薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (5) 475-480 (1985)

アルブミン値低下を伴ったてんかん患者のフェニトイン蛋白結合率の変動

間々田久美子,^{*,a} 粕谷泰次,^a 辺見 仁,^b 高橋洋一,^b

染谷一彦,^b 高尾良洋,^c 佐々木康人^d

東京薬科大学,^a 聖マリアンナ医科大学第三内科,^b

同薬剤部,^c 東邦大学放射線科^d

The Variability of Plasma Protein Binding of Phenytoin in Epileptic Patients with Hypoalbuminemia

KUMIKO MAMADA,^{*,a} YASUJI KASUYA,^a JIN HENMI,^b YŌICHI TAKAHASHI,^b

KAZUHIRO SOMEYA,^b YOSHIHIRO TAKAO,^c and YASUTO SASAKI^d

Tokyo College of Pharmacy,^a 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo, 192-03, Japan,

St. Marianna University School of Medicine,^{b,c} 2095, Sugao, Miyamae,

Kawasaki, Kanagawa, 213, Japan, and Tōhō University,^d 5-21-16

Ōmorinishi Ōta-ku, Tokyo, 143, Japan

(Received November 19, 1984)

The plasma protein binding of phenytoin in man is about 90% and the impaired plasma binding may lead to large variations in the unbound fraction of phenytoin in the plasma. In the present study, the percent of unbound phenytoin was accurately determined by equilibrium dialysis by using ¹⁴C-labeled phenytoin. When intra- and intersubject differences in the plasma binding were studied in 22 patients during long-term treatment with phenytoin, a strong linear correlation was observed between the unbound fraction of phenytoin and albumin concentration. The obtained results of the linear correlation were demonstrated to be of clinical significance in predicting the percentage of unbound phenytoin in patients with moderate hypoalbuminemia (plasma albumin of 2.0 to 3.0 g/100 ml).

Keywords—phenytoin; plasma protein binding; equilibrium dialysis; epileptic patients; albumin concentration

ここ数年来、薬物血中濃度モニタリングに基づき適切な薬物治療を進めるいわゆる therapeutic drug monitoring に多くの関心が向けられるようになってきた。特に、長期にわたる投与が必要となる抗てんかん薬のなかで、フェニトイン(以下 DPH と略す)は、有効血中濃度範囲が 10–20 µg/ml と狭く、^{1,2)} また DPH の代謝は比較的低い血中濃度においても飽和してしまうため、³⁾ 血中濃度モニタリングを行うことは有効かつ安全な治療を進める上で重要な意義をもっている。さらに DPH のように血中アルブミンとの結合率が約 90%⁴⁾ と高い薬物では、蛋白結合率のわずかな変化が薬効・中毒発現に大きく影響してくることから、治療経過中に血清アルブミン値の低下が観察されるような際には、血中 DPH 総濃度よりも、遊離型濃度が臨床効果の評価の上でより有効な指標となる。^{5,6)} したがって著者らは、まず DPH 蛋白結合率の測定法についての検討を行い、次に DPH 蛋白非結合率と血清アルブミン値との関係について検討し、蛋白非結合率測定の臨床的意義について考察した。

実 験 の 部

1. 試料・試薬 健康人の蛋白結合率測定の際に添加した DPH は大日本製薬、5,5-[4-¹⁴C]-diphenylhydantoin (比放射能; 47.05 mCi/nmol, 放射化学的純度; 99%) は New England Nuclear 社製のものを、penta-deuterophenytoin (以下 DPH-*d*₅ と略す) はすでに報告した方法で合成したものをを用いた。⁷⁾

2. 採血 血漿中の DPH 総濃度及び蛋白結合率を測定するために健康人又は各患者の病態の推移に合わせ、肘静脈よりヘパリン採血を行い、3000 rpm で 10 分間遠心後、血漿を分離し、測定日まで -20°C で凍結保存した。また生化学検査には血清を用い、クリナライザー H-12 とクリナライザー HF-6 (日本電子) を使用

し、血清総蛋白濃度、アルブミン-グロブリン比 (A/G 比)、glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), lactic dehydrogenase (LDH), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), leucine aminopeptidase (LAP), alkaline phosphatase (Al-P), cholinesterase (ChE), indocyanine green (ICG), 血清クレアチニン, blood urea nitrogen (BUN), 尿中クレアチニンと尿中蛋白濃度の測定を行った。

3. 血漿中 DPH 総濃度の測定 血漿中の DPH 総濃度の測定は、すでに報告したマスマグメントグラフィ法にて行った。⁷⁾ すなわち、血漿 100 μ l に内部標準としてメタノールに溶解した DPH- d_5 を 302.85 ng 加え、塩酸酸性にしてクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧留去した。残渣をメタノールに溶解し、ジアゾメタン (エーテル溶液) を加えメチル化した後、thin layer chromatography (TLC) で分離精製した試料をメタノール 100 μ l に溶解し、その 1 μ l を gas chromatography-mass spectrum (GC-MS) に注入した。この分析法による精度は、DPH が 0.05–10.0 μ g の間で、相対誤差が 3% 以下と良好であった。

4. 蛋白結合率の測定 透析器は Fig. 1 に示すように、容量 2 ml のガラス製容器を 2 つ合わせたものを使用した。透析膜には、ヴィスキングチューブ (21.4 Å のユニオンカーバイト社) を用い、一方の容器には血漿 500 μ l に 14 C-DPH を 0.1 μ Ci 加え、もう一方の容器には 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500 μ l を入れ、37°C の恒温器 (IC-42 型, ヤマト科学) 中で 18 時間振盪した。透析終了後、血漿液側と緩衝液側からそれぞれ 50 μ l 取り、液体シンチレーションカウンター (Aloka Liquid Scintillation System LSC 900, アロカ株式会社) を用いて放射能 (dpm) を測定し、次式により DPH の蛋白非結合率 (f_u) を算出した。

Fig. 1. Apparatus for Equilibrium Dialysis

$$\text{蛋白非結合率} = \frac{\text{緩衝液中の dpm}}{\text{血漿液中の dpm}} \times 100 (\%) \quad \dots (1)$$

5. 平衡透析法の条件に関する検討 健康人のプール血漿を用い、濃度が 10 μ g/ml となるように DPH を添加した試料につき透析時間 (37°C で 2, 6, 9, 15, 18, 24, 36, 48 時間) 及び透析温度 (8, 25, 33, 37, 40.5°C で 18 時間) による影響を調べるため、各条件下でそれぞれ 3 検体ずつ用意した。また DPH 濃度の違いによる蛋白結合率への影響は、健康人 3 名の血漿を用い、DPH を 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 μ g/ml の濃度となるように加え、37°C で 18 時間透析を行い検討した。さらに追加実験として、健康人 1 名の血漿を用い、同じ平衡透析条件下で DPH 濃度が 5 μ g/ml 及び 33 μ g/ml となるように加えた各 6 検体の蛋白結合率を調べた。一方血漿試料の保存期間が蛋白結合率に影響を与えるかどうかを調べるため、健康人 1 名の血漿に DPH 濃度が 10 μ g/ml となるように加え、採血当日、2, 7, 30, 60 日及び一年目に 37°C で 18 時間の透析を行った。

6. 平衡透析法の再現性に関する検討 本透析法による再現性は、同一健康人の血漿を用い、DPH 10 μ g/ml で合計 12 検体用意し、日内及び日間の測定値の変動を調べることににより検討した。

7. 健康成人における蛋白結合率の測定 健康成人における蛋白結合率の個人差について調べるために、健康成人 7 名 (男 5 名, 女 2 名, 23–35 才) を対象に、それぞれの血漿試料に DPH 濃度が 10 μ g/ml となるように加え、37°C で 18 時間透析を行い蛋白結合率を測定した。

8. 対象患者 患者 22 名 (男 10 名, 女 12 名, 28–84 才) 中、22 名はてんかん患者、2 名は不整脈のため DPH による治療を受けていた。このうち、低アルブミンと認められる患者 (アルブミン値が 3.4 g/dl 以下) の血漿試料は 31 検体であった。この間、DPH の蛋白結合率に影響を与えられる薬 (バルプロ酸, サリチル酸, 非ステロイド性抗炎症薬等) の併用は行われていなかった。さらに 1 例 (脳卒中後遺症, 女, 62 才, 44 kg) については、臨床経過及びアルブミン値の変動に伴う DPH 蛋白結合率を 4 ケ月間にわたって追跡測定した。

結

果

1. 平衡透析法の条件に関する基礎検討

透析温度 37°C における平衡透析時間と DPH の蛋白結合率との関係は、Fig. 2 に示すごとく透析開始後 2 時間で 12.4%, 9 時間で 13.0% と上昇し続け、15, 18, 24 時間の時点では $13.8 \pm 0.39\%$ とほぼ一定の値を示した。その後、32, 48 時間において蛋白非結合率は約 16% まで上昇した。そこで以後の平衡透析の実験において

Fig. 2. Relationship between Unbound Fraction (%) and Incubation Time

は、透析時間を 18 時間に設定した。

一方、DPH の蛋白非結合率と透析温度との関係については、Fig. 3 から明らかなように、温度の上昇とともに蛋白非結合率がほぼ直線的に増加し、透析温度は蛋白結合率に大きく影響することが明らかとなった。

健康人の血漿に DPH を 0.1—100.0 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え、37°C で 18 時間平衡透析を行い、各濃度での DPH の蛋白非結合率を求めたところ、Table I に示すごとく、この濃度範囲では蛋白非結合率の値がほぼ一定しており、蛋白結合の飽和は問題とならないことが確認された。さらに臨床上問題となる低濃度と高濃度範囲内での蛋白結合率の変動をより詳細に調べることを目的に、同一健康人の血漿を用い、DPH 濃度が 5 $\mu\text{g/ml}$ と 33 $\mu\text{g/ml}$ における蛋白非結合率を測定したところ、各濃度それぞれ 6 検体における平均値は 5 $\mu\text{g/ml}$ の場合では 12.5% (CV: 1.94%), 33 $\mu\text{g/ml}$ の場合では 12.2% (CV: 2.66%) と一定の値が得られた。

血漿試料を -20°C で凍結保存した場合に、DPH の蛋白結合率が保存期間中に変動するかどうか調べたところ、採血当日及び採血後 2, 7, 30, 60 日及び一年経過した時点での DPH の蛋白非結合率は、それぞれ 14.1% ($n=3$, CV: 2.35%), 14.5% ($n=3$, CV: 3.32%), 13.2% ($n=3$, CV: 3.19%), 14.2% ($n=3$, CV: 2.02%), 14.5% ($n=2$) と、一年目までの保存期間は蛋白結合に何ら影響を与えないことが明らかとなった。

37°C の恒温器中で 18 時間平衡透析を行うことにより DPH の蛋白結合率を測定した本法の日内及び日間の測定変動係数は 3.1%, 3.8% 以下で、再現性は良好であった (Table II)。

TABLE I. Unbound Fraction (%) of DPH in Plasma at Various Concentration Levels

Subject	Total DPH concentration ($\mu\text{g/ml}$)				Mean (%)	CV (%)
	0.1	1.0	10.0	100.0		
N.Y.	12.4	12.7	12.5	13.1	12.7	2.11
G.K.	13.0	12.7	12.0		12.6	3.33
K.M.	15.2	15.1	16.3	16.8	15.9	5.25

TABLE II. Within Day and Day-to-Day Precision

	Within day			Day-to-day
Mean unbound Fraction (%)	13.7 (3)	13.0 (6)	13.7 (3)	13.5 (3)
CV (%)	1.82	3.10	2.34	2.99

Figures in parentheses indicate the number of samples.

Fig. 3. Relationship between Unbound Fraction (%) and Incubation Temperature

Fig. 4. Relationship between Bound and Unbound Fraction versus Albumin Concentration

$$y = 1.155x, r = 0.950.$$

Fig. 5. Relationship between Unbound Fraction of DPH (%) and Serum Albumin Concentration

$$y = -4.507x + 36.102, r = -0.787.$$

●, 20 epileptic patients ($n=79$), ▲, 2 epileptic patients with uremia ($n=3$).

7名の健康成人を対象に、血漿 DPH 濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ の DPH 蛋白非結合率を本法により測定した結果、蛋白非結合率は 14.4% (CV: 5.2%) であり、個人間で大きな差は認められなかった。

2. 臨床データ

本研究で対象とした 22 名の患者のなかで、治療期間中に低アルブミン血症を併発したてんかん患者 1 名について、アルブミン値と DPH 蛋白非結合率を 4 ケ月間にわたり測定を行い、その結果を Fig. 4 に示した。本患者の測定期間中の DPH 投与量は $210\text{--}300 \text{ mg/d}$ であり、その血漿中濃度は $3.26\text{--}23.22 \mu\text{g/ml}$ であった。また生化学検査値の中では、 $\gamma\text{-GTP}$ (正常値: $3\text{--}12 \text{ mU/ml}$) が 28 mU/ml から次第に上昇し、DPH 服用開始後 25 日目には 90 mU/ml 以上となり、 Al-P (正常値: $80\text{--}260 \text{ mU/ml}$) は $170\text{--}392 \text{ mU/ml}$ と幾分高値を示した他は、特に著しい異常は認められなかった。Fig. 4 に示したアルブミン値と蛋白結合率/蛋白非結合率の関係は一般に、質量作用の法則から、薬物濃度が低い場合には近似式として次式で表現することができる。^{11,12)}

$$\frac{1-f_u}{f_u} = n \cdot K \cdot P \quad \dots\dots (2)$$

ここで n はアルブミン 1 モルの有する結合部位数を、 K は結合定数、 P はアルブミン総濃度を表す。この式から、Fig. 4 の両者の関係は原点を通る直線となるはずであり、その傾きは $n \cdot K$ 値を示しているといえる。これより両者の間の相関係数は 0.950 とな、その傾きから算出した $n \cdot K$ 値は約 7.97×10^3 となった。

Fig. 5 は DPH 服用中の 22 名の患者のうち 20 名の患者から得た合計 79 検体につき、血漿中 DPH 総濃度、蛋白非結合率及びアルブミン値を測定し、これらの値から蛋白非結合率とアルブミン値の関係を検討したものである。両者の間には、 $y = -4.507x + 36.102$, $r = -0.787$ で負の相関関係 ($P < 0.01$) が得られた。

考 察

蛋白結合率の測定に関しては、すでに種々の方法が報告されており、同じ平衡透析法においても、透析温度、透析時間、緩衝液など透析条件がさまざまであるため、得られた結果もこれらの条件の違いから一定していない。著者らも平衡透析法以外に活性炭吸着法、超遠心分離法 (Amicon centriflo membrane cone, CF 25: アミコン・ファー・イースト・リミテッド社) による DPH の蛋白結合率測定についても検討したが、活性炭吸着法では活性炭の必要量が DPH の濃度により異なり、また超遠心分離法では再現性が悪く (CV: 22%), 使用するには至ら

なかった。

平衡透析時間が 24 時間以後 32, 48 時間で蛋白非結合率が再び上昇した原因としては (Fig. 2), 長時間のインキュベーションにより微生物が繁殖し, 蛋白が変性したためと考えられる。⁸⁾

平衡透析温度による蛋白結合率の違いについて Lund ら⁹⁾ や Kinniburgh ら¹⁰⁾ は 37°C の方が蛋白非結合率が室温で行った時より高くなることを指摘しているが, 今回の著者らの実験結果 (Fig. 3) においても透析温度が DPH の蛋白結合率に大きく影響することが確かめられた。

Odar-Cederlöf ら¹¹⁾ は, 健康人の血漿 (アルブミン濃度: 4 g/dl) に DPH を 250 $\mu\text{g/ml}$ 以上加えた時, 蛋白結合率が DPH の濃度に依存し低下するが, 100 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では, ほぼ一定した蛋白結合率が得られたと報告している。高濃度の DPH を使用した際の蛋白結合の飽和に関して検討した著者らの実験においても, これと同様の結果が得られた (Table I)。

一方, Odar-Cederlöf と Borgå¹¹⁾ 及び Kinniburgh と Boyd¹⁰⁾ は, 健康人の $n \cdot K \cdot 10^{-3}$ 値はそれぞれ 10.72 ± 0.36 及び 10.3 , 尿毒症あるいは人工透析治療中の患者では 5.88 ± 0.52 及び 6.7 であったと報告している。本研究において低アルブミン血症を併発した 1 名の患者について 4 ケ月間 DPH の蛋白結合率を追跡測定し, 得られた結果から算出した本患者の $n \cdot K \cdot 10^{-3}$ 値は 7.97 となり, 上記の報告と比較すると本患者では腎機能の異常は認められなかったものの, 健康人と腎不全患者の中間の値を示した。

著者らが対象とした 22 名の患者のうち 20 名の 79 検体から得た DPH 蛋白結合率とアルブミン値の間には, 同一個人内においてのみならず, 個人間においても良い相関が得られたことから (Fig. 4, 5), 蛋白結合率の測定が困難な際には, Fig. 4 あるいは Fig. 5 に示した関係に基づき, アルブミン値から DPH 蛋白非結合率を充分予測し得ると考えられる。これら DPH 蛋白結合率とアルブミン値の関係について Gugler ら¹³⁾ や Porter ら¹⁴⁾ は検体数は 14 ないし 27 と少ないものの, 本研究結果と同様の傾向が示されたことをすでに報告している。しかし本研究において, 重篤な尿毒症を併発しており, クレアチニン・クリアランスが 10 ml/min 以下の 2 名の患者から得られた 3 検体につき測定した蛋白非結合率は, $34.3\text{—}38.7\%$ という異常な高値を示した (Fig. 5 の▲印)。この異常な高値は, アルブミン値の低下のみでは説明することが困難であり, すでに報告^{15,16)} されているように, 尿毒症の患者では, アルブミンと結合する遊離脂肪酸などの内因性物質の増加, 体液 pH の低下, 結合アルブミンの質的变化などについても結合率低下の要因として考える必要のあることが示唆された。したがってこのような患者においては, 単にアルブミン値のみから蛋白結合率を予測すると蛋白非結合濃度を低く見積るという可能性があり, その危険性について充分考慮する必要がある。^{17,18)}

血中濃度モニタリングのデーターに基づき適切な薬物治療を進める際に重要なことは, 薬物による治療効果・中毒発現について合理的に評価のできる指標を得ることである。この観点から, 薬理作用発現に係わる, いわゆる作用組織へ移行することのできる血中遊離型の薬物濃度の測定が重要となる。本研究で対象とした 22 名の患者の中には, 血漿中 DPH 総濃度が $11.2 \mu\text{g/ml}$ から $17.7 \mu\text{g/ml}$ と有効治療濃度範囲内であるにもかかわらず, ねむけや眠振など, DPH による副作用と考えられる症状が 5 例において観察されている。これらの患者における副作用発現時の血漿 DPH 遊離型濃度は $2.6 \mu\text{g/ml}$ から $3.1 \mu\text{g/ml}$ で, いずれの症例においても高値を示した。これらの事実から, 蛋白結合率が変化した際には, 血漿中 DPH 総濃度の測定値のみを治療効果の指標とすることは妥当ではないと考えられる。しかし血中濃度モニタリングを実施する場合, 血漿中の総薬物濃度の測定が行われるのが現在のところ一般的であり, 遊離型濃度の測定は測定法の困難性などの理由からほとんど行われていない。このため, 血漿中の薬物総濃度の測定値から遊離型濃度を予測することは治療上重要なことと思われる。そこで著者らは, 次式より血漿 DPH 総濃度及び蛋白非結合率の実測値と, 本研究で得た健康人の平均 DPH 蛋白非結合率 (14.4%) から, 対象患者の DPH 蛋白結合率が正常な時の DPH 総濃度を算出した。

$$C_p = \frac{C_p' \times f_u'}{f_u} \quad \dots\dots (3)$$

ここで C_p は蛋白結合率が正常な時の血漿中の DPH 総濃度 ($\mu\text{g/ml}$), f_u は健康人の DPH 蛋白非結合率 (14.4%), C_p' 及び f_u' はそれぞれ患者血漿中の DPH 総濃度 ($\mu\text{g/ml}$) と蛋白非結合率 (%) の実測値を表す。

一方, アルブミン値に変動が見られた場合の血漿 DPH 総濃度 (C_p') を, アルブミン値が正常な場合の DPH

総濃度 (C_p) に次式を用いて換算した。¹⁹⁾

$$\frac{C_p'}{C_p} = (1 - f_u) \times \frac{P'}{P} + f_u \quad \cdots \cdots (4)$$

ここで P は正常アルブミン値 (3.5—5.7 g/dl) を, P' は患者血清中のアルブミン値を表し, 計算に際しては P については平均値 4.7 g/dl, f_u については前式と同様に 14.4% を, また P' , C_p' については患者の実測値を用いた. ここで算出された C_p 値を, 先の (3) 式から求めた C_p 値と比較した結果 (Fig. 6), 両者の間には $y = 0.885x + 0.614$ とほぼ原点を通る直線関係が認められた. 以上より, DPH の蛋白結合率の実測が困難な際には, 患者のアルブミン値をもとに, (4) 式から正常域内のアルブミン値における DPH 総濃度の算出が可能と考えられる. こうして得られた DPH 総濃度の値に基づき, 治療効果の判定あるいは中毒発現の予測が可能と考えられ, このことは適切な投与設計を進める上できわめて有用なことと思われる.

Fig. 6. Correlation of Estimated Total Plasma Concentrations

$$y = 0.885x + 0.614, r = 0.989.$$

$$x\text{-axis } C_p = \frac{C_p' \times f_u}{f_u}$$

$$y\text{-axis } C_p = \frac{C_p'}{(1 - f_u)(P'/P) + f_u}$$

引用文献

- 1) H. Kutt, W. Winters, R. Kokenge, F. McDowell, *Arch. Neurol.*, **11**, 642 (1964).
- 2) L. Lund, *Arch. Neurol.*, **31**, 289 (1974).
- 3) G. W. Houghton, A. Richens, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1**, 155 (1974).
- 4) W. Löscher, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **208**, 429 (1979).
- 5) H. E. Booker, B. Darcey, *Epilepsia*, **14**, 177 (1973).
- 6) The Boston Collaborative Drug Surveillance Program, *Clin. Pharmacol. Therap.*, **14**, 529 (1973).
- 7) S. Baba, T. Goromaru, K. Yamazaki, Y. Kasuya, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 1300 (1980).
- 8) T. W. Guentert, S. Øie, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 325 (1982).
- 9) K. M. Lund, A. Rane, S. J. Yaffe, L. Lund, F. Sjöqvist, *Clin. Pharmacol. Therap.*, **11**, 846 (1970).
- 10) D. W. Kinniburgh, N. D. Boyd, *Clin. Pharmacol. Therap.*, **29**, 203 (1981).
- 11) I. Odar-Cederlöf, O. Borgå, *Clin. Pharmacol. Therap.*, **20**, 36 (1977).
- 12) A. Goldstein, *Pharmacol. Rev.*, **1**, 102 (1949).
- 13) R. Gugler, D. W. Shoeman, D. H. Huffman, J. B. Cohlmiä, D. L. Azarnoff, *J. Clin. Invest.*, **55**, 1182 (1975).
- 14) R. J. Porter, R. B. Layzer, *Arch. Neurol.*, **32**, 298 (1975).
- 15) W. A. Craig, M. A. Evenson, R. P. Sarver, J. P. Wagnild, *J. Lab. Clin. Med.*, **87**, 637 (1976).
- 16) E. Perucca, *Therap. Drug. Monitoring*, **2**, 331 (1980).
- 17) K. Lynn, R. Braithwaite, S. Pawling, R. Rosser, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **19**, 73 (1981).
- 18) E. Martin, J. G. Gambertoglio, D. S. Adler, T. N. Tozer, L. A. Roman, H. Grausz, *JAMA*, **238**, 1750 (1977).
- 19) M. A. Koda-Kimble, B. S. Katcher, L. Y. Young, "Applied Therapeutics for Clinical Pharmacists," 2nd ed by M. E. Winter, Applied Therapeutics Inc., San Francisco, 1978, pp. 11—32.