

氏 名 ( 本 籍 )                    まる                    やま                    たけ                    お  
丸                    山                    武                    夫

学 位 の 種 類                    医                    学                    博                    士

学 位 記 番 号                    医 博 第                    7 3 5                    号

学 位 授 与 年 月 日                    昭 和   4 7 年   3 月   2 4 日

学 位 授 与 の 要 件                    学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 專 門 課 程                    東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科  
( 博 士 課 程 ) 生 理 学 系 專 攻

学 位 論 文 題 目                    The sugar evoked potential in the  
renal proximal tubule.Observations in  
single nephrons of newt kidney.  
( 腎 近 位 尿 細 管 に お け る 糖 誘 発 電 位 , イ モ リ  
腎 臓 の 単 一 ネ フ ロ ン に お け る 観 察 )

( 主 査 )

論 文 審 査 委 員   教 授   星                    猛   教 授   鈴 木   泰   三

教 授   田 崎   京   二

# 論文内容要旨

## 序 論

小腸における糖, アミノ酸の能動輸送は, 外液中に  $\text{Na}^+$  が存在することを絶対的に必要とし, かつその能動輸送には著明な壁内外電位差の変化を伴うことが知られている。今日その電位変化は, 上皮細胞におけるそれら有機溶質の能動輸送が  $\text{Na}^+$  輸送と連結しているために生ずると解釈されている。一方腎近位尿細管においても, D-glucose, D-galactose の能動輸送は管腔内  $\text{Na}^+$  の存在に依存することが知られているが, 小腸でみられるような糖輸送に密接に関係した電位変化が尿細管内外及び細胞膜にみられるか否かは未だ全く知られていない。有機溶質の能動輸送に伴う細胞電位の変化は, 能動輸送の細胞機序, 特にその  $\text{Na}^+$  依存機構を解明するのに重要な資料を提供するものである。本研究においては, イモリ腎臓の単一近位尿細管を用いて, 糖輸送に伴って生ずる細胞内電位及び尿細管内外電位変化の諸性質について微小注入技術, 微小電極技術を用いて研究した。腎尿管では小腸と異なり, 基底部膜電位を容易に調べ得る利点があるので, 特にこの部の膜電位変化に注目して実験を行なった。

## 方 法

実験には餌を与えずに 4~6℃で飼育した雄イモリを用いた。動物の脊髓を金属棒で破壊したのち, 電気メスを用いて開腹し, 大腸及び膀胱を除去して腎臓を広く露出した。そののち動物全体を基本リングル液を満たした液槽に固定した。左腎の secretory (又は pelvic) kidney のみを用いた。実体顕微鏡下で, まず先端 20  $\mu$  以内の単一ガラス毛細管を用いてポーマン囊を穿刺し, 鉍油を注入して汗過液の尿細管への移行を止め, 次いで先端 20  $\mu$  以内の灌流用二連ガラス毛細管, 又は灌流用三連ガラス毛細管を近位尿細管に穿刺して, 基本リングル液, 又は各種試験液を注入し, その際の基底部膜電位;  $E_{bm}$  及び尿細管内外電位差;  $E_{tt}$  を 3M KCl + 10 mM クエン酸カリ液を満たした微小ガラス電極 (抵抗 12~18 M $\Omega$ , 尖端電位 5 mV 以下) を用いて測定した。電位は FET 高入力抵抗前置増巾器を介して, 高感度ペン書き記録計によつて記録した。

## 結 果

糖を含まない基本リングル液を注入した際の  $E_{bm}$  は外液に対して平均  $-73.6 \pm 2.4$  mV ( $\pm$  S.E.,  $n = 57$ ),  $E_{tt}$  は平均  $-4.2 \pm 0.1$  mV ( $\pm$  S.E.,  $n = 23$ ) であつた。能動輸送されない D-mannitol を 0.55, 1.375, 2.75, 5.5, 11.0 mM の各濃度を溶かした基本リングル液を注入したときの  $E_{bm}$  及び  $E_{tt}$  はいずれの濃度でも基本リングル液注入時との間には有意の差がみられなかつた。D-glucose を含む試験リングル液を注入した場合は直ちに  $E_{bm}$  の脱分極及び  $E_{tt}$  の増大がみられた。この電位変化の大きさは注入液中の D-glucose に依存し, D-glucose

濃度に対して Michaelis-Menten 型の飽和性を示した。E<sub>bm</sub>変化は 3mM で、E<sub>tt</sub>変化は 5.5 mM でほぼ最大に達し、その最大変化値は前者では平均  $-1.2.4 \pm 0.6 \text{ mV}$  ( $\pm \text{SE}$ ,  $n=19$ )、後者では平均  $-1.48 \pm 0.13 \text{ mV}$  ( $\pm \text{SE}$ ,  $n=8$ ) であつた。D-glucose 注入によつて誘発される電位変化は管腔内注入液の  $\text{Na}^+$  濃度にも強く依存し、 $\text{Na}^+$  濃度の低下と共に減少して、E<sub>bm</sub> の脱分極は無  $\text{Na}^+$  で、E<sub>tt</sub> 増大は  $50 \text{ mEq/L}$  以下でみられなくなつた。これら D-glucose によつて誘発された電位変化は  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  phlorizin を含む 5.5 mM D-glucose リンゲル液を更に追加して注入すると E<sub>bm</sub> は過分極方向に変化し、E<sub>bm</sub> は平均  $-69.7 \text{ mV}$  ( $n=3$ ) のレベルに達した。すなわち D-glucose による脱分極は著明に抑制された。

## 考 察

以上の観察によつて、腎近位尿細管においても管腔内に能動輸送される糖が存在すると管腔内負電位の増大がおこること、その増大は管腔内の糖濃度に対して飽和する性質を有し、かつ糖濃度一定の時には管腔内  $\text{Na}^+$  濃度に依存すること、低濃度 phlorizin によつて抑制されることなどが明らかとなつた。誘発される電位変化の諸性質の類似性から、この電位変化は、小腸上皮細胞で観察される糖誘発電位 (又は糖輸送電位) と本質的に同じ機序によつて発生するものであると考えられる。その際同時におこる E<sub>bm</sub> の脱分極は管腔内負電位増大とは逆方向なのでこの変化は、管腔側膜における糖と共軛する  $\text{Na}^+$  の移動、又は糖  $\text{Na}^+$  担体の複合体の移動が刷子縁膜に脱分極をおこさせ、その脱分極が上皮細胞内の漏洩抵抗を介し、基底部膜に脱分極効果を及ぼすと解釈せざるを得ない。Rose & Schultz 及び White & Armstrong は小腸での刷子縁膜変化から同様の基底部膜脱分極の可能性を想定しているが、本実験では直接 E<sub>bm</sub> を測定してこのことを実証したと考える。同時にこのことは、糖誘発電位の発生には、刷子縁膜での担体機構が直接関与しているとの考えを支持し、細胞内に入った  $\text{Na}^+$  によつて起電性の  $\text{Na}^+$ -pump が刺激されるとの考えを除外する。尿細管内外で記録される最大の誘発電位が小腸内外で報告された値より著しく小さいのは、近位尿細管細胞内外短絡路が多く、電気抵抗が極めて低いことに関係がある。腎近位尿細管においても小腸における同様の糖誘発電位がみられること、及びその発生の方が刷子縁膜と考えられることから尿細管における能動輸送の細胞機序も少なくとも D-glucose, D-galactose に関する限り小腸における場合と本質的に同一であることを裏づけている。又腎近位尿細管内外電位の形成には従来この種の有機溶質輸送電位の関与が考えられていなかったが、今回の結果は少なくともその一部にこの輸送電位が関与していることを示しており、それを無視し得ないことを示している。

## 結 論

イモリ腎近位尿細管の管腔内に能動輸送される糖を含む液を注入することによつて E<sub>tt</sub> の増大並びに E<sub>bm</sub> の脱分極を記録することが出来た。能動輸送されない D-mannitol 溶液の注入時には同種の変化はみられなかつた。D-glucose による糖誘発電位は、D-glucose 濃度に依存し Michaelis-Menten 型の飽和特性を示し、その最大値は平均  $-1.48 \pm 0.13 \text{ mV}$  ( $\pm \text{SE}$ ,  $n=19$ ) であつた。これら電位変化は又管腔内  $\text{Na}^+$  濃度にも依存し、低濃度 ( $2 \times 10^{-4} \text{ M/L}$ ) phlorizin 溶液によつて抑制された。E<sub>bm</sub> は、刷子縁膜で発生した電位変化 (脱分極) が漏洩抵抗を介して基底部膜に干渉する結果と解釈され、本質的に重要な糖誘発電位発生の方は刷子縁膜であると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

有機溶質の能動輸送の細胞機序については、一般的に、 $\text{Na}^+$  との共輸送の過程が本質的に重要なステップであると考えられ、小腸ではその様な機構が刷子縁膜に存在し、かつその機構は起電性であると考えられている。然し腎尿細管においては、糖輸送にその様な起電性の過程が関与するか否かは全く未知である。著者はそこでイモリ腎細管を用い、微小穿刺注入法によつて管内に能動輸送される糖や、されない糖を含む各種試験液を注入し、その際の尿細管内外電位差 ( $E_{tt}$ ) 及び尿細管細胞基底膜電位 ( $E_{bm}$ ) の変化を微小電極を用いて研究し、小腸における機序と同様であるか否かの検討を行つた。

この研究によつて得られた重要な所見は、 $E_{tt}$ ,  $E_{bm}$  は共に、能動輸送される D-glucose の注入によつて速かに、かつ著しい変化を示し、 $E_{tt}$  は管内負電位が増大する方向に、 $E_{bm}$  は脱分極方向に変化すること、それらの変化は共に注入液中の D-glucose 濃度に依存し、電位変化と glucose 濃度の間には Michaelis-Menten 型の飽和関係が見られること、又注入液中の  $\text{Na}^+$  濃度を下げると  $E_{tt}$ ,  $E_{bm}$  の glucose による変化は共に抑制され、低濃度 phlorizin によつても略完全に抑制され、D-mannitol の如く能動的に輸送されない糖では全くこの様な電位変化は起こらぬことなどである。これらの結果は尿細管においても小腸で見られると全く性質の等しい糖誘発電位が発生することを明かに、更にこの事は  $\text{Na}^+$  - 糖相互作用の面でも小腸における場合と同様であることを強く暗示するものである。更に特筆すべきことは  $E_{bm}$  が脱分極することを直接的に実証したことであり、このことは起電性の  $\text{Na}^+$  - 糖連結機構が刷子縁膜に存在すること、基底膜は細胞外短絡抵抗を通る電流によつて二次的に脱分極する事を明確にしており、糖輸送の細胞機序を一層明確にしたものと考えられる。また本研究で用いられた研究法は尿細管の如く構造的に複雑な組織における物質輸送機能の研究に極めて有用であることを示し、今後の発展が期待しうる。

よつて学位授与に充分値する論文であると考ええる。