慢性腎不全患者における蛋白結合性尿毒症毒素としてのインドキシル硫酸とフランカルボン酸の continuous ambulatory peritoneal dialysis による除去

丹羽 利充 矢澤 智子 前田 憲志 浅田 博章*

名古屋大学分院内科 県立多治見病院内科*

(平成1年3月8日受付)

key words : CAPD, indoxyl sulfate, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, uremia

〈要旨〉

蛋白結合性尿毒症毒素としてのインドキシル硫酸とフランカルボン酸（3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸）の測定法を確立し，continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) を受けている慢性腎不全患者と慢性血液透析患者における血中濃度を測定し，いずれの血液浄化法がこれらの除去に有効か検討した。

CAPD 患者 20 名ならびに平均透析年数がほぼ同じ慢性血液透析患者 23 名を対象として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて血清中および CAPD 排液中のインドキシル硫酸とフランカルボン酸を定量した。

CAPD 患者においては血清インドキシル硫酸とフランカルボン酸濃度は，それぞれ 2.03 ± 1.22 (mean $\pm$ SD) mg/dl, 1.31 ± 0.69 (mean $\pm$ SD) mg/dl で，それぞれ正常者の約 40 倍，約 4 倍に増加していた。CAPD 排液中へのインドキシル硫酸とフランカルボン酸の除去量はそれぞれ 30.2 ± 39.2 (mean $\pm$ SD) mg/日, 1.13 ± 0.42 (mean $\pm$ SD) mg/日であった。

一方，慢性血液透析患者においては血清インドキシル硫酸とフランカルボン酸濃度は，それぞれ血液透析直前で 2.76 ± 1.65 (mean $\pm$ SD) mg/dl, 4.10 ± 1.83 (mean $\pm$ SD) mg/dl，また血液透析直後でそれぞれ 2.27 ± 1.25 (mean $\pm$ SD) mg/dl, 4.83 ± 2.13 (mean $\pm$ SD) mg/dl と正常者に比較して著明に増加していた。血液透析によるインドキシル硫酸とフランカルボン酸の除去率はそれぞれ 17.8%，-18.0% であり，血液透析ではインドキシル硫酸は少し除去されるが，フランカルボン酸は全く除去されないことが分かった。

以上のように，CAPD 患者においてはフランカルボン酸の血清濃度が血液透析患者に比較し有意に低下していた。これは主として CAPD 排液中へのアルブミンの漏出に伴うフランカルボン酸の除去の結果である。血清インドキシル硫酸濃度に関しては CAPD 患者と血液透析患者において有意差が認められなかった。

Removal of indoxyl sulfate and furancarboxylic acid as protein-bound uremic toxins in patients with chronic renal failure by continuous ambulatory peritoneal dialysis

Toshimitsu Niwa, M. D., Tomoko Yazawa, M. D., Kenji Maeda, M. D., Hiroaki Asada, M. D.*

Department of Internal Medicine, Nagoya University Branch Hospital ; Prefectural Tajimi Hospital*

Indoxyl sulfate and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid (furancarboxylic acid) in serum and equilibrated peritoneal dialysate from 20 uremic patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and 23 uremic patients on maintenance hemodialysis (HD) were analyzed by high-performance liquid chromatography.

Serum levels of indoxyl sulfate and furancarboxylic acid in CAPD patients, 2.03 ± 1.22 (mean $\pm$ SD) mg/dl and 1.31 ± 0.69 (mean $\pm$ SD) mg/dl, respectively, were about 40 and about 4 times as high as in healthy subjects.

The amounts of indoxyl sulfate and furancarboxylic acid removed by CAPD and transferred into the equilibrated

丹羽 利充 名古屋大学分院内科

〒461 名古屋市東区大幸南 1-1-20 (052-723-1111)

peritoneal dialysate were 30.2 ± 39.2 (mean $\pm$ SD) mg/day and 1.13 ± 0.42 (mean $\pm$ SD) mg/day, respectively.

On the other hand serum levels of indoxyl sulfate and furancarboxylic acid in HD patients (pre-HD : 2.76 ± 1.65 (mean $\pm$ SD) mg/dl and 4.10 ± 1.83 (mean $\pm$ SD) mg/dl, respectively, and post-HD : 2.27 ± 1.25 (mean $\pm$ SD) mg/dl and 4.83 ± 2.13 (mean $\pm$ SD) mg/dl, respectively) were markedly higher than those in healthy subjects. Rates of reduction of indoxyl sulfate and furancarboxylic acid were 17.8% and 18.0%, respectively.

These results indicate that the serum level of furancarboxylic acid in CAPD patients was significantly lower than that in HD patients, owing to removal of furancarboxylic acid by CAPD associated with transfer of albumin into the peritoneal dialysate. The serum level of indoxyl sulfate in CAPD patients was not significantly different from that in HD patients.

緒言

血液透析療法が長期に行われるようになり、その結果長期透析の合併症対策が重要な研究課題となっている。長期透析の合併症の一つであるアミロイドーシスの原因としては通常の血液透析により除去されない β_2 -ミクログロブリンの蓄積が明らかにされているが、さらに通常の血液透析によっては除去されにくい蛋白結合物質の蓄積も長期透析の合併症の原因となる可能性がある。筆者ら¹⁻⁴⁾はインドキシル硫酸、ならびに 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸(フランカルボン酸)がアルブミンとそれぞれ 90%, 100% 結合しており、通常の血液透析では除去されにくく、慢性血液透析患者で著明に増加していることを明らかにし、さらにこれらの蛋白結合物質は薬物のアルブミン結合を抑制することを認めた。また、Mabuchi ら⁵⁾はフランカルボン酸が肝臓あるいは尿細管で種々の物質と結合し、その無毒化あるいは転送に関係しているグルタチオン-S-トランスフェラーゼと結合し、その酵素活性を阻害することを報告している。そこで我々は血液透析患者と CAPD 患者の血清中インドキシル硫酸とフランカルボン酸の濃度を比較することによりこれらの蛋白結合性尿毒症毒素の除去にいずれの血液浄化法が有利か検討した。

方法

対象

透析歴が 1.08 ± 0.87 年である CAPD 患者 20 名 (男性 13 名, 女性 7 名) から血清を採取した。このうち 8 名から一日の CAPD 排液を集めた。また、比較の対象として透析年数が 1.06 ± 0.54 年である血液透析患者 23 名から透析前後に血清を採取した。正常者 11 名から血清を採取した。また、正常者 20 名から一日尿を採取した。試料は分析に供するまで -20°C で保存した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

日本分光製の BIP-1 ポンプ, 875-UV 検出器, VL-614 インジェクター, クロマトコーダー-12 を用いた。インドキシル硫酸の測定にはピンカートン internal-surface reversed-phase (ISRP) カラム (150×4.6 mm 内径, 粒子径 $5 \mu\text{m}$) を用い, ISRP ガードカラムを装着した。移

動相は 1 M NaOH により pH 6.5 に調節した 0.1 M KH_2PO_4 /テトラヒドロフラン, (95 : 5, V/V) を用いた。流速は 1 ml/分で、溶出液の UV 検出は 270 nm で行った。総インドキシル硫酸の測定のためには Chromatodisc 13 A フィルター ($0.45 \mu\text{m}$, Biofield Co., 東京) を通した血清あるいは CAPD 排液 $10 \mu\text{l}$ を直接 HPLC に注入した。蛋白結合していない遊離型のインドキシル硫酸の測定には血清あるいは CAPD 排液を CF-25 フィルター (Amicon Co., Lexington, MA) で遠心、濾過し、除蛋白された濾液を Chromatodisc 13 A に通し、その $10 \mu\text{l}$ を HPLC に注入した。

フランカルボン酸の測定には Nucleosil 5-C 18 カラム (250×4.6 mm 内径, 粒子径 $5 \mu\text{m}$) を用いた。移動相はアセトニトリル-水-トリフルオロ酢酸 (40 : 60 : 0.08, V/V) を用い、流速は 1 ml/分で、溶出液の UV 検出は 270 nm で行った。総フランカルボン酸の測定のためには Mabuchi ら⁶⁾の方法により血清あるいは CAPD 排液を 100°C で 5 分間加熱し、凝固した血清蛋白を遠心除去後、その上清をミリポアフィルターにより濾過し、その $10 \mu\text{l}$ を HPLC に注入した。蛋白結合していない遊離型のフランカルボン酸の測定には血清あるいは CAPD 排液を CF-25 フィルターで遠心、濾過し、除蛋白された濾液を Chromatodisc 13 A に通し、その $10 \mu\text{l}$ を HPLC に注入した。

結果

図 1 に CAPD 患者血清と血清濾液、正常者の血清、CAPD 排液、排液濾液中のインドキシル硫酸の HPLC クロマトグラムを示す。CAPD 患者血清のインドキシル硫酸は正常者に比較して約 40 倍と著明に増加しており、また患者血清濾液中のインドキシル硫酸が血清中の約 10% であることから、その蛋白結合率は約 90% であることが分かる。また CAPD 排液中のインドキシル硫酸は UV 検出器の感度を 8 倍に高くして検出されたが、その蛋白結合率は 10% 以下であった。

図 2 に CAPD 患者血清と血清濾液、正常者の血清、CAPD 排液、排液濾液中のフランカルボン酸の HPLC クロマトグラムを示す。CAPD 患者血清と血清濾液、正

表 1 CAPD 患者と HD 患者における血清中インドキシル硫酸濃度とフランカルボン酸濃度の比較

	正常 (mg/dl) (mean±SD, n=11)	CAPD (mg/dl) (mean±SD, n=20)	HD (mg/dl, mean±SD, n=23) 透析前	透析後
インドキシル硫酸 (蛋白結合率, %)	0.05±0.027 (90)	2.03±1.22 (89.9)	2.76±1.65 (88.9)	2.27±1.25 (83.3)
3-カルボキシ-4- メチル-5-プロピル- 2-フランプロピオン酸 (蛋白結合率, %)	0.36±0.24 (100)	1.31±0.69** (100)	4.10±1.83 (100)	4.83±2.13 (100)
クレアチニン	<1.5	10.8±3.7	11.6±2.1	5.0±1.3

** p<0.01 HD 患者の透析前血清濃度と比較して

図 1 インドキシル硫酸 (A), CAPD 患者血清 (B), CAPD 患者血清濾液 (C), 正常血清 (D), CAPD 排液 (E), CAPD 排液濾液 (F) の HPLC クロマトグラム

常者の血清, CAPD 排液, 排液濾液中のフランカルボン酸の HPLC クロマトグラムを示す。CAPD 患者血清中のフランカルボン酸は正常者に比較して約 4 倍に増加していた。CAPD 患者血清濾液中にはフランカルボン酸が検出されなかったことから, その蛋白結合率は約 100% であることが分かる。CAPD 排液中のフランカルボン酸は非常に微量のため UV 検出器の感度を 80 倍に高くして検出されたが, その蛋白結合率は約 60% であった。

表 1 に CAPD 患者と血液透析患者におけるインドキ

図 2 フランカルボン酸 (A), CAPD 患者血清 (B), CAPD 患者血清濾液 (C), 正常血清 (D), CAPD 排液 (E), CAPD 排液濾液 (F) の HPLC クロマトグラム

シル硫酸とフランカルボン酸の血清濃度の比較を示した。血清中インドキシル硫酸濃度は CAPD 患者で平均 2.03 mg/dl と血液透析患者の透析前 2.76 mg/dl に比較して有意差を示さなかった。血液透析によるインドキシル硫酸 (分子量 213) の平均除去率は 17.8% と, クレアチニンの平均除去率 56.9% に比較して低値を示した。これは血清中のインドキシル硫酸の約 90% が蛋白 (アルブミン) と結合しておりその透析性が低い結果である。一方, 血清中フランカルボン酸濃度は CAPD 患者において 1.31 mg/dl と血液透析患者の透析前 4.1 mg/dl に比較して有意に低値を示した。しかし CAPD 患者においても

表 2 CAPD によるインドキシル硫酸，フランカルボン酸およびアルブミンの除去量

	CAPD による除去量 (mg/day, mean±SD, n=8)	蛋白結合率 (%, mean±SD, n=8)
インドキシル硫酸	30.2±39.2	7.4±7.9
3-カルボキシ-4-メチル-5- プロピル-2-フランプロピオン酸	1.13±0.42	55.2±9.3
アルブミン	2,820±580	

正常者の 0.36 mg/dl に比較して約 4 倍に増加していた。血液透析によるフランカルボン酸の除去率は -18% と全く血液透析により除去されなかった。これは血清中のフランカルボン酸がほぼ 100% 蛋白 (アルブミン) と結合しており、透析中の除水により蛋白が濃縮され、その結果透析後のフランカルボン酸の血清濃度が高くなったものである。

表 2 に CAPD によるインドキシル硫酸とフランカルボン酸の一日当りの除去量を示す。インドキシル硫酸は CAPD により一日約 30 mg 除去され、その蛋白結合率は約 7% であった。一方、フランカルボン酸は CAPD により一日約 1.1 mg 除去され、その蛋白結合率は約 55% であった。CAPD 排液中へのアルブミンの漏出は一日約 2800 mg であった。

正常者においてインドキシル硫酸は一日 61.8 ± 22.8 mg (n=20) が尿中に排泄され、フランカルボン酸は一日 1.24 ± 0.48 mg が尿中に排泄されていた。

考察

インドキシル硫酸はトリプトファンの代謝産物であり、その生成経路は腸管内でトリプトファンが腸内細菌によりインドールに代謝され、さらにインドールは腸管から吸収され肝臓において硫酸抱合されインドキシル硫酸が生成する。正常者では生成したインドキシル硫酸は尿中に排泄される。事実、正常者の一日尿中インドキシル硫酸の排泄量は約 60 mg であった。慢性腎不全となると尿中へのインドキシル硫酸の排泄が低下し血中に蓄積することになる。

慢性腎不全患者血中で蓄積したインドキシル硫酸はアルブミンと約 90% 結合しており、その結果種々の薬物のアルブミン結合を抑制し^{4,7)}、遊離型薬物の血中濃度を増加させ、薬物の副作用を発現し易くさせる。インドキシル硫酸のアルブミン結合部位は主としてインドールベンゾジアゼピン結合部位とされているが、さらにワルファリン結合部位にもある程度結合するものと考えられている⁸⁾。また、インドキシル硫酸は分子量が 213 と低分子であるにもかかわらず蛋白結合しているため、その透析性は低く、通常の血液透析では除去率が約 18% と除去され

にくい。しかし、インドキシル硫酸のアルブミンとの結合力は、フランカルボン酸のアルブミン結合力より弱く血液透析あるいは CAPD によりある程度除去されるため、CAPD 患者と血液透析患者で血清インドキシル硫酸濃度において有意差が認められない結果となったものと思われる。このことは CAPD 排液中にインドキシル硫酸がほとんど遊離型で一日約 30 mg 排泄されていることから理解される。また、インドキシル硫酸の除去には蛋白漏出膜を用いた血液濾過法あるいは血液濾過透析法が有効であるとの報告がある⁹⁾。

フランカルボン酸の生成経路はいまだ不明であるが、正常者では尿中に一日約 1.2 mg 排泄されていることが明らかになった。慢性腎不全患者では尿中にフランカルボン酸が排泄されないために血中に蓄積することになる。血中に蓄積したフランカルボン酸はアルブミンとの結合力が非常に強くほとんど 100% がアルブミンと結合しており、通常の血液透析によってはほとんど除去されない。その結果、種々の薬物のアルブミン結合を抑制し^{2,6,10)}、遊離型薬物濃度を増加させ薬物の副作用を発現させ易くしている。フランカルボン酸のアルブミン結合部位はワルファリン結合部位とされている⁸⁾。

フランカルボン酸は肝臓あるいは尿細管の細胞内に存在するグルタチオン-S-トランスフェラーゼと結合し、その酵素活性を抑制することが報告されている⁵⁾。この酵素は求電子性薬物、発癌性物質、代謝物などの幅広い基質とグルタチオンの反応を触媒し、これらを還元して無毒化している¹¹⁾。また、この酵素はビリルビンなどの種々の脂溶性化合物と結合し肝細胞あるいは尿細管細胞における有機陰イオンの輸送に関係していると考えられている¹¹⁾。慢性腎不全患者ではフランカルボン酸の血中濃度が増加しており、肝臓におけるグルタチオン-S-トランスフェラーゼと結合し、その酵素活性を抑制し、その結果、種々の毒性化合物の肝臓による無毒化作用を阻害している可能性が考えられる。

CAPD 患者では血液透析患者に比較して血清フランカルボン酸濃度が有意に低下しており、これは主として CAPD 排液中に漏出するアルブミンに結合してフラン

カルボン酸が除去される結果である。

結論

CAPD 患者と血液透析患者において蛋白結合型尿毒症毒素であるインドキシル硫酸およびフランカルボン酸の血清濃度を比較したところ、インドキシル硫酸濃度は両者に有意差を認めなかったが、フランカルボン酸濃度は CAPD 患者において血液透析患者に比較して有意に低値を示した。これは CAPD に付随するアルブミンの漏出に伴うフランカルボン酸の除去の結果と考えられた。

文献

- 1) Takeda N, Niwa T, Tatematsu A, Suzuki M : Identification and quantification of a protein-bound ligand in uremic plasma. Clin Chem 33 : 682-685, 1987
- 2) Niwa T, Takeda N, Maeda K, Shibata M, Tatematsu A : Accumulation of furancarboxylic acids in uremic serum as inhibitors of drug binding. Clin Chim Acta 173 : 127-138, 1988
- 3) Takeda N, Niwa T, Maeda K, Shibata M, Tatematsu A : Rapid assay for indoxyl sulphate in uremic serum by internal-surface reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 431 : 418-423, 1988
- 4) Niwa T, Takeda N, Tatematsu A, Maeda K : Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography. Clin Chem 34 : 2264-2267, 1988
- 5) Mabuchi H, Nakahashi H : Inhibition of hepatic glutathione S-transferase by a major endogenous ligand substance present in uremic serum. Nephron 49 : 281-283, 1988
- 6) Mabuchi H, Nakahashi H : Isolation and characterization of an endogenous drug-binding inhibitor present in uremic serum. Nephron 44 : 277-281, 1986
- 7) Gulyassy PF, Jarrard E, Stanfel LA : Contribution of hippurate, indoxyl sulfate, and o-hydroxy-hippurate to impaired ligand binding by plasma in azotemic humans. Biochem Pharmacol 36 : 4215-4220, 1987
- 8) Mabuchi H, Nakahashi H : Displacement by anionic drugs of endogenous ligands bound to albumin in uremic serum. Ther Drug Monit 10 : 261-264, 1988
- 9) 佐中 孜, 川島洋一郎, 田中好子, 杉野信博 : 長期血液透析中の慢性腎不全患者における蛋白結合性尿毒症毒素としてのインドキシサルフェイトならびに馬尿酸の液体クロマトグラフィーによる分析. 透析会誌 22 : 71-75, 1989
- 10) Collier R, Lindup WE : Drug binding defect of uraemic plasma : Inhibitory effect of furanoid acids. Br J Clin Pharmacol 23 : 650-651, 1987
- 11) Kaplowitz N : Physiological significance of glutathione-S-transferases. Am J Physiol 239 : G 439-G 444, 1980