



Title	液体イオン交換膜微小電極による生体膜K, Clイオン 転送機構の研究
Author(s)	三木, 茂裕
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32154">https://hdl.handle.net/11094/32154</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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文につい て <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</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・(本籍)	三 木 茂 裕
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 5 7 3 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	液体イオン交換膜微小電極による生体膜 K, Cl イオン転送機構の研究
論文審査委員	(主査) 教授 宮井 潔 (副査) 教授 中馬 一郎 教授 阿部 裕

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目 的]

腎は生体の homeostasis にとって最も重要な役割をはたしており、特に尿細管は生体に必要な物質の再吸収、不必要な物質の排泄を介してこの homeostasis に関与する。この尿細管における物質転送の基本過程は、尿細管細胞膜に存在する物質転送機構にあると考えられる。体液の重要な組成を占めるイオンのうち、 $K^+$  は cell volume regulation, protein synthesis 等、多くの細胞内部の生命現象に重要な役割をはたしている。又、 $Cl^-$  は cation ( $Na^+$ ,  $K^+$  等) が転送される場合、電気的中性を保ち、cation の転送効率をよくする役割をはたしていると考えられる。最近では、Henle 係蹄上行脚で  $Cl^-$  が能動的に再吸収されるとの説も提唱されている。これら  $K^+$  及び  $Cl^-$  の転送機構の解明は、腎生理学上極めて重要と考えられる。さて、従来の生体膜イオン転送機構の研究は、細胞内を black box とし、細胞外の変化よりなされていた。今回、私は最近開発された液体イオン交換液を充填した微小イオン電極を用い、これを最も実験の行い易いモデル生体膜であり、ほ乳類遠位部ネフロンのアナログであるヒキ蛙膀胱膜に応用し、直接細胞内イオン ( $K^+$  及び  $Cl^-$ ) 活動度を測定して、細胞膜レベルでの電解質転送機構の解明を試みた。

#### [方法ならびに成績]

先端  $1\mu m$  以下のガラスピペットの先端  $200\sim 500\mu m$  に  $K^+$  及び  $Cl^-$  感性液体イオン交換液 (組成;  $K^+$  交換液 1, 2 - dimethyl - 3 - nitrobenzene 2 g / potassium tetrakis borate 100ml,  $Cl^-$  交換液 10% trioctylpropyl ammonium chloride in 3 - nitro - o - xylene) を、残部に 0.5M  $KCl$  溶液を充填し微小イオン電極を作製、特性を検討しその信頼性を確認した後、以下の実験を行った。

Ussing & Zerahn の改良型装置に、ヒキ蛙 (*Bufo bufo japonicus*) 膀胱膜を粘膜側を上にして張り、両側を amphibian ringer 液で満たした。漿膜側から 97% O<sub>2</sub>-3% CO<sub>2</sub> 混合ガスで bubbling を行った。微小イオン電極及び KCl 電極 (膜電位測定用) は、すべての実験で、粘膜側から細胞内に刺入した。又、同時に経膀胱膜電位 (PD), short-circuit current (SCC) を測定した。

実験条件は、K<sup>+</sup>では① basal condition, ② 5 × 10<sup>-4</sup> M ouabain 漿膜側 (以下(S)と略) 添加, ③ 10<sup>-4</sup> M ethacrynic acid (S), ④ 100 mU/ml ADH (S), ⑤ 10<sup>-5</sup> M PGE<sub>1</sub> (S) の 5 条件で行った。又、Cl<sup>-</sup>では① basal condition, ② 4 × 10<sup>-3</sup> M ouabain (S), ③ 100 mU/ml ADH (S), 及び④ Cl<sup>-</sup> 濃度勾配 (粘膜側液 Cl<sup>-</sup> 95 mM, 漿膜側液 Cl<sup>-</sup> 47.5 mM) の 4 条件で行った。

<K<sup>+</sup>についての成績>① basal condition; 17個の膀胱膜で計 167回の測定結果は、細胞内 K<sup>+</sup> 活動度 a<sub>k</sub><sup>i</sup>: 41.2 ± 0.5 mM (M ± S.E 以下同じ), 細胞内外の K<sup>+</sup> 平衡電位 E<sub>k</sub> は -68.9 ± 0.3 mV, 又, PD, SCC, 粘膜側膜電位 mEm, 漿膜側膜電位 sEm は、各々, 22.3 ± 2.2 mV, 22.5 ± 1.7 μA, 10.0 ± 1.3 mV (細胞内 > 粘膜側外液), 12.3 ± 1.3 mV (細胞内 < 漿膜側外液) であった。② ouabain 添加により, PD, SCC, mEm, sEm は低下し, a<sub>k</sub><sup>i</sup>, E<sub>k</sub> の有意の低下がみられた。③ ethacrynic acid 添加では, PD, SCC, mEm, sEm の低下がみられるが a<sub>k</sub><sup>i</sup>, E<sub>k</sub> は不変であった。④ ADH 添加; PD, SCC, mEm は上昇, sEm は不変で, a<sub>k</sub><sup>i</sup>, E<sub>k</sub> は有意に低下した。⑤ PGE<sub>1</sub> 添加; PD, SCC, mEm sEm は上昇し, 且つ, a<sub>k</sub><sup>i</sup>, E<sub>k</sub> も有意に上昇した。

<Cl<sup>-</sup>についての成績>① basal condition; 11個の膀胱膜, 計 75回の穿刺により, PD, SCC, mEm, sEm は、各々, 32.5 ± 3.7 mV, 28.1 ± 4.6 μA, 18.9 ± 2.5 mV (細胞内 > 粘膜側外液), 13.6 ± 1.6 mV (細胞内 < 漿膜側外液) であった。細胞内 Cl<sup>-</sup> 活動度 a<sub>cl</sub><sup>i</sup>, 細胞内外 Cl<sup>-</sup> 平衡電位 E<sub>cl</sub> は各々, 49.9 ± 2.9 mM, -10.9 ± 2.1 mV であった。又, E<sub>cl</sub> と sEm 間には有意の相関が認められた。② ouabain 添加により, PD は低下, mEm は低下逆転 (細胞内 < 粘膜側外液), これに対し, sEm は低下, 上昇の両方がみられた。又, a<sub>cl</sub><sup>i</sup> は sEm の変化と対応して減少と増加がみられ, E<sub>cl</sub> は, sEm の変化に一致して変動した。③ ADH 添加では, PD, SCC, mEm, の上昇, 及び a<sub>cl</sub><sup>i</sup> の増加, E<sub>cl</sub> の低下がみられた。④ Cl<sup>-</sup> 勾配を形成させると, PD の低下, mEm の低下逆転 (細胞内 < 粘膜側外液), sEm の上昇がみられ, a<sub>cl</sub><sup>i</sup> は低下, 又, E<sub>cl</sub> は, 粘膜側細胞膜において上昇, 漿膜側細胞膜において低下した。

#### [総括]

① ouabain, ethacrynic acid の漿膜側添加実験の結果より, ヒキ蛙膀胱膜の漿膜側細胞膜に 2 種類の異なる Na<sup>+</sup> ポンプが存在し, 細胞内 K<sup>+</sup> は, ouabain sensitive な Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 交換ポンプにより, 維持されていることが示唆された。更に, ADH は, 発電性 Na<sup>+</sup> ポンプを, PGE<sub>1</sub> は Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 交換ポンプを賦活すると考えられる。② Cl<sup>-</sup> は, 粘膜側, 漿膜側両細胞膜レベルで能動的再吸収機構の発現は認められず, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> の転送に付随した balancing ion としての役割をはたしていると考えられる。③ 細胞内 K<sup>+</sup> は, 約 1/2 が遊離状態で, 残り 1/2 は結合状態か区画された状態にありこれに対し, Cl<sup>-</sup> は, ほとんどすべて遊離状態で存在すると考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、液体イオン交換膜微小電極を用い生体膜（ヒキ蛙膀胱膜）細胞内  $K^+$   $Cl^-$  活動度を直接測定することにより、両イオンの細胞膜レベルでの転送機構および細胞内での存在様式を検索したものである。その結果、①  $K^+$  は漿膜側の  $Na^+ - K^+$  交換ポンプにより能動的に細胞内に取り込まれ、 $Cl^-$  は、粘膜側および漿膜側両細胞膜で受動的に再吸収されていること。② 細胞内  $K^+$  は約 1/2 が、 $Cl^-$  はほとんど全てが遊離イオンとして存在すること、を示す成績を得た。本論文は、このようにユニークな方法で生体膜転送機構に価値ある知見を得た点高く評価される。