

氏名	なべ くら とも ひろ 鍋 倉 智 裕
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第402号
学位授与の日付	平成10年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	腎尿細管有機カチオン輸送系の膜流動性による制御に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 乾 賢一 教授 半田 哲郎 教授 橋田 充

論文内容の要旨

多くのカチオン性薬物は腎臓の近位尿細管において能動的に分泌され、尿中へと排泄される。近位尿細管におけるカチオン性薬物の分泌は、上皮細胞の血管側側底膜及び管腔側刷子縁膜を介した輸送によって決定される。特に後者は逆向き H^+ 勾配と共役した二次性能動輸送過程 (H^+ /有機カチオン逆輸送) であり、カチオン性薬物の体内動態の決定に大きな役割を果たしている。膜流動性は生体膜の基本的な性質の一つであり、膜流動性の変動は生体膜中の様々な酵素や輸送体の活性に影響を与えることが知られている。腎有機カチオン輸送体も膜内在性蛋白質と考えられ、膜流動性の変動の影響を受けることが推察されるが、これまで有機カチオン輸送活性と膜流動性との関連について検討した報告は見当たらない。そこで著者は、腎皮質から単離した刷子縁膜小胞を用いて詳細な検討を行い、膜流動性の変動による有機カチオン輸送活性の制御機構に関して種々の有用な知見を得た。

I. 刷子縁膜の流動性上昇による有機カチオン輸送の調節

ラット腎皮質から単離した刷子縁膜小胞に膜流動化試薬であるベンジルアルコールを加えたところ、刷子縁膜中の 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) の偏光度は濃度依存的に低下し、膜流動性が上昇することが確認された。刷子縁膜小胞への有機カチオン tetraethylammonium (TEA) の取り込みはベンジルアルコールによって濃度依存的に阻害され、その IC_{50} は 18.3mM であった。ベンジルアルコールと同様、膜流動化作用を持つ n-アルキルアルコール類 (ブタノール、ヘキサノール、オクタノール) についても検討を行ったところ、いずれの場合も濃度依存的な TEA 輸送阻害が観察され、その強さはオクタノール、ヘキサノール、ブタノールの順であった。各アルコールの分配係数と TEA 輸送活性阻害効果の強さとは良好な関係、すなわち脂溶性が高いほど輸送阻害効果が強いという関係が見られた。また、刷子縁膜中の DPH の偏光度と TEA の取り込みには良い相関が認められた。これらの結果から、刷子縁膜の流動性の上昇に伴い、有機カチオン輸送活性は低下することが明らかとなった。

刷子縁膜小胞への choline 及び glucose の取り込みはベンジルアルコールによって濃度依存的に阻害され、その IC_{50} はそれぞれ、37.4mM、24.3mM であった。ベンジルアルコールによる輸送阻害効果の強さは、有機カチオン輸送系、glucose 輸送系、choline 輸送系の順であり、これら輸送系の中では有機カチオン輸送系が膜流動性上昇の影響を最も受けやすいことが示唆された。

刷子縁膜と側底膜では脂質組成、膜流動性が異なっており、また輸送系の局在も異なっていることが知られている。そこで、側底膜の有機カチオン輸送系に対する膜流動性上昇の影響について刷子縁膜と比較検討を行った。側底膜小胞への TEA 取り込みは刷子縁膜とは異なり、ベンジルアルコールの影響を受けなかった。従って膜流動性変動による有機カチオン輸送の調節は主として刷子縁膜において行われることが示唆された。

II. 刷子縁膜の流動性低下による有機カチオン輸送の調節

コレステロールは生体膜を構成する重要な成分であり、膜流動性の決定に大きな役割を果たしている。コレステロールのエステル体である cholesteryl hemisuccinate (CHS) を含む緩衝液中で刷子縁膜小胞を 37°C, 1 時間インキュベートしたところ、刷子縁膜中のコレステロール含量は増加し、これに伴い DPH の偏光度の上昇、すなわち膜流動性の低下が観察された。

種々の用量の CHS で処理した刷子縁膜小胞への TEA 取り込みを測定したところ、用量依存的に TEA 取り込みは増加した。TEA 取り込みと CHS 処理した刷子縁膜中の DPH の偏光度とは良い相関が認められた。これらの結果から、刷子縁膜の流動性の低下に伴い、有機カチオン輸送活性が上昇することが明らかとなった。

III. 膜流動性変化による有機カチオン輸送の調節：発育の影響

新生児の腎機能は成人と比べて低く、成長に伴い発達することが知られている。しかし薬物分泌能と発育の関連について膜レベルで解析した報告は極めて乏しい。そこで哺乳ラット及び成熟ラットの腎から調製した刷子縁膜小胞を用い、両群における有機カチオン輸送及び膜流動性について比較検討を行った。生後14日齢の哺乳ラットから調製した刷子縁膜画分中の刷子縁膜指標酵素であるアルカリ性ホスファターゼとアミノペプチダーゼの比活性はホモジネートと比べ17倍以上であり、得られた刷子縁膜は生後8週齢の成熟ラットからのものと同様、十分精製されていることが確認された。哺乳ラットから調製した刷子縁膜中での DPH の偏光度は成熟ラットからのものと比べて低く、哺乳ラットの刷子縁膜流動性は成熟ラットよりも高いことが示された。

生後14日齢の哺乳ラットから調製した刷子縁膜小胞においても、TEA の取り込みには駆動力である逆向き H^+ 勾配と共役した一過性の上り坂輸送 (overshoot 現象) が観察され、また基質認識性も成熟ラットからのものと同一であった。しかし TEA 取り込みの初期速度は成熟ラットと比べ14日齢の哺乳ラットでは低く、有機カチオン輸送活性は低いことが示された。輸送活性は成長に伴い上昇し、28日齢で成熟ラットの値に達した。これらの結果から、哺乳ラットの腎刷子縁膜中に成熟ラットと同様の性質を持つ有機カチオン輸送系が存在すること、しかしその輸送活性は成熟ラットと比べて低く成長に伴い上昇すること、膜流動性の低下が輸送活性上昇の一因であることが明らかとなった。

以上、著者は腎皮質から単離した刷子縁膜小胞を用いて膜流動性変動による有機カチオン輸送活性の調節について検討を行い、膜流動性の上昇によって輸送活性が低下すること、逆に膜流動性の低下によって輸送活性が上昇すること、成長に伴う膜流動性の低下が輸送活性上昇の要因の一つであることを明らかにした。これらの研究結果は、腎尿細管上皮細胞を介したイオン性薬物輸送の生理的、病態生理的な輸送変化について解明を進める上で有用な基礎的知見となり得るものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

カチオン性薬物は、近位尿細管上皮細胞の側底膜 (血管側) 及び刷子縁膜 (管腔側) に局在する固有の輸送体を介して、能動的に尿中へ分泌される。特に刷子縁膜では、逆向き H^+ 勾配によって駆動される H^+ /有機カチオン逆輸送系がカチオン性薬物の尿中排泄を制御している。生体膜の基本的性質の一つである膜流動性は、生体膜に局在する酵素や輸送体の活性に影響を及ぼすことが知られているが、有機カチオン輸送活性と膜流動性との関連について検討した報告はない。本論文は、刷子縁膜小胞を用いて有機カチオン輸送に及ぼす膜流動性の影響について系統的に解析したものであり、得られた成果は以下の通りである。

刷子縁膜小胞に膜流動化試薬ベンジルアルコールを加えると、膜流動性は上昇し、一方刷子縁膜小胞への有機カチオン Tetraethylammonium (TEA) の取り込みは、ベンジルアルコール濃度に依存して阻害された。また有機カチオン輸送系は、グルコース輸送系、コリン輸送系に比べてベンジルアルコールの影響を受けやすいこと、側底膜小胞への TEA 取り込みは、刷子縁膜とは異なりベンジルアルコールの影響を受けにくいことが示された。

次に刷子縁膜の流動性低下による有機カチオン輸送の変化を検討するために、刷子縁膜小胞をコレステロールのエステル体である cholesteryl hemisuccinate で処理し、TEA 取り込みを測定した。その結果、刷子縁膜の流動性の低下に伴い、有

機カチオン輸送活性の上昇することが判明した。

更に哺乳ラット及び成熟ラットの腎から調製した刷子縁膜小胞を用い、両群における有機カチオン輸送及び膜流動性について比較検討した。その結果、哺乳ラットの有機カチオン輸送活性は、成熟ラットに比べて低いこと、成長に伴う膜流動性の低下が輸送活性上昇の一因であることが明らかとなった。

以上の研究は、刷子縁膜小胞を用いて膜流動性変動による有機カチオン輸送の制御について初めて明らかにしたもので、腎尿細管におけるイオン性薬物輸送の生理的、病態生理的变化の解明に貢献するところ大であり、医療薬剤学の発展に寄与するものと考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成9年12月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。