



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 培養腎近位尿細管上皮細胞におけるgentamicin蓄積に及ぼすPTHの影響                                                                                                          |
| Author(s)    | 柿原, 昌弘                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1991, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/37723">https://hdl.handle.net/11094/37723</a>                                                             |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|                  |                                                            |
|------------------|------------------------------------------------------------|
| 氏 名              | 柿 原 昌 弘                                                    |
| 博士の専攻分野<br>の 名 称 | 博 士 (医 学)                                                  |
| 学 位 記 番 号        | 第 9 8 7 4 号                                                |
| 学位授与年月日          | 平 成 3 年 8 月 8 日                                            |
| 学位授与の要件          | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                           |
| 学 位 論 文 名        | 培養腎近位尿管上皮細胞における gentamicin 蓄積に及ぼす<br>PTHの影響                |
| 論文審査委員           | (主査)<br>教 授 鎌 田 武 信<br>(副査)<br>教 授 園 田 孝 夫 教 授 矢 内 原 千 鶴 子 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

代表的なアミノ配糖体抗生物質のひとつである gentamicin は、グラム陰性桿菌感染症の治療に広く用いられているが、臨床的に高頻度に腎毒性を生じることが知られている。Gentamicin は、大部分未変化体のまま腎臓より速やかに排泄されるが、その一部が尿管細胞内に蓄積して細胞機能障害を惹起するためと考えられている。

Gentamicin 腎毒性に影響する因子としてよく知られているものに、食事性 Ca 摂取量と血中 PTH レベルがあげられる。ラットでは、高 Ca 食での飼育や副甲状腺摘除により gentamicin 腎毒性が軽減されること、逆に低 Ca 食では腎毒性が増強されることが知られている。しかしながら、in vivo においては、高 Ca 食や低 Ca 食により PTH レベルが変動するという相互の密接な関連性により、Ca、PTH 各々の gentamicin 腎毒性への影響を直接評価するのは困難である。本研究では、PTH の gentamicin 腎毒性に対する直接の影響を評価するため、gentamicin の尿管細胞蓄積性に焦点を絞り、腎培養細胞系を用い、Ca レベルを一定にした条件下で検討した。腎近位尿管機能を有する培養細胞系として、PTH 受容体を有する OK (opossum kidney) 細胞と PTH 受容体を有しない LLC-PK1 (pig kidney) 細胞を用いた。

### 〔 方 法 〕

#### 1) 細胞培養

OK 細胞は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 10% fetal calf serum (FCS) を培養液として用い、5% CO<sub>2</sub>-95% air, 37℃ 中で培養した。2-3 日毎に培養液を交換し、7 日毎

に継代した。本研究では100-130代のOK細胞を実験に用いた。LLC-PK1細胞はmedium 199 + 10% FCSを培養液とする以外はOK細胞と同一条件で培養した。220-250代のLLC-PK1細胞を実験に用いた。

## 2) 細胞内cAMP 量測定

継代7-10日目に、1 mM 3-isobutylmethylxanthine, 0.1% bovine serum albumin (BSA), 0.1% glucose, 20 mM Tris-HEPES (pH 7.4) により調整されたDMEM (FCSを含まない) 1 ml に交換し, bovine PTH (1-34) amide (bPTH) ( $10^{-6}$ ~ $10^{-9}$  M) または forskolin ( $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$  M) を添加後室温で反応させ, 培養液の吸引により反応を停止させた。5% trichloroacetic acid (TCA) 0.5 mlを加えて細胞内cAMP を抽出した。cAMP 濃度測定には市販のRIAキット (Amersham, Japan) を用いた。

## 3) Gentamicin 取り込みの測定

継代7-10日目に0.1% BSA, 0.1% glucose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM Tris-HEPES (pH 7.4) により調整されたDMEM (FCSを含まない) 1 mlに1 mM gentamicinを加えた培養液に交換した。5%  $\text{CO}_2$ -95% air, 37℃中で一定時間反応後, すばやく培養液を吸引し, 0.5% TCA 0.5 mlで gentamicinを抽出し, gentamicin 濃度をAmes TDA ゲンタマイシン測定キット (マイルス三共) を用い, substrate-labeled fluorescent immunoassay法 (Burd JF et.al. 1977)で測定した。培養皿上の残渣を0.5 N NaOH 1mlで溶解し, 蛋白濃度測定に供した。

## 〔成績〕

### 1) bPTH ( $10^{-7}$ M) 添加時の細胞内 cAMP量の経時的変化および濃度依存性

bPTH ( $10^{-7}$  M) 添加時の細胞内cAMP量の経時的変化は, OK細胞では5分後にピークを認め, その後徐々に減少したが, LLC-PK1細胞ではまったく反応がなかった。また, OK細胞ではbPTH濃度依存性に細胞内cAMP量が増加した ( $10^{-8}$  M以上) が, LLC-PK1細胞では高濃度 ( $10^{-6}$  M) でも反応がみられなかった。

### 2) Gentamicin の経時的取り込み

OK細胞, LLC-PK1細胞ともに6時間までは同程度で, ほぼ直線的にgentamicin 取り込みが増加した。したがって, 以下の実験は3時間の取り込みで検討した。

### 3) Gentamicin取り込みへのbPTH添加の影響

bPTHまたはvehicle (1 mM 酢酸 + 0.1% BSA) を添加した取り込み実験用培養液1 mlと交換し, gentamicin取り込みを測定した。OK細胞ではgentamicin 取り込みは,  $10^{-7}$  M以上のbPTH濃度で有意に増加した (PTH 0 M vs PTH  $10^{-7}$  M:  $3.01 \pm 0.01$  nmol/mg protein vs  $7.62 \pm 0.39$  nmol/mg protein,  $M \pm SD$ )。しかし, LLC-PK1細胞では, bPTHによるgentamicin 取り込み促進効果は認められなかった。

### 4) Gentamicin取り込みへのdibutyl cAMP (DBcAMP) 添加の影響

OK細胞ではgentamicin取り込みはDBcAMP濃度依存性を示し, DBcAMP 2 mM以上で有意に

増加した。bPTH 添加では影響のなかった LLC-PK1 細胞でも、DBcAMP 5 mM で gentamicin 取り込みは有意に増加した。

#### 5) Gentamicin 取り込みへの forskolin 添加の影響

Forskolin 添加時の細胞内 cAMP 量は、OK 細胞、LLC-PK1 細胞ともに濃度依存性を示し、forskolin  $10^{-6}$  M 以上では有意に増加した。また、いずれの細胞においても forskolin  $10^{-6}$  M 以上の添加で、gentamicin 取り込みは濃度依存性に有意に増加した。

#### 〔総括〕

培養腎近位尿細管上皮細胞で、PTH 受容体を有する OK 細胞および PTH 受容体を有しない LLC-PK1 細胞において、gentamicin 取り込みへの PTH の直接作用を検討した。

- 1) OK 細胞において、bPTH は濃度依存性に細胞内 cAMP 量を増加させ、それに平行する gentamicin 取り込みを増加させた。
- 2) OK 細胞のみならず LLC-PK1 細胞においても、DBcAMP は gentamicin 取り込みを増加させた。
- 3) OK 細胞のみならず LLC-PK1 細胞においても、forskolin は濃度依存性に細胞内 cAMP 量を増加させ、それに平行する gentamicin 取り込みを増加させた。
- 4) 以上の成績より、PTH は second messenger である cAMP を介して、gentamicin 取り込みを促進することが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では PTH の gentamicin 腎毒性増強作用機序を腎近位尿細管培養細胞系を用いて検討し、PTH が濃度依存性に gentamicin 細胞内取り込みを増加させること、その機序としては second messenger である cAMP を介することを初めて明らかにした。本研究の成果は、gentamicin 腎毒性発現機序解明と本薬物の有効かつ安全な投与指針の決定に資するところ大であり、学位に値するものと考えられる。