血液透析患者におけるアニオン性尿毒症物質の血漿中濃度と プラバスタチンのタンパク結合に対する影響

市村祐一,^a 高松宏行,^a 出内秀樹,^b 小田雅子,^a 武田清孝,^b 齊藤浩司^{*,a}

Plasma Concentrations of Anionic Uremic Toxins in Hemodialysis Patients and Their Effects on Protein Binding of Pravastatin

Yuichi Ichimura,^a Hiroyuki Takamatsu,^a Hideki Ideuchi,^b Masako Oda,^a
Kiyotaka Takeda,^b and Hiroshi Saitoh^{*,a}

^aDepartment of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido;
1757 Kanazawa, Tobetsu-cho, Ishikari-gun, Hokkaido 061-0293, Japan; and ^bDepartment of Pharmacy,
Sapporo Higashi Tokushukai Hospital; Kita 33, Higashi 14, Higashi-ku, Sapporo 065-0033, Japan.

(Received October 8, 2014; Accepted February 19, 2015)

Uremic toxins (UTs) accumulate in the body of hemodialysis patients. UTs often exert unfavorable effects on patients and cause significant interactions with clinically relevant drugs. In this study, we assayed plasma concentrations of three typical anionic UTs, indoxyl sulfate (IS), 3-indoleacetic acid (IA), and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid (CMPF), in 20 hemodialysis patients and 5 healthy volunteers. Moreover, the effects of these anionic UTs on the binding of pravastatin to human serum albumin (HSA) were also evaluated. CMPF concentrations in the plasma of patients were unchanged before and after dialysis ($63.0 \pm 6.3 \mu\text{M}$ and $65.1 \pm 6.7 \mu\text{M}$, respectively), and these values were about 5-fold greater compared with those in healthy volunteers. Although dialysis decreased the plasma IS concentration from $157.9 \pm 19.9 \mu\text{M}$ to $103.8 \pm 13.3 \mu\text{M}$, the value after hemodialysis was still *ca.* 27-fold greater than that in healthy volunteers. IA concentrations before and after hemodialysis were almost identical to those in healthy volunteers. There were no significant differences in the plasma concentrations of the three anionic UTs between male and female patients. The magnitude of protein binding was in the order $\text{CMPF} > \text{IS} > \text{IA}$, indicating that hemodialysis clearance of these anionic UTs was dependent on their protein binding capacities. The ability of IS to reduce pravastatin binding to HSA was much greater than that of CMPF. The present results suggest that statins bind to site II on HSA, and that their binding is modulated by IS when elevated in hemodialysis patients.

Key words—anionic uremic toxin; plasma concentration; hemodialysis patient; protein binding; indoxyl sulfate; pravastatin

緒 言

現在、日本国内には約 30 万人の血液透析患者があり、その数は毎年約 1 万人ずつ増加している。透析導入患者の原疾患としては、糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症、慢性腎盂腎炎などが挙げられるが、現在では透析導入原疾患の約半数を糖尿病性腎症が占めている。¹⁾ また、これら血液透析患者の背景には約 1330 万人に上る慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) 患者が存在する。²⁾

血液透析患者では、糸球体ろ過機能や尿細管分泌機能が著しく低下しているため、様々な尿毒症物質 (uremic toxins; UTs) が体内に蓄積する。³⁾ UTs は、水溶性低分子物質、水溶性中分子物質、タンパク結合型物質の 3 群に分けられるが、⁴⁾ タンパク結合型物質のうち、アニオン性 UT である 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 (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid; CMPF) はヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) のサイト I に、一方、インドキシル硫酸 (indoxyl sulfate; IS) とインドール酢酸 (3-indoleacetic acid; IA) は HSA のサイト II に結合することが知られている。^{5,6)}

血液透析患者は様々な合併症を有するが、中でも

^a北海道医療大学薬学部薬剤学講座, ^b札幌東徳洲会病院薬剤部

*e-mail: saito@hoku-iro-u.ac.jp

脂質異常症は心血管疾患，特に心筋梗塞発症の独立因子とされ，食事や運動により脂質管理目標が達成されない場合はスタチン系薬剤の積極的な投与が推奨されている。⁷⁾ スタチン系薬剤の多くは 90% を超えるタンパク結合率を示すことから，アニオン性 UTs によってタンパク結合置換が起こると，横紋筋融解症などの重篤な副作用が惹起されるおそれがある。しかしながら，スタチン系薬剤が HSA に結合することは明らかであるものの，⁸⁾ HSA 上の結合サイトが未確定であるため，実際にどの UTs がスタチン系薬剤のタンパク結合に影響を及ぼすかは不明である。

アニオン性 UTs によるタンパク結合置換はそれらの血漿中濃度に依存すると考えられる。IS や IA は食物由来のトリプトファンの代謝産物であり，⁹⁾ CMPF は魚卵などに含まれるリン脂質中のフランド脂肪酸が代謝されることにより生成される。¹⁰⁾ 食物の摂取量及び食事内容は，年齢や性別あるいは国・地域によって異なり，嗜好の個人差も様々であるため，血液透析患者の食習慣の違いが，アニオン性 UTs の血漿中濃度の変動要因となり得る。したがって，アニオン性 UTs とスタチン系薬剤間の相互作用を予測する上で，血液透析患者におけるアニオン性 UTs の血漿中濃度を把握しておくことは重要である。

そこで本研究では，札幌東徳洲会病院に通院中の血液透析患者の血漿中 CMPF，IS，IA 濃度を簡便な HPLC 法で測定し，さらに当研究室で既に定量法を確立しているプラバスタチンをスタチン系薬物のモデルとして用い，HSA 結合におけるアニオン性 UTs との相互作用を検討した。

方 法

1. 使用薬物及び試薬 CMPF は Cayman Chem. Co. (Ann Arbor, USA) より，IS 及びプラバスタチンナトリウムは Sigma 社 (St. Louis, USA) より，IA と HSA は和光純薬工業（大阪）よりそれぞれ購入した。その他の試薬及び溶媒は，すべて市販の特級規格品又はそれに準ずるものを使用した。

2. 血液透析患者及び健常成人からの血液試料の採取 札幌東徳洲会病院に通院中の血液透析患者及び健常成人に対して，所定の様式に従った文書を用いて研究の主旨と個人情報の保護について説明を

Table 1. Laboratory Test Values of Twenty Hemodialysis Patients

Patients	Age	eGFR (mL/min)	Scr (mg/dL)		BUN (mg/dL)		Albumin (g/dL)	
			before HD	after HD	before HD	after HD	before HD	after HD
1	72	3.8	10.8	4.5	59.8	22.1	4.0	4.7
2	57	3.4	10.1	3.9	43.1	13.8	3.7	3.9
3	73	6.4	6.7	3.0	53.2	19.2	4.0	4.8
4	74	3.8	7.9	3.3	45.4	14.8	3.9	3.8
5	57	4.1	11.1	4.8	51.4	18.9	3.9	4.5
6	67	2.4	10.9	4.1	63.8	17.3	3.8	4.2
7	48	2.8	11.5	3.0	59.9	11.1	4.1	4.5
8	73	2.9	9.8	3.4	53.3	14.3	3.9	4.0
9	53	12.6	4.2	2.4	57.5	32.1	4.0	4.1
10	62	5.2	8.5	3.4	42.8	13.9	3.6	3.9
11	72	5.2	9.4	4.3	57.4	22.9	4.0	3.8
12	46	3.4	11.5	5.1	66.7	24.8	3.6	4.3
13	73	3.4	9.5	3.9	84.1	22.8	3.9	4.7
14	71	3.1	9.5	4.0	81.1	26.6	4.1	4.3
15	92	22.6	2.3	1.3	41.2	19.0	4.0	4.0
16	76	4.1	9.9	4.1	47.3	16.4	3.5	3.4
17	46	2.8	12.1	4.5	66.3	19.5	4.1	4.8
18	79	3.9	6.7	2.1	58.5	14.1	3.9	3.9
19	62	4.2	10.9	5.1	63.1	24.7	4.0	4.0
20	73	6.7	6.3	2.6	48.1	15.3	3.3	3.9

Abbreviation: HD, hemodialysis.

行い，同意の得られた患者 20 名（男女各 10 名）と健常成人 5 名（男 4 名，女 1 名）を対象とした。患者からの採血は透析回路から行い，透析前及び透析終了直後の血液各 4 mL をヘパリン入り採血管（Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, USA）に採取後，遠心分離（2600 g，5 分，5°C）し，血漿画分を得た。試料は定量時まで -30°C にて保存した。なお，本研究は札幌東徳洲会病院の承認を得，透析室スタッフの協力の下に実施した。

今回対象となった血液透析患者及び健常成人の血清クレアチニン（serum creatinine; Scr），血中尿素窒素（blood urea nitrogen; BUN），推算糸球体ろ過量（estimated glomerular filtration rate; eGFR）を Table 1, Table 2 に示した。BUN，Scr，患者年齢は患者カルテより確認し，eGFR は Eq. (1), (2) 及び (3) に従って算出した。

$$\text{体表面積 (body surface area; BSA)} \\ = \text{体重}^{0.425} \times \text{身長}^{0.725} \times 0.007184 \quad (1)$$

$$\text{eGFR (男性)} \\ = 194 \times \text{Scr}^{-1.094} \times \text{Age}^{-0.287} \times \text{BSA} \quad (2)$$

Table 2. Laboratory Test Values of Five Healthy Volunteers

Healthy volunteers	Age	eGFR (mL/min)	Scr (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Albumin (g/dL)
1	26	97.8	0.8	11.8	4.7
2	28	81.8	1.0	13.4	5.1
3	41	78.0	0.8	10.9	4.9
4	27	126.3	0.6	8.6	4.4
5	25	85.3	0.9	9.2	5.1

eGFR (女性)

$$= 194 \times \text{Scr}^{-1.094} \times \text{Age}^{-0.287} \times 0.739 \times \text{BSA} \quad (3)$$

3. 限外ろ過法による3種アニオン性UTsのタンパク結合率の測定 CMPF, IS 及び HSA は塩化カルシウムを含まない Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂ · 6H₂O, pH 7.4) に溶解した. 濃度は CMPF 及び IS を 100 μM, HSA 8% (w/v) とした. IA は水に難溶のため, まずエタノールに溶解して原液を調製し, これを上述の DPBS で希釈して 100 μM とした. なお, エタノールの最終濃度は 0.5% (v/v) 以下とした. 各溶液を pH 7.4 に調整後, 各アニオン性 UT 溶液と HSA 溶液を 1 : 1 で混合し, 37°C で 30 分間インキュベートした. なお, インキュベート時の濃度はアニオン性 UTs 50 μM, HSA 4% (w/v) である.

インキュベート後の溶液 0.5 mL を Nanosep® 10 K OMEGA centrifugal devices (Pall Life Sciences, Port Washington, USA) の上部に充填して遠心分離 (12000 g, 10 分, 20°C) し, 得られたろ液中のアニオン性 UT 濃度を測定して遊離濃度とした. また, 各アニオン性 UT 溶液 (100 μM) と DPBS を 1 : 1 で混合し, 前述と同様の操作にて得られたろ液中の濃度を測定して総濃度とし, Eq. (4) に従ってタンパク結合率を算出した. なお, 今回用いた限外ろ過膜への吸着率は, 遠心分離直前のアニオン性 UT の濃度である 50 μM を 100% とし, Eq. (5) に従って算出した.

タンパク結合率 (%)

$$= (\text{総濃度} - \text{遊離濃度}) / \text{総濃度} \times 100 \quad (4)$$

限外ろ過膜への吸着率 (%)

$$= (50 - \text{総濃度}) / 50 \times 100 \quad (5)$$

4. プラバスタチンの HSA 結合に対するアニオン性 UTs の影響 プラバスタチンのタンパク結合に対するアニオン性 UTs の影響の検討では, 塩化カルシウムを含まない DPBS とジメチルスルホキシドの 1 : 1 混液を用いて, 800 μM の各 UT 溶液と 100 μM のプラバスタチンナトリウム溶液を調製した. これらの pH を 7.4 に調整後, 4% (w/v) の HSA 溶液と 1 : 1 で混合し, 37°C で 30 分間インキュベートした後, 前述のように限外ろ過を行った. なお, 最終濃度はプラバスタチン 50 μM, UT 400 μM, HSA 2% (w/v) である.

5. アニオン性 UTs 及びプラバスタチンの定量

各 UT 及びプラバスタチンの濃度は HPLC-UV 法にて絶対検量線法により測定した. 血液透析患者及び健常成人の血漿 50 μL に生理食塩液 50 μL 及びメタノール 200 μL を加えて十分に混和し, 遠心分離 (5350 g, 10 分, 5°C) によって得られた上清を HPLC の注入試料とした. HPLC システムとして Shimadzu SPD-10A を備えた Shimadzu LC-10AS (島津製作所, 京都) を用いた. 測定波長は CMPF 261 nm, IA 282 nm, IS 280 nm, プラバスタチン 238 nm とした. 分析カラムとして, CMPF 及びプラバスタチンの測定には Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. × 250 mm, GL Sciences Inc., 東京) を用い, カラム温度は 40°C とした. IA 及び IS の測定には Cosmosil 5C₁₈AR-II (4.6 mm i.d. × 150 mm, ナカライテスク, 京都) を用い, カラム温度は 50°C とした. CMPF の移動相には 0.08 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) / CH₃CN / CH₃COOH (65 : 35 : 0.5, 流速 1.0 mL/min) を, IA の移動相には 0.05 M KH₂PO₄ / CH₃CN (9 : 1, 流速 0.8 mL/min) を, IS の移動相には 0.05 M KH₂PO₄ / CH₃CN (95 : 5, 流速 1.0 mL/min) を用いた. また, プラバスタチンの移動相には 2.5 mM CH₃COONH₄ / CH₃CN (7 : 3) を用い, 流速は 1.0 mL/min とした. なお, 検量線の下限濃度は CMPF 5 μM, IA 0.63 μM, IS 1.56 μM, プラバスタチン 10 μM とした. 各測定において検量線は相関係数 0.999 以上の良好な直線性を示した.

6. 統計処理

血漿中アニオン性 UT 濃度の測定結果は, 平均値 ± 標準誤差 (最小値 - 最大値), 又は患者個々の値で示した. タンパク結合率は平均値 ± 標準誤差で示した. 血液透析患者の透析前後での血漿中 UT 濃度の有意差の検定は paired *t* 検定に

Fig. 1. Plasma Concentrations of CMPF (A), IS (B) and IA (C) in Hemodialysis Patients

Open circles represent the individual data of patients before hemodialysis. Open squares represent the individual data of patients after hemodialysis.

Fig. 2. Mean Plasma Concentrations of CMPF (A), IS (B) and IA (C) in Hemodialysis Patients and Healthy Volunteers

Each point represents the mean with S.E. (hemodialysis patients: $n=20$, healthy volunteers: $n=5$). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, significantly different from healthy volunteers or before dialysis.

て行い、血液透析患者及び健康成人の血漿中 UT 濃度間における有意差並びに UT 共存下、非共存下におけるプラバスタチンのタンパク結合率の有意差の検定は Dunnett 検定及び Tukey 検定にて行った。また、透析膜としてセルローストリアセテート (cellulose triacetate membranes; CTA) 及びポリエーテルスルホンを用いた場合のアニオン性 UTs の除去率における有意差の検定とプラバスタチン単独時及びアニオン性 UTs 共存下でのプラバスタチンのタンパク結合率の有意差の検定は Student's *t*-test により行い、いずれも $p<0.05$ をもって有意差ありとした。

結 果

1. 血液透析患者及び健康成人における 3 種アニオン性 UTs の血漿中濃度 血液透析患者 20 名の透析前後における 3 種 UTs の血漿中濃度を Fig. 1 に、各平均値を健康成人と比較した結果を Fig. 2 に示した。血液透析患者における血漿中平均 CMPF 濃度は透析前 63.0 ± 6.3 (29.5–139.1) μM 、透析後 65.1 ± 6.7 (30.7–155.1) μM であり、透析後に若干濃度が上昇したがこれらの値に有意差は認められなかった ($p=0.203$)。健康成人における血漿中 CMPF 濃度は 12.0 ± 2.3 (5.1–18.1) μM であり、透析前後の血漿中 CMPF 濃度は健康成人の値に比べて有意に高いことが示された ($p<0.001$)。

Table 3. Plasma Concentrations of Three A-UTs in Male and Female Hemodialysis Patients

		Before HD	After HD
CMPF	male	60.4±8.0	61.0±7.4
	female	65.7±10.2	69.2±11.4
IA	male	5.0±0.8	2.8±0.4
	female	3.7±0.6	1.8±0.3
IS	male	143.8±34.8	97.7±22.7
	female	172.0±20.5	109.9±13.9

Each value represents the mean±S.E. ($n=10$).

血液透析患者における血漿中 IS 濃度は、透析前 157.9 ± 19.9 ($8.9\text{--}358.4$) μM 、透析後 103.8 ± 13.0 ($6.8\text{--}240.9$) μM であった。これに対し、4 人の健康成人では血漿中に IS は検出されず、残る 1 名についても $3.8 \mu\text{M}$ と低い値を示した。血漿中 IS 濃度は透析後に有意に減少 ($p<0.001$, 透析除去率: $32.8 \pm 2.1\%$) したが、健康成人と比較して依然高値を示した。一方、血漿中 IA 濃度は透析前 4.3 ± 0.5 ($1.2\text{--}10.1$) μM 、透析後 2.3 ± 0.3 ($0.8\text{--}5.4$) μM 、健康成人で 2.0 ± 0.3 ($1.0\text{--}2.6$) μM であり、透析によって有意に減少した ($p<0.001$, 透析除去率: $46.6 \pm 2.0\%$)。また、透析前の血漿中 IA 濃度と健康成人の血漿中 IA 濃度の間には有意差が認められた ($p<0.01$) が、透析後の血漿中 IA 濃度と健康成人の血漿中 IA 濃度の間には有意差は認められなかった (Fig. 2)。また、これら 3 種 UTs の血漿中濃度に性差は認められなかった (Table 3)。

今回アニオン性 UTs 濃度を測定した患者のうち、透析膜に CTA を用いた患者は 15 名、ポリエーテルスルホンを用いた患者は 5 名であった。CTA 又はポリエーテルスルホンを用いた場合の IS の除去率はそれぞれ $33.4 \pm 2.5\%$ 、 $31.3 \pm 3.7\%$ 、IA の除去率はそれぞれ $45.2 \pm 2.1\%$ 、 $50.9 \pm 4.5\%$ であり、透析膜の違いによるアニオン性 UTs の除去率への影響はほとんど認められなかった (Fig. 3)。

2. 3 種アニオン性 UTs のタンパク結合率と透析除去率の相関 IA 及び IS のタンパク結合率を限外ろ過法により算出した結果、それぞれ $29.0 \pm 2.1\%$ 、 $64.8 \pm 1.2\%$ であった。一方、CMPF はろ液中に全く検出されなかったことから、タンパク結合率はほぼ 100% とみなされた。なお、今回使用した限外ろ過膜への CMPF、IA 及び IS の吸着率は、そ

Fig. 3. Reduction Ratio of IS and IA by Hemodialysis Using Cellulose Triacetate or Polyether Sulfone

Each column represents the mean with S.E. The numbers of open and closed columns were 15 and 5, respectively.

Fig. 4. Correlation between Protein Binding Ratio and Hemodialysis Clearance of CMPF, IS and IA

Each point represents the mean±S.E. ($n=3$). Error bars are hidden behind symbols.

れぞれ 0%, 0.6% 以下, 12.1% 以下であった。Figure 4 に示すように、タンパク結合率と透析除去率との間には良好な負の相関 ($r=-0.970$) が認められた。

3. プラバスタチンのタンパク結合に対する 3 種アニオン性 UTs の影響 3 種アニオン性 UTs 共存下におけるプラバスタチンのタンパク結合率の変化を Fig. 5 に示した。本実験におけるプラバスタチンのタンパク結合率は $23.4 \pm 0.5\%$ であったが、その値は CMPF 共存下で $20.6 \pm 0.8\%$ 、IA 共存下で $16.6 \pm 2.4\%$ 、IS 共存下で $2.8 \pm 1.1\%$ に低下し、プラバスタチン単独時と比較して、IA 及び IS 共存下において有意差が認められた。また、CMPF 共存下と比較して IS 共存下において、IA 共存下と比較して IS 共存下においてそれぞれ有意差が認められた。

Fig. 5. Effects of Three Anionic UTs on the Protein Binding of Pravastatin

Each column represents the mean with S.E. (pravastatin alone: $n=6$, with anionic UTs: $n=3$). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, significantly different from pravastatin alone. ** $p<0.001$, significantly different from with CMPF. *** $p<0.001$, significantly different from with IA.

考 察

UTs は従来、尿毒症の原因物質と定義されてきたが、最近では、CKD 患者において尿毒症発症以前から生体に様々な悪影響を及ぼし、長期血液透析患者の合併症の発現に深く関係する物質とみなされている。⁴⁾ 例えば、CKD 患者で血漿中 IS 濃度が上昇すると、甲状腺障害や血管障害の誘発や腎機能障害の進行が引き起こされる。¹¹⁻¹³⁾ UTs の体内蓄積は、食習慣に加えて透析期間や残存腎機能などにより個体間で大きく変動すると考えられる。本研究においても、CMPF と IS では血液透析患者間での血漿中濃度の変動が大きく、透析前の最大濃度と最小濃度の差が CMPF では 4.7 倍 [Fig. 1(A)], IS では 40.3 倍 [Fig. 1(B)] に達することが示された。また、健常成人に比べて透析前平均血漿中濃度が最も高値を示したのは IS で、平均 42.1 倍に達した [Fig. 2(B)]。IA の透析前平均血漿中濃度は CMPF 及び IS と比較して低く、血液透析患者における IA の蓄積性はそれ程大きなものではないと考えられた [Fig. 2(C)]。

今回検討したアニオン性 UTs の血液透析患者や健常人における血中濃度についてはこれまでも様々な検討がなされてきたが、^{3,14-18)} 今回の測定結果はこれまでの報告とほぼ一致している。

透析前後の血漿中濃度を比較すると、CMPF では濃度変化がほとんどみられなかったことから、血

液透析による CMPF の透析除去率は極めて低いことが示された [Fig. 2(A)]。IS の場合には、透析前に比べ透析後の血漿中濃度は有意に低下したが、それでもなお健常成人に比べて 27.3 倍高い値を示した [Fig. 2(B)]。一方、IA では血液透析により 46.6% 減少し、健常成人とほぼ同程度の濃度となった [Fig. 2(C)]。限外ろ過法によりこれら 3 種アニオン性 UTs のタンパク結合率を算出したところ、IA と IS はそれぞれ 29.0%, 64.8% だったのに対し、CMPF はろ液中に全く検出されなかったことから、タンパク結合率はほぼ 100% であると判断された。CMPF や IS の透析除去率の決定要因としてタンパク結合率が指摘されているが、¹⁹⁾ 本研究でもこれらアニオン性 UTs のタンパク結合率と透析除去率との間に良好な負の相関 ($r=-0.970$) が認められた (Fig. 4)。

本研究における重要な知見は、IS 共存下におけるプラバスタチンの HSA への結合が CMPF 共存下に比べて著しく低下したことである (Fig. 5)。タンパク結合率が大きい CMPF や IS が HSA への薬物結合を阻害することについては、これまでも様々な報告がなされている。例えば、フロセミドでは IA や IS 共存下よりも CMPF 共存下において明らかに遊離体濃度が増加する。²⁰⁾ また、ワルファリンの HSA 結合を阻害する CMPF はダンシルザルコシンの HSA 結合には影響せず、これに対し IS は CMPF とは正反対の挙動を示す。²¹⁾ これらの違いは、CMPF が HSA のサイト I に、一方 IS はサイト II に高い親和性を有することに起因する。²²⁾ したがって、ここで得られた知見に基づけば、プラバスタチンは HSA のサイト II に結合すると推察され、IA や IS が強くプラバスタチンの HSA 結合を阻害した結果 (Fig. 5) がこのことを支持している。

本研究では、プラバスタチンの HSA 上の結合サイトを明らかにし、また、プラバスタチンの HSA 結合に対する 3 種 UTs の阻害効果の強さを比較するために、UTs の濃度を一律の $400\ \mu\text{M}$ とし、プラバスタチンの濃度を $50\ \mu\text{M}$ として、UTs の濃度が 8 倍高い条件下にて実験を行った。

一方、インタビューフォームによると、プラバスタチン 20 mg を経口投与した場合の最高血漿中濃度は $0.07\pm0.04\ \mu\text{M}$ であると示されており、また、今回検討した血液透析患者における IS の透析前最

大血漿中濃度は $358.4 \mu\text{M}$ であったことから、血液透析患者の体内における IS の濃度は、プラバスタチンと比較して非常に高濃度で存在することが推察され、本研究よりもさらに濃度差が大きいことが推察された。よって、血液透析患者の体内において、プラバスタチンの HSA 結合はより顕著に IS によって置換されることが推察された。プラバスタチンのタンパク結合率は 53% であるが、他のスタチン系薬剤のタンパク結合率は、シンバスタチン 95% 以上、フルバスタチン 95–97%、アトルバスタチン 80–90%、ピタバスタチン 99% と報告されている (各インタビューフォームより)。これらのスタチン系もプラバスタチンと同様に HSA のサイト II に結合すると考えられることから、今後、よりタンパク結合率の高いこれらのスタチン系薬物のタンパク結合に対する IS の影響について詳細に検討してゆく必要があると考えられた。

CMPF は *in vitro* の研究においてエリスロマイシンやジゴキシンの肝細胞への取り込みを阻害することが報告されている。^{23,24)} しかしながら、本研究でも示唆されたように、CMPF は血漿中でほぼ 100% HSA に結合した状態で存在すると考えられることから、相互作用に関する *in vitro* の結果が臨床レベルに反映されるかについて、今後検討が必要と思われる。

結論として、今回検討したアニオン性 UTs のうち、IS の血漿中濃度には血液透析患者間で大きな差があること、また透析後でも健常人に比べて高濃度で血漿中に存在することが改めて確認された。IS は末期 CKD 患者において心血管疾患や腎機能低下を予測するマーカーとなることも指摘されており、²⁵⁾ 簡便な測定法を駆使した血中濃度のモニタリングは、臨床上重要な意味を持つと考えられる。

謝辞 本研究を遂行する機会を与えて頂いた札幌東徳洲会病院の諸先生、並びに本研究の統計解析にご指導頂いた北海道医療大学薬学部薬剤学講座小林道也教授に深謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Nakai S., Watanabe Y., Masakane I., Wada A., Shoji T., Hasegawa T., Nakamoto H., Yamagata K., Kazama J. J., Fujii N., Itami N., Shinoda T., Shigematsu T., Marubayashi S., Morita O., Hashimoto S., Suzuki K., Kimata N., Hanafusa N., Wakai K., Hamano T., Ogata S., Tsuchida K., Taniguchi M., Nishi H., Iseki K., Tsubakihara Y., *Ther. Apher. Dial.*, **17**, 567–611 (2013).
- 2) Imai E., Yasuda Y., Matsuo S., *Jpn. J. Clin. Dial.*, **27**, 9–16 (2010).
- 3) Duranton F., Cohen G., De Smet R., Rodriguez M., Jankowski J., Vanholder R., Argiles A., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **23**, 1258–1270 (2012).
- 4) Neirynck N., Vanholder R., Schepers E., Eloot S., Pletinck A., Glorieux G., *Int. Urol. Nephrol.*, **45**, 139–150 (2013).
- 5) Watanabe H., Maruyama T., Otagiri M., *Xenobio. Metabol. Dispos.*, **16**, 264–270 (2001).
- 6) Takamura N., Tokunaga J., Chosa E., Kawai K., Fujita K., Arimori K., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 1805–1811 (2007).
- 7) The Japanese Society for Dialysis Therapy, Clinical Guidelines for the Evaluation and the Treatment of Cardiovascular Complications in Hemodialysis Patients, 2011.
- 8) Tse F. L., Nickerson D. F., Yardley W. S., *J. Pharm. Sci.*, **82**, 942–947 (1993).
- 9) Banoglu E., Jha G. G., King R. S., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **26**, 235–240 (2001).
- 10) Ishii K., Okajima H., Okada Y., Watanabe H., *J. Biochem.*, **103**, 836–839 (1988).
- 11) Lim C. F., Bernard B. F., de Jong M., Docter R., Krenning E. P., Hennemann G., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 318–324 (1993).
- 12) Dou L., Bertrand E., Cerini C., Faure V., Sampol J., Vanholder R., Berland Y., Brunet P., *Kidney Int.*, **65**, 442–451 (2004).
- 13) Niwa T., Ise M., *J. Lab. Clin. Med.*, **124**, 96–104 (1994).
- 14) De Smet R., Dhondt A., Eloot S., Galli F., Waterloos M. A., Vanholder R., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **22**, 2006–2012 (2007).

- 15) Mutsaers H. A., van den Heuvel L. P., Ringens L. H., Dankers A. C., Russel F. G., Wetzel J. F., Hoenderop J. G., Masereeuw R., *PLoS One*, **6**, e18438 (2011).
- 16) Vanholder R., De Smet R., Glorieux G., Argilés A., Baurmeister U., Brunet P., Clark W., Cohen G., De Deyn P. P., Deppisch R., Descamps-Latscha B., Henle T., Jörres A., Lemke H. D., Massy Z. A., Passlick-Deetjen J., Rodriguez M., Stegmayr B., Stenvinkel P., Tetta C., Wanner C., Zidek W., European Uremic Toxin Work Group (EUTox), *Kidney Int.*, **63**, 1934–1943 (2003).
- 17) Iitaka M., Kawasaki S., Sakurai S., Hara Y., Kuriyama R., Yamanaka K., Kitahama S., Miura S., Kawakami Y., Katayama S., *Clin. Endocrinol.*, **48**, 739–746 (1998).
- 18) Itoh Y., Ezawa A., Kikuchi K., Tsuruta Y., Niwa T., *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1841–1850 (2012).
- 19) Niwa T., *Blood Purif.*, **35** (Suppl. 2), 20–25 (2013).
- 20) Takamura N., Maruyama T., Otagiri M., *Clin. Chem.*, **43**, 2274–2280 (1997).
- 21) Watanabe H., Noguchi T., Miyamoto Y., Kadowaki D., Kotani S., Nakajima M., Miyamura S., Ishima Y., Otagiri M., Maruyama T., *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 1423–1428 (2012).
- 22) Sakai T., Takadate A., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1755–1761 (1995).
- 23) Sun H., Huang Y., Frassetto L., Benet L. Z., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1239–1246 (2004).
- 24) Tsujimoto M., Kinoshita Y., Hirata S., Otagiri M., Ohtani H., Sawada Y., *Ther. Drug Monit.*, **30**, 576–582 (2008).
- 25) Lin C.-J., Liu H.-L., Pan C.-F., Chuang C.-K., Jayakumar T., Wang T.-J., Chen H.-H., Wu C.-J., *Arch. Med. Res.*, **43**, 451–456 (2012).