薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (5) 589-593 (1983)

急性腎不全家兎の血漿蛋白とフロセミドの結合¹⁾

吉富博則, 安保成二, 山下典子, 池田克己, 武田真理子, 後藤 茂*

岡山大学薬学部

Plasma Protein-Furosemide Binding in Acute Renal Failure Rabbit¹⁾

HIRONORI YOSHITOMI, SEIJI ABO, NORIKO YAMASHITA, KATSUMI IKEDA,
MARIKO TAKEDA and SHIGERU GOTO*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University,
Tsushima-naka 1-1-1, Okayama

(Received October 20, 1982)

Acute renal failure (R.F.) rabbits induced by the muscular injection (*i.m.*) of HgCl_2 (10 mg/kg) produced a significant increase of blood urea nitrogen concentration (BUN) and plasma creatinine concentration (Cre.) after a few days. However, no significant change was observed for free fatty acid (FFA) level. The pharmacokinetics of furosemide in acute renal failure rabbit was also studied. The apparent volume of tissue compartment (V_2) slightly increased. The elimination rate constant (k_{10}) from central compartment significantly decreased, and mutually correlated with BUN or Cre.

It was found from results of *in vitro* equilibrium dialysis measurement that the protein binding of furosemide (FR) significantly decreased in the plasma obtained from R.F. rabbits as well as that from patients with acute renal failure. Calculations made according to Sandberg-Rosenthal's formula revealed that the maximum binding concentrations (nP) was not changed but binding constant (K) decreased in the R.F. rabbit. The presence of endogenous substances that inhibit the plasma protein-FR binding competitively may be suggested from the above result.

Keywords—acute renal failure rabbit; pharmacokinetics of furosemide; plasma protein binding; Sandberg-Rosenthal plot

さきに腎および肝障害患者血漿を対象に行ったループ利尿薬-血漿蛋白結合実験において、肝障害では患者の血漿アルブミン濃度と結合 % の間にきわめて良好な相関性が成立するが、腎障害患者血漿については相関性がきわめて小さな事実を得て報告した^{2,3)}したがって、腎障害患者血漿について、結合 % 低下の原因は症状の進行に伴う血漿アルブミン濃度低下以外に他の原因が存在するものと考えられる。しかし、腎障害患者の血液を大量に得ることはきわめて困難であり、これに代わる実験材料が必要である。家兎血漿を対象にした薬物-血漿蛋白結合実験は以前より検討を積み重ねてきている。そこで家兎に塩化第二水銀を筋注し、急性腎不全を生起させた後、血液を採取した。得られた血漿を用いて結合実験を試みたところ、前述した腎障害患者血漿についての実験結果^{2,3)}にきわめて類似した結果が得られた。このことから直ちに急性腎不全家兎血漿が腎障害患者血漿の代用になると結論するのは早計であるが、今後検討を重ねることはきわめて意義深いものと考えられる。ここでは今回実施した基礎的な実験の結果について述べる。

実 験 の 部

試料 ループ利尿薬の代表例としてフロセミド (FR と略) を選択した。FR はヘキスト・ジャパン (株) より供与されたものを使用した。試薬類はいずれも試薬特級 (和光純薬ならびに半井化学) を使用した。

実験動物 体重約 3 kg の白色雄性家兎 (柵原ラビットセンター, 岡山県柵原町より購入) を使用した。急性腎不全の発症にさいしては、5% 塩化第二水銀 (HgCl_2 , 試薬特級, 半井化学) を 5—10 mg/kg の割合で大腿部に筋注を行った。

血中内因性物質の測定 血中尿素窒素 (BUN と略): Diacetylmonoxime 法により行った。⁴⁾ クレアチニン (Cre. と略): Jaffé 反応により行った。⁵⁾ 遊離脂肪酸 (FFA と略): NEFA-Test (和光純薬) を用いて行った。⁶⁾

以上の測定は毎日定められた時間（午前 10 時）に実施した。総蛋白の定量：Lowry 法により行った。⁷⁾ アルブミンの定量：セルロース・アセート膜電気泳動の結果を用いて算出した。

平衡透析法 すでに報告した方法⁸⁾と同様に行った。

フロセミド (FR) の定量 FR を含む血漿 0.5 ml に 1 N HCl 0.5 ml とジエチルエーテル 5 ml を加えて振盪，遠心分離後，エーテル層から 4 ml をとり，1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 4 ml を加え，再び振盪，遠心分離後，緩衝液層から 2 ml をとり，これに 0.1 N HCl 1.5 ml を加えて蛍光強度を測定した。（励起波長：345 nm，蛍光波長：410 nm）また平衡透析実験においては FR を含む試料 1.5 ml に 0.1 N HCl 1.5 ml を加えて同様に蛍光強度を測定した。

速度論的パラメータの算出 血漿中 FR 濃度の時間的推移のデータから 2-コンパートメントモデルに従うと想定し，最小 2 乗法により 2-コンパートメントモデルの式 (1) 中の定数値 P , Q , α , β を求めた。

$$C_p = P \cdot \exp(-\alpha t) + Q \cdot \exp(-\beta t) \quad \dots\dots\dots (1)$$

さらに常法により Fig. 4 の注射中に示す速度論の数値， V_1 , V_2 , k_{12} , k_{21} , k_{10} を求めた。ただし， V_1 は体液（又は血液）コンパートメント容積 (ml/kg)， V_2 は組織コンパートメント容積 (ml/kg)， k_{21} は組織から体液への， k_{12} は体液から組織への， k_{10} は体液からの FR の消失の一次速度定数 (min^{-1}) である。なお，実験に用いた急性腎不全家兎は何れも BUN 値が 50 以上のものである。

結 果 と 考 察

HgCl₂ 投与急性腎不全家兎の血中内因性物質濃度の変動

ラットに HgCl₂ を投与して急性腎不全を生起させた際の血中内因性物質の測定値の変動については長瀬ら⁹⁾が詳細に報告している。しかし，家兎における系統的な報告は未だ見あたらない。したがって病態の進行度と薬物の体内動態の関係を知るために，まず血中内因性物質 (BUN, Cre., FFA) の変動を測定して病態の進行の尺度とすることを試みた。

Fig. 1 は家兎大腿部に HgCl₂ を 10 mg/kg 筋注後の BUN, Cre., FFA の血中濃度の経日的な推移の典型的なパターンである。BUN, Cre. の両値は一般に投与後 3 日で最高に達し，以後 10 日から 2 週間で正常値に回復する傾向があった。ただし，BUN が 3 日目で 150 mg/dl 以上を示す場合は無尿と顕著な体重減少を示し，死亡する例が多かった。FFA は薬物の血漿蛋白結合を阻害するものとして知られており，長瀬ら⁹⁾によれば，HgCl₂ 投与後の値は正常値の 2 倍程度に増加すると報告されているが，今回の家兎を用いた実験では有意な変化はみられなかった。むしろ FFA は食事の影響のため，日内変動が大きいことに注意しなければならない。HgCl₂ 投与後の BUN と Cre. の両数値間には Fig. 2 に示すように，かなり良好な相関性が認められた。したがって，以後

Fig. 1. Representative Pattern of Blood Urea Nitrogen (BUN), Plasma Creatinine (Cre.) and Free Fatty Acid (FFA) Concentrations after HgCl₂ Administration

Key: ●: blood urea nitrogen, ○: plasma creatinine, ▲: free fatty acid, ▨: normal level of rabbit endogenous substances.

Fig. 2. Relationship between Blood Urea Nitrogen (BUN) and Plasma Creatinine (Cre.) Concentrations

Key: ○: normal, ●: acute renal failure.

Fig. 3. Representative Plasma Concentration Curve of Furosemide after Intravenous Administration (10 mg/kg) to Normal Rabbit (○) and Acute Renal Failure Rabbit by HgCl_2 (●)

BUN of normal and renal failure rabbits used in this experiment were 28.5 and 74.3 mg/dl, respectively.

BUN 測定により病態進行の尺度となすことにしたがこれは Cre. の測定に比べ、微量の試料 (0.02 ml) 採取で定量ができるからである。

血漿中の総蛋白濃度は正常時平均 8.3 g/dl で HgCl_2 投与後にも変動はみられなかった。しかし、血漿蛋白中にしめるアルブミンの % は正常家兎では約 70% であったが HgCl_2 投与後には約 65% まで低下した。とくに BUN が 100 mg/dl 以上に上昇すると 53% まで低下した例もあった。また、セルロース・アセテート膜電気泳

Fig. 4. Difference of Various Pharmacokinetic Parameter for Furosemide between Normal Rabbit (N, ○) and Acute Renal Failure Rabbit by HgCl_2 (R.F., ●)

Pharmacokinetic parameters are shown in the following figure (two-compartment model).

動の結果から、 HgCl_2 投与後には α, β -グロブリン分画に増加の傾向が認められた。

急性腎不全家兎血中からの FR 消失

Fig. 3 に正常時と腎不全時の家兎に FR を 10 mg/kg 静注後の典型的な血漿中濃度の推移パターンを示す。正常時に比べて腎障害時には FR は血漿中からの消失が遅くなることが認められた。FR の腎排泄はそのほとんどが尿細管分泌によることが知られており、¹⁰⁾ HgCl_2 投与によって尿細管が大きな障害をうけることが予想できる。

得られた薬物速度論的パラメータを Fig. 4 中にまとめて示した。このなかで体液コンパートメント容積 (V_1) は正常と病態ではほとんど変化が認められないのに対し、組織コンパートメント容積 (V_2) は病態においてやや増加の傾向がある。このことは体液以外の他の組織中への分布が活発化し、特定の臓器中への蓄積を示唆するものと思われる。各速度定数のうち、病態において最も変化したものは消失速度定数 (k_{10}) であり、これは代謝過程が阻害を受けたのではなく、腎障害により、腎排泄が大きく減少したためと考えるべきである。

k_{10} 値は病態の指標となる BUN, Cre. と良好な相関性が認められた。すなわち、 k_{10} と BUN および Cre. について両対数プロットを行ったものが Fig. 5, 6 である。いずれも相関係数 0.9 程度の値を得ることができた。当然のことではあるが家兎への HgCl_2 投与につづく腎障害の進行度と薬物消失速度定数 (k_{10}) の減少とは関連性があるものと思われる。従って逆にこの相関性を利用して家兎の BUN あるいは Cre. の測定値より k_{10} を予測し、薬物投与の変更により、血中濃度の制御を行うことも可能であろう。

Fig. 5. Relationship between Blood Urea Nitrogen (BUN) and Elimination Rate Constant (K_{10})

Key: ○: normal, ●: acute renal failure.

Fig. 6. Relationship between Plasma Creatinine Concentration (Cre.) and Elimination Rate Constant (K_{10})

Key: ○: normal, ●: acute renal failure.

TABLE I. Binding of Furosemide with Rabbit Plasma Protein and Concentration of Endogenous Substances in Normal and Acute Renal Failure Rabbit Plasma

	Binding percent ^{a)}		Binding constant (K , $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$)	Maximum binding concentration (nM, $\times 10^{-5} \text{ M}$)	Plasma creatinine (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Total protein (g/dl)
	To plasma	To 1/10 dilution plasma					
Normal	99.0 $\pm$ 0.4 ^{c)}	82.3 $\pm$ 3.3	3.2 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.4	1.47 $\pm$ 0.39	15.2 $\pm$ 0.8	8.3 $\pm$ 0.5
R.F. ^{b)} No. 1	93.0	75.5	1.3	8.0	8.00	89.1	7.9
No. 2	92.3	67.6	0.9	9.1	7.95	107.0	8.1
No. 3	96.0	78.2	1.9	7.9	4.93	97.2	8.2
No. 4	96.2	65.5	1.7	8.2	3.87	55.2	7.2
No. 5	87.8	64.0	0.7	7.1	12.40	167.8	6.0
No. 6	97.5	78.0	1.9	8.5	4.23	150.9	7.0
No. 7	91.3	72.5	0.9	8.2	8.24	100.2	6.8

a) Furosemide concentration was $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ in this experiment.

b) Acute renal Failure (R.F.) was induced by intramuscular injection (i.m.) of HgCl_2 .

c) Values represent the mean $\pm$ S.D.

急性腎不全家兎の血漿蛋白とFRとの結合

平衡透析法により正常家兎および急性腎不全家兎の血漿とFRの結合性を検討した結果をTable Iにまとめて示した。FR, 1×10^{-4} M ($33 \mu\text{g/ml}$)の濃度において血漿との結合率は正常時, 99%であるが急性腎不全時には低下することが明らかである。血漿を $1/15$ M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で10倍希釈して行った場合, その差はさらに顕著になる。

10倍希釈の血漿を用いてFR濃度範囲 10^{-4} — 10^{-6} Mにおいて平衡透析を実施し, 得られたデータを用いてSandberg-Rosenthalプロットを行ったものがFig. 7である。Fig. 7から計算できるFR-血漿蛋白結合定数 (K), 最大結合濃度 (nP)はさきに示したTable I中に併記した。

得られた値のうち, nPには正常家兎と急性腎不全家兎では大きな相違は認められなかったが, K については大きく低下していることがわかった。このことはすでに報告²³⁾した腎不全患者の血漿を使用して行った実験結果と同様な傾向であり, 腎障害に伴って体内で生じる何らかの内因性物質による結合の阻害が原因であると考えられる。これらの事実は HgCl_2 投与による急性腎不全家兎血漿が腎障害患者血漿の代用として実験遂行上きわめて有用であることを示すものであり, 今後, 内因性で結合阻害を演じる物質の追求のため, 利用して行きたいと考えている。

Fig. 7. Representative Sandberg-Rosenthal Plots for Binding of Furosemide to Rabbit Plasma

Key: normal rabbit plasma (○, BUN: 12.4 mg/dl), acute renal failure rabbit plasma (●, BUN: 100.2 mg/dl).

引用文献および注

- 1) 本報を「医薬品と血液成分との相互作用 (第14報)」とする。
第13報: H. Yoshitomi, S. Kiko, K. Ikeda, S. Goto, *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 771 (1983).
- 2) S. Goto, H. Yoshitomi, A. Miyamoto, K. Inoue, M. Nakano *J. Pharm. Dyn.*, **3**, 667 (1980).
- 3) S. Goto, H. Yoshitomi, A. Miyamoto, H. Yamada, S. Fujii, T. Nakayama, K. Fujiwara, *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 865 (1981).
- 4) 紫田 進, 佐々木匡秀, “日常臨床化学超微量定量法,” 金芳堂, 東京, 1966, p. 239.
- 5) 北村元仕, “実践臨床化学,” 医歯薬出版, 東京, 1974, p. 243.
- 6) “NEFA-Test 試薬使用説明書,” 和光純薬, 1981, に従い実施した。
- 7) O.H. Lowry, N.J. Rosebough, A.L. Farr, R.J. Randall *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 8) S. Goto, H. Yoshitomi, M. Kishi, *Yakugaku Zasshi*, **97**, 1219 (1977).
- 9) 長瀬すみ, 田中寿子, “実験動物の臨床化学データ,” ソフトサイエンス社, 東京, 1976, p. 292.
- 10) M. Nakano, Y. Hirotsu, S. Goto, Y. Araki, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2301 (1980).