原 著

慢性腎不全患者における calcitriol の血漿蛋白結合に関する研究

黒山 政一 朝長 文弥 熊野 和雄* 酒井 糾*

中山 幸子** 深沢 英雄**

北里大学病院薬剤部 北里大学泌尿器科* 日本ロシュ研究所**

key words : 蛋白結合, ビタミンD₃, calcitriol, 慢性腎不全, 血液透析

〈要旨〉

活性型ビタミンD₃である calcitriol の蛋白結合率を, 健康人および慢性腎不全患者各6名の血清を用いて比較検討した。

薬物濃度 50 pg/ml における calcitriol の蛋白結合率は, 健康人で $97.93 \pm 0.18\%$, 保存期患者で $98.03 \pm 0.25\%$, HD 施行患者で $97.30 \pm 0.19\%$ であった。薬物濃度 200 pg/ml における calcitriol の蛋白結合率は, 健康人で $96.11 \pm 0.56\%$, 保存期患者で $96.28 \pm 0.42\%$, HD 施行患者で $95.11 \pm 0.89\%$ であった。Calcitriol 濃度 200 pg/ml におけるその蛋白結合率は, 50 pg/ml における蛋白結合率より若干低値を示したが, 健康人および保存期, HD 施行の慢性腎不全患者の蛋白結合率は, calcitriol 濃度 50 pg/ml および 200 pg/ml において顕著な差は認められなかった。

血液透析前後における検討において, 薬物濃度 50 pg/ml における calcitriol の蛋白結合率は, 透析開始直前で $97.30 \pm 0.19\%$, 透析終了直後で $97.27 \pm 0.59\%$ で, 薬物濃度 200 pg/ml におけるその蛋白結合率は, 透析開始直前で $95.11 \pm 0.89\%$, 透析終了直後で $95.10 \pm 0.47\%$ で, いずれも有意な差は認められなかった。

通常, 薬物の体内動態の検討に際しては, その蛋白結合率の変動に関しても十分留意する必要がある。しかし, calcitriol の蛋白結合率は健康人および慢性腎不全患者で殆ど変化しないため, 慢性腎不全患者における calcitriol の体内動態の検討に際しては, その蛋白結合率の変動はあまり考慮する必要はなく, 総 calcitriol 濃度を指標とすれば良いと考えられた。

Protein binding of calcitriol in patients with chronic renal failure

Masakazu Kuroyama, Fumiya Tomonaga, Kazuo Kumano*, Tadasu Sakai*, Sachiko Nakayama**, Hideo Fukazawa**

Department of Pharmacy, Kitasato University Hospital ; Department of Urology, Kitasato University School of Medicine* ; Department of Pharmacokinetics and Metabolism, Nippon Roche Research Center**

The protein binding rate of the active vitamine D₃, calcitriol, was evaluated using sera from 6 normal healthy subjects (HS) and 6 patients with chronic renal failure (CRF).

The binding rates of calcitriol at a concentration of 50 pg/ml were $97.93 \pm 0.18\%$, $98.03 \pm 0.25\%$ and $97.30 \pm 0.19\%$ for sera from HS, patients receiving conservative treatment (ND) and those receiving hemodialysis (HD), respectively. The binding rates at a concentration of 200 pg/ml were $96.11 \pm 0.56\%$, $96.28 \pm 0.42\%$ and $95.11 \pm 0.89\%$ for sera from HS, ND and HD patients, respectively. Thus, the protein binding rate of calcitriol was somewhat lower at a concentration of 200 pg/ml than at 50 pg/ml in all subject groups. However, no significant difference was seen in the protein binding rate between the two concentrations in any of the subject groups.

The binding rates of calcitriol at a concentration of 50 pg/ml were $97.30 \pm 0.19\%$ and $97.27 \pm 0.59\%$ for sera before and after HD, respectively. At a concentration of 200 pg/ml, rates were $95.11 \pm 0.89\%$ and $95.10 \pm 0.47\%$ for sera before and after HD, respectively. There were no significant differences among these values.

In evaluating the metabolic fate of drugs, careful consideration should be given to changes in their protein binding rate. However, our results showed little difference in the protein binding rate of calcitriol between HS and

CRF patients, suggesting that the total calcitriol concentration can be used as an indicator in evaluating the disposition of calcitriol in CRF patients, without considering changes in its protein binding rate.

結論

一般に、体内に投与された薬物は、血液中で血漿蛋白と非特異的に結合している“結合型薬物”と、血漿蛋白と結合していない“遊離型薬物”として存在し、両者間に平衡状態が保たれている。

薬物と血漿蛋白との結合性は、薬物の分布・代謝・排泄などの体内動態に大きな影響を与え、血漿蛋白と結合していない遊離型薬物のみが作用を発現することが知られている¹⁻⁴⁾。そのため、薬物の蛋白結合性は、その薬物の薬理作用および副作用の強さと密接な関連を有し、薬物の血漿蛋白との結合性を検討することは、適切な薬物療法を実施する上で重要な課題となっている。特に蛋白結合性の高い薬物では、わずかな蛋白結合率の低下でも、遊離型薬物濃度の上昇が顕著で、思いもよらぬ副作用が発現する可能性がある。当然のことながら薬物は病態時に使用されるものであり、薬物の蛋白結合率の変動を健常時と病態時と比較検討することは特に重要である。すでに、いくつかの薬物において、腎障害時⁵⁻¹⁰⁾などの病態時に、薬物の蛋白結合率が低下し、遊離型薬物濃度が上昇することが報告されている。しかしながら、慢性腎不全患者に使用される機会の多い活性型ビタミンD₃である1 α ,25(OH)₂D₃ (以下、calcitriol) の腎障害患者における蛋白結合率に関する検討は全くない。そこで、健常人および慢性腎不全患者の血清を用いて、calcitriol の蛋白結合率を比較検討した。

対象と方法

1. 対象

健常人および非透析(保存期)、hemodialysis (HD) 施行の慢性腎不全患者各6名の血清を用いた。対象患者の原疾患はいずれも慢性糸球体腎炎で、糖尿病、感染症、肝障害などを合併していない患者を選択した。また、対象としたHD施行患者の残腎機能(自尿50 ml/日以下)は殆どなく、その透析条件は、クプロファン膜ダイアライザーを用いて週に3回、1回当たり4～5時間透析とした。なお、HD施行患者における採血は血液透析開始直前および終了直後に実施した。表に対象とした健常人および慢性腎不全患者の性別・年齢および蛋白結合に影響を与えると思われる主な臨床検査値を示す。

2. 方法

1) 使用薬物

[26,27-methyl-³H] calcitriol (³H-calcitriol) (比放射能:414 μ Ci/ μ g) は、Amersham 社より購入した。³H-calcitriol の放射化学的純度は高速液体クロマトグラフィー (Hypersil silica column 12.5 $\times$ 0.46 cm, multilinear iso-octane:isopropanol:water gradient system) により97.8%であった。

2) 実験方法

a) calcitriol 溶液の調製

³H-calcitriol のトルエン・エタノール (1:1, v/v) 溶液を窒素ガス気流下で乾固し、エタノール (アルゴン

表 Laboratory data for healthy subjects and patients with chronic renal failure

		HS ^{a)}	ND ^{b)}	HD (pre) ^{c)}	HD (post) ^{d)}
Sex	(M/F)	6/0	4/2	2/4	2/4
Age	(yr)	27.7 $\pm$ 5.8	41.8 $\pm$ 27.1	48.0 $\pm$ 5.2**	48.0 $\pm$ 5.2**
TP	(g/dl)	7.4 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.5**	7.9 $\pm$ 0.8
Alb	(g/dl)	4.7 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.4*	4.0 $\pm$ 0.3**	4.8 $\pm$ 0.5
Gl	(g/dl)	2.7 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.4*
TB	(mg/dl)	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1*	0.5 $\pm$ 0.1*	0.6 $\pm$ 0.2
GOT	(IU/l)	15.0 $\pm$ 4.9	14.3 $\pm$ 5.5	8.7 $\pm$ 4.1*	12.0 $\pm$ 5.7
GPT	(IU/l)	11.0 $\pm$ 8.2	7.5 $\pm$ 5.5	5.7 $\pm$ 1.5	6.8 $\pm$ 1.8
BUN	(mg/dl)	14.2 $\pm$ 4.4	63.5 $\pm$ 18.5**	63.3 $\pm$ 8.5**	20.2 $\pm$ 4.3*
Cr	(mg/dl)	0.8 $\pm$ 0.1	6.2 $\pm$ 2.5**	12.1 $\pm$ 1.9**	4.7 $\pm$ 1.1**
NEFA ^{e)}	(mEq/l)	0.20 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.13	0.16 $\pm$ 0.15	1.48 $\pm$ 0.29**
α_1 AG ^{f)}	(mg/dl)	65.2 $\pm$ 16.1	124.3 $\pm$ 32.4**	86.5 $\pm$ 21.7	117.7 $\pm$ 50.8

^{a)}healthy subjects

^{b)}non-dialyzed patients

^{c)}HD patients (pre dialysis)

^{d)}HD patients (post dialysis) ^{e)}non-esterified fatty acid

^{f)} α_1 -acid glycoprotein

*p < 0.05, **p < 0.01 vs healthy subjects

置換)を加え 2.5 ng/ml 溶液を調製した。また、 ^3H -calcitriol を非標識 calcitriol にて希釈 ($103.5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) した後乾固し、エタノールを加え 10 ng/ml 溶液を調製した。

b) 蛋白結合率の測定

Calcitriol の常用量を経口投与した際の血中濃度を参考として、 ^3H -calcitriol の最終濃度が 50 および 200 pg/ml となるよう血清 0.735 ml に ^3H -calcitriol 溶液 (2.5 または 10 ng/ml) 15 μl を添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。インキュベートした血清を分画分子量 10,000 の遠心限外濾過装置 (MPS-1, O-リングをテフロン加工, Amicon) を用いて、1,000 $\times$ g で 10 分間限外濾過した。得られた濾液および限外濾過前の血清 50 μl に、15 ml のシンチレーター (Monophase® S, Packard) を加え放射活性を測定し、次式により蛋白結合率を算出した。

蛋白結合率 (%)

$$= (1 - \text{Cf}/\text{Ct}) \times 100$$

Cf: 濾液中の放射活性

Ct: 血清中の放射活性

なお、統計学処理 (二群間の比較) には Student's t-test を用いた。

結果

健常人および保存期, HD 施行 (透析開始前) の慢性腎不全患者の血清における calcitriol の蛋白結合率の比較を図 1, 2 に示す。Calcitriol 濃度 50 pg/ml における健常人, 保存期 HD 施行患者の蛋白結合率は、それぞれ $97.93 \pm 0.18\%$ (mean $\pm$ SD, 以下同様), $98.03 \pm 0.25\%$, $97.30 \pm 0.19\%$ であった (図 1)。Calcitriol 濃度 200 pg/ml における健常人, 保存期 HD 施行患者の蛋白結合率は、それぞれ $96.11 \pm 0.56\%$, $96.28 \pm 0.42\%$, $95.11 \pm 0.89\%$ であった (図 2)。Calcitriol 濃度 50 pg/ml における HD 施行患者の蛋白結合率は健常人および保存期の慢性腎不全患者と比較して有意に低値を示した ($P < 0.05$)。

HD 施行患者の透析開始直前, 透析終了直後の比較を図 3 に示す。Calcitriol 濃度 50 pg/ml における透析開始直前, 透析終了直後の蛋白結合率は、それぞれ $97.30 \pm 0.19\%$, $97.27 \pm 0.59\%$ であった。Calcitriol 濃度 200 pg/ml における透析開始直前, 透析終了直後の蛋白結合率は、それぞれ $95.11 \pm 0.89\%$, $95.10 \pm 0.47\%$ であった。HD 施行患者の透析前後における calcitriol の蛋白結合率には有意な差は認められなかった。

これら calcitriol の蛋白結合率と表に示した臨床検査値との間には、いずれも有意な相関は認められなかった。

図 1 Protein binding rate of calcitriol in sera from healthy subjects and patients with chronic renal failure (calcitriol concentration: 50 pg/ml)

図 2 Protein binding rate of calcitriol in sera from healthy subjects and patients with chronic renal failure (calcitriol concentration: 200 pg/ml)

考察

Calcitriol は、1971 年に DeLuca ら¹¹⁾, Kodicek ら¹²⁾ より単離・同定され、その後の研究によりビタミン D の作用を司る最終代謝産物であることが明らかにされた¹³⁾。生体内における calcitriol の生理的役割としては、カルシウムおよびリンの生体内恒常性維持と骨代謝機能の亢進などが知られているが、近年、calcitriol が副甲状腺に直接作用し、副甲状腺ホルモンの産生・分泌を抑制するとの報告もみられる¹⁴⁻¹⁷⁾。現在、本邦においては、慢性腎不全、骨軟化症、骨粗鬆症などを適応症として経口剤が臨床使用されており、また、透析期腎不全患者の二次性副甲状腺機能亢進に対して大量投与が実施されている。

Calcitriol の体内動態に関しては、すでにいくつかの報告がみられるが、その蛋白結合に関する報告は少なく、筆者らが調査した範囲では、富澤ら¹⁸⁾が人血清アルブミ

図3 Protein binding rate of calcitriol in sera from hemodialyzed patients before and after dialysis

ンを用いた検討において、88～95%と報告しているのみである。

当然のことながら、これら薬物の蛋白結合率は、薬物側の条件(薬物の種類、薬物の血中濃度など)、生体側の条件(患者の病態、年齢、血清中のアルブミン濃度、 α_1 -酸性糖蛋白濃度など)、治療法の相違(併用薬の有無、血液浄化療法の種類など)などにより変動する可能性がある。特に蛋白結合性の高い薬物においては、わずかな蛋白結合率の低下でも、遊離型薬物濃度の上昇が顕著で、薬理作用の増強、副作用発現率の増加の可能性が考えられる。そのため、適切な薬物療法を実施する上で、薬物の蛋白結合率の変動を健常時と病態時と比較検討することは重要である。しかしながら、calcitriolの腎不全患者における蛋白結合率に関する報告は全くない。そこで、健常人および保存期、HD施行の慢性腎不全患者各6名の血清を用いて、calcitriolの蛋白結合率を比較検討した。

一般に、慢性腎不全患者においては、血清アルブミン値の低下やhippuric acid, 3-carboxy-4-methyl-propyl-2-furan-propionic acid, 2-hydroxybenzoylglycinなどの内因性の蛋白結合阻害物質の増加などにより、健常人と比較して薬物の蛋白結合率が低下することが報告されている^{5-10,19-21)}。しかしながら、今回の検討において、calcitriol濃度50 pg/mLにおけるその蛋白結合率は、健常人では $97.93 \pm 0.18\%$ 、保存期患者では $98.03 \pm 0.25\%$ 、HD施行患者では $97.30 \pm 0.19\%$ で、calcitriol濃度200 pg/mLにおけるその蛋白結合率は、健常人では $96.11 \pm 0.56\%$ 、保存期患者では $96.28 \pm 0.42\%$ 、HD施行患者では $95.11 \pm 0.89\%$ であった。Calcitriol濃度200 pg/mLにおけるその蛋白結合率は、50 pg/mLにおける蛋白結合率より若干低値を示したが、健常人および保存期、

HD施行の慢性腎不全患者の蛋白結合率は、calcitriol濃度50 pg/mLおよび200 pg/mLにおいて顕著な差は認められなかった。薬物濃度50 pg/mLにおけるcalcitriolの蛋白結合率と比較して、200 pg/mLにおける蛋白結合率が低下した理由としては、calcitriolの濃度に対するアルブミン濃度の相対的な低下に起因するものと思われる。

また、一般に、HD施行患者の透析施行前後における蛋白結合率は、血液透析時に使用されるヘパリンによりリパーゼが活性化され、血清中の遊離脂肪酸が上昇することなどにより、低下することが知られている^{5-8,22,23)}。しかしながら、今回の透析前後におけるcalcitriolの蛋白結合率の検討において、calcitriol濃度50 pg/mLにおけるその蛋白結合率は、透析開始直前で $97.30 \pm 0.19\%$ 、透析終了直後で $97.27 \pm 0.59\%$ で、calcitriol濃度200 pg/mLにおけるその蛋白結合率は、透析開始直前で $95.11 \pm 0.89\%$ 、透析終了直後で $95.10 \pm 0.47\%$ で、いずれも有意な差は認められなかった。

このようにcalcitriolの蛋白結合率が、慢性腎不全患者においても顕著に低下せず、また、血液透析によっても殆ど変動しなかった要因として、1)calcitriolは他の薬剤と比較して非常に低濃度で薬効を示すため、その蛋白結合率は血清アルブミン値の低下の影響を受けづらいこと、2)calcitriolの蛋白結合性は非常に強く、内因性の蛋白結合阻害物質や遊離脂肪酸の影響を受けづらいこと、3)calcitriolのアルブミン分子上の結合位置が蛋白結合阻害物質や遊離脂肪酸の結合位置と異なる可能性があることなどが考えられた。しかしながら、calcitriolはアルブミン以外にもビタミンD結合蛋白を含むグロブリンあるいはリポプロテインなどの血漿蛋白と結合することが示唆されている²⁴⁾ので、これらの要因に関しては、今後さらに検討を加えたいと考えている。

通常、薬物の体内動態の検討に際しては、その蛋白結合率の変動に関しても十分留意する必要がある。しかし、calcitriolの蛋白結合率は健常人と慢性腎不全患者で殆ど変化がないため、慢性腎不全患者におけるcalcitriolの体内動態の検討に際しては、その蛋白結合率の変動はあまり考慮する必要はなく、総calcitriol濃度を指標とすれば良いと考えられた。

文献

- 1) 田原一二: 薬物の分布と蛋白結合. 臨床薬物治療学体系3臨床薬物動態学(砂原茂一, 植木昭和監, 中野重行編), p 113-129, 同朋舎出版, 東京, 1988
- 2) 林 正弘, 澤田康文, 伊賀立二: 薬物の吸収・分布・代謝・排泄に関する基礎知識. 医薬品の開発18薬物の代謝(廣部雅昭, 鎌滝哲也編), p 7-59, 廣川書店,

- 東京, 1990
- 3) 尾関昭二：薬物の血漿タンパク結合. 名古屋市大薬学研年報 29 : 1-24, 1981
 - 4) 今村順茂, 小田切優樹, 杉山雄一, 堀江利治, 宮内正二：薬物—蛋白結合の体内動態に与える影響. 薬物の蛋白結合実験法 (小田切優樹, 杉山雄一編), p 103-144, 廣川書店, 東京, 1991
 - 5) 黒山政一, 熊野和雄, 朝長文弥, 酒井 糾, 真下節夫：セフェム系抗生剤の蛋白結合に関する検討—健康人及び慢性腎不全患者における比較—. 日腎誌 33 : 769-777, 1991
 - 6) 黒山政一, 熊野和雄, 村瀬勢津子, 朝長文弥, 酒井糾：Cefpiramide の蛋白結合に関する検討—健康人及び慢性腎不全患者における比較—. 透析会誌 24 : 1547-1556, 1991
 - 7) 黒山政一, 熊野和雄, 本橋 茂, 木村利美, 村瀬勢津子, 朝長文弥：14 種のセフェム系抗生剤の血漿蛋白結合に関する研究—健康人および慢性腎不全患者における比較—. Chemotherapy 40 : 898-908, 1992
 - 8) 黒山政一, 熊野和雄, 本橋 茂, 村瀬勢津子, 朝長文弥：慢性腎不全患者における経口用セフェム系抗生剤の血漿蛋白結合に関する研究. Jap J Antibiotics 46 : 323-330, 1993
 - 9) Craig WA, Suh B : Changes in protein binding during disease. Scand J Infect Dis 14 : 239-244, 1978
 - 10) Morse GD, Rowinski C, Lieveld PE, Walshe JJ : Drug-protein binding during continuous ambulatory peritoneal dialysis. Peritoneal Dial Bull 6 : 144-147, 1986
 - 11) Holick MF, Schnoes HK, Deluca HF, Suda T, Cousins RJ : Isolation identification of 1, 25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. Biochemistry 10 : 2799-2804, 1971
 - 12) Lawson DEM, Fraser DR, Kodicek E, Morris HR, Williams DH : Identification of 1, 25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. Nature 230 : 228-230, 1971
 - 13) DeLuca HF, Schnoes HK : Vitamin D : Recent advances. Annu Rev Biochem 52 : 411-439, 1983
 - 14) Cantley LK, Russell J, Lettieri D, Sherwood LM : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses parathyroid hormone secretion from bovine parathyroid cells in tissue culture. Endocrinology 117 : 2114-2119, 1985
 - 15) Russell J, Lettieri D, Sherwood LM : Suppression by 1,25(OH)₂D₃ of transcription of the pre-parathyroid hormone gene. Endocrinology 119 : 2864-2866, 1986
 - 16) Kremer R, Bolivar I, Goltzman D, Hendy GN : Influence of calcium and 1, 25-dihydroxycholecalciferol on proliferation and proto-oncogene expression in primary cultures of bovine parathyroid cells. Endocrinology 125 : 953-941, 1989
 - 17) Szabo A, Merke J, Beier E, Mall G, Ritz E : 1, 25(OH)₂ vitamin D₃ inhibits parathyroid cell proliferation in experimental uremia. Kidney Int 35 : 1049-1056, 1989
 - 18) 未発表データ
 - 19) 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
 - 20) Collier R, Lindup WE, Liebich HM, Spitteller G : Inhibitory effect of the ureaemic metabolite 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propionic acid on plasma protein binding. Brit J Clin Pharmacol 21 : 610-611, 1986
 - 21) Lichtenwalner DM, Suh B : Isolation and chemical characterization of 2-hydroxybenzoylglycine as a drug binding inhibitor in uremia. J Clin Invest 71 : 1289-1296, 1983
 - 22) 黒山政一, 熊野和雄, 村瀬勢津子, 朝長文弥, 酒井糾：Hemodialysis 施行時におけるセフェム系抗生剤の蛋白結合率に関する研究—特に抗血液凝固剤の影響—. 透析会誌 26 : 525-532, 1993
 - 23) Dromgoole SH : The effect of haemodialysis on the binding capacity of albumin. Clin Chim Acta 46 : 469-472, 1973
 - 24) 小林 正, 岡野登志夫, 増田園子：ビタミンD結合蛋白の同定と臨床—ビタミンDおよび代謝物の腸管吸収と体内転送機構をめぐって—. ビタミン 63 : 419-428, 1989