

尿毒症物質の血液透析除去率の向上を目指したタンパク結合阻害に関する基礎的検討

瀬戸口 奈央, 高村 徳人, 緒方 賢次, 徳永 仁, 園田 徹*, 小川 修**

Effect of protein binding inhibition in improving the rate of removal of uremic toxins in hemodialysis

Nao Setoguchi, Norito Takamura, Kenji Ogata, Jin Tokunaga, Tohru Sonoda*, Osamu Ogawa**

Abstract

Uremic toxins that strongly bind to human serum albumin (HSA) are not easily removed through hemodialysis (HD). We searched for drugs and endogenous substances inhibiting HSA binding of uremic toxins, indoxyl sulfate (IS) and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF), and examined their in vitro inhibitory effects in improving the rate of removal of IS and CMPF in HD. We evaluated the free fraction of IS and CMPF in mixed healthy human serum by ultrafiltration. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA; the active metabolite of nabumetone) and naproxen, and the free fatty acid (FFA) oleic acid inhibited the binding of IS to HSA. The free fraction of IS was markedly increased by 6-MNA, naproxen, and oleic acid. The NSAID bucolome and oleic acid inhibited the binding of CMPF to HSA. The free fraction of CMPF was markedly increased by bucolome and oleic acid. Therefore, NSAIDs and FFA may be able to inhibit HSA binding of IS and CMPF in HD.

Key words : human serum albumin, hemodialysis, uremic toxins, non-steroidal anti-inflammatory drugs, free fatty acid

キーワード : ヒト血清アルブミン, 血液透析, 尿毒症物質, 非ステロイド性消炎鎮痛薬, 遊離脂肪酸

緒言

腎機能が低下し末期腎不全（透析期）に至ると、全身的な代謝の変化および尿中への代謝産物の排泄障害に伴い、様々な尿毒症物質が体内に蓄積するため、血液透析による体外への除去が必要となる。尿毒症物質は水溶性低分子、水溶性中分子および血清タンパク質結合性低分子の3つのグループに大別され、これまでに約100種類の物質が報告されている¹⁾。なかでも、血清タンパク質結合性低分子尿毒症物質は、ヒト血清アルブミン（HSA）

と強く結合するため、血液透析による体外への除去が非常に難しく、透析後においても依然として高い血清中濃度を示す。尿毒症物質が体内に蓄積すると、心血管系などにおいて合併症を誘発し、その結果、生存期間の短縮をも引き起こすことが報告されている^{2,3)}。

本研究では、HSAに強く結合する尿毒症物質のHSAへの結合を阻害することで除去率を高めることを目的としている。そこでその一貫として、HSAへの結合が強く高濃度になることが報告されている尿毒症物質であるインドキシル硫酸（indoxyl sulfate ; IS）および3-カル

九州保健福祉大学薬学部薬学科 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町1714-1
Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare
1714-1 Yoshino-machi, Nobeoka-city, Miyazaki, 882-8508, Japan

*九州保健福祉大学保健科学部作業療法学科 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町1714-1

*Department of Occupational Therapy, School of Health Science, Kyushu University of Health and Welfare
1714-1 Yoshino-machi, Nobeoka-city, Miyazaki, 882-8508, Japan

**おがわクリニック 〒882-0803 宮崎県延岡市大貫町2-1206-1

**Ogawa Clinic, 2-1206-1 Ohnuki-machi, Nobeoka-city, Miyazaki, 882-0803, Japan

ボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロパノ酸 (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid; CMPF) が HSA に結合するのを阻害する物質を探索し、さらにその阻害効果を *in vitro* にて検討する。

材料

ブコロームはあすか製薬、ナプロキセンは田辺三菱製薬から入手した。6-メトキシナフタレン-2-酢酸 (6-methoxy-2-naphthylacetic acid; 6-MNA) はスミスクラインビーチャム、イブプロフェンはシグマアルドリッチ、フルルビプロフェンは東京化成工業、オレイン酸ナトリウムおよび IS はナカライテスクから購入した。CMPF は第一薬科大学高館明教授から恵与されたものを使用した。他の試薬はすべて特級品を使用した。

方法

1. 血清試料の調製および血清中各種成分の濃度測定

血液試料は4名の健常成人より採取した。本研究は九州保健福祉大学倫理委員会において承認され、インフォームド・コンセントを行った後に実施した。

血液試料は採血後直ちに1670 g、10分間遠心分離し、血清を分取した。分取した血清は全て混合し、その混合血清は実験に使用するまで-80℃で凍結保存した。

アルブミンおよび遊離脂肪酸 (FFA) 濃度の測定は BIOLIS 24i Premium (東京貿易機械株式会社) を用いて行った。アルブミン濃度はシカリキッド ALB (関東化学株式会社) 測定試薬を用いて BCG 法⁴⁾ により測定した。FFA 濃度はシカリキッド NEFA (関東化学株式会社) 測定試薬を用いて測定した。

IS および CMPF の遊離形濃度は以下の島津社製超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) システム (SPD-20A UV/VIS detector, LC-30AD pump, SIL-30AC auto sampler, CBM-20A system controller, CTO-10Avp column oven) を用いて測定した。

IS および CMPF を分離するカラムは GL Sciences InertSustain C18 (3 mm I.D. × 100 mm, 2 μm) を使用した。流速 0.8 mL/min、カラム温度 40 °C で稼働させ、IS は UV 285 nm、CMPF は UV 261 nm でモニターした。移動相は A 液に 0.4 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)、B 液にアセトニトリルを用い、グラジエントで分析を行った (5% B (0~5 min) → 90% B (5~10 min) → 5% B (10~15 min) → 5% B (15~20 min))。

2. 尿毒症物質の HSA への結合に対する各種薬物の阻害効果の評価

標記阻害効果を示す物質の候補としての非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAIDs) であるブコローム、6-MNA (ナブメトンの活性代謝物)、ナプロキセン、イブプロフェンおよびフルルビプロフェン、また FFA であるオレイン酸を用いて、以下の方法に従って試験した。まず、混合血清は HSA 濃度が 526 μM (3.5 g/dL) となるよう 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した。希釈後の FFA 濃度は 115 μM であった。次に、IS および CMPF を最終濃度が 100 μM、200 μM となるよう各混合血清に添加した。さらに、ブコローム、6-MNA、ナプロキセン、イブプロフェン、フルルビプロフェンおよびオレイン酸を最終濃度が 300 μM、200 μM、200 μM、100 μM、30 μM、1500 μM となるよう各試験液に添加し、それらの試験液を限外ろ過した。ろ液中の IS および CMPF の遊離形濃度は、前述の UHPLC システムを用いて測定し、遊離形分率 (遊離形濃度/添加濃度) を算出した。実験操作は 25℃ にて行った。

結果

IS および CMPF の HSA への結合に対する NSAIDs および FFA の阻害効果を調べるために、臨床治療濃度のブコローム、6-MNA、ナプロキセン、イブプロフェン、フルルビプロフェンおよび生体内濃度のオレイン酸を血清試料に添加し、これらの物質により HSA から遊離された IS および CMPF の量を遊離形分率としてそれぞれ算出して評価した (Figure 1, 2)。

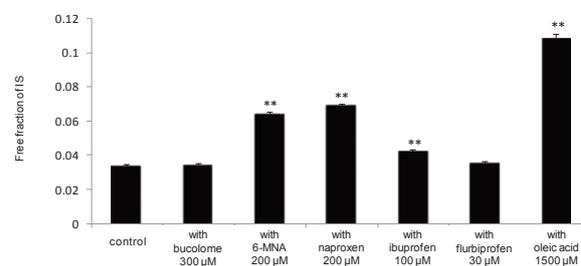


Figure 1. Effects of various NSAIDs and oleic acid on the free fraction of IS in human serum

The following concentrations were used: [serum] (as HSA), 526 μM; [IS], 100 μM. Each column is the mean of three experiments ± S.D.. ***P*<0.01 compared with the control.

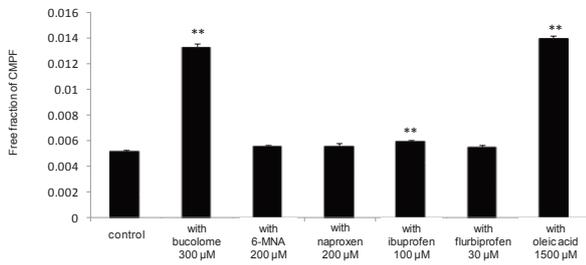


Figure 2. Effects of various NSAIDs and oleic acid on the free fraction of CMPF in human serum

The following concentrations were used: [serum] (as HSA), 526 μM; [CMPF], 200 μM. Each column is the mean of three experiments ± S.D.. ** $P < 0.01$ compared with the control.

ISの遊離形分率は6-MNA、ナプロキセン、イブプロフェンおよびオレイン酸により有意に上昇し、それぞれの上昇率はコントロールに対し1.90倍、2.05倍、1.25倍および3.20倍であった (Figure 1)。また、CMPFの遊離形分率はブコローム、イブプロフェンおよびオレイン酸により有意に上昇し、それぞれの上昇率はコントロールに対し2.56倍、1.15倍および2.69倍であった (Figure 2)。

また、ISのHSA結合に大きな阻害効果を示したNSAIDsである6-MNAおよびナプロキセンにおいては、同様に大きな阻害効果を示したオレイン酸との併用による阻害効果を調べた (Figure 3)。

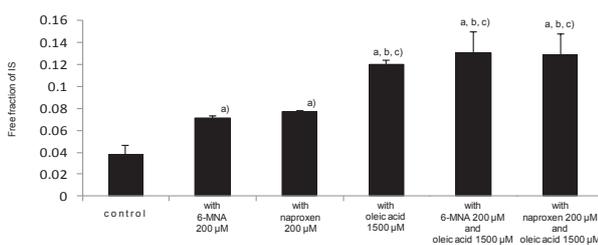


Figure 3. Additive effects of NSAIDs and oleic acid on the free fraction of IS in human serum

The following concentrations were used: [serum] (as HSA), 526 μM; [IS], 100 μM. Each column is the mean of three experiments ± S.D.. ^{a)} $P < 0.01$ compared with the control. ^{b)} $P < 0.01$ compared with the 6-MNA. ^{c)} $P < 0.01$ compared with the naproxen.

その結果、オレイン酸との併用による有意な上昇はみられなかった。さらに、CMPFにおいても、大きな阻害効果を示したブコロームおよびオレイン酸の併用によ

る阻害効果を調べた (Figure 4)。

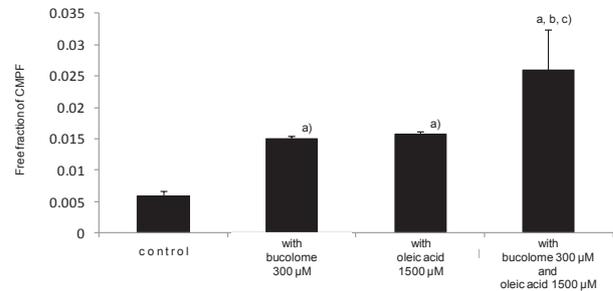


Figure 4. Additive effect of bucolome and oleic acid on the free fraction of CMPF in human serum

The following concentrations were used: [serum] (as HSA), 526 μM; [CMPF], 200 μM. Each column is the mean of three experiments ± S.D.. ^{a)} $P < 0.01$ compared with the control. ^{b)} $P < 0.01$ compared with the bucolome. ^{c)} $P < 0.01$ compared with the oleic acid.

その結果、ブコロームおよびオレイン酸の併用によるCMPFの遊離形分率の有意な上昇がみられ、その上昇率は相加的であった。

考察

今回の結果より、尿毒症物質のHSAへの結合に阻害効果を有するNSAIDsとして、ISにおいては6-MNA、ナプロキセンおよびイブプロフェン、CMPFにおいてはブコロームおよびイブプロフェンが見出された。さらに、生体内物質として、オレイン酸がISおよびCMPFのHSAへの結合を阻害することが見出された。

HSAにおいてISがサイトII、CMPFがサイトIに結合するのにに対し、6-MNAおよびナプロキセンはサイトII、ブコロームはサイトIに結合することが報告されている⁵⁻⁷⁾。さらに、6-MNA、ナプロキセンおよびブコロームは他のNSAIDsに比べ、臨床治療濃度が200-300 μMと高い。したがって、ISは6-MNAおよびナプロキセンにより、一方CMPFはブコロームによりHSAへの結合が大きく阻害され (Figure 1、2)、その阻害様式は競合阻害であることが考えられる。

さらに、HSAにおけるFFA結合サイトはX線構造解析によって6-7カ所存在することが知られている。このうち、第一結合サイトはサブドメインIII B領域のサイトII近傍にあり、第二結合サイトはサブドメインIII A領域のサイトIIに位置することが報告されている^{8,9)}。したがって、HSAに対するFFAの濃度比が高くなると、FFAがサイトIIを占有する割合が高くなるため、薬物

のサイト II への結合が阻害されると思われる。実際に、オレイン酸濃度1000-2000 μM において、ISのHSAへの結合に対する阻害効果を確認したところ、オレイン酸濃度が高くなるにつれISの遊離形濃度が上昇した (date not shown)。これらのことより、オレイン酸によるISのHSAへの結合阻害は (Figure 1)、競合阻害によるものと考えられる。一方、CMPFにおいては、FFAのHSAへの結合サイトより遠い位置であるサイト I に結合するにもかかわらず、オレイン酸によりHSAへの結合が大きく阻害された。実際に、ISと同様、オレイン酸濃度1000-2000 μM において、CMPFのHSAへの結合に対する阻害効果を確認したところ、オレイン酸濃度が高くなるにつれCMPFの遊離形濃度が上昇した (date not shown)。オレイン酸が大量に存在する場合、オレイン酸はHSA分子上の高親和性サイトだけでなく、サイト I を含む低親和性サイトにも結合することが報告されている^{10, 11)}。これらのことより、オレイン酸によるCMPFのHSAへの結合阻害は (Figure 2)、アロステリック阻害および競合阻害の2つの阻害様式によるものと考えられる。

血液透析患者は高齢者が多く、腰痛や関節痛に対しNSAIDsを服用している場合が多い。それらの患者において、今回、ISあるいはCMPFのHSAへの結合に阻害効果を示した6-MNA、ナプロキセンおよびブコロームを鎮痛薬として服用することができれば、それらの薬物の最高血中濃度到達時間 (T_{max}) を考慮した服用時間の調節を行うことにより、尿毒症物質の除去率を向上させることが可能かもしれない。実際に、6-MNA、ナプロキセンおよびブコロームの T_{max} は、それぞれ約4時間、2~4時間および4~6時間であるため、それらの時間を考慮し、透析開始時間に T_{max} となるよう各薬物を服用することとなる。その際の薬物の選択は、ISおよびCMPFのどちらの除去を目的とするかによって決定する。また、血液透析時には通常、抗凝固薬としてヘパリンが汎用されているが、ヘパリンを投与すると、リポタンパクリパーゼ活性が高くなるため、体内におけるFFA濃度が一時的に3000 μM 程度まで上昇することがあるとの報告がある^{12, 13)}。今回、オレイン酸1500 μM において、ISおよびCMPFともにコントロールと比較し、約3倍の遊離形分率の上昇がみられたことより (Figure 1, 2)、ヘパリン使用時には尿毒症物質の除去効果が高くなることが期待される。

さらに今回、オレイン酸およびブコロームを併用した場合のCMPFのHSAへの結合阻害効果を調べたところ、オレイン酸およびブコローム単独よりも大きな阻害効果

がみられたため (Figure 4)、抗凝固薬としてヘパリンを使用し、さらにブコロームを透析開始4~6時間前に服用することにより、より高いCMPFの除去効果が得られるものと考ええる。一方、オレイン酸と6-MNAまたはナプロキセンを併用した場合のISのHSAへの結合阻害効果は、オレイン酸単独と比較し有意な差はみられなかったため (Figure 3)、ISの除去を目的とした6-MNAおよびナプロキセンの服用は、ヘパリン使用が困難あるいはヘパリン使用後のFFA濃度上昇の程度が小さい場合に有効であると考ええる。また、FFAは日内変動を有する生体内物質であるが、空腹時において血液中濃度が高くなるため、血液透析前および透析中の食事を制限することにより、ヘパリンを使用できない患者においても、高い除去効果を期待できるかもしれない。

今回の検討において、臨床治療濃度のNSAIDsや生体内濃度のFFAがISおよびCMPFのHSAへの結合を阻害できることが見出されたため、今後は透析によるこれらの尿毒症物質の除去率との関係性について検討する必要があると思われる。

引用文献

- 1) Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G.: What is new in uremic toxicity?. *Pediatr Nephrol.* 23: 1211-1221, 2008.
- 2) Dou L, Bertrand E, Cerini C, et al.: The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int.* 65: 442-451, 2004.
- 3) Wu I. W., Hsu K. H., Hsu H. J., et al.: Serum free p-cresyl sulfate levels predict cardiovascular and all-cause mortality in elderly hemodialysis patients - a prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant.* 27: 1169-1175, 2012.
- 4) Doumas BT, Watson WA, Biggs HG.: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta.* 31 (1): 87-96, 1971.
- 5) Ulrich Kragh-Hansen, Victor Tuan Giam Chuang, Otagiri M.: Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biol Pharm Bull.* 25 (6): 695-704, 2002.
- 6) Setoguchi N, Takamura N, Fujita K, et al.: A diclofenac suppository-nabumetone combination therapy for arthritic pain relief and a monitoring

- method for the diclofenac binding capacity of HSA site II in rheumatoid arthritis. *Biopharm Drug Dispos.* 34 (2): 125-136, 2013.
- 7) Nishi K, Kobayashi M, Nishii R, et al.: Pharmacokinetic Alteration of ^{99m}Tc -MAG3 using Serum Protein Binding Displacement Method. *Nucl Med Biol.* 40: 366-370, 2013.
 - 8) Petitpas I, Grune T, Bhattacharya AA, et al.: Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J Mol Biol.* 314: 955-960, 2001.
 - 9) Chuang VT, Otagiri M.: How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin?. *Pharm Res.* 19: 1458-1464, 2002.
 - 10) Fehske KJ, Muller WE, Wollert U.: The location of drug binding sites in human serum albumin. *Biochem Pharmacol.* 30 (7): 687-692, 1981.
 - 11) Takamura N, Maruyama T, Otagiri M.: Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia. *Clin Chem.* 43 (12): 2274-2280, 1997.
 - 12) Naranjo CA, Sellers EM, Khouw V, et al.: Variability in heparin effect on serum drug binding. *Clin Pharmacol Ther.* 28: 545-550, 1980.
 - 13) Brown JE, Kitchell BB, Bjornsson TD, et al.: The artifactual nature of heparin-induced drug protein-binding alterations. *Clin Pharmacol Ther.* 30: 636-643, 1981.