

Title	gentamicinの家兎腎近位尿細管刷子縁膜に及ぼす影響
Author(s)	守山, 敏樹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/35268">http://hdl.handle.net/11094/35268</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名・(本籍)	もり 守	やま 山	とし 敏	き 樹
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7676	号	
学位授与の日付	昭和62年3月26日			
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	gentamicinの家兎腎近位尿細管刷子縁膜に及ぼす影響			
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 中馬 一郎 教授 園田 孝夫			

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

アミノ配糖体抗生物質 gentamicin は代表的な腎毒性薬物の一つであり、その腎傷害の場は主として近位尿細管であるとされている。しかし gentamicin の binding site が存在するとされ本薬物と近位尿細管細胞との最初の相互作用の場である近位尿細管刷子縁膜に及ぼす gentamicin の影響に関する研究はほとんどないのが現状である。本研究では、in vitro 添加実験系において gentamicin の単離尿細管刷子縁膜におよぼす影響を 1) 同部位の重要な膜機能の一つである  $\text{Na}^+$ -dependent D-glucose 輸送特性、2) 電子スピン共鳴法による刷子縁膜内スピンラベルの運動性測定 (脂質流動性の指標化) という点につき検討した。また異なる部位より刷子縁膜小胞を調製し、gentamicin 作用の heterogeneity についても検討した。

#### 〔材料及び方法〕

- 1) 腎刷子縁膜小胞の調製; 体重約 2 kg の雄性家兎腎より近位尿細管起始部 (segment 1 + 2) を含む皮質外層 (OC) と主に近位尿細管終末部 (segment 3) を含む髓質外層 (OM) を切り取り、 $\text{Ca}^{2+}$  沈澱法により刷子縁膜小胞 (brush-border membrane vesicles; BBMV) を調製した。得られた膜標品は指標酵素活性から他の分画の混入の少ない良好な刷子縁膜と考えられた。
- 2) gentamicin 添加; 単離した BBMV に適当濃度 gentamicin を添加、 $37^\circ\text{C}$  にて 60 分間 incubate 後実験に供した。
- 3) 迅速ろ過法; uptake 測定は迅速ろ過法によった。BBMV  $50 \mu\text{l}$  を入れた試験管を mixer にて攪はんしつつ、ここに D-( $^3\text{H}$ )-glucose と反応に必要な溶質を含む反応液  $100 \mu\text{l}$  を加え反応を開始した。

一定時間後に microswitch, 電動タイマー, 電磁石より成る fast sampling apparatus により氷冷反応停止液を加え filter 上で吸引・ろ過し, 液体シンチレーションカウンターにより放射能活性を測定し glucose uptake を求めた。1 秒間の uptake 値より初速度を求め kinetic parameters を算出した。

- 4) 電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル; B BMV を 10mg protein/ml に調製し 3  $\mu$ g/mg protein の割合で stearic acid spin label (SAL) の 5-および 16-SAL を添加・攪はん, 室温にて 10 分間放置後 ESR 測定に供した。ESR スペクトルは Varian EPR spectrometer, model E-109 により測定した。温度設定はセル表面に固定した熱電対によるモニター下, Varian temperature controller, model E-257 にて行った。得られたスペクトルより outer hyperfine splitting (2 T $\parallel$ ) を計測し order parameter S (T $\parallel$ ) を算出し, また 16-SAL に関しては the peak height ratio および motion parameter を求めそれぞれ刷子縁膜流動性の指標とした。

[結果および考察]

- 1) 1 mM gentamicin 添加の Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose 輸送に対する影響

OC において gentamicin 添加群で V<sub>max</sub> 低下 (81.6 $\pm$ 26.2 vs 62.6 $\pm$ 20.8 nmoles/min/mg protein; P<0.05 by paired t-test) がみられたが K<sub>m</sub> に変化はなかった。OM では K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub> とも変化なかった。

- 2) gentamicin 添加 B BMV における osmotically active space および passive leakiness の検討

gentamicin が B BMV の size, permeability に影響するか否かを検討した。小胞外液の浸透圧を mannitol で変化させた際の平衡 uptake 値, 特異的輸送担体を有さない L-glucose の受動拡散による B BMV からの遊出を control 群, gentamicin 添加群で比較したが差がみられなかった。これらの結果は 1) の V<sub>max</sub> 低下が B BMV の size, permeability の変化に起因しないことを示唆する。

- 3) D-glucose 輸送阻害の dose-dependency

添加 gentamicin 濃度を変化させ, D-glucose 輸送 kinetics を検討すると, OC, OM いずれの B BMV においても gentamicin dose-dependent な V<sub>max</sub> 減少, K<sub>m</sub> 不変という阻害がみられた。Dixon-plot にて阻害定数を求めると, OC で約 4 mM, OM で約 7 mM であり OC においてより強く D-glucose 輸送阻害がみられた。

- 4) スピラベル法による ESR

a) 5-SAL を用い 5 mM gentamicin 添加 25°C, 35°C の温度条件下に S (T $\parallel$ ) 測定を行ったところ, 25°C では OC にのみ (0.797 $\pm$ 0.004 vs 0.825 $\pm$ 0.004; P<0.01) また 35°C では OC, OM いずれの B BMV でも, (OC; 0.694 $\pm$ 0.004 vs 0.723 $\pm$ 0.004; P<0.001/OM; 0.668 $\pm$ 0.005 vs 0.694 $\pm$ 0.004, P<0.01) gentamicin 添加により増大がみられ, gentamicin により刷子縁膜脂質流動性低下が惹起されたことがうかがわれた。

b) 16-SAL を用いた ESR 測定では, 5-SAL と同様の条件下で gentamicin 添加による変化はみられなかった。16-SAL は 5-SAL に比し膜内のより hydrophobic な部位の状態を反映するとされており, これらの結果は gentamicin が膜の polar head group に近い部分に強く影響することを示唆する。

5) 上記の D-glucose 輸送阻害, 膜内スピンドラベル運動性低下の可逆性を検討するため gentamicin 処理後 gentamicin free の buffer にて超遠心操作を 2 度繰り返し添加 gentamicin を wash out した BBMV を実験に供した。gentamicin 添加により減少した D-glucose uptake は washing によって control と同値に回復した。また ESR においても gentamicin 添加により有意に増加した S (T II) は washing 操作後 control 値へと復した。この結果は, gentamicin が刷子縁膜への可逆的な結合を介して D-glucose 輸送および刷子縁膜脂質流動性に影響を及ぼすことを示唆する。

[総括]

本研究により, gentamicin の腎近位尿細管刷子縁膜に対する影響が明らかとなった。

- 1) gentamicin は刷子縁膜  $\text{Na}^+$ -dependent D-glucose 輸送を  $V_{\max}$  減少,  $K_m$  不変という様式で dose-dependent に阻害する。
- 2) 5-SAL, 16-SAL による ESR 測定から, gentamicin は刷子縁膜の polar head group に近い部分の脂質流動性を低下させることが示唆された。
- 3) 上記の変化はいずれも OC, OM の順に強く現れた。
- 4) washing 実験の結果から, gentamicin の刷子縁膜への可逆的な結合が glucose 輸送阻害, 膜内スピンドラベル運動性低下をひきおこしたと考えられた。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は, アミノ配糖体抗生物質の一種である gentamicin の家兎腎近位尿細管に対する影響を刷子縁膜レベルで明らかにしたものである。単離刷子縁膜を用いた系で gentamicin が  $\text{Na}^+$ -依存性 D-glucose 輸送を dose-dependent に阻害し, また同時に刷子縁膜脂質流動性を低下せしめることを明らかにし得た。さらにこれらの変化が近位尿細管  $S_1 + S_2$  で  $S_3$  に比しより強く現れるという腎内 heterogeneity をも初めて示し得た。これらの結果は, gentamicin 腎毒性の機序に全く新しい知見を加えるものであるとともに, 腎生体膜機能研究上も示唆に富むもので, 学位論文として価値あるものと評価される。