析患者 8 症例の検討は、採血時点の血清 Alb 濃度および血清 Cre 濃度と PBR について相関性を検討した。

検討 II : PBR と血清 Alb 値および血清 Cre 値の相関について

NS 9 検体、US 7 検体各 2.5 ml に $80 \mu\text{g/ml}$ となるように VPA を添加し、12 時間 37°C で incubation した。その内 1 ml を t-VPA 濃度の測定に利用し、他の 1 ml を Amicon 社の centrifree MPS を用い、 25°C 、2,000 rpm の条件下で 1 時間遠心分離することにより得られた限外濾液から f-VPA 濃度を測定し、PBR を次式より算出した。

$$\text{PBR} (\%) = (\text{t-VPA} - \text{f-VPA}) \times 100 / \text{t-VPA}$$

検討 III : 血清 Alb 値と PBR について

NS、US 両血清 (各 $n=3$) の Alb 濃度が各々 3.5, 2.5, 1.5 g/dl になるように生理食塩水を用いて希釈し、検討 II と同様の実験を行った。

検討 IV : VPA 濃度変動による PBR 変化について

両血清 (各 $n=3$) において、Alb 濃度を 3.5 g/dl に固定し、VPA 濃度を 20~160 $\mu\text{g/ml}$ に変動させ、検討 II と同様の実験を行った。

検討 V : NS への インドキシル硫酸 (IS) 添加による PBR 変化について

IS の MeOH 溶液を蒸発乾固したものに、NS ($n=3$) を添加し、その後の方法は検討 IV に準じた。

検討 VI : AST-120 (クレメジン[®]) 添加前後の PBR 変化について

各血清 ($n=3$) を 2N HCl を用いて pH 3.0 に調整し、AST-120 を 40 mg/ml 加え、1 時間混和後遠

心分離し、上清のみを取りだし 2N NaOH により元の pH に戻した。その後の方法は検討 IV に準じた。

VPA 濃度の測定

t-VPA および f-VPA の測定は、fluorescence polarization immunoassay (FPIA) 法 (Dainabot TDX[®]) を用いて測定した。

統計学的検討

平均値の差の検定には、Student's *t* test を用いた。相関係数の検定には最小二乗法を用い、検定率 5% 未満を有意とした。

2 結果

検討 I

VPA の PBR は血清 Alb 値と有意な強い正相関 ($r=0.870$, $P<0.005$) を示したのに対して、血清 Cre 値とは相関を示さなかった (図 1)。

検討 II

NS および US の PBR と血清 Alb 値との間にはそれぞれ強い正相関が認められた (NS; $r=0.944$, $P<0.0005$: US; $r=0.805$, $P<0.05$) が、血清 Cre 値との間に相関は認められなかった (図 2)。

検討 III

血清 Alb 値の低下とともに両血清において PBR の低下が認められ、すべての血清 Alb 値で US、NS の PBR 間に有意差が認められた (図 3)。

検討 IV

US、NS ともに VPA 濃度の上昇に伴って PBR は有意に低下した。しかしながら、US の VPA 高濃度においてのみ、VPA 濃度上昇に伴う有意な PBR 低下が認められなかった (図 4)。

検討 V

VPA の濃度変化において、IS 濃度依存的に PBR の低下が認められた (図 5)。

検討 VI

AST-120 の前処置は、NS の PBR に有意な影響を与えなかった。一方、US に対する AST-120 の前処置は有意差はなかったが回復傾向を示した (図 6)。なお、AST-120 前処置時の US における血清 Cre 値は 11.4 ± 0.8 mg/dl から 0.63 ± 0.07 mg/dl に、血清尿酸値は 8.37 ± 0.04 mg/dl から測定限界以下まで低下していた。

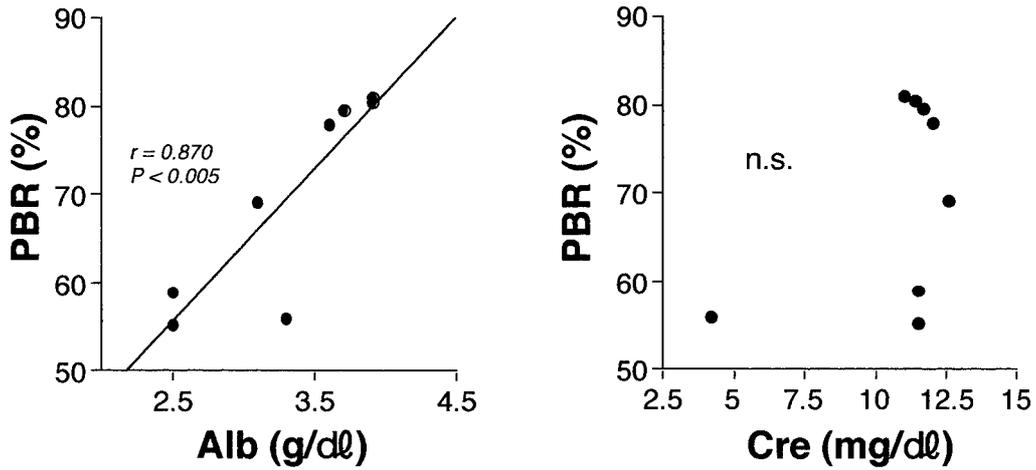


図1 透析患者のPBR と血清 Alb 値および血清 Cre 値との相関

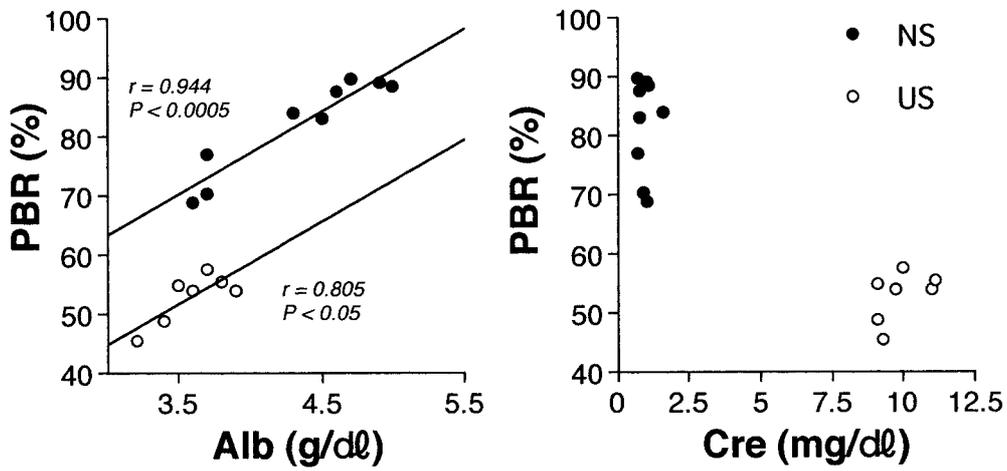


図2 PBR と血清 Alb 値および血清 Cre 値

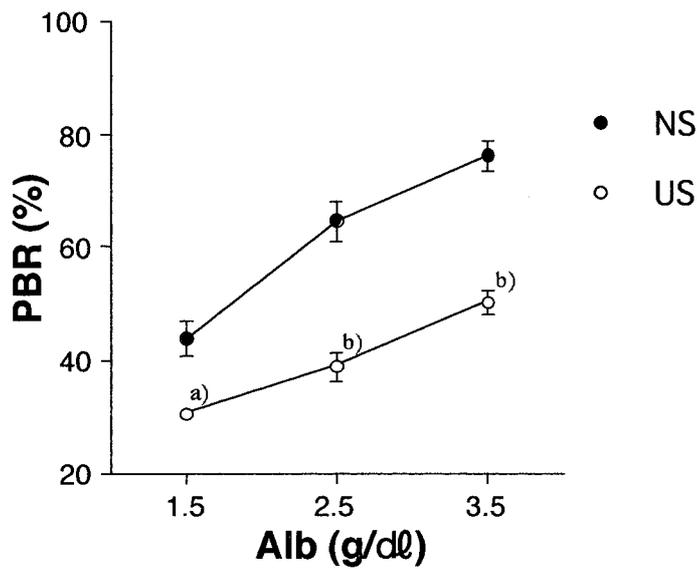


図3 PBR と血清 Alb 値

mean±SD (n=3)

a) $P < 0.05$ vs. NS b) $P < 0.005$ vs. NS

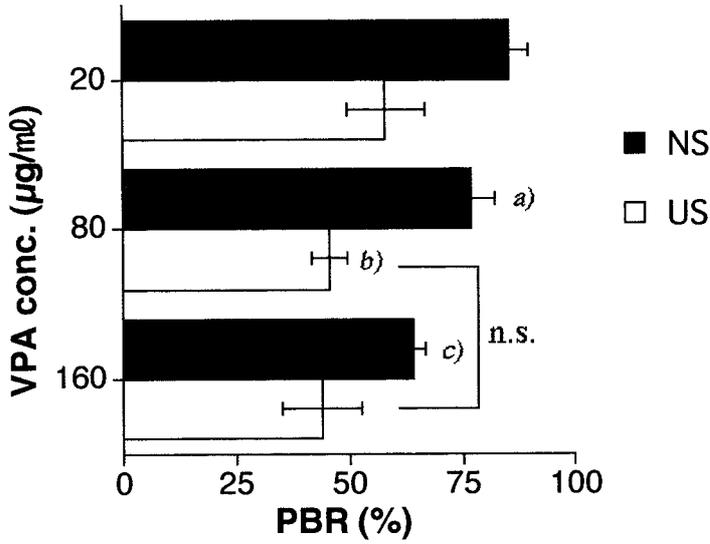


図4 VPA濃度変動によるPBR変化
 mean±SD (n=3)
 a) $P < 0.005$ vs. VPA 20 μg/ml (NS)
 b) $P < 0.05$ vs. VPA 20 μg/ml (US)
 c) $P < 0.05$ vs. VPA 80 μg/ml (NS)

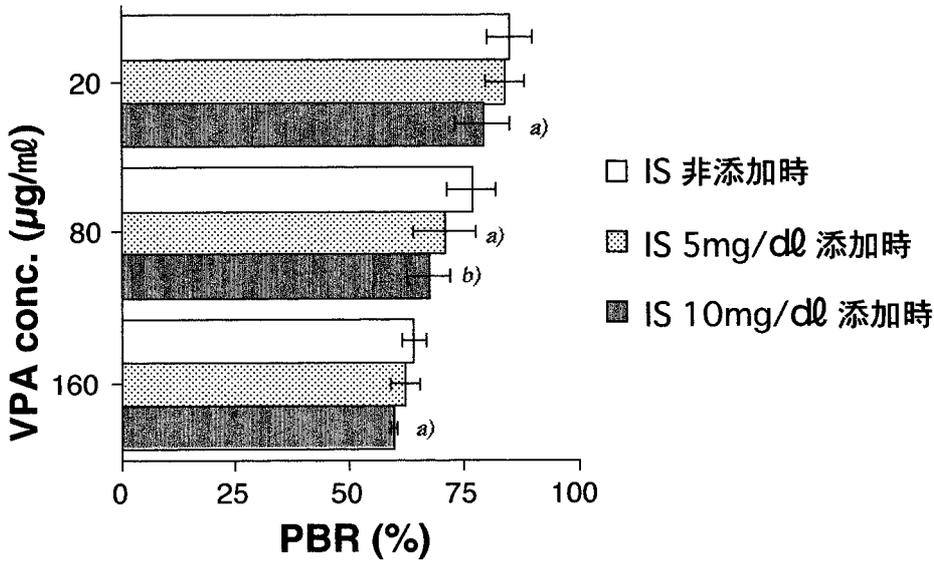


図5 NSへのIS添加によるPBR変化
 mean±SD (n=3)
 a) $P < 0.05$ vs. control
 b) $P < 0.005$ vs. control

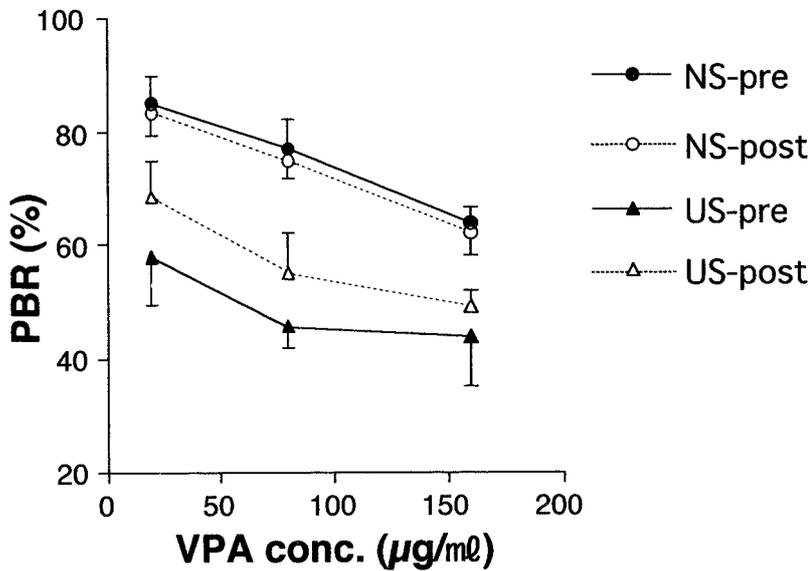


図6 AST-120添加前後のPBR変化
 mean±SD (n=3)

3 考察

f-VPA および t-VPA 濃度を測定した 8 症例について、採血時の血清 Alb 値および血清 Cre 値との関係について検討した。その結果、VPA の PBR は血清 Alb 値と強い相関 ($r=0.870$, $P<0.005$) が示され、血清 Cre 値とは相関が示されなかった (図 1)。しかしながら、US 中の蓄積物が VPA だけでなく、フェニトインやサリチル酸などの酸性薬物の蛋白結合を阻害するという報告も存在している⁶⁻⁹⁾。

そこで、われわれは US 中に存在する蛋白結合阻害因子について *in vitro* 実験において検討した。検討 II においても 8 症例の検討と同様に、US および NS 両群において PBR と血清 Alb 値の間に強い正相関 (NS; $r=0.944$, $P<0.0005$: US; $r=0.805$, $P<0.05$) が認められたが、US および NS の両群において PBR と血清 Cre 値の間には相関が認められなかった (図 2)。

以上のことから、透析患者の VPA の PBR 低下には血清 Cre 値の上昇よりも低 Alb 血症の寄与が大きいことが示唆された。

US, NS を用いて Alb 濃度変化に対する PBR の変化 (図 3)、VPA 濃度変動による PBR への影響について実験した (図 4)。図 3 において、Alb 濃度を等しくしても US, NS 間で PBR に明らかな差異が認められたことから、低 Alb 血症以外にもなんらかの蛋白結合阻害因子が US 中に存在している可能性が示され、図 4 において、US 中の蛋白結合阻害因子の関与は、VPA 高濃度において小さい可能性が示された。すなわち、US には NS には存在しないなんらかの親和性低下原因が存在することが示された。

そこで、この親和性低下原因を探るため、NS に対して尿毒症時に蓄積し、腎不全の進行を促進し、Alb との親和性が高い物質である IS^{10,11)} を添加したときの PBR 変化について調査した (図 5)。すべての VPA 濃度において、IS 添加により、IS 濃度依存的な PBR 低下が認められたことから IS が競合的に VPA と Alb の結合を阻害していると考えられた。また、IS 以外にもフラン環化合物やインドール酢酸などが酸性薬物と Alb の蛋白結合を阻害するという報告^{11, 12)}があり、IS を初めとする様々な尿毒症物質が VPA と Alb の蛋白結合を阻害すると考えられた。

次に、Alb の影響を無くしたときの PBR 低下が尿毒症性物質の蓄積のみで説明できるかどうかを検討するために検討 VI を行った。US 中に蓄積されている尿毒症性物質を除去するため、分子量 100~数千の物質をよく吸着し、蛋白質レベルの高分子にはまったく影響を与えないことが報告されている¹³⁾ AST-120 を用いて、尿毒症物質の除去を試み、AST-120 処置前後の生化学検査データを比較した。生化学検査データより、尿毒症の指標となる血清 Cre 値、および血清尿酸値が AST-120 添加により顕著に減少している (血清 Cre 値: 11.4 ± 0.8 mg/dl \rightarrow 0.63 ± 0.07 mg/dl, 血清尿酸値: 8.37 ± 0.04 mg/dl \rightarrow 測定限界以下) ことがわかり、AST-120 前処置により、US 中の尿毒症性物質がほぼ完全に除去されたと考えられた。

そこで、この尿毒症物質を除去した US を用いて VPA の PBR 変化について実験した (図 6)。その結果、US に対する AST-120 前処置は PBR の回復傾向を示したが回復は有意ではなかった。この結果より、VPA の PBR 低下が尿毒症物質の蓄積による競合的阻害だけでは説明ができないため、尿毒症物質の蓄積などにより生じた Alb の構造変化に起因する結合サイトの親和性低下も少なからず関与している可能性が示唆された。これらの結果は Dasgupta ら⁷⁻⁹⁾による報告と同様であり、この仮説を支持するものである。

以上のように、透析患者に対して VPA を投与するときにはその PBR 低下に様々な原因が存在していることが推測された。また、腎不全時における Alb の機能低下の可能性を指摘したが、このような腎不全時に生じる機能性蛋白の機能低下は、輸送蛋白である P 糖蛋白質が胆管や脳などの腎外組織においても阻害されることが示されている¹⁴⁾ ことから、腎不全においては一般的である。また、Liponi ら¹⁵⁾ は、末期腎不全時における遊離型フェニトイン濃度を総フェニトイン濃度と血清 Alb 値から予測する補正式を示している。今回われわれの検討では、*in vitro* でも *in vivo* においても VPA の PBR と血清 Alb 値と強い相関が認められたことから、t-VPA 濃度と血清 Alb 値が得られれば透析患者の f-VPA 濃度は予測可能であることが示唆された。今後、例数を増やして、f-VPA 濃度の予測が可能になるよう、さらに検討する予定である。

4 結 語

透析患者における PBR 低下要因は、低 Alb 血症、尿毒症蓄積物による蛋白結合競合阻害、低親和性結合サイトの存在が関与している可能性が示された。

本論文の要旨は、第 56 回大阪透析研究会（2001 年 3 月 11 日、大阪）において発表した。

文 献

- 1) 児玉庸夫, 木本裕郎, 藤井 薫, 他: *In vivo* における valproic acid の血清蛋白結合を変化させる要因. 臨床薬理, 22; 471, 1991.
- 2) 長田道夫, 中川利香, 伊藤克己, 他: 血液透析患者における血中バルプロ酸ナトリウムの動態. 透析会誌, 20; 855, 1987.
- 3) 川上美由希, 平田純生, 田中一彦, 他: 遊離型 Valproic acid (VPA) 濃度が変動する透析症例における VPA 蛋白結合率変動の要因についての検討. 臨床薬理, 31; 175, 2000.
- 4) 福西勇夫: 血液透析中にけいれん発作を呈した腎不全患者における抗てんかん薬の血中動態. 臨床精神医学, 20; 1293, 1991.
- 5) 泉 達郎, 今泉友一, 伊藤克己, 他: 血液透析中のてんかん患者における, バルプロ酸 Na 徐放剤の有用性・症例報告. 発達薬理学誌, 6; 17, 1993.
- 6) Takamura N, Maruyama T, Otagiri M: Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia. Clin Chem, 43(12); 2274, 1997.
- 7) Dasgupta A, Abu-alfa A: Increased free phenytoin

- concentrations in predialysis serum compared to postdialysis serum in patients with uremia treated with hemodialysis. Role of uremic compounds. Am J Clin Pathol, 98; 19, 1992.
- 8) Dasgupta A, Jacques M: Reduced *in vitro* displacement of valproic acid from protein binding by salicylate in uremic sera compared with normal sera. Role of uremic compounds. Am J Clin Pathol, 101 ; 349, 1994.
 - 9) Dasgupta A, Crossey MJ: Elevated free fatty acid concentrations in lipemic sera reduce protein binding of valproic acid significantly more than phenytoin. Am J Med Sci, 313; 75, 1997.
 - 10) Dhondt A, Vanholder R, Lameire N, et al: The removal of uremic toxins. Kidney Int, 58 (Suppl 76); S47, 2000.
 - 11) Niwa T: Organic acid and the uremic syndrome : protein metabolite hypothesis in the progression of chronic renal failure. Seminars in Nephrology, 16; 167, 1996.
 - 12) Mabuchi H, Nakanishi H: Isolation and characterization of an endogenous drug-binding inhibitor present in uremic serum. Nephron, 44 ; 277, 1986.
 - 13) 本田義輝, 中野真汎: 球形吸着炭 (クレメジン原体) の吸着特性に関する検討. 病院薬学, 23(3); 219, 1997.
 - 14) Huang ZH, Murakami T, Takano M : Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure. Europ J Pharmacol, 406; 453, 2000.
 - 15) Liponi DF, Winter ME, Thzer TN: Renal function and therapeutic concentration of phenytoin. Neurology, 34; 395, 1984.