

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	なか 中	はま 浜	はじめ 肇
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	8 8 2 4	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 2 kg の雄性家兎に乳酸リンゲル液 100 ml/min 注入下に GM 20 mg/kg (G 群), GM 20 mg/kg + FM 10 mg/kg (GF 群), FM 10 mg/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 (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, Ca^{2+} 沈澱法により刷子縁膜小胞 (brush-border membrane vesicles; BBMVs) 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。BBMV 50 μ l を入れた試験管を mixer にて攪拌しつつ, ここに D- ^3H -glucose と反応に

に必要な溶質を含む反応液100 μ l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-PK1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%CO₂-95%air, 37°C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 \pm 0.31vs6.25 \pm 0.21mM; CvsG: p<0.05) 上昇がみられたがVmax (97.5 \pm 25.3vs135.2 \pm 32.5nmol/min/mg protein; CvsG: ns)に変化はなかった。OMではKm (0.80 \pm 0.16vs0.84 \pm 0.25mM; CvsG: ns), Vmax (38.2 \pm 7.4vs42.7 \pm 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 \pm 0.31vs6.29 \pm 0.40mM; CvsGF: p<0.05) 上昇, Vmax (97.5 \pm 25.3vs155.3 \pm 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 \pm 0.16vs1.21 \pm 0.14mM; CvsGF: p<0.05) 上昇, Vmax (38.1 \pm 7.4vs47.6 \pm 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 \pm 12.40vs112.70 \pm 26.93 μ g/g wet tissue; GvsGF: p<0.05), OM (82.45 \pm 18.33vs153.47 \pm 37.39 μ g/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 V_{\max} 不変, K_m 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H4 II E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-PK₁ 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-PK₁ 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。