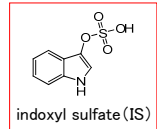


演題名: in vitro小型化血液透析システムを用いたindoxyl sulfateが各種薬物および血漿成分の透析性に与える影響の検討

所属名: 株式会社鎌倉テクノサイエンス 生物試験業務部

氏名: 〇島村昌弘、河野誠、佐藤舞、杉崎章子、村尾康雄、平野豊、内田時彦



目的

透析患者において、蛋白結合性の尿毒症物質であるindoxyl sulfate (IS)の血漿中濃度の上昇が知られているが、ISが他の薬物および血漿成分の透析性に与える影響については不明な点が多い。すでに我々は、in vitro小型化血液透析システムの構築および各種薬物の臨床透析クリアランスの予測について報告している^{1),2)}。そこで、このシステムを用い、ISによる各種薬物および血漿成分の透析性的変化について検討した。

方法

1. 小型化血液透析器

以下の中空糸型透析膜を束ねて円筒形の容器に挿入し、両端をポッティング剤(接着剤)で固定化して小型化血液透析器を作製した。



透析膜の分子構造

ポリスルホン(PS)
セルロース トリアセテート(CTA)

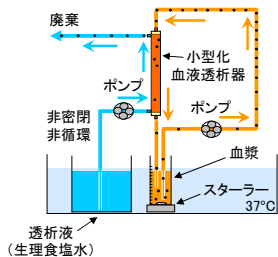
ポリエーテル スルホン(PES)

ポリエステル系 ポリマーアロイ(PEPA)

ポリメチルメタクリレート(PMMA)

2. in vitro小型化血液透析システム

実験システムは右図の通り。血漿流路は循環系、透析液流路は非循環系とし、向流となるようにした。



3. IS自体の透析性評価

健康人から採取した血漿(正常血漿)にISを添加後(IS添加血漿、初期濃度:50 μg/mL)、in vitro小型化血液透析システム(透析膜種:PS、CTA、PES、PEPA、PMMA)を用いて透析し、0、15、30、60、90、120分の血漿中IS濃度をHPLCにて測定した。なお、透析系の妥当性を確認するため、0、120分の血漿成分(Alb、BUN、Cre、T-Bil、P)濃度を自動分析装置にて測定した。

3-1. 血漿中IS濃度測定

前処理

血漿(測定試料)
↓ ←メタノール
↓ ←オクタン酸ナトリウム

溶液

↓ ←攪拌、静置
↓ ←冷アセトン
↓ ←攪拌、遠心

上清

↓ ←ジクロロメタン
↓ ←攪拌、遠心

上清

↓ ←ジクロロメタン
↓ ←攪拌、遠心

上清

↓ ←蒸留水
↓ HPLC分析

HPLC分析条件

HPLC LC-20AD System(島津製作所)
移動相 20 mmol/L リン酸緩衝液(pH7) / アセトリル
分析カラム XBridge C18(Waters)
検出法 蛍光検出
励起波長 280 nm
蛍光波長 390 nm

3-2. 血漿成分濃度測定

自動分析装置 JCA-BM6010(日本電子)

測定用試薬(関東化学)

Alb シカリキッドALB (BCG法)
BUN シカリキッド-N UN (アンモニア消去法)
Cre シカリキッド-N CRE (酵素法)
T-Bil シカリキッドT-BIL (酵素法)
P シカリキッドIP (酵素法)

4. ISが他の薬物の透析性に与える影響の検討

正常およびIS添加血漿に、血漿蛋白結合率(PB)の異なることが報告されている6種の薬物³⁾(アテノロール(PB:0-16%)、リシノプリル(PB:0-10%)、ピンドロール(PB:40-57.2%)、カプトプリル(PB:25-30%)、ロサルタン(PB:>98%)、カルベジローラ(94.2-98%)のカクテル溶液を添加後(初期濃度:各250 ng/mL)、in vitro小型化血液透析システム(透析膜種:PS)を用いて透析し、0、15、30、60、90、120分の血漿中薬物濃度をLC/MS/MSにて、0、120分の血漿成分(Alb、BUN、Cre、T-Bil、P)濃度を自動分析装置にて測定した。さらに、これらの薬物について、正常およびIS添加血漿における血漿蛋白非結合率を、超遠心法にて測定した。

4-1. 血漿中薬物濃度測定

前処理

血漿(測定試料)
↓ ←攪拌、静置
↓ ←メタノール
↓ ←攪拌、遠心

上清

↓ ←蒸留水
↓ LC/MS/MS分析

LC/MS/MS分析条件

HPLC Agilent 1100(Agilent Technologies)
移動相 0.1 vol% ギ酸 / メタノール
分析カラム Capcell Pak C18 MGIII(資生堂)
MS/MS API 4000(AB SCIEX)
イオン化 ESI, positive
スキャン MRM

4-2. 血漿蛋白非結合率測定

超遠心による遊離薬物層の分離

血漿(正常 or IS添加)
↓ ←薬物
↓ ←インキュベーション(37°C、10分)
↓ ←遠心(60000 × g、25°C、120分)
透明層(遊離薬物層)
↓
(前処理、LC/MS/MS分析)

血漿蛋白非結合率(fp.u)の算出

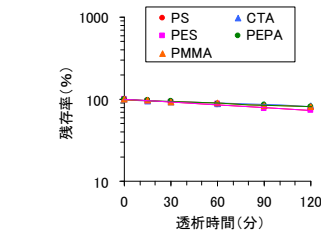
fp.u(%) = 遊離薬物層中濃度 / 血漿中薬物濃度 × 100
(= 遠心後濃度 / 遠心前濃度 × 100)

結果・考察

1. ISの透析性

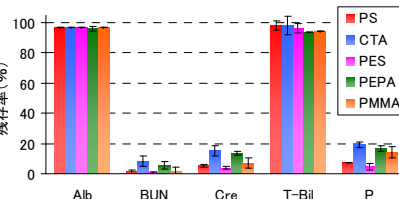
1-1. IS添加血漿を透析後のISの残存率

平均値(n=3)



1-2. IS添加血漿を透析後の血漿成分の残存率

透析後120分、平均値±標準偏差(n=3)

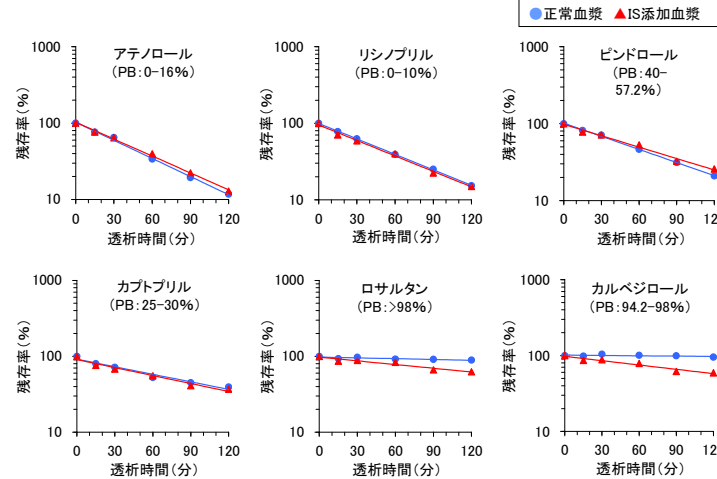


ISの透析性は、透析膜の種類によらず低かった。

2. IS添加による薬物および血漿成分の透析性変化

2-1. 正常およびIS添加血漿を透析後の各種薬物の残存率

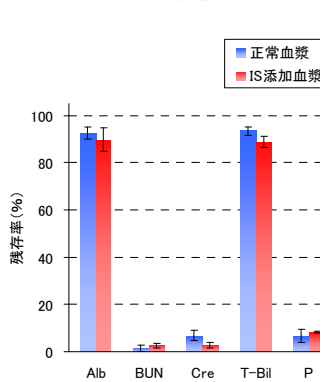
PS膜、平均値(n=3)



正常血漿とIS添加血漿におけるアテノロール、リシノプリル、ピンドロール、カプトプリルの透析性はほぼ同等であったが、ロサルタンおよびカルベジローラの透析性は、IS添加により上昇した。

2-2. 正常およびIS添加血漿を透析後の血漿成分の残存率

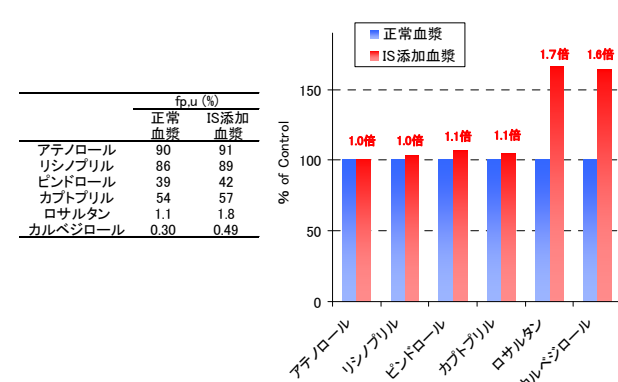
PS膜、透析後120分、平均値±標準偏差(n=3)



正常血漿とIS添加血漿におけるAlb、BUN、Cre、T-Bil、Pの透析性はほぼ同等であった。

2-3. 正常およびIS添加血漿における各種薬物の血漿蛋白非結合率

平均値(n=2)



ロサルタンおよびカルベジローラの血漿蛋白非結合率は、IS添加により上昇したが、その他4種の薬物には大きな変化が認められなかった。⇒ISによってロサルタンおよびカルベジローラの血漿蛋白結合率が変化したことが、透析性が上昇した原因の1つと考えられた。

結論

以上の結果から、血漿中の蛋白結合性尿毒症物質indoxyl sulfate (IS)は、蛋白結合率の高い薬物の透析性に影響を与える可能性があることが示唆された。蛋白結合率の高い薬物を透析患者に投与する場合には注意が必要である。

参考文献

- 河野誠、笹子慎一郎、福山臣一、渡邊綾乃、磯ヶ谷昌文、in vitro透析実験による臨床透析クリアランスの予測、日本薬学会第126年会(ポスター発表)、2006年
- 島村昌弘、河野誠、佐藤舞、村尾康雄、in vitro小型化血液透析システムを用いた各種透析膜における降圧剤の透析性に関する検討、第4回日本腎と薬剤研究会学術大会(ポスター発表)、2010年
- 平田純生、和泉智、古久保拓、改訂2版 透析患者への投薬ガイドブック、株式会社じほう、2009年