

血清中タクロリムス濃度の変動因子に関する検討 —血清タンパク結合の観点から—

*緒方 賢次 **†高村 徳人 **徳永 仁 ***藤田 健一
****本屋 敏郎 *山崎 啓之 *有森 和彦

Study of the Change Factors of Tacrolimus Concentration in Serum :
From a Viewpoint of Serum Protein Binding

*Kenji OGATA **†Norito TAKAMURA **Jin TOKUNAGA ***Ken-ichi FUJITA
****Toshiro MOTOYA *Keishi YAMASAKI *Kazuhiko ARIMORI

Abstract

Tacrolimus (FK506), which is a potent immunosuppressive drug, has the excellent effect for prevention of rejection after an organ transplantation. Although the pharmacological activity of FK506 depends on its serum concentration, the serum concentration of FK506 is widely fluctuated. We hypothesized that the change of FK506 serum concentration is concerned with the protein binding of FK506, because it is well-known that FK506 bind to serum proteins strongly in general. However, the change factors of FK506 serum concentration were not studied. Therefore, the present study was undertaken to investigate the relationship between the change of FK506 serum concentration and serum protein binding of FK506, as well as to identify the binding sites of FK506.

Binding activities of FK506 to serum, human serum albumin (HSA), α_1 -acid glycoprotein (AGP) and human immunoglobulin (IgG) were examined by ultrafiltration method.

Serum concentration of FK506 was only elevated by the increment of AGP concentration in whole blood system. This means that FK506 transferred from blood cells to serum with increasing AGP concentration. In the study of binding sites of FK506, it is obvious that FK506 bind to the overlapping region of acidic and basic drug binding site on AGP molecule.

It is important to check AGP serum concentration for a dosage plan of FK506.

Key words : tacrolimus, protein binding, α_1 -acid glycoprotein, human serum albumin

キーワード : タクロリムス, タンパク結合, α_1 -酸性糖タンパク, ヒト血清アルブミン

*宮崎大学医学部附属病院薬剤部 〒889-1692 宮崎県宮崎郡清武町大字木原5200

Department of Pharmacy, Miyazaki Medical College Hospital, 5200 Kihara, Kiyotake-cho, Miyazaki-gun, Miyazaki 889-1692, Japan

**九州保健福祉大学薬学部臨床薬学第二講座 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町1714-1

Second Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshino, Nobeokacity, Miyazaki 882-8508, Japan

***埼玉医科大学臨床腫瘍科 〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38

Department of Clinical Oncology, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama-cho, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan

****九州保健福祉大学薬学部臨床薬学第一講座 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町1714-1

First Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshino, Nobeokacity, Miyazaki 882-8508, Japan

†通信著者 Corresponding Author

緒言

免疫抑制薬であるタクロリムス（以下FK506と略す）は臓器移植後の拒絶反応を抑えるために優れた効果を発揮する。しかしながら、適切に投与されないで腎機能や肝機能に障害を与えることが知られている。したがって、これらの副作用を回避し効果を高めるために、FK506はTherapeutic Drug Monitoring (TDM) により、最適な投与設計を企てる必要がある。

Backmanらは肝移植後の免疫抑制コントロールにFK506を使用し、全血中および血清中FK506濃度と臨床効果の相関を検討した。その結果、全血中よりも血清中濃度との関係が臓器障害や急性拒絶と優位に相関がみられたため、FK506のTDMは血清中濃度で行うべきだとしている¹⁾。また、一般にFK506の全血中と血清中の濃度比率は患者間および患者内においても変動が大きいことが知られている。

これらの報告よりFK506の薬効は全血中濃度よりも血清中濃度に大きく依存するが、血清中濃度は患者の状態により大きく変化することが考えられる。しかし、血清中FK506濃度の変動因子について検討した報告はほとんどない。そこで我々は、FK506の高いタンパク結合率(99%以上)に注目し、血清タンパク結合の観点から血清中FK506濃度の変動要因の解明を試みた。また、血清タンパクに対するFK506の結合サイトの同定を行ったので報告する。

材料と方法

1) 材料

FK506原末は藤沢薬品工業（株）より提供を受けた。ヒト血清アルブミン（HSA）、 α_1 -酸性糖タンパク（AGP）、イムノグロブリン（IgG）、ワルファリン、フェニルブタゾン、ジアゼパムおよびベラパミルはSIGMA社より購入した。AGPの測定にはMBLプレートの α_1 -AGプレート（医学生物学研究所）を用いた。限外ろ過器はULTRACENT-10を東ソー（株）より購入した。その他の試薬および溶媒類は全て市販特級品を用い、緩衝液は1/15Mリン酸緩衝液を使用した。

2) 方法

FK506のタンパク結合形および遊離形試料の調整は次のように行った。まず、血清タンパク種のうちヒト血清

は健常人のものを、各血清タンパク（HSA、AGPおよびIgG）は1/15Mリン酸緩衝液（pH7.4）に溶解し種々濃度に調整した。FK506はメタノールに溶解し、マイクロシリンジで目的濃度になるように添加した。次に、これら試料を限外ろ過（3000rpm, 10分）し、得られたろ液を分取・調製し遊離形試料とした。試料中のFK506の定量にはダイナボット社製IMXおよびデイドベアリング社製定量キットを使用した。

種々AGP濃度における全血中および血清中FK506の定量は次のように行った。まず、本研究に同意を得た健康成人男性から採血し、目的濃度になるようにAGPを加え試料を調整し、37°Cの浴槽にて緩やかに30分間振とうした。次に、目的濃度になるようにFK506を試料に加え、さらに30分間緩やかに振とう後、試料を分離剤入り採血管に移し、遠心分離（3000rpm, 10分）して得られた血清中のFK506を定量した。また、血清試料は溶血していないことを確認した。

FK506のHSAとAGPに対する結合サイトの同定には、サイト特異性薬物をプローブとして用い置換実験を行った。HSAのサイトI系に分類されているプローブとしてはワルファリン（ワルファリンサイト）とフェニルブタゾン（アザプロバゾンサイト）の2つを、サイトIIに分類されるプローブにはジアゼパムを用いた。また、AGPの酸性薬物結合サイトに対するプローブとしてワルファリンを、塩基性薬物結合サイトに対するプローブとしてベラパミルを用いた。タンパク結合データの有意差検定はWilcoxon-t-testにより行った。

結果と考察

1) 血清中FK506濃度の変動要因について

Fig.1は臨床濃度に調整された各種血清タンパクとFK506の結合性を示す。このタンパク結合実験結果から、FK506と血清タンパクとの結合率はHSAおよびAGPでは90%以上と高かったが、IgGは67%と低かった。これよりFK506は主にAGPとHSAに結合し、その中でもAGPへの結合が最も大きいことが判明した。

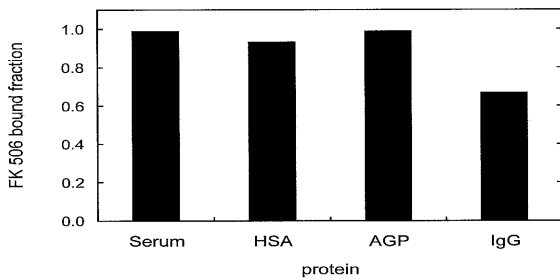


Fig. 1 血清, HSA, AGPおよびIgGに対するFK506の結合性

The following concentrations were used : serum, 720 μ M ; HSA, 720 μ M ; AGP, 17 μ M ; IgG, 62 μ M ; FK 506, 12 μ M.

次に, FK506との結合率が高かったHSAとAGPについて, これら2種のタンパクの濃度変化がFK506の結合性におよぼす影響を調べた. Table1AはAGP濃度 (17 μ M) とFK506濃度 (12 μ M) を一定にして, HSA濃度を変化させた場合の遊離形FK506濃度の変化を比較した結果である. 臨床で起こりうるHSAの濃度変化を想定 (低アルブミン血症) した実験系において, HSA濃度が360 μ Mから600 μ Mに変化した場合の遊離形FK506濃度の変化は1.12倍 (①/②) であった. 一方, HSA濃度 (600 μ M) とFK506濃度 (12 μ M) を一定にし, 臨床で起こりうるAGPの濃度変化を想定 (外傷や炎症時) した実験系において (Table1B), AGP濃度が17 μ Mから45 μ Mに変化した場合, 遊離形FK506濃度は8.00倍以上 (①/②) 変化した. これらの結果より, AGPの濃度変化はHSAのそれに比べFK506のタンパク結合力に大きく影響することが明らかとなった. したがって, 血清中のAGP濃度が高くなると, FK506のAGPに対する結合力が強まり, 赤血球に取り込まれているFK506が血清中に移動し, 血清中FK506濃度が増大することが予測される. これを調べるために, 全血中FK506濃度が同じで, AGP濃度が異なる (17 μ Mと45 μ M) 血液試料において, 血清中FK506濃度の差がどの程度生じるか検討した. その結果をTable2に示す. 全血中におけるAGP濃度が17 μ Mから45 μ Mへ上昇すると, 血清中FK506濃度は0.23ng/mLから0.33ng/mLへ約1.4倍に (②/①) 増大した. 予想通り, AGP濃度の上昇によりAGPの結合力が増大したため, 血球中のFK506を血清中へ引き出したものと考えられる.

Table1 HSAおよびAGPの濃度変化によるFK506のタンパク結合への影響

A) AGP 17 μ M (75mg/dL), FK 506 12 μ M

Protein concentration	Free concentration	① / ②
① HSA 360 μ M (2.4g/dL)	0.19 μ M	1.12
② HSA 600 μ M (4.0g/dL)	0.16 μ M	

B) HSA 600 μ M (4.0g/dL), FK 506 12 μ M

Protein concentration	Free concentration	① / ②
① AGP 17 μ M (75mg/dL)	0.16 μ M	>8.00
② AGP 45 μ M (200mg/dL)	<0.02 μ M	

Table2 全血中でのAGP濃度の変化による血清中FK506濃度への影響

AGP concentration in blood	FK 506 concentration in serum	② / ①
① 17 μ M (75mg/dL)	0.23ng/mL	1.43
② 45 μ M (200mg/dL)	0.33ng/mL	

2) FK506のタンパク分子上の結合サイトの同定

HSAとAGPの分子上にはいくつかの薬物結合サイトが存在することが広く知られている. 临床上重要とされるHSA上の結合サイトは主にサイトI (サイトIはさらに2つの領域より構成されており, ワルファリンサイトとアザプロバゾンサイトがある) とサイトIIであり²⁾, AGPには酸性薬物結合サイトと塩基性薬物結合サイトがある³⁾. そこで, FK506のHSAとAGPに対する結合サイトの同定を試みた. HSAのサイトI系のプローブとしてワルファリン (ワルファリンサイト) およびフェニルブタゾン (アザプロバゾンサイト) を用い, サイトIIとしてジアゼパムを使用した. 一方, AGPの結合サイトプローブは酸性薬物結合サイトのワルファリンおよび塩基性薬物結合サイトのベラパミルを用いた. Fig.2のAとBはそれぞれのプローブ存在下におけるFK506の遊離率 (遊離形FK506濃度/FK506の総濃度) を示す. すなわち, FK506の遊離率が高いほど, そのサイトにおいてFK506の結合阻害が生じたことを意味する. これより, FK506とHSA分子上の結合はワルファリンおよびジアゼパムによる結合阻害はなく, フェニルブタゾンのみわずかな結合阻害が観察された (Fig.2A). したがって, FK506の結合サイトはアザプロバゾンサイトの近傍である可能性が高いと考えられた. また, FK506とAGP分子上の結合はワルファリンおよびベラパミルにより著しく結合阻害が観察されたことから (Fig.2B), 酸性および塩基性薬物結合サイトのオーバーラッピング領域に結合するこ

とが明らかになった。

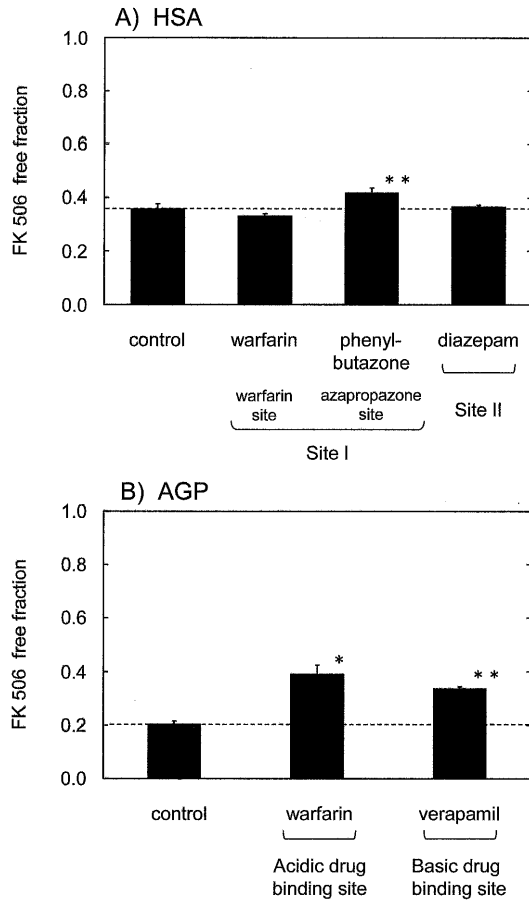


Fig.2 FK506のHSAおよびAGP分子上における結合サイトの同定

The following concentrations were used : HSA, 120 μ M ; AGP, 17 μ M ; FK 506, 12 μ M

Each column is the mean of three experiments \pm S.D..

* ; P<0.05 vs. control. ** ; P<0.01 vs. control.

まとめ

今回の結果より、血清中FK506濃度の変動はHSAよりAGP濃度の変化に大きく依存していることが証明された。また、FK506はAGPの酸性および塩基性薬物結合サイトのオーバーラッピング領域に結合することが明らかになった。

以上のことから、FK506のTDMを行う際、AGP濃度をモニタリングすることは重要である。

謝辞

本研究は「薬学的観点からの体内動態の診断法の開発とその結果に基づく投与法の確立：各患者に対する最適な薬物療法を目指して」の研究課題で獲得した宮崎県戦略的地域科学技術振興事業補助金の一部で行った。また、本研究においてタクロリムス原末を提供していただいた藤沢薬品工業（株）に感謝致します。

参考文献

- 1) Backman L, Nicar M, Levy M et al: FK506 trough levels in whole blood and plasma in liver transplant recipients. Correlation with clinical events and side effects. *Transplantation*, 57 (4) : 519-525, 1994
- 2) Fehske KJ, Muller WE, Wollert U: The location of drug binding sites in human serum albumin. *Biochem. Pharmacol.*, 30: 687-692, 1981
- 3) Maruyama T, Otagiri M, Takadate A: Characterization of drug binding sites on alpha 1-acid glycoprotein. *Chem. Pharm. Bull.*, 38: 1688-1691, 1990