Osaka University Knowledge Archive

Title	アミノ配糖体抗生物質 gentamicin 腎毒性に対するループ利尿薬 furosemide の影響
Author(s)	中浜, 肇
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36847
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【60】

氏名・(本籍)	中浜　肇（なかはま　はじめ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第　8824　号
学位授与の日付	平成元年8月12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	**アミノ配糖体抗生物質 gentamicin 腎毒性に対するループ利尿薬 furosemide の影響**
論文審査委員	(主査) 教授　鎌田　武信 (副査) 教授　園田　孝夫　　教授　和田　博

論文内容の要旨

（目　的）

アミノ配糖体抗生物質 gentamicin（GM）は代表的な腎毒性薬物であり，その腎障害は主として近位尿細管における形態的ならびに機能的異常発現として特徴づけられる。しかしGMによる近位尿細管細胞の機能的異常について投与後短時間に追求した報告は少ない。また，ループ利尿薬 furosemide（FM）はGMの腎毒性を増強することが知られているが，その機序に関する研究もほとんどない。本研究では，GM腎毒性に対するFMの影響を，家兎腎および培養腎細胞を用い，1）腎近位尿細管刷子縁膜 Na^{+}-dependent D-glucose 輸送特性に対するGM投与の効果およびFM併用の影響，2）GMの尿細管への集積に対するFMの効果という観点より検討し両薬物の近位尿細管細胞に及ぼす作用を明らかにせんとした。

（材料及び方法）

1）腎刷子縁膜小胞の調製；体重約2kgの雄性家兎に乳酸リンゲル液100ml／min 注入下にGM20mg／kg（G群），GM20mg／kg＋FM10mg／kg（GF群），FM10mg／kg（F群），vehicle（C群）を静注60分後，両腎を摘出した。主に近位尿細管起始部（segmentl＋2）を含む皮質外層（OC）と主に近位尿細管終末部（segment 3）を含む髄質外層（OM）を切り取り，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膜標品と考えられた。また，血漿，尿，腎 homogenate 中GM濃度を substrate labeled fluorescent immunoassay（SLFIA）にて測定した。2）迅速濾過法；uptake 測定は迅速濾過法によった。BBMV50μlを入れた試験官を mixer にて攪拌しつつ，ここにD-〔^{3}H〕-glucose と反応に

に必要な溶質を含む反応液100μlを加え反応を開始した。一定時間後にfast sampling apparatusにより氷冷反応停止液を加えfilter上で吸引・濾過し，filter上のtracerを含むＢＢＭＶを液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定し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。３）ＬＬＣ－ＰＫＩ細胞（pig kidney epithelial cell line）およびＨ４ⅡＥ細胞（rat hepatoma cell line）へのＧＭ集積に対するＦＭの効果；培養７日目にDulbecco's PBS10mlにて２回洗浄後，ＧＭ（0.2－1.0mMあるいはＧＭ（1.0mM）＋ＦＭ（0.1－1.0mM）を含有する培養液に交換した。５％CO_2-95％air，37℃中で一定時間静置後，培養液を吸引し，Dulbecco's PBS10mlにて３回洗浄した。0.5％トリクロロ酢酸２mlにてＧＭを抽出し，細胞内ＧＭ濃度をＳＬＦＩＡ法にて測定した。

（結果および考察）

１）Na^+-dependent D-glucose輸送に対する影響　Ｇ群でＯＣにおいてKm（3.51±0.31vs6.25±0.21mM；CvsG：p<0.05）上昇がみられたがVmax（97.5±25.3vs135.2±32.5nmol／min／mg protein；CvsG：ns）に変化はなかった。ＯＭではKm（0.80±0.16vs0.84±0.25mM；CvsG：ns），Vmax（38.2±7.4vs 42.7±17.6nmol／min／mg protein；CvsG：ns）とも変化はなかった。ＧＦ群ではＯＣにおいてKm（3.51±0.31vs6.29±0.40mM；CvsGF：p<0.05）上昇，Vmax（97.5±25.3vs155.3±40.0nmol／min／mg protein；CvsGF：ns）不変が認められ，さらにＯＭにおいてもKm（0.80±0.16vs1.21±0.14mM；CvsGF：p<0.05）上昇，Vmax（38.1±7.4vs47.6±12.2nmol／min／mg protein；CvsGF：ns）不変が認められた。即ちＦＭ併用によりNa^+-dependent D-glucose輸送障害がＯＭにまで拡がることが明らかとなった。Ｆ群ではNa^+-dependent D-glucose輸送特性の変化は認められなかった。２）ＢＢＭＶのosmotic active spaceおよびpassive leakinessに対する影響の検討　ＧＭ，ＦＭ，ＧＭ＋ＦＭ投与がＢＢＭＶ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ＢＢＭＶからの遊出をＣ群，Ｇ群，ＧＦ群，Ｆ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Km上昇がＢＢＭＶのsize，permeabilityの変化に起因しないことを示唆する。３）ＧＭのpharmacokineticsに対するＦＭの影響　ＦＭ併用の有無にかかわらず，血漿濃度半減期（$T_{1/2}$），Area under the plasma concentration curve（ＡＵＣ），尿中排泄量等のGM pharmacokineticsに有意の変化は認めなかったが，腎homogenate中ＧＭ濃度はＧＦ群でＧ群に比し，ＯＣ（74.35±12.40vs112.70±26.93μg／g wet tissue；GvsGF：p<0.05），ＯＭ（82.45±18.33vs153.47±37.39μg／g wet tissue；GvsGＦ：p<0.05）において有意に上昇し，ＦＭが尿細管へのＧＭ集積を促進することが示された。４）培養細胞へのＧＭ集積に対するＦＭの効果　ＬＬＣ－ＰＫ１細胞によるＧＭ取り込みは反応開始後６時間までは直線的に増加し，それ以後は平衡に達した後徐々に減少した。ＧＭ取り込みはＧＭ濃度依存性を示した。ＦＭは濃度依存性にＧＭ取り込みを促進し，FM１mM併存時に促進効果は有意となった。Ｈ４ⅡＥ細胞では反応開始後24時間まで検出可能なＧＭ集積は認められず，ＦＭによるＧＭ集積促進も認められなかった。

（総　　括）

本研究により，下記の点が明らかとなった。

1）GMはＯＣ刷子縁膜 Na^+-dependent D-glucose 輸送を Vmax 不変，Km 上昇という様式で阻害する。ＦＭ併用により同様式の輸送阻害がＯＭ刷子縁膜にも出現し，尿細管機能障害部位の拡大が認められた。

2）ＦＭによる尿細管ＧＭ集積促進が尿細管機能障害部位拡大の一因であることが示唆された。

3）ＦＭが濃度依存性にＬＬＣ－ＰＫ１細胞によるＧＭ取り込みを促進したことより，ＦＭは循環動態の変化を介さずに，腎近位尿細管レベルで直接的に働き，ＧＭ取り込みを促進することが示唆された。

4）GMはＨ４ⅡＥ細胞に集積しにくく，ＧＭ集積の臓器特異性が培養細胞レベルでも明らかとなった。

論文の審査結果の要旨

本研究はアミノ配糖体抗生物質 gentamicin とループ利尿薬 furosemide の腎近位尿細管細胞に対する影響を家兎腎近位尿細管刷子縁膜および培養腎細胞（$LLC\text{-}PK_1$ 細胞）で明らかにしたものである。gentamicin により惹起される近位尿細管起始部 Na^+-dependent D-glucose 輸送阻害が furosemide 併用により近位尿細管終末部にも出現し，尿細管機能障害部位の拡大が認められる。また furosemide が濃度依存性に $LLC\text{-}PK_1$ 細胞による gentamicin 取り込みを促進し，furosemide が循環動態の変化を介さずに腎近位尿細管レベルで直接的に働き，gentamicin 取り込みを促進するという新しい知見を得た。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，薬物相互作用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。