原 著

慢性腎不全血清中のアルブミン結合物質の分析

馬淵 非砂夫 丸山 圭史 垣内 孟 青木 正*

中橋 弥光*

西陣病院内科 同泌尿器科*

key words : endogenous ligand, uremic toxin, drug-binding inhibitor

〈要旨〉

酸性および中性薬物の血清蛋白への結合能が低下する現象は、慢性腎不全 (CRF) において広く認められている。私共は、3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) が、CRF 血清中の主要な内因性蛋白結合物質であり、薬物の蛋白結合阻害物質であると報告してきた。しかしながら、CRF で認められる低アルブミン血症を考慮にいれても、CMPF 単独では、CRF で観察されるのと同程度のフェニトインの蛋白結合低下は *in vitro* で再現できず、他の因子の関与が推測される。そこで今回、正常および CRF 血清よりリン酸緩衝液、pH 7.4 を溶離液として用いる条件下でアルブミンを分離し、それに結合しているアルブミン結合物質の分析を試みた。その結果、アルブミンに結合している主要な強い結合物質は、artifact と考えられるものを除くと、CMPF のみであった。このことより、アルブミンへの親和性の比較的小さい薬物の血清蛋白結合阻害には、インドキシル硫酸のような、弱い結合物質もある程度関与しているものと考えられた。

Analysis of albumin-binding substances retained in chronic renal failure

Hisao Mabuchi, Yoshifumi Maruyama, Takeshi Kakiuchi, Tadashi Aoki*, Hisamitsu Nakahashi*

Department of Internal Medicine and Department of Urology*, Nishijin Hospital

The decreased binding of anionic drugs to serum protein in chronic renal failure (CRF) is now well documented. We previously reported that 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) is a major endogenous protein binding substance and a drug-binding inhibitor retained in CRF serum. CMPF inhibits phenytoin and dyes binding to serum protein and serum albumin at the concentrations usually observed in CRF serum. Taking into consideration the hypoalbuminemia usually observed in CRF however, CMPF does not entirely account for the impaired phenytoin binding found in CRF serum. This observation suggests the presence of other drug-binding inhibitors, not yet identified, in CRF serum. In this study, we separated serum albumin from normal and CRF sera by fast protein liquid chromatography (FPLC) and ligand affinity chromatography (LAC) using phosphate buffer, pH 7.4, as an eluent, and analyzed the albumin-binding ligands by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC peak having the highest UV absorbance was only CMPF in both samples obtained from FPLC and LAC. Weak albumin-binding substances such as an indoxyl sulfate were not detected. These results indicate that the only major potent albumin-binding substance may be CMPF and that retention of other potent binding substances is scarce in CRF serum. These observations suggest that the weak binding substances retained in CRF serum contribute to a certain extent to the inhibition of protein binding observed for some drugs in CRF.

緒言

血清アルブミンは、酸性および中性薬物の血液中での carrier protein であることが知られている。そして一般

的に、これらの薬物の薬理作用は血清アルブミンに結合していない部分、すなわちフリー分画が receptor に結合することで発揮される。それ故、薬理作用はフリー分画

馬淵非砂夫 西陣病院内科 〒602 京都市上京区五辻通六軒町西入溝前町 1035 (075-461-8800)

〔受付：平成2年11月22日，受理：平成2年12月26日〕

表 1 Fast protein liquid chromatography

Column : Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia)
 Elution buffer : 1/15 M phosphate buffer, pH 7.4
 Flow-rate : 0.3 ml/min
 Detection : UV 280 nm, 0.64 AUFS
 Sample : 4-fold diluted serum, 200 μ l

の程度に依存していると考えられている。

慢性腎不全 (CRF) では、これらの薬物と血清アルブミンとの結合が低下する現象、すなわちフリー分画の増加が観察されているが¹⁻³⁾、このことは therapeutic range の血中薬物濃度であっても、CRF においては副作用発現の可能性があることを示唆し、臨床上重要な現象と考えられる。これまでの研究で、この現象は腎不全血清中に蓄積した内因性蛋白結合物質が、アルブミン薬物結合部位で薬物の結合を競合的に阻害するためと考えられている³⁾。種々の内因性物質が蛋白結合阻害物質として報告⁴⁻⁷⁾されているが、CRF 血清中に存在する濃度で結合阻害作用が証明されているのは、私共の報告したフラン環化合物、3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) のみである^{8,9)}。しかしながら、CMPF 単独では、CRF 血清中で観察されるのと同程度の phenytoin 結合低下を in vitro で再現することはできない。このことから、CRF 血清中には CMPF 以外の蛋白結合阻害物質の蓄積が推定された¹⁰⁾。そこで今回私共は、CRF 血清からリン酸緩衝液、pH 7.4 を溶離液として用いる条件下で血清アルブミンを分離し、それに結合している物質を高速液体クロマト法 (HPLC) にて分析し、CMPF 以外の強い蛋白結合物質の有無について検討したので報告する。

対象および方法

血清アルブミンは、薬物の投与を受けていない、5 症例の慢性透析患者と 3 例の健常人の血清より分離した。

アルブミンは、superose 12HR10/30 column (Pharmacia) を用いる fast protein liquid chromatography と、アルブミンに特異性を有する色素である Cibacron blueF3GA を結合したゲル、AF-blue Toyopearl MH (Tosoh) を用いる ligand affinity chromatography の 2 方法で分離した (表 1, 2)。

これらの方法で分離したアルブミンは、トリフルオロ酢酸を終濃度が 15% (V/V) になるよう加え、結合物質を遊離させた後除去し、そして上清を Sep-pak C₁₈ にアプライし、10 ml の蒸留水で洗浄後、3 ml のエタノールで溶出した。

分離したアルブミン結合物質は、すでに報告した逆相 HPLC 法¹⁰⁾にて分析した。HPLC ピークの UV スペク

表 2 Ligand affinity chromatography

Column : AF-Blue Toyopearl MH (0.82×10 cm)
 Binding buffer (A) : 1/15 M phosphate buffer, pH 7.4
 Eluting buffer (B) : 1/15 M phosphate buffer, pH 7.4
 +2 M KCl
 Flow-rate : 1.5 ml/min
 Detection : UV 280 nm, 1.24 AUFS
 Sample : Serum, 1 ml

トルは、SPD-M1A photodiode array UV-VIS spectrophotometer (島津) を用いて on-line で記録した。

結果

図 1, 2 にそれぞれ fast protein liquid chromatography, ligand affinity chromatography による、正常および透析患者血清からのアルブミン分離のクロマトグラムを示す。アルブミン分画を分取し、アルブミン結合物質を逆相 HPLC にて分析したが、図 3 に fast protein liquid chromatography, 図 4 に ligand affinity chromatography にて得たサンプルのクロマトグラムを示す。各々の CRF サンプルのクロマトグラムで、最も強い UV 吸収を呈するピークは、保持時間と UV スペクトル (data not shown) より CMPF と同定されたが、弱い結合物質である、インドキシル硫酸、馬尿酸、インドール酢酸などに相当するピークは検出されなかった。また、図 4 の正常および CRF サンプルで認められる、保持時間約 24 分のピークは artifact と考えられた。いずれの方法で分離された CRF 血清のサンプルも、逆相 HPLC 法にて、CMPF の近傍に有意なピークを検出したが、同定はできなかった。

考察

CMPF は CRF 血清中に認められる濃度で、in vitro や薬物や色素の血清アルブミンへの結合を阻害し、血液透析では除去されず、hemoperfusion や plasmapheresis でしか除去されない強い蛋白結合物質である^{8,9,11,12)}。しかしながら、CRF 血清で認められる phenytoin の結合低下は、CRF において一般的に観察される低アルブミン血症を考慮にいれても、CMPF 単独では説明できず、他の因子の関与が推測される⁹⁾。また、Gulyassy ら¹³⁾は、正常血漿へ馬尿酸とインドキシル硫酸を単独あるいは共に加えても、尿毒症血漿で観察される、サリチル酸の血漿蛋白結合低下の 15% 程度しか説明できないと報告し、他の結合阻害物質の存在を示唆している。そこで、現在までに検出されていない、CMPF に匹敵する強い結合物質の存在の可能性について今回検討した。

今回用いたアルブミン分離法は、溶離液にリン酸緩衝液、pH 7.4 を用いる温和な条件下であるが、弱い結合物

図1 Typical chromatograms of fast protein liquid chromatography. Albumin fractions collected as marked.

図2 Typical chromatograms of ligand affinity chromatography. Albumin fractions collected as marked.

質であるインドキシル硫酸や馬尿酸などが検出されなかったのは、分離操作がアルブミンの結合能に影響を与えている可能性を否定できない。殊に ligand affinity chromatography では、溶離液に 2M KCl を添加しているので、血清中に比して高いイオン強度となっている。しかし CMPF が検出されたことから、CMPF に匹敵する強い結合物質は操作中に失われず、検出され得ると推測される。このことより、CRF サンプルで検出したピークは強いアルブミン結合物質と推測されるが、CMPF とその近傍に溶出するピーク以外は、極めて微量しか蓄積していないものと推測された。また、CMPF 近傍に溶出するピークも、CRF 血清のエタノール除蛋白上清を直接、逆相 HPLC 法で分析¹⁰⁾しても検出されず、artifact のピークである可能性が高い。CMPF は、いずれのアルブミン分離法にても dominant なピークとして検出されることより、アルブミンへの親和性が最も強く、かつ CRF 血清中に蓄積する、主要な強い結合阻害物質と考え

られた。

私共は、血清アルブミンを ligand とする、high-performance affinity chromatography にて、CRF 血清中に蓄積するアルブミン結合物質を分離し、今回と同じ逆相 HPLC 法にて分析したが、その際には CMPF 以外の dominant なピークを検出した¹⁰⁾。しかしそのピークは、今回の CMPF 近傍に溶出するピークと同様に、除蛋白血清サンプルの直接分析の結果からは有意なピークとは考えがたく、そのピークの意義についても不明である。

以上のことより、今回の方法にて検出されない比較的アルブミンに強い親和性を有する結合物質の存在を完全には否定できないが、腎不全血清中で観察される薬物結合阻害には、CMPF を中心とし、それ以外は微量にしか蓄積していない強い結合物質のみでなく、インドキシル硫酸を代表とする弱い結合物質も関与している可能性が推測される。無論、個々の薬物のアルブミンへの親和性の強弱に、これらの内因性結合物質の関与は依存してい

図 3 Reversed-phase HPLC of samples obtained from fast protein liquid chromatography. Arrows indicate the elution position of authentic CMPF.

図 4 Reversed-phase HPLC of samples obtained from ligand affinity chromatography. Arrows indicate the elution position of authentic CMPF.

るものと考えられる。

薬物を CRF 血清へ添加することにより、内因性蛋白結合物質のアルブミン結合能を低下せしめることは可能¹⁴⁾であり、diazepam はインドキシル硫酸、インドール酢酸、馬尿酸の結合を阻害し、warfarin はこれらに加えて、CMPF の結合も阻害する。CMPF は、warfarin のアルブミンへの結合を阻害¹⁵⁾することから、このような薬物と内因性蛋白結合物質との相互作用が、CRF において認められる、薬物の血清蛋白への結合が低下する現象の機序ではないかと推測される。

CMPF を中心とする強い結合物質と弱い結合物質との、個々の薬物の結合阻害現象における synergism については、今後検討の予定である。

結語

1. リン酸緩衝液、pH 7.4 を溶離液として用いる fast protein liquid chromatography, ligand affinity chromatography で分離した腎不全血清中のアルブミン

に結合している主要な強い結合物質はフラン環化合物のみであり、他の強い結合物質の蓄積は微量と考えられた。

2. 以上のことより、薬物によってはインドキシル硫酸などの弱い結合物質も、腎不全血清中で認められる、薬物の血清蛋白結合低下に関与している可能性が推測された。

本論文の要旨は第 35 回日本透析療法学会総会(横浜, 1990 年 7 月)において発表した。

文献

- 1) Reidenberg MM, Odar-Cederlöf I, vonBahr C, Borga O, Sjöquist F: Protein binding of diphenylhydantoin and desmethylinipramine in plasma from patients with poor renal function. N Engl J Med 285: 264-267, 1971
- 2) Reidenberg MM: The binding of drugs to plasma

- proteins and the interpretation of measurements of plasma concentrations of drugs in patients with poor renal function. *Am J Med* 62 : 466-470, 1977
- 3) Gulyassy PF, Depner TA : Impaired binding of drugs and endogenous ligands in renal diseases. *Am J Kidney Dis* 2 : 578-601, 1983
- 4) Bowmer CJ, Lindup WE : Decreased drug binding in uraemia : Effect of indoxylsulphate and other endogenous substances on the binding of drugs and dyes to human albumin. *Biochem Pharmacol* 31 : 319-323, 1982
- 5) Lichtenwalner DM, Suh B, Lichtenwalner MR : Isolation and chemical characterization of 2-hydroxybenzoylglycine as a drug binding inhibitor in uremia. *J Clin Invest* 71 : 1289-1296, 1983
- 6) Ikeda K, Yoshitomi H, Nakayama T, Goto S, Kimura T : Plasma protein binding of frusemide in renal failure rabbits : Investigation of endogenous protein binding inhibitors. *J Pharm Pharmacol* 36 : 663-667, 1984
- 7) Gulyassy PF, Bottini AT, Stanfel LA, Jarrard EA, Depner TA : Isolation and chemical identification of inhibitors of plasma ligand binding. *Kidney Int* 30 : 391-398, 1986
- 8) Mabuchi H, Nakahashi H : Isolation and characterization of an endogenous drug-binding inhibitor present in uremic serum. *Nephron* 44 : 277-281, 1986
- 9) Mabuchi H, Nakahashi H : A major inhibitor of phenytoin binding to serum protein in uremia. *Nephron* 48 : 310-314, 1988
- 10) Mabuchi H, Nakahashi H : Separation of albumin-binding ligands present in uremic serum by high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr* 529 : 424-430, 1990
- 11) Mabuchi H, Nakahashi H : Determination of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, a major endogenous ligand substance in uremic serum, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr* 415 : 110-117, 1987
- 12) Mabuchi H, Nakahashi H : A major endogenous ligand substance involved in renal failure. *Nephron* 49 : 277-280, 1988
- 13) Gulyassy PF, Jarrard EA, Stanfel LA : Contribution of hippurate, indoxyl sulfate, and o-hydroxyhippurate to impaired ligand binding by plasma in azotemic humans. *Biochem Pharmacol* 24 : 4215-4220, 1987
- 14) Mabuchi H, Nakahashi H : Displacement by anionic drugs of endogenous ligands bound to albumin in uremic serum. *Ther Drug Monit* 10 : 261-264, 1988
- 15) 馬淵非砂夫, 青木 正, 垣内 孟, 中橋弥光 : 慢性腎不全血清中の内因性蛋白結合物質に関する研究. *日腎誌* 31 : 563-564, 1989