



| | |
|--------------|--|
| 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 | https://hdl.handle.net/11094/37723 |
| 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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

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 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 | 培養腎近位尿細管上皮細胞におけるgentamicin蓄積に及ぼす PTH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 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otoxicity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、その一部が尿細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otoxicity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otoxicityが軽減されること、逆に低Ca食では腎otoxicity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otoxicity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otoxicityに対する直接の影響を評価するため、gentamicinの尿細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。腎近位尿細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% CO₂-95% air, 37°C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 CaCl₂, 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% CO₂-95% air, 37 °C 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 1 ml 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 ± 0.01 nmol / mg protein vs 7.62 ± 0.39 nmol / mg protein, M ± 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 dibutyryl 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 取り込みは有意に增加了。

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 以上では有意に增加了。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增加了。

[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 量を增加させ、それに平行する gentamicin 取り込みを增加了。
- 2) OK 細胞のみならず LLC-PK1 細胞においても、DBcAMP は gentamicin 取り込みを增加了。
- 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 量を增加させ、それに平行する gentamicin 取り込みを增加了。
- 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 細胞内取り込みを增加させること、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。