

細胞膜プレートを使用したサイトプローブ薬物の 細胞膜透過性に関する基礎的検討^{a)}

徳永仁, 高村徳人, 緒方賢次, 吉田裕樹, 永田将司, *近藤照義, **西尾豊隆, **川井恵一

Basic examination of the cell membrane permeability of site probe agents using a cell membrane plate^{a)}

Jin Tokunaga, Norito Takamura, Kenji Ogata, Hiroki Yoshida, Masashi Nagata,
Teruyoshi Kondo*, Toyotaka Nishio**, Keiichi Kawai**

Abstract

Drug efficacy depends on the amount of a preparation reaching the target tissue (grade of tissue transfer). In this experiment, we established the normal albumin concentration of a healthy adult (600 μ M) or a low-albumin state indicating marked liver hypofunction (100 μ M) on a cell membrane plate, and evaluated the cell membrane permeability of the probe agents. The cell membrane permeability of phenytoin or valproate depended on the concentration of albumin. Probe agent site-I and -II inhibitors, bucolome and oleic acid, respectively, increased the cell membrane permeability. In the future, the cell membrane permeability of probe agents should be further investigated to estimate the tissue transfer of agents based on various laboratory data (albumin, free fatty acids, uremic toxins, and bilirubin).

Key words : - pharmaceutical distribution diagnostic method, cell membrane plate, probe agent, human serum albumin, protein binding

キーワード : 薬学的分布診断法, 細胞膜プレート, プローブ薬物, ヒト血清アルブミン, 蛋白結合
2008.11.26受理

緒言

我々は、薬学的分布診断法として血清アルブミン (HSA) または α_1 -酸性糖蛋白質 (AGP) 分子上の各結合サイトの薬物結合能とその結合に影響する臨床検査値を測定して、薬物を投与するタイミングや薬効を高める簡便な方法を確立してきた¹⁻³⁾。この薬学的分布診断法では、HSAやAGPなどの各蛋白結合サイトの結合能をモニターできるプローブ薬物 (結合サイトに特異な薬物) を使用し、人工のセルロース膜を用いた限外ろ過法によりプローブの遊離形薬物濃度の測定を行い、薬物結合能

の評価を行っている。しかしながら、実際の薬物の組織分布を考えた場合、薬物は細胞膜上の様々な輸送蛋白、受容体、蛋白結合阻害剤存在下や生体内物質などの親和性・結合性により組織への透過は制限されるため、単純な薬物の蛋白結合能だけでは薬物の分布の推測を行うことはできない。よって、実際の細胞膜を使用し、さらに蛋白結合阻害剤存在下や様々な生体内物質の濃度存在下での薬物の細胞膜透過性を評価する手法は、腎障害・肝障害・血液障害などの病態時における薬物投与設計において重要な評価系になると考えられる。そこで、細胞透過用プレートに細胞を培養し、異なるアルブミン濃度に

九州保健福祉大学薬学部 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町1714-1

School of Pharmaceutical Sciences, Kyusyu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshino, Nobeoka-shi, Miyazaki, 882-8508 Japan

*九州保健福祉大学保健科学部

*School of Health Science, Kyusyu University of Health and Welfare,

**金沢大学大学院医学研究科

**Kanazawa University Graduate School of Medical Science

における蛋白結合阻害剤存在下のプローブ薬物の細胞膜透過性に関する基礎的検討を行った。

方法

1. LLC-PK1細胞膜プレートの作製

市販されているブタ腎臓由来LLC-PK1細胞は、抗生物質 (Penicillin-Streptomycin, GIBCO) およびウシ胎仔血清 (FBS, GIBCO) などからなる細胞増殖用培地 (Medium199, GIBCO) を含む培養フラスコ (25cm²) に播種した。その後、CO₂インキュベーター (5%CO₂-95%空気, 37°C) 中で培養し、翌日に培養液を交換、その後2日おきに培養液と培養フラスコ (75または150cm²) を交換しながら、さらに約5~6日間培養した。培養終了後、Trypsin-EDTA液 (0.05%trypsin, 0.02%EDTA, GIBCO) で細胞を剥離、懸濁液としてLLC-PK1細胞が2×10⁶個となるように6穴細胞透過用プレート(メンブレン孔サイズ3.0μm, トランズウェル®, トランズウェルコル®, CORNING)に播種した後、さらに3日間培養した。トランズウェル®はポリカーボネートメンブレンに細胞培養表面処理が施されているが、トランズウェルコル®はその上にウシ胎盤由来type I とtype IIIコラーゲン処理が施されている。培養日数の検討では、各細胞間の細胞間抵抗測定装置 (Millicell®-ERS, MILLIPORE) を用いて、細胞間抵抗値を測定した。ここでは、細胞膜プレートの上側を組織側、下側を血管側と想定し、培養はEarle's M199 solutionを、細胞膜透過性の実験ではEarle's balanced salt solution (EBSS) を用いた。実験に用いたLLC-PK1の継代数は15-18であった。実験終了後、すべての細胞を0.1%トリパンブルーで3分間染色し、細胞の状態を観察した。すべての群はn=3-4で実験を行った。

2. プローブ薬物の細胞膜透過性実験

HSAのサイト I に結合するプローブ薬物としてフェニトイン (PHT, 最終濃度100μM)、サイト II のプローブ薬物としてバルプロ酸 (VPA, 最終濃度100μMまたは200μM) を用いた。細胞膜プレート下側のHSA溶液 (最終濃度0, 100または600μM) に、サイト I の阻害剤としてブコローム (Buc, 最終濃度100μMまたは600μM)、サイト II の阻害剤としてオレイン酸 (Ole, 最終濃度200μMまたは1200μM) を添加した。サンプリングは阻害剤添加後、4時間後に行った (HSA濃度100μMのみ2, 4時間後のサンプリング)。

プローブ薬物細胞膜透過性実験は、実験当日に培養液をEBSSに換え(上側および下側にそれぞれ1.5mL、2.6mL)、1時間後下側に各濃度に調整したHSAを含む

EBSSに交換し、その1時間後に下側に阻害剤を添加した。さらに、1時間後に下側にプローブ薬物を添加した後、その時点を実験開始 (0時間) とした。4時間後に反対側である上側から100μLずつサンプリングした。

薬物の細胞膜透過性として、組織側と想定している細胞膜プレート上側のプローブ薬物の濃度を測定した。測定には、自動血中濃度測定装置TDX/FLX® (アボットジャパン) を使用した。また、プレート下側の薬物が完全に上側に移行した際のプローブ薬物濃度 (理論値PHT16μg/mL[PHT100μM], 理論値VPA9.15μg/mL[VPA100μM], 理論値VPA18.3μg/mL[VPA200μM]) に対する実際に移行した薬物濃度 (上側の薬物濃度) の割合 (%) も求めた。すべての群はn=3-4で実験を行った。

3. 統計解析

結果はすべて平均±標準偏差で示した。他群間検定では、Student-Newman-Keuls test (SNK test) を使用した。有意差はp<0.05以下とした。

結果

1. 細胞膜プレートの細胞抵抗値

細胞透過用プレートにLLC-PK1細胞を播種し、経時的に細胞抵抗値を測定した結果を図1に示した。トランズウェル®に播種した細胞の細胞抵抗値は2日目において最大値を示した。一方、トランズウェルコル®に播種した細胞の細胞抵抗値は上昇が認められなかった。よって、細胞膜透過性実験ではトランズウェル®を使用し、2日目または3日目の細胞を用いて透過性実験を行った。

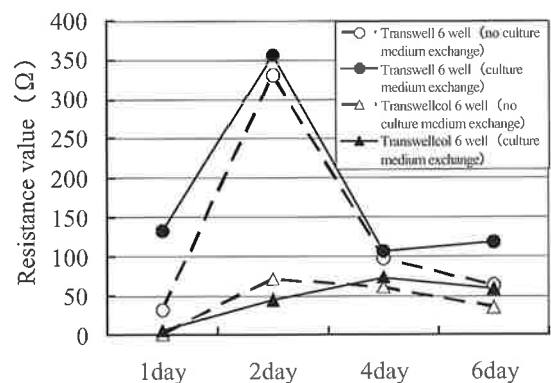
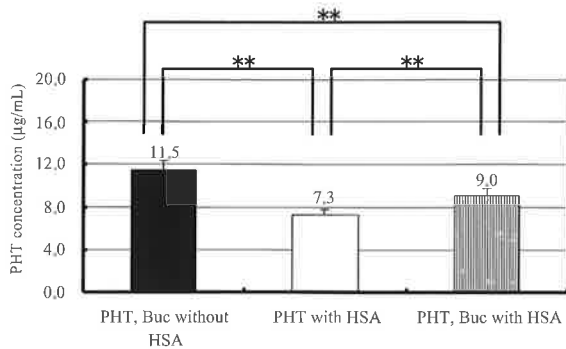


図1 細胞膜プレートの細胞間抵抗値の経時的変化

2. HSA濃度0, 100, 600μMにおけるPHTの細胞膜透過性

図2にHSA濃度600μMにおけるPHTの細胞膜透過性を示した。健康人の血清中HSA濃度を想定した600μMに

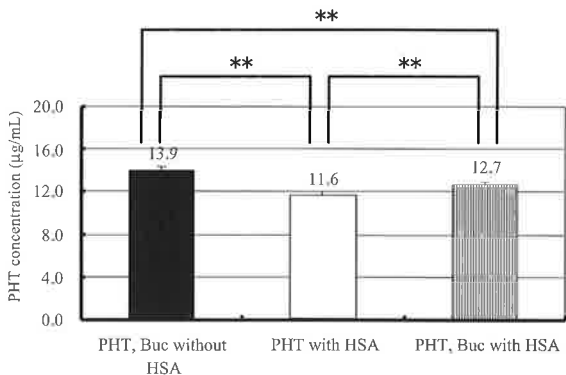
おけるPHTの細胞膜透過性は、HSAを添加していない場合に比べ有意に低下した ($p<0.01$)。また、同じHSA濃度600 μ Mにおいては、サイトI阻害剤であるBuc600 μ Mの添加により細胞膜透過性は有意 ($p<0.01$) に高まった。



PHT concn.; 100 μ M, HSA concn.; 600 μ M, Buc concn., 600 μ M
 **, $p<0.01$

図2 HSA濃度600 μ MにおけるPHTの細胞膜透過性

図3にHSA濃度100 μ MにおけるPHTの細胞膜透過性を示した。著しい肝機能低下状態を想定したHSA濃度100 μ MにおけるPHTの細胞膜透過性は、HSAを添加



PHT concn.; 100 μ M, HSA concn.; 100 μ M, Buc concn., 100 μ M
 **, $p<0.01$

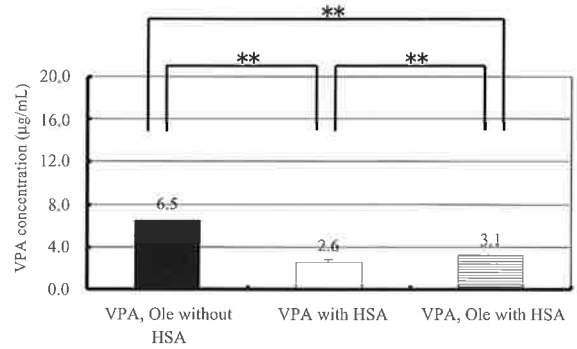
図3 HSA濃度100 μ MにおけるPHTの細胞膜透過性

していない場合に比べ有意に低下した ($p<0.01$)。また、同じHSA濃度100 μ Mにおいては、Buc100 μ Mの添加により細胞膜透過性は有意 ($p<0.01$) に高まった。

3. HSA濃度0, 100, 600 μ MにおけるVPAの細胞膜透過性

図4にHSA濃度600 μ MにおけるVPAの細胞膜透過性を示した。HSA濃度600 μ MにおけるVPAの細胞膜透過性は、HSAを添加していない場合に比べ有意に低下した

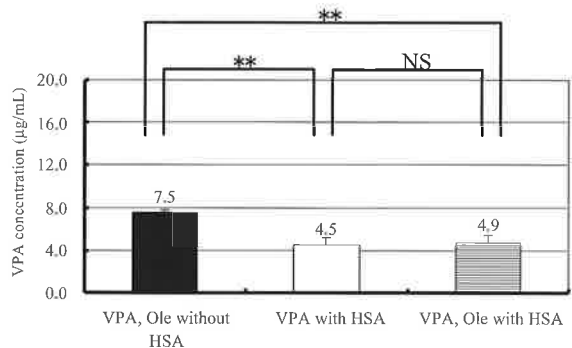
($p<0.01$)。また、同じHSA濃度600 μ Mにおいては、サイトII阻害剤であるOle1200 μ Mの添加により細胞膜透過性は有意 ($p<0.01$) に高まった。



VPA concn.; 100 μ M, HSA concn.; 600 μ M, Ole concn., 1200 μ M
 **, $p<0.01$

図4 HSA濃度600 μ MにおけるVPAの細胞膜透過性

図5にHSA濃度100 μ MにおけるVPAの細胞膜透過性を示した。HSA濃度100 μ MにおけるVPAの細胞膜透過性は、HSAを添加していない場合に比べ有意に低下した ($p<0.01$)。また、同じHSA濃度100 μ Mにおいては、Ole200 μ Mの添加により細胞膜透過性に有意差はみられなかったが增加傾向がみられた。



VPA concn.; 100 μ M, HSA concn.; 100 μ M, Ole concn., 200 μ M
 **, $p<0.01$

図5 HSA濃度100 μ MにおけるVPAの細胞膜透過性

4. PHT細胞膜透過性の経時変化

PHTの細胞膜透過性の経時変化を図6に示した。HSA濃度0 μ M、HSA濃度100 μ MにおけるBucなし、Bucありの群のPHTの細胞膜透過性は、いずれも時間依存的に高まった。また、HSA濃度100 μ MにおけるPHTの細胞膜透過性は、2時間値、4時間値のいずれも、HSAを添加していない場合に比べ有意に低下した ($p<0.01$)。また、同じHSA濃度100 μ Mにおいては、2時間値、4時間

値のいずれも、Buc100 μ Mの添加により細胞膜透過性は有意 ($p<0.01$) に高まった。

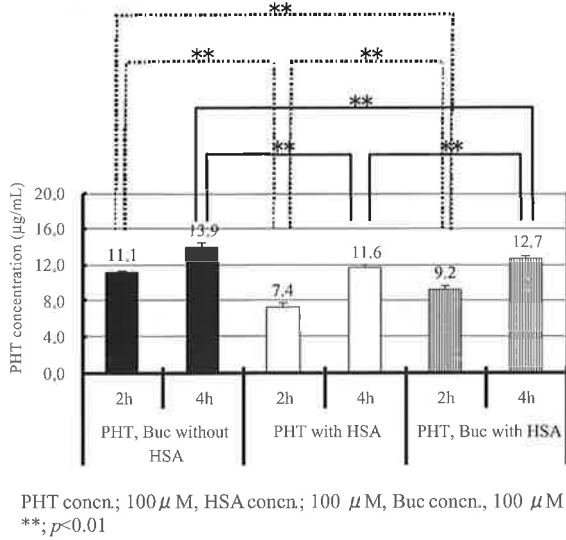


図6 PHT細胞膜透過性の経時変化

5. VPA細胞膜透過性の経時変化

VPAの細胞膜透過性の経時変化を図7に示した。HSA濃度0 μ M、HSA濃度100 μ MにおけるOleなし、Oleありの群のVPAの細胞膜透過性は、いずれも時間依存的に高まった。また、HSA濃度100 μ MにおけるVPAの細胞膜透過性は、2時間値、4時間値のいずれも、HSAを添加していない場合に比べ有意に低下した ($p<0.01$)。また、同じHSA濃度100 μ Mにおいては、2時間値、4時間値のいずれも、Ole200 μ Mの添加により細胞膜透過性は有意 ($p<0.01$) に高まった。

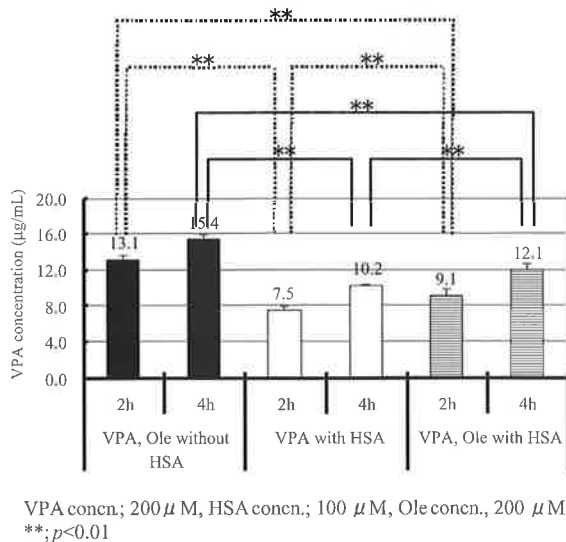


図7 VPA細胞膜透過性の経時変化

6. サイトII阻害剤添加におけるPHT細胞膜透過性

PHT濃度100 μ M、HSA濃度600 μ MにおけるサイトII阻害剤添加時のPHT細胞膜透過性を図8に示した。Ole1200 μ Mの添加によりPHTの細胞膜透過性は変化が認められなかった。

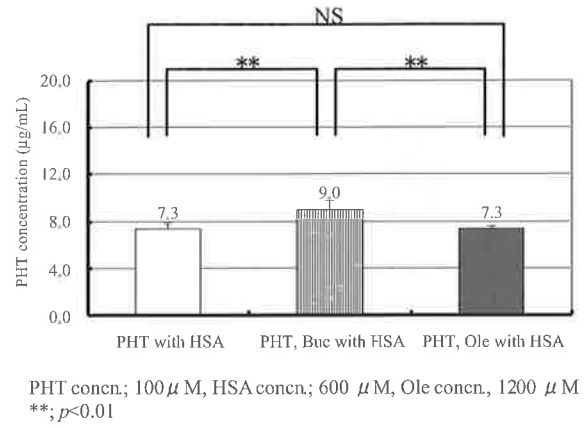


図8 サイトII阻害剤添加におけるPHTの細胞膜透過性

7. トリパンブルー染色

実験終了後、すべての細胞を0.1%トリパンブルーで3分間染色し細胞の状態を観察した結果、すべての細胞において青色に染まった細胞(死滅細胞)はみられなかった。

考 察

我々は、健常人のアルブミン濃度の状態 (600 μ M) または著しい肝機能低下を想定した低アルブミン値の状態 (100 μ M) を細胞膜プレート上に再現し、薬物の細胞膜透過性を評価した結果、プローブ薬物であるPHTまたはVPAの細胞膜透過性はHSA濃度に依存して変化することを示した。また、蛋白結合阻害剤存在下での薬物の細胞膜透過性を評価した結果、サイトI阻害剤であるBucまたはサイトII阻害剤であるOleによりPHTまたはVPAの細胞膜透過性は増大することを示した。

Takamuraらは、利尿薬であるフロセミドとHSAのサイトIとの蛋白結合が、非ステロイド性消炎鎮痛薬(NSAIDs)であるBucにより阻害を受け、血中および尿中においてフロセミドの遊離形濃度が増加することを報告している⁴⁾。そこで、本実験ではサイトIの阻害剤としてBucを使用した。実際にBucの投与により、フロセミドの利尿耐性が回復されたことが示されている⁴⁾。また、遊離脂肪酸(FFA)はHSAのサイトIIに結合することが報告されている⁵⁾。我々は、これまでにNSAIDsで

あるフルルビプロフェンの蛋白結合を阻害するためにはHSAのサイトIIに対する結合を阻害する必要があり、FFAがその阻害物質になることを報告してきた⁶⁾。血液中のFFAは、一般に数種の長鎖脂肪酸から構成されており、オレイン酸 (Ole, 33.1%)、パルミチン酸 (24.7%)、リノール酸 (20.0%) が約80%を占めている⁷⁾。よって、本実験ではFFAの中で最も構成比の高いOleを使用した。実際にFFAを使用した蛋白結合阻害を利用して、ラットにおいてフルルビプロフェンの遊離形濃度および組織移行性を一時的に高め、鎮痛効果の増強を引き起こすことを示している⁸⁾。

表1、表2では、細胞膜プレート下側の薬物が完全に上側に移行した際のプローブ薬物濃度の理論値に対する実際に移行した薬物濃度 (上側の薬物濃度) の割合 (%) を示した。表1に示すようにPHT、VPAの細胞膜透過性はHSA濃度に依存し、HSA濃度が高いほど細胞膜透過性が低いことが確認できた。また、サイトI阻害剤であるBuc添加によりPHTの移行性はHSA濃度600 μM、100 μMいずれも45.6%から56.3%、72.6%から79.6%に増加した。これらの結果から、BucはサイトI部位の阻害によりPHTの細胞膜透過性を高めたと推察される。サイトII阻害剤であるOleの添加では、HSA濃度600 μM、100 μMにおいて、いずれも28.2%から33.5%、49.0%から53.6%に増加した。FFAのHSA分子における第一結合サイト (FFAサイト) はサブドメインIII B領域にあり、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考えられている。よって、FFAの一つであるOleはFFAサイトを阻害した後に、サイトII部位を阻害したと推察される。また、これらの各阻害剤による上側への移行性は、それぞれのHSA濃度においても変化することが確認できた。

表1 細胞膜透過性のHSA濃度の違いによる変化 (%)

	PHT, Buc without HSA	PHT with HSA	PHT, Buc with HSA	VPA, Ole without HSA	VPA with HSA	VPA, Ole with HSA
HSA600 μM (4hr)	72.0	45.6	56.3	70.7	28.2	33.5
HSA100 μM (4hr)	87.1	72.6	79.6	82.3	49.0	53.6

n=3-4
PHT (最終濃度100 μM) は16 μg/mLとして計算した移行率 (%)
VPA (最終濃度100 μM) は9.15 μg/mLとして計算した移行率 (%)

表1 細胞膜透過性のHSA濃度の違いによる変化 (%)

実際の薬学的分布診断法では、患者の血清にプローブ薬物であるPHTは最終濃度100 μM、VPAは最終濃度200 μMとなるよう添加し診断を行っている¹³⁾。PHT、VPAはHSAと速やかに非共有結合するため、添加後直

ちに限外ろ過器に移し遠心分離を行い、非共有結合型の薬物濃度を測定している。今回の我々の実験では、4時間後の細胞膜透過性を検討した。しかしながら、4時間後では移行性に飽和状態が生じ、また阻害効果も頭打ちをしているとも考えられた。そこで、我々は薬物の細胞膜透過性に関して2時間後、4時間後の経時的変化も検討した。表2に示すようにPHT、VPAいずれもHSAが存在しない場合2時間後には70%前後、4時間後には85%前後の薬物が移行することが明らかになった。よって、実験開始2時間以内に半分以上の薬物が移行するため、4時間後での薬物移行性の評価は、頭打ちに近い状態であるかもしれない。HSA濃度100 μMにおける2時間後から4時間後の薬物移行性はPHTが46.0%から72.6%、VPAが40.8%から55.6%に増加した。また、サイトI阻害剤であるBuc添加によりPHTの移行性は2時間後、4時間後いずれも46.0%から57.6%、72.6%から79.6%に増加、サイトII阻害剤であるOle添加によりVPAの移行性は2時間後、4時間後いずれも40.8%から49.9%、55.6%から65.9%に増加した。よって、それぞれの阻害剤による細胞膜透過性の増加は、4時間後においても確認できた。

表2 細胞膜透過性の経時的変化 (%)

	PHT, Buc without HSA	PHT with HSA	PHT, Buc with HSA	VPA, Ole without HSA	VPA with HSA	VPA, Ole with HSA
HSA100 μM (2hr)	69.5	46.0	57.6	71.8	40.8	49.9
HSA100 μM (4hr)	87.1	72.6	79.6	84.4	55.6	65.9

n=3-4
PHT (最終濃度100 μM) は16 μg/mLとして計算した移行率 (%)
VPA (最終濃度200 μM) は18.3 μg/mLとして計算した移行率 (%)

表2 細胞膜透過性の経時的変化 (%)

また、VPA100 μMにおいてはOle200 μMによる有意な変化は認められなかったが (図5)、VPA200 μMにおいてはOle200 μMにより有意 (p<0.01) に細胞膜透過性が高まった (図7)。前者の実験ではVPA:HSA:Oleの比が1:1:2であり、後者の実験ではVPA:HSA:Oleの比が2:1:2となっていることから、有意な変化がみられたと考えている。さらに、OleはFFAサイトの阻害、サイトIIの阻害後、サイトIに対しアロステリックな変化をきたし、蛋白結合を増大させると考えられているが¹⁰⁾、今回の結果では変化は認められなかった (図8)。この実験では、PHT:HSA:Oleの比は1:6:12で行っているが、Oleの比をさらに高めた比で行った場合、アロステリックな変化によるPHTの蛋白結合増強効果が確認できたのかもしれない。

HSA濃度100 μMにおける2時間後から4時間後の薬物移行性において、阻害剤なし、阻害剤ありと共にPHTよりVPAが低い理由は、これらの薬物とHSAとの結合定数が影響を及ぼしていると考えられる。Schoenemann

らの報告によるとPHTの結合定数は 6.0×10^4 (M^{-1})¹¹⁾、VPAの結合定数は 2.8×10^5 (M^{-1})¹²⁾であると報告されている。よって、VPAの結合定数が高いことから移行性が低いと考えられる。

今回の我々の実験では、細胞膜プレート上における細胞膜の透過性の検討を行ったが、限外ろ過法におけるセルロース膜との直接的な比較は行っていない。今までにセルロース膜を用いた限外ろ過法における蛋白結合阻害剤による遊離型濃度の上昇が報告されているが^{4, 6)}、実際の細胞膜を用いた蛋白結合阻害剤による遊離型濃度の上昇は初めて確認できた。これらの蛋白結合阻害剤によるプローブ薬物の遊離型濃度の上昇は、セルロース膜を用いた限外ろ過法から予想される実験結果と同様な結果である。しかしながら、サイトII阻害剤であるOle1200 μ M添加におけるPHTの細胞膜透過性は変化が認められなかった(図8)。よって、セルロース膜を用いた限外ろ過法において得られる遊離型濃度だけではなく、さらに実際の細胞膜を用いた細胞膜透過性の評価系を加えることで、薬物の分布をより正確に予測することが可能になると考えられた。

Nishioらは、血液透析患者における薬物のHSA結合能の変化を臨床検査値から予測することが可能であることを報告している¹³⁾。透析前後のサイトIおよびサイトIIの結合能の変動の予測にはHSA、FFA以外に、尿毒症物質である血液尿素窒素(BUN)、3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸(CMPF)、インドキシル硫酸塩(IS)または馬尿酸(HA)の各濃度の変動に注目することが重要であると述べている^{3, 13)}。尿毒症物質はHSAのサイトIまたはサイトIIに¹⁴⁾、生体内物質であるビリルビンはHSAのサイトIに結合することが明らかになっている¹⁰⁾。また、ヘパリン投与時においてFFA濃度はアルブミンに対してモル比で6-7倍のレベルまで上昇し、さらに絶食、感染症、糖尿病時においても著しく増加することも報告されている^{15, 16)}。よって、これらの臨床検査値の変動を考慮したサイトIおよびサイトIIのプローブ薬物の結合能の細胞膜透過性について詳細に検討する必要がある。今後、アルブミンのみならず、生体内物質である尿毒症物質またはビリルビン添加時の細胞膜透過性について本細胞膜プレートを使用して評価することで、効果的な薬物治療を行う際の有益な評価系となり得るだろうと確信する。

本研究は、臨床検査値より薬物の組織移行性の程度を間接的に判断する薬学的評価系の開発のための基礎的検討である。今後、様々な臨床検査値の濃度を設定した細胞膜透過性の検討に加え、実際にヒト血管細胞やヒト組

織を培養した細胞膜プレートを用い細胞膜透過性を評価する必要があると考えている。

⁹⁾ 本研究の一部は、平成18年度独立行政法人科学技術振興機構「実用化のための可能性試験(F S)」および平成19年度九州保健福祉大学「学内共同研究」の助成を受けている。

謝 辞

本実験の一部は、九州保健福祉大学薬学部薬学科楠瀬直喜氏、大柿滋氏、大橋弘治氏の協力をいただきました。ここに心から御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Takamura, N., Tokunaga, J.: The pharmaceutical distribution diagnostic method which was created by clinical sense of a pharmacist: A construction of the most unique bedside training, *Yakuzaigaku*, **67**: 165-171, 2007.
- 2) Takamura, N., Tokunaga, J., Chosa, E., et al.: Need for pharmaceutical skill in using displacement of protein binding, *Yakugaku Zasshi*, **127**: 1805-1811, 2007.
- 3) Takamura, N., Tokunaga, J., Arimori, K.: Interpretations of laboratory test data on serum protein binding, *Yakugaku Zasshi*, **127**: 231-236, 2007.
- 4) Takamura, N., Maruyama, T., Chosa, E., et al.: A potent binding inhibitor for furosemide, alters the pharmacokinetics and diuretic effect of furosemide: potential for use of bucolome to restore diuretic response in nephrotic syndrome, *Drug Metab. Dispos.*, **33**: 596-602, 2005.
- 5) Menke, G., Worner, W., Kratzer, W., et al.: Kinetics of drug binding to human serum albumin: allosteric and competitive inhibition at the benzodiazepine binding site by free fatty acids of various chain lengths, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **339**: 42-47, 1989.
- 6) Ogata, K., Takamura, N., Tokunaga, J., et al.: Dosage plan of a flurbiprofen injection product using inhibition of protein binding by lipid emulsion in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**: 15-20,

- 2008.
- 7) Saifer, A. GL.: The free fatty acids bound to human serum albumin, *J. Lipid Res.*, **2**: 268-270, 1961.
 - 8) Petitpas, I., Grune, T.; Bhattacharya A. A. , et al.: Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, *J. Mol. Biol.* , **314**: 955-960, 2001.
 - 9) Chuang, V. T. , Otagiri, M.: How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin?, *Pharm. Res.*, **19**: 1458-1464, 2001.
 - 10) Fehske, K. J., Müller, W. E., Wollert, U.: The location of drug binding sites in human serum albumin, *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 687-92, 1981.
 - 11) Schoenemann, P.T., Yesair, D. W., Coffey, J.J., Bullock, F.J.: Pharmacokinetic consequences of plasma protein binding of drugs. All about Albumin, *Ann. NY Acad. Sci.*, New York, pp162-171, 1973.
 - 12) Takamura, N., Shinozawa, S., Maruyama, T., et al.: Effects of fatty acids on serum binding between furosemide and valproic acid, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**: 174—176, 1998.
 - 13) Nishio, T., Takamura, N., Nishii, R., et al.: Influences of haemodialysis on the binding sites of human serum albumin: possibility of an efficacious administration plan using binding inhibition, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **23**: 2304-2310, 2008.
 - 14) Kragh-Hansen, U., Chuang, V. T., Otagiri, M.: Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**:695-704, 2002.
 - 15) Kragh-Hansen, U.: Molecular aspects of ligand binding to serum albumin, *Pharmacol. Rev.*, **33**: 17-53, 1981.
 - 16) Naranjo, C. A., Sellers, E. M.: Fatty acids modulation of drug binding to plasma proteins. *Drug-Protein Binding*, Praeger Scientific, New York, pp233-251, 1986.