

論 文 内 容 要 旨

尿の濃縮は、腎機能の中で最も重要なもののひとつであるが、その主役となるのは、ヘンレのループと呼ばれる腎髄質部の尿細管による尿の濃縮・希釈機構である。ヘンレのループは近位尿細管直部から始まり、ヘンレの細い下行脚、ヘンレの細い上行脚、ヘンレの太い上行脚の各部よりなる。下行脚では主に水の再吸収による尿の濃縮が起こり、上行脚では水の輸送を伴わない尿の希釈が起こり、このループにおいて尿量の大幅な減少と、集合尿細管での最終的な尿濃縮の準備が行われる。これらの尿細管の中で、以前より、ヘンレの細い上行脚では、尿の希釈が能動的なイオン輸送により起こっているのか、それとも単なる受動的拡散によるのかをめぐって大きく議論が分かれ、腎髄質部、取り分け髄質内層部（腎乳頭部）での浸透圧勾配の形成機序をめぐり激しい議論が戦われた。今井らは、単離尿細管灌流法によるヘンレの細い上行脚の *in vitro* 微小灌流に成功し、この部位の尿細管には、ネットでのイオン輸送や経上皮電位差がなく、一方で、ナトリウムとクロライドの受動的透過性が極めて高いことを見いだした。とりわけクロライドの透過性は、近位尿細管でのその十倍にも達するような極めて高いもので、その輸送機序がいかなるものかについて多くの議論が巻き起こった。当初このクロライド輸送は、尿細管の片側の希釈により生じる NaCl 拡散電位が、希釈する側によらず対称性であることから、細胞間隙を通るものと考えられた。しかし一方で、輸送が飽和性で、ブロマイドイオンで競合的に阻害されるなど、輸送体の存在が考えられたことから、細胞間隙の特異的輸送体の存在が示唆された。

今回私は、これらの知見を踏まえ、この部位のクロライド輸送の機序を明らかにすべく、各種の陰イオン輸送阻害薬の効果と、イオン置換によるイオン間の相互輸送依存性の検討を行った。

方法としては、ハムスター腎より単離したヘンレの細い上行脚を倒立顕微鏡上にて灌流し、尿細管管腔より管腔外への ^{22}Na あるいは ^{36}Cl の経上皮透過性（拡散係数）を、種々の条件下で測定した。また、血液側の NaCl 濃度を 100 mM 下げた際に、ナトリウムよりクロライドの透過性が高いために生じると考えられる管腔側陽性の NaCl 拡散電位の変化を観察した。

まず輸送体の特異性をより明らかにするため、各種生体膜陰イオン輸送阻害薬がヘンレの細い上行脚のクロライド輸送に及ぼす作用を検討した。4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonic acid (DIDS) は、赤血球膜のクロライド・重炭酸イオン交換輸送体の阻害薬として有名だが、血液側あるいは管腔側に加えられた DIDS は 10^{-3} M で、経上皮 NaCl 拡散電位をクロライドイオン優位（陽性）からナトリウムイオン優位（陰性）に逆転し、管腔側よりの ^{36}Cl 拡散係数、 $\text{KCl} (\times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s})$ を 74.5 ± 2.1 から 17.9 ± 3.6 （血液側 DIDS）に、あるいは 77.7 ± 3.6 から 51.1 ± 5.4 （管腔側 DIDS）に有意に減少させた。一方、DIDS は、 ^{22}Na

拡散係数を抑制しなかった。このほか赤血球膜の尿素拡散阻害薬であり、クロライドのネット輸送阻害薬でもある phloretin は 10^{-3} M で DIDS と同じ効果を示した。さらに、ヘンレの太い上行脚のクロライド輸送阻害薬である furosemide は 10^{-3} M で、管腔側より加えても作用を示さなかったが、血液側より加えると、経上皮 NaCl 拡散電位をナトリウム優位方向に変移させるいっぽう、KCl を 75.7 ± 3.9 から 62.8 ± 4.1 へ有意に減少させた。

次に他のイオンとの相互作用を検討した。重炭酸イオンの除去は、経上皮 NaCl 拡散電位をより優位にして KCl を増加させて、重炭酸イオンがクロライド輸送に共役しないことを示した。ナトリウムイオンの実験系よりの除去は、KCl を、 119.2 ± 6.9 から 107.3 ± 8.5 へと僅かに減少させるにとどまった。実験系よりのカリウムイオン除去とバリウムイオンの添加の併用は、KCl に全く影響を与えなかった。

以上、ヘンレの細い上行脚におけるクロライド輸送が、陰イオン輸送阻害薬に非対称性に抑制されることは、この輸送体が細胞膜上に存在していることを示しており、この部位でのクロライド輸送が細胞間隙での輸送機序によらない可能性を強く示唆した。このことはクロライド輸送体が管腔側膜及び血液側膜の両方に存在し、しかも異なった性質を持つことも示している。更に、イオン置換の実験からは、クロライド輸送体が、ナトリウム、カリウム、重炭酸イオンとは共しない輸送系であることを示唆している。

結論として、ヘンレの細い上行脚の細胞膜には、管腔側及び血液側のそれぞれに、性質の異なるクロライドの起電的非共軛輸送系が存在することが示された。

審査結果の要旨

尿の濃縮は、腎機能の中で最も重要なもののひとつであるが、その主役となるのは、ヘンレのループと呼ばれる腎髄質部の尿細管による尿の濃縮・希釈機構である。以前より、ヘンレの細い上行脚では、尿の希釈が能動的なイオン輸送により起こっているのか、それとも単なる受動的拡散によるのかをめぐって大きく議論が分かれたが、単離尿細管灌流法によるヘンレの細い上行脚のin vitro微小灌流法により、この部位の尿細管にネットでイオン輸送や経上皮電位差がなく、ナトリウムとクロライドの受動的透過性が極めて高いことが明らかとなった。また、ここでのクロライド輸送は、当初、細胞間隙の特異的輸送体によると考えられた。

著者はこの部位のクロライド輸送の機序を明らかにすべく、各種の陰イオン輸送阻害薬の効果と、イオン置換によるイオン間の相互輸送依存性の検討を行った。

著者は、ハムスター腎より単離したヘンレの細い上行脚を倒立顕微鏡上で灌流し、尿細管管腔より管腔外への ^{22}Na あるいは ^{36}Cl の経上皮透過性（拡散係数）を測定した。また、血液側のNaCl濃度を100mM下げた際の管腔側陽性のNaCl拡散電位の変化を観察した。

陰イオン輸送阻害薬4,4'-diisothiocyano stilben-2,2'-disulfonic acid (DIDS) は経上皮NaCl拡散電位を陰性にし、 ^{36}Cl 拡散係数を管腔側・血液側より有意に減少させ、 ^{22}Na 拡散係数を抑制しなかった。赤血球膜の尿素拡散阻害薬・クロライドネット輸送阻害薬のphloretinも同じ効果を示した。また、太い上行脚のクロライド輸送阻害薬furosemideは、血液側よりのみクロライド輸送を抑制した。重炭酸イオンあるいはナトリウムイオンの実験系よりの除去、さらにカリウムイオン除去とバリウムイオンの添加の併用はクロライド輸送に影響を与えなかった。

結論として、著者はヘンレの細い上行脚の細胞膜には、管腔側及び血液側のそれぞれに性質の異なるクロライドの起電的非共転輸送系が存在することを示した。

以上の研究成果は、従来の細いヘンレの上行脚でのクロライド輸送機序の概念を大きく変更させるものであり、尿の濃縮機序の解明に貢献しており、医学博士の授与に値するものと判定された。