

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本尿路結石症学会誌 (2002.12) 1巻1号:90～92.

腎上皮細胞-蓷酸カルシウム結晶相互作用におけるクエン酸・マグネシウムの効果について

加藤祐司, 山口聡, 高下紀子, 八竹直, 奥山光彦

◆ Session 3-4

腎上皮細胞 - 蔞酸カルシウム結晶相互作用における
クエン酸・マグネシウムの効果について

1)旭川医科大学 泌尿器科 2)遠軽厚生病院 泌尿器科

加藤 祐司¹⁾、山口 聡¹⁾、高下 紀子¹⁾、八竹 直¹⁾、奥山 光彦²⁾

目的

尿路結石形成のごく初期の段階では、腎尿細管細胞と結晶の接着が必要であるとされる。今回我々は Mardin-Darby canine kidney 細胞(以下MDCK細胞)と ¹⁴CラベルCaOx結晶(以下COM結晶)を用いて低分子結石抑制物質としてクエン酸およびマグネシウムに着目し、細胞 - 結晶間相互作用における影響を検討するとともに、過蔞酸尿症のモデルとして蔞酸により細胞障害を惹起させ、クエン酸の結石接着抑制効果を検討した

▲ スライド1

尿路結石形成の初期の段階では、腎尿細管細胞と結晶の接着が起こるとされます。今回の検討は腎尿細管培養細胞と蔞酸カルシウム結晶の細胞結晶間相互作用に関して、従来低分子抑制物質とされてきたクエン酸、マグネシウムに着目し、結晶の接着抑制効果について検討しました。また、過蔞酸尿症のモデルとして高濃度の蔞酸に曝露された細胞に対するクエン酸の効果も検討しました。

MDCK cell culture

MDCK細胞(経代8~10)をDMEMで培養。細胞は12wellのplate内に置いたガラスカバースリップ(φ15mm)にまかれ、confluenceに達するまで3~4日間培養し(4×10⁶cell/plate)し、これを実験に使用した

¹⁴C labeled COM crystal preparation

10mM CaCl₂に同量の10mM NaOx(50 μCi/ml [¹⁴C]labeled oxalateを混入)をartificial urine buffer内に混ぜ、10分間室温で放置後1000×g 20分間で遠沈。上澄を捨てdesiccatorで一昼夜vacuum dryとした作成した結晶は顕微鏡下で観察すると典型的なCaOx monohydrateであり、またFTIRでもpureなCOM結晶であった

▲ スライド2

使用した細胞はイヌの腎尿細管細胞である MDCK 細胞で、12well のプレート内に置いたカバースリップに confluence に達するまで培養し、これを実験に用いました。Calcium oxalate monohydrate 結晶は塩化カルシウムとカーボン14で標識された蔞酸ナトリウムを混合することにより、カーボン14で標識されたCOM結晶を作成しました。顕微鏡下、FTIRでもCOM結晶であることを確認しました。

Inhibitor concentration

作用させるfinal concentrationを以下のように設定した

	①	②	③	④	⑤
Citrate phase					
sodium citrate(mM)	0.1	0.25	0.625	1.25	2.5
Magnesium phase					
magnesium chloride(mM)	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0
Citrate+Magnesium phase					
sodium citrate(mM)	0.1	0.25	0.625	1.25	2.5
magnesium chloride(mM)	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0

各溶液は37°C、pH6.0に設定した

▲ スライド3

作用させるクエン酸、マグネシウムの濃度はクエン酸では0.1から2.5まで、マグネシウムでは0.2から4.0 mMまでの5段階に設定しました。クエン酸とマグネシウムを同時に曝露する場合の濃度はそれぞれ単独で使用する濃度を混合して作成しました。

実験手順

- 1) COM結晶液を20 μg/mlとなるようartificial urine内に溶解し凝集を予防するためsonicatorでsuspensionする(37°C)
- 2) mediumを吸引後、PBS buffer(37°C)2mlで2回細胞表面を洗浄する
- 3) 実験プロトコールに従い、各反応物質をwell内に入れ10分間incubator内(5% CO₂, 37°C)で反応させる
- 4) カバーガラスを取り出し、少量のワセリンの着いたスライドガラスに貼付し、1分間ゆっくり攪拌したartificial urine内で付着していない結晶を除去する
- 5) カバーガラスをシンチレーションバイアル内に挿入し6N HCl(2ml)を入れシンチレータ(BIOFLUOR Packard BioScience社製)5mlを混入し液体シンチレーションカウンターで¹⁴Cを測定する

▲ スライド4

実験手順ですが、まず作用させるCOM結晶の濃度を20 μg/mlになるようにartificial urineで調整しました。細胞に結晶または抑制物質を作用させる前にmediumを吸引後、細胞表面をPBSで洗浄します。次に後で述べる実験プロトコールに従って、反応物質を細胞に曝露し10分間

37°Cでincubationします。COM結晶液および洗浄に用いたPBS液、抑制物質溶液はそれぞれ37°Cに保温した物を用いました。

Incubation後、well内にあるカバーグラスを取り出し、1分間攪拌したartificial urine内で付着していない結晶を取り除きます。最後にカバーグラスごとシンチレーションバイアルの中に入れ、塩酸で細胞を剥離後、シンチレーターを混入し液体シンチレーションカウンターでカーボン14を測定します。

実験1

- A: MDCK細胞にCOM結晶と抑制物質を同時に曝露
- B: MDCK細胞にあらかじめ抑制物質を2時間曝露しPBS bufferで洗浄後COM結晶を曝露
- C: COM結晶に抑制物質を2時間曝露し3000rpm/15minで遠沈後、上澄みを捨て、artificial urine bufferを加えMDCK細胞に曝露

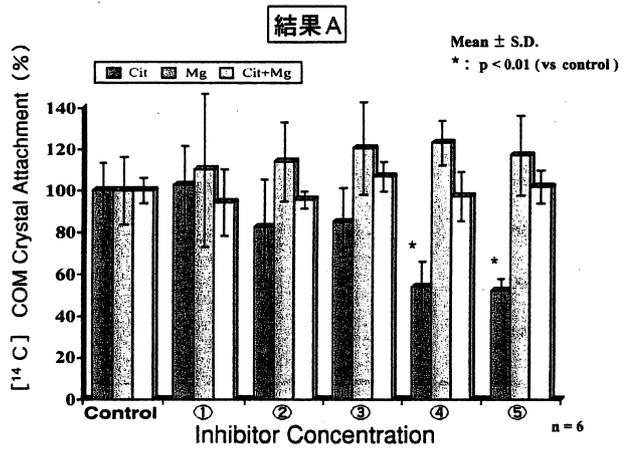
▲ スライド5

実験プロトコルですが、まず3つの条件を設定しました。Aは細胞に結晶と抑制物質を同時に曝露した場合。また抑制物質が細胞と結晶のどちらに作用するのかを検討する目的で細胞に抑制物質を2時間曝露した後、PBSで細胞を洗浄し結晶を曝露した場合をB、結晶に抑制物質を2時間曝露した後、遠沈し上澄みを捨て、volumeを調整し、細胞に曝露した場合をCとしました。

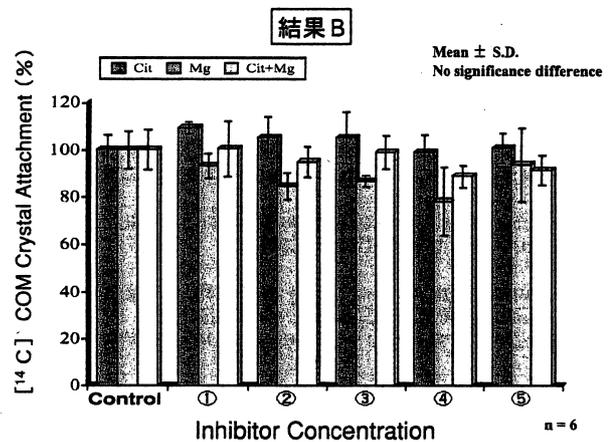
結晶と抑制物質を同時に曝露した場合の結果です(スライド6)。赤はクエン酸、緑はマグネシウム、水色はクエン酸とマグネシウムです。クエン酸の時だけ濃度依存性に最大40%結晶の付着が抑制されましたが、マグネシウム単独、2剤混合では結晶の付着に変化を認めませんでした。

実験Bは、はじめに抑制物質を細胞に反応させた後、細胞を洗浄しその後結晶を曝露した場合ですが(スライド7)、この場合では3者とも結晶の付着はコントロールと比較して変化を認めませんでした。

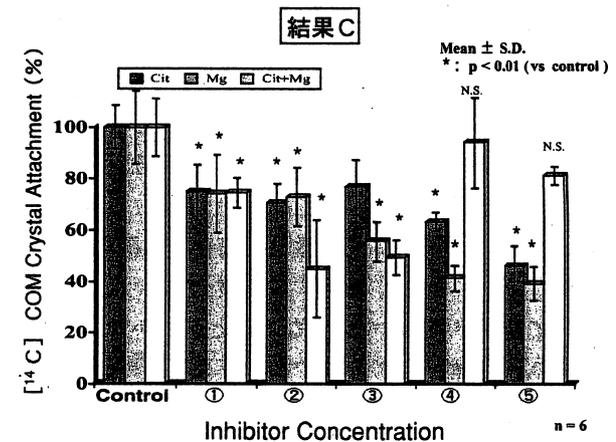
実験Cは結晶と抑制物質をはじめに曝露した場合ですが(スライド8)、クエン酸、マグネシウムのそれぞれ単独では濃度依存性にコントロールと比較して最大60%結晶の付着を抑制する傾向を認めました。また2剤の混合でも途中の濃度までは結晶の付着が抑制される傾向を認めました。



▲ スライド6



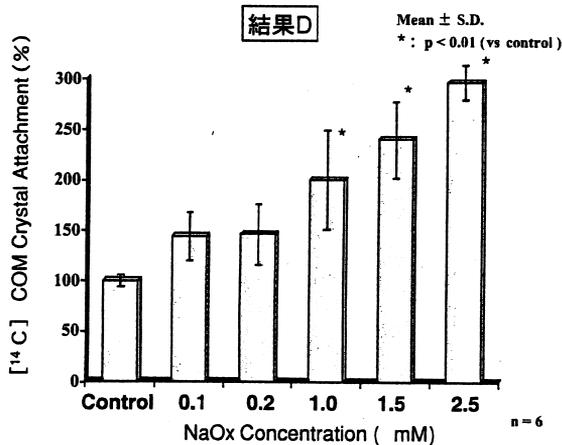
▲ スライド7



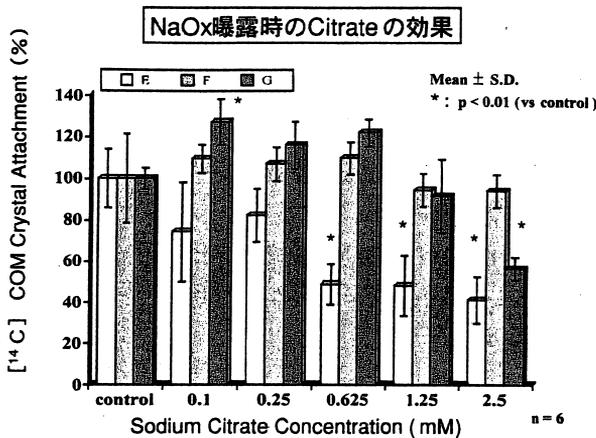
▲ スライド8



Dr. Kato



▲ スライド 10



▲ スライド 11

実験②

- D : MDCK細胞に種々の濃度のsodium oxalate (NaOx)を2時間曝露し、細胞を洗浄後にCOM結晶を曝露させる
- E : MDCK細胞に2.5mMのNaOxを2時間曝露し、細胞表面を洗浄後COM結晶とsodium citrate (Na-Cit)を同時に曝露
- F : 2.5mMのNaOxとNa-CitをMDCK細胞に2時間曝露しPBS bufferで洗浄後COM結晶を曝露
- G : MDCK細胞には2.5mM NaOxを2時間曝露、COM結晶にNa-Citを2時間曝露し3000rpm/15minで遠沈後上澄みを捨てartificial urine bufferを加えMDCK細胞に曝露

▲ スライド 9

次に実験2として、まず過尿酸血症のモデルとして尿酸ナトリウムの濃度を5段階に設定し、細胞に作用させた後、結晶の付着状況を検討しました。この結果をふまえて、2.5 mMの尿酸ナトリウムで細胞を前処置し、先程の実験1と同様に、クエン酸と結晶を細胞に同時に曝露する、あらかじめクエン酸を細胞に曝露し、細胞を洗浄して結晶を曝露する、結晶とクエン酸をあらかじめ反応させ、遠沈して上澄みを捨てた後に曝露するという3つの条件で検討しました。

まず、尿酸ナトリウムを曝露した場合の結晶の付着効果ですが(スライド10)、曝露する尿酸ナトリウムの濃度に依存して結晶が付着しやすくなることがわかりました。

2.5 mMの尿酸ナトリウムで前処置した後のクエン酸の効果についてですが(スライド11)、尿酸非曝露の時と同様に、細胞にあらかじめクエン酸を曝露させた場合には結晶の接着抑制効果は認められませんでした。クエン酸と結晶を同時に曝露した場合と結晶にあらかじめ曝露した場合にはクエン酸の濃度が高濃度の方で結晶の接着抑制効果を認めました。

考察および結論

- 1) クエン酸は生理的濃度(1.25、2.5mM)でCOM結晶の接着抑制効果を認め、その効果は細胞に対してではなく結晶に作用して発現すると思われた
- 2) 高濃度の尿酸環境下でもクエン酸の結晶接着抑制効果は認められ、結石形成の抑制には有用である可能性が示唆された
- 3) マグネシウムは結晶に作用して細胞への接着を抑制する可能性が示唆されたが、クエン酸との相乗効果は認められなかった

▲ スライド 12

考察ですが、クエン酸は生理的濃度で尿酸カルシウム結晶の細胞への接着を抑制する効果を認めました。その効果は細胞に対して作用するのではなく、結晶に作用して発現するものと考えられました。また、高濃度の尿酸に曝露された細胞は結晶の付着が増強しましたが、クエン酸はそのような条件下でも接着抑制効果を認め、結石形成の抑制に有用である可能性が示唆されました。マグネシウムは結晶に作用して細胞への接着を抑制する可能性が示唆されましたが、クエン酸との相乗効果は認められませんでした。