慢性腎不全における Ketoprofen の立体選択的蛋白結合 : 透析の影響

今 村 均 青 木 淳 子* 嶋 田 英 剛* 末 永 綾 香
 小田切 優樹 原 田 久美子 杉 井 篤
 熊本大学薬学部 嶋田病院*

key words : renal disease, hemodialysis, stereoselective protein binding of ketoprofen, fatty acid, mercaptalbumin

〈要旨〉

非ステロイド系抗炎症薬である Ketoprofen の立体選択的蛋白結合性を尿毒症血清について検討したところ、血液透析の前後で立体選択的蛋白結合性に著しい変化が観察された。そこで、それらの変動要因を明らかにするため、透析後に急激に増える血中脂肪酸およびヒト血清アルブミン (HSA) 中のメルカプトアルブミン (HMA) およびノンメルカプトアルブミン (HNA) に着目して、Ketoprofen の立体選択的蛋白結合性に及ぼすこれらの影響について検討した。その結果、遊離 Ketoprofen の R 体と S 体の割合 $[(F_R/F_S) \text{ ratio}]$ と血清中の遊離脂肪酸濃度との間に良好な負の相関性が認められた。この結果は、血清中の遊離脂肪酸が異常に増加したことにより、HSA のコンホメーション変化が惹起されたことによるものと考えられる。さらに、メルカプトアルブミン分率 $[f_{HMA} = HMA / (HMA + HNA)]$ と立体選択的蛋白結合性 $[(F_R/F_S) \text{ ratio}]$ との間にも良好な負の相関性が認められた。これは、HMA と HNA に対する Ketoprofen の結合能の差異に起因するものと推察される。

以上のように、Ketoprofen の立体選択的蛋白結合性の変動は、HSA への遊離脂肪酸の結合あるいはメルカプトアルブミン分率の増大に伴う HSA のコンホメーション変化などに基づくことが示唆された。これらの知見は、透析後において活性体 S(+)-Ketoprofen の遊離濃度が R(-) 体のそれより著しく増加することを示しており、慢性腎不全患者における薬物療法を考える上で有用な基礎資料になるものと思われる。

Stereoselective protein binding of ketoprofen in uremic serum : Effects of hemodialysis

Hitoshi Imamura, Junko Aoki*, Hidekata Shimada*, Ayaka Suenaga, Masaki Otagiri, Kumiko Harada, Atsushi Sugii

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University ; Shimada Hospital*

The stereoselective protein binding of ketoprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, was studied in uremic serum. Marked changes in isomer binding to protein were observed before and after hemodialysis. In order to clarify the factors involved in this variation, we investigated the effects of human mercaptalbumin (HMA) and free fatty acid (FFA) on stereoselective protein binding, since HMA and FFA rapidly increase after hemodialysis. There was a fairly strong negative correlation ($r = -0.62$) between the unbound (R)/(S)-ketoprofen ratio (F_R/F_S ratio) and the FFA concentration in serum. This finding can be explained by the conformational change in HSA induced by FFA. A strong negative correlation ($r = -0.75$) was also found between the F_R/F_S ratio and the fraction of human mercaptalbumin (f_{HMA}), which shows the different binding affinities of ketoprofen to HMA and HNA, respectively.

We conclude that the stereoselective protein binding of ketoprofen varies on the basis of conformational change in HSA induced by FFA, or an increase in f_{HMA} . These data imply that the free concentration of active S(+)-ketoprofen increases more markedly than does R(-)-ketoprofen after hemodialysis. Accordingly, these findings

should be useful in drug therapy of renal disease patients.

緒言

近年、医薬品の安全性と有効性を高めるため、ラセミ型薬物の生体内挙動が検討されつつあり、光学異性体の吸収、代謝、排泄ならびに分布が相互に異なることが指摘されている¹⁾。なかでも、酸性薬物は結合蛋白質である血清アルブミンと、比較的高い立体選択的蛋白結合性を示すことが知られている。たとえば、イブプロフェンでは、活性体S(+)よりR(-)体の方が血清アルブミンと強く結合することが知られている²⁾。

慢性腎不全では、結合蛋白量の減少と蛋白結合能の低下がみられる。腎不全では、特に代謝性アシドーシスの状態にあるために、酸性薬物の蛋白結合能が低下して、遊離薬物濃度の増加を惹起することが予測される^{3,4)}。このため、薬物の体内動態は透析治療の前後で大きく変わることが予想される。

このような観点から、今回我々は、腎不全血液透析患者と健常人における薬物の血清蛋白結合性について比較し、さらに、血清蛋白結合の変動要因について検討した。なお、対象薬物として分子内に不斉炭素有する非ステロイド系抗炎症薬である Ketoprofen を選択した(図1)。

対象と方法

嶋田病院に入院中の腎不全以外の合併症を有していない血液透析患者20名ならびに健常人20名を対象とした。性別は、慢性腎不全患者が男16名(54.4±13.3歳, mean±SD), 女4名(40.8±9.0歳, mean±SD)であり、健常人が男17名(23.0±2.0歳, mean±SD), 女3名(22.0±1.2歳, mean±SD)であった。血清蛋白結合率は、限外濾過法(セントリフリー：アミコン社製)により算出した。また遊離 Ketoprofen 濃度は光学異性体分離カラム(キラルセル OJ：ダイセル社製)を用いて HPLC にて分離定量した。なお Ketoprofen はキッセイ薬品工業より恵与されたものを用いた。

HSA 中のメルカプトアルブミン(HMA)およびノンメルカプトアルブミン(HNA)の分離分析は、杉井らの方法⁵⁾により、4-ビニルピリジウム樹脂カラムを用いて HPLC で分離定量し、HSA 中の HMA の割合をメルカプトアルブミン分率($f_{\text{HMA}} = \text{HMA}(\%) / (\text{HMA}(\%) + \text{HNA}(\%))$)として表した。

結果

1. 健常人と慢性腎不全患者(透析前後)の臨床的所見
対象とした健常人ならびに慢性腎不全患者の透析前後における臨床的所見を表1に示す。腎機能の指標となる血中尿素窒素値(BUN)、クレアチニン値(Cr)および

図1 Chemical formula of ketoprofen

尿酸値(UA)は、透析前の方が健常人ならびに透析後に比べて有意に高値であった($P < 0.001$)。また、HSA およびメルカプトアルブミン分率は、透析前で低値を示し、透析により健常人に近い値に回復した。遊離脂肪酸(FFA)は、透析後の方が透析前ならびに健常人に比べて有意に高値であった($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

2. 健常人と慢性腎不全患者(透析前後)における Ketoprofen の血清蛋白結合性

Ketoprofen の血清蛋白結合率は、健常人で $99.4 \pm 0.1\%$ を示し、慢性腎不全患者で有意な結合率の低下が観察された($P < 0.001$, 図2)。また、血清蛋白結合率と FFA との間に良好な負の相関性($r = -0.72$)が認められた(図3)。

Ketoprofen の立体選択的蛋白結合性((F_R/F_S) ratio)は、健常人ならびに透析前では認められなかったが、透析後に有意に減少した($P < 0.01$, 図4)。また、立体選択的蛋白結合性と FFA ($r = -0.62$)(図5A)、メルカプトアルブミン分率($r = -0.75$)(図5B)との間に良好な負の相関性が観察された(図5)。さらに、立体選択的蛋白結合性を従属変数、FFA およびメルカプトアルブミン分率を独立変数として重回帰分析を行った結果、表2に示すように FFA とメルカプトアルブミン分率を組み合わせることで相関係数が改善された。

データには示さなかったが、Ketoprofen の血清蛋白結合性と BUN, Cr, UA, コレステロール, ビリルビンおよび pH などとの間には相関性を見出すことができなかった。

考察

Ketoprofen の血清蛋白結合率は、HSA 濃度の減少を反映して透析患者において有意に減少した。しかしながら、透析後において HSA 濃度は健常人に近い値に回復しているにもかかわらず、結合率が回復していないことがわかった(表1, 図2)。これは、透析の際へパリンを投与することにより、透析後に異常に増加した遊離脂肪酸が、アルブミンに対し Ketoprofen と競合的に結合す

表 1 Biochemical data of normal volunteers and renal disease patients

	Normal (a)	Before HD (b)	After HD (c)	Statistics
BUN	16.7±1.7	64.8±3.7	19.2±1.90	(a) vs (b); $P < 0.001$, (b) vs (c); $P < 0.001$ (a) vs (c); NS
Cr	1.15±0.03	11.4±0.86	4.96±0.38	(a) vs (b); $P < 0.001$, (b) vs (c); $P < 0.001$ (a) vs (c); $P < 0.001$
UA	5.41±0.33	8.46±0.60	2.45±0.16	(a) vs (b); $P < 0.01$, (b) vs (c); $P < 0.001$ (a) vs (c); $P < 0.001$
TP	7.83±0.10	7.06±0.08	9.48±0.25	(a) vs (b); $P < 0.001$, (b) vs (c); $P < 0.001$ (a) vs (c); $P < 0.001$
TC	175±6	182±6	247±9	(a) vs (b); NS, (b) vs (c); $P < 0.001$ (a) vs (c); $P < 0.01$
FFA	0.39±0.05	0.64±0.10	1.73±0.29	(a) vs (b); NS, (b) vs (c); $P < 0.01$ (a) vs (c); $P < 0.001$
Bil	1.83±0.17	1.61±0.18	1.72±0.17	(a) vs (b); NS, (b) vs (c); NS (a) vs (c); NS
HSA	5.08±0.05	3.67±0.06	4.96±0.14	(a) vs (b); $P < 0.001$, (b) vs (c); $P < 0.001$ (a) vs (c); NS
f _{HMA}	0.75±0.01	0.48±0.01	0.71±0.01	(a) vs (b); $P < 0.001$, (b) vs (c); $P < 0.001$ (a) vs (c); $P < 0.05$
pH	7.37±0.01	7.36±0.02	7.45±0.02	(a) vs (b); NS, (b) vs (c); $P < 0.05$ (a) vs (c); $P < 0.01$

Each value represents the mean±SE.

Abbreviations: BUN; blood urea nitrogen (mg/dl), Cr; creatinine (mg/dl), UA; uric acid (mg/dl), TP; total protein (g/dl), TC; total cholesterol (mg/dl), FFA; free fatty acid (mEq/dl), Bil; bilirubin (mg/dl), HSA; human serum albumin (g/dl), f_{HMA}=HMA/(HMA+HNA), HD; hemodialysis

図 2 Serum protein binding of ketoprofen in normal volunteers and renal disease patients. Each bar represents the mean±SE.

- a): HSA concn.=5.08±0.05 g/100 ml
b): HSA concn.=3.69±0.06 g/100 ml
c): HSA concn.=4.96±0.14 g/100 ml

図 3 Relationship between the FFA concentration in serum and serum protein binding of ketoprofen

るためと考えられる^{6,7)}。事実、図 3 に示すように血清蛋白結合率と FFA との間に良好な負の相関性が認められた。さらに、遊離脂肪酸が HSA と結合して HSA のコンホメーション変化を惹起することも結合低下の一因と

して考えられる。また、透析により除去されない小分子量の尿毒症物質の関与の可能性⁸⁾も否定できない。いずれにせよ、この機序解明のためにはさらに検討を要する。

Ketoprofen の立体選択的蛋白結合性は、透析後に有意に減少した (図 4)。健康人血清中の HSA の約 75% は Cys-34 に SH 基を持つ HMA、25% はシステインやグルタチオンと S-S 結合を形成した HNA からなっている。

一方、慢性腎不全患者 HSA 中の HMA は、健常人より非常に低く (45%)、逆に HNA は高い値 (55%) を示した。また、メルカプトアルブミン分率 (f_{HMA}) と立体選択的蛋白結合性 [(F_R/F_S) ratio] との間に良好な負の相関性が認められた (図 5 A)。これは、HMA と HNA に対する Ketoprofen の結合能の差異に起因するものと推察される。透析後において観察された立体選択的蛋白結合性は、メルカプトアルブミン分率だけでなく FFA との間にも良好な負の相関性が観察された (図 5 B)。さらに、興味深いことに、立体選択的蛋白結合性を従属変数

に、FFA およびメルカプトアルブミン分率を独立変数として重回帰分析を行った結果、FFA とメルカプトアルブミン分率を組み合わせることによって相関係数が改善された (表 2)。このことは、Ketoprofen の立体選択的蛋白結合性の変動が HSA への FFA の結合あるいはメルカプトアルブミン分率の増大に伴う HSA のコンホメーション変化、または、両者による HSA の質的变化に基づく可能性を示唆するものと考えられる。透析後に Ketoprofen の立体選択的蛋白結合性が変動することは、換言すると、活性体である S(+)-Ketoprofen が R(-) 体のそれより増加することを意味している。また、Ketoprofen は体内で主に肝で代謝され、R(-) 体から S(+) 体への変換が生じる⁹⁾ことなどを考えると、in vivo 実験では、さらに S(+) 体の遊離薬物濃度が増大し、予期せぬ薬効の増強をまねく可能性が十分考えられる。以上のことから、これらの実験結果は、透析を行う際の薬物療法を考える上で重要な基礎データになるものと思われる。

結論

慢性腎不全における Ketoprofen の血清蛋白結合率および立体選択的蛋白結合性の変動は、Ketoprofen の結合

図 4 Effect of dialysis on stereoselective protein binding of ketoprofen. Each bar represents the mean $\pm$ SE. F_R =Free concentration of R-isomer. F_S =Free concentration of S-isomer.

表 2 Regression equations for characterization of stereoselective protein binding of ketoprofen

(1) $\{(F_R/F_S) \text{ Ratio}\} = -0.045 \cdot [\text{FFA}] + 0.86$	($r = -0.62$)
(2) $\{(F_R/F_S) \text{ Ratio}\} = -0.449 \cdot [f_{HMA}] + 0.11$	($r = -0.75$)
(3) $\{(F_R/F_S) \text{ Ratio}\} = -0.045 \cdot [\text{FFA}] - 0.35 \cdot [f_{HMA}] + 0.86$	($r = -0.81$)

図 5 Relationship between stereoselective protein binding of ketoprofen and FFA concentration in serum (A) or mercaptalbumin fraction (f_{HMA}) (B). F_R =Free concentration of R-isomer. F_S =Free concentration of S-isomer. f_{HMA} =HMA/(HMA+HNA).

蛋白質である HSA の量的変化や HSA への FFA の結合あるいはメルカプトアルブミン分率の増大に伴う HSA の質的变化に基づくことが示唆された。これらの知見は、透析後において活性体 S (+)-Ketoprofen の遊離濃度が R (-) 体のそれより著しく増加することを示しており、慢性腎不全時の薬物療法を考えるうえで有用な基礎資料になるものと思われる。

文献

- 1) Jamali F, Mehavar R, Pasutto FM : Enantioselective aspects of drug action and disposition : Therapeutic pitfalls. J Pharm Sci 78 : 695-715, 1989
- 2) Lee EJD, Williams K, Day R, Graham G, Champion D : Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. Br J Clin Pharmacol 19 : 669-674, 1985
- 3) Reidenberg MM, Affrime M : Influence of disease on binding of drugs to plasma protein. Ann N Y Acad Sci 226 : 115-125, 1973
- 4) Sjöholm I, Kober A, Odar-Cederlöf I, Borgå O : Protein binding of drugs in uremic and normal serum : The role of endogenous binding inhibitors. Biochem Pharmacol 25 : 1205-1213, 1976
- 5) Nishimura K, Harada K, Masuda S, Sugii A : High-performance liquid chromatography of serum albumins on an N-methylpyridinium polymer-based column. J Chromatogr 525 : 176-182, 1990
- 6) Naranjo CA, Sellers EM, Khouw V, Alexander P, Fan T, Shaw J : Variability in heparin effect on serum drug binding. Clin Pharmacol Ther 28 : 545-550, 1980
- 7) Brown JE, Kitchell BB, Shand DG : The artificial nature of heparin induced drug protein-binding alteration. Clin Pharmacol Ther 30 : 636-643, 1981
- 8) Gulyassy PF, 佐中 孜 : 尿毒症毒素。腎と透析 23 : 15-19, 1987
- 9) Abas A, Meffin PJ : Enantioselective disposition of 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. IV. Ketoprofen disposition. J Pharmacol Exp Ther 240 : 637-641, 1986