



Title	変性tetracyclineによる実験的家兔Fanconi症候群（膜疾患）のNa+依存性D-glucose輸送障害の解析
Author(s)	岡田, 倫之
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33648
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	おか	だ	のり	ゆき
	岡	田	倫	之
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6 3 4 4	号	
学位授与の日付	昭 和 59 年 3 月 14 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	変性 tetracycline による実験的家兎 Fanconi 症候群（膜疾患）の Na^+ 依存性 D-glucose 輸送障害の解析			
論文審査委員	(主査)			
	教授 阿部 裕			
	(副査)			
	教授 山野 俊雄	教授 田川 邦夫		

論文内容の要旨

（目 的）

Fanconi 症候群は腎近位尿細管における glucose, アミノ酸, リン酸などの再吸収障害にもとづく膜疾患と定義づけられる。しかし, Fanconi 症候群の尿細管輸送障害に関して細胞膜レベルで検討した報告は極めて少ない。近年確立された膜小胞テクニックは膜機能を細胞内代謝系の影響除外下に調べることを可能とし, 従来は困難であった速度論などの解析も比較的容易に行いうる。本研究では, 臨床的にも Fanconi 症候群を来すことが知られている変性 tetracycline を家兎に投与し, 近位尿細管刷子縁膜小胞を調製し, Na^+ 依存性 D-glucose 輸送の障害様式について検討した。

（方法ならびに成績）

生理的食塩水のみ投与家兎（対照群）, あるいは 100 mg/kg 体重の anhydro-4-epitetracycline (epi-TC) を投与し, 一時間後に尿糖出現を確認した家兎（E 群）より, Ca 沈澱法にて刷子縁膜小胞を調製し, 実験に供した。単離した刷子縁膜小胞は marker enzyme 比活性が腎皮質 homogenate の 10 倍に上昇し, 対照群, E 群間に差を認めなかった。また基底側細胞膜, mitochondria, microsome の marker enzyme 比活性は各々 0.6 倍以下に減少した。小胞への D-glucose uptake は迅速濾過法により測定した。

1. D-glucose distribution space の検討

反応液に終濃度 150 ~ 750 mM の蔗糖を添加し, 浸透圧を変化させ D-glucose uptake を測定した。uptake 値は浸透圧の逆数に比例して直線的に変化し, 対照群と E 群の直線は重なり合い, 両群で D-glucose は同じ浸透圧変化反応性 space に平衡化することが示された。また, 刷子縁膜小

胞や filter への非特異的結合や捕捉は両群とも微少で差を認めなかった。

2. Na^+ 勾配依存性 D-glucose overshoot uptake の変化。

100 mM Na^+ (Cl^- あるいは SO_4^{--}) 勾配下、および 100 mM NaCl 勾配下で小胞内外に 100 mM KSCN, valinomycin を添加し、膜電位の変化を 0 とした voltage clamp 下で D-glucose overshoot uptake を測定した。

いずれの条件においても、E 群において有意な ($P < 0.05$) D-glucose overshoot uptake の低下を認め、 Na^+ 勾配依存性 D-glucose 輸送障害が明らかとなった。

この E 群における Na^+ 勾配依存性 D-glucose 輸送障害の様式を検討する前に膜透過性亢進 による小胞内 L-glucose の遊出、 Na^+ 勾配の変化について検討した。

3. 膜透過性亢進による小胞内 L-glucose 遊出、 Na^+ 勾配の変化の検討。

小胞を特異な担体を有さない L-glucose で平衡化しておき、L-glucose を含まない液で 6 倍希釈時の小胞内 L-glucose 量を測定した。また、正常小胞を epi-TC 無添加、0 秒に 1 mM epi-TC 添加、1 mM epi-TC 添加し 60 分間 incubate した群の各群で D-glucose uptake を測定した。

両群間で L-glucose 遊出曲線に差がなく、1 mM epi-TC 添加各群において epi-TC 無添加群と overshoot uptake に差を認めないことから、E 群での膜透過性亢進による L-glucose 遊出亢進、 Na^+ 勾配の減少はないことが示された。

4. Na^+ 依存性 D-glucose 輸送 kinetics の検討。

Hopfer らの平衡交換法により初速度を求め kinetics を検討した。小胞を 100 mM NaCl および 0.1 ~ 30 mM D-glucose で preload し、反応液は同組成の液に trace 量の D- $[^3\text{H}]$ -glucose を加えた。

D-glucose 輸送速度を D-glucose 濃度の関数として表示すると Michaelis-Menten 型の飽和現象を示し、Eadie-Hofstee plot より kinetic parameter を求めた。Km, Vmax は対照群で 274 ± 18 mM, 1413 ± 94 nmoles/min./mg protein, E 群で 223 ± 0.9 , 793 ± 7.6 であり、E 群にて Vmax の有意な低下が認められた。

(総括)

anhydro-4-epitetracycline を家兎に投与し Fanconi 症候群を惹起させ、刷子縁膜小胞を単離、D-glucose 輸送について検討し、以下の結果を得た。

1. epi-TC 投与家兎刷子縁膜小胞において Na^+ 勾配依存性 D-glucose 輸送障害が明らかとなった。
2. epi-TC 投与家兎刷子縁膜小胞において、膜透過性亢進による小胞内 glucose 遊出の亢進、駆動力としての Na^+ 勾配の減少はないことが示された。
3. 平衡交換法による kinetics の検討より、E 群において Km 不変、Vmax 低下の D-glucose 輸送障害が明らかとなった。この E 群における Vmax の低下は epi-TC による D-glucose 輸送担体数の減少によるものと推測される。

論文の審査結果の要旨

腎近位尿細管再吸収障害に関する細胞膜レベルでの研究は極めて少ない。病態時の膜障害様式を明らかにすることは物質の膜輸送機序解明に有用である。本研究では、変性テトラサイクリン投与家兎より単離した刷子縁膜小胞を用い、 Na^+ 依存性 D-glucose 輸送を検討し、 K_m 不変 $V_{\max}$ 低下の D-glucose 輸送障害（見かけ上の担体数の減少）を明らかにした点で価値ある研究と評価できる。