

13. 尿細管におけるNaCl輸送機序とその制御機構 (No.8913)

今井 正 (自治医科大学)

〔目的〕 腎髄質内集合管(IMCD)はネフロンの最終部位であり、尿の濃縮に重要な役割をはたしていると考えられているが、そのイオン輸送機構は不明の点が多い。IMCDの前1/3(IMCD₁)とそれ以後では機能がやや異なると考えられている。IMCD₁ に関しては他の報告があるので、主として IMCD₂について、電気生理学的手法を用いて、細胞膜のイオン輸送機序を明らかにしようとした。

〔方法〕 ハムスターの腎より乳頭部を摘出し、顕微鏡下でIMCD₂を単離し、Burgらの方法に準じて尿細管を灌流した。灌流中の尿細管の管腔内電位(V_T)を測定するとともに、1M KClを含むガラス電極で細胞穿刺を行ない、基底側膜電位(V_B)を測定した。また、2連の灌流ピペットの一侧より通電を行ない、ケーブル解析により、経管電気抵抗(R_T)、管腔側膜抵抗分画(fR_A)を測定した。

〔成績〕 V_T は0と区別できなかつた。221回穿刺したデータをまとめると V_B は -82 ± 0.9 mVであった。 R_T は $109 \pm 1 \Omega \text{ cm}^2$ で、IMCD₂は比較的非漏洩性の上皮である。 fR_A は 0.98 ± 0.003 ($n=10$)で管腔側膜の抵抗が相対的に高い。管腔側の Na^+ , K^+ , Cl^- を急激に変化させても膜電位はほとんど変化しなかつた。2 mM Ba^{2+} も10 mM amilorideも V_T , V_B に影響を与えなかつた。DOCA 5 mg/kg 10-14日投与によると V_T , R_T はわずかに変化した。溶液の K^+ を5から50 mMに上昇させるか2 mM Ba^{2+} を加えると V_B は39 mVおよび29 mV正の偏位を示し、基底側膜に大きな K^+ コンダクタンスが存在する。 Cl^- 及び HCO_3^- のコンダクタンスは証明されなかつたが、 Ba^{2+} によって K^+ コンダクタンスを抑制しておくくと、 HCO_3^- コンダクタンスが明らかになった。溶液にouabainを加えても V_B はごくわずかしき変化しなかつた。 K^+ を除去すると V_B は著しい過分極の後、脱分極の傾向を示したが、他の分節のように著明な脱分極はみられなかつた。このことは IMCD₂の V_B は弱い Na^+ - K^+ ポンプ活性と高い K^+ コンダクタンスで維持されていることを示す。

〔結論〕 以上のような膜特性から、IMCD₂では、基底側細胞膜にある Na^+ - K^+ ポンプや K^+ コンダクタンスは主として細胞内イオン組成に関与しており、正味のイオン輸送への関与は少ないと考えられる。

12. 尿細管におけるNaCl輸送機序とその制御機構 (No.8913)

今井 正 (自治医科大学)

1. 研究目的

集合管はネフロンの最終部位にあり、尿中への水、Naの排泄や酸塩基平衡の調節に重要な役割をはたしている。集合管は形態学的には皮質部、髓質外層部、髓質内層部に分けられる。これらの集合管は基本的に共通した機能を持つが、各部位によって、それぞれ特有の機能も有していると考えられる(14)。皮質集合管は集合管細胞(CD細胞)、 α -間在細胞(α -IC細胞)、 β 間在細胞(β -IC細胞)の3種の異なる上皮から成り、それらの占める量によって、各部位の微妙な違いが生ずる。一方、髓質部内層部集合管(IMCD)は形態学的にIMCD₁、IMCD₂、IMCD₃の3つの部位に分けられる(2, 14)。

IMCDの機能はマイクロカテーテル(25, 30)、露出した乳頭のマイクロパンクチャー(3, 7, 12, 15, 19, 21, 27, 31)、腎スライスや単離尿細管を用いた *in vitro* でのマイクロパーフュージョンなどさまざまな方法で研究されてきた(8, 11, 20, 22)。しかしながら、IMCDの上皮細胞膜の輸送特性に関してはほとんど知られていない。我々の研究と平行して行なわれた Stantonの研究が唯一のものである(13, 26)。彼らはラットのIMCD₁を用いて、基底側にあるNa⁺-K⁺ポンプと連動した管腔側のNa⁺チャンネルによって正味のNa⁺の再吸収が起こるとした(26)。ひきつずいて培養細胞を用いてパッチクランプを行ない、アミロライド感受性カチオンチャンネルの存在を証明した(13)。

しかしながら、IMCD₂やIMCD₃はたとえば尿素透過性がバソプレシンにより高まるなどの、IMCD₁とは機能的に異なっていることが報告されており(8, 22)、膜特性もIMCD₁と異なる可能性がある。ImaiらはラットのIMCD₂を用いて基底側膜電位(V_b)が-80 mVであり、高いK⁺コンダクタンスがあることを報告した。しかし、この研究は主にNa⁺利尿ホルモンがIMCD₂に作用するかどうかを検討したもので

あり、詳細な膜特性の解析は行なっていない。

そこで、本研究ではハムスターのIMCD₂を用いて、その上皮の膜輸送特性を解明しようと試みた。研究の課程で、我々はV_Bがウワバインに感受性が著しく低いことに気付いた。そこでNa⁺-K⁺ATPase活性が高いことが知られている髓質部太いHenle上行脚(MTAL)と長ループ下行脚上部(LDLu)を用いてV_Bを測定し、ウワバインやK⁺除去の効果と比較した。本論文ではハムスターのIMCD₂では管腔側のNa⁺コンダクタンスは極めてわずかであり、高いK⁺コンダクタンスと弱いNa⁺-K⁺ポンプの存在によって深いV_Bが生じていることを報告する。

2. 方法

2.1. In vitroマイクロパーフュージョン

Burgら(1)の方法に準じて、単離尿細管灌流を行なった(32)。通常の餌で飼育した正常又は10-14日間DOCA 5 mg/day皮下注したハムスターを断頭し、腎を摘出し、腎皮質を除去した。腎組織は冷却した細胞内液溶液(14 KH₂PO₄, 44 K₂HPO₄, 14 KCl, 9NaHCO₃, 360 mM しょ糖pH 7.4))に入れ、顕微鏡下で、乳頭部よりIMCD₂を単離した。一部の実験では髓質部太いHenle上行脚(MTAL)又は長ループ下行脚上部(LDLu)を単離した。単離したネフロンは倒立顕微鏡(IMT-2, オリンパス)に装着した灌流層に移し、ガラスピペットに吸引固定し、HCO₃-Krebs-Ringer(200 NaCl, 25 NaHCO₃, 5 KCl, 10 Na acetate, 0.8 NaH₂PO₄, 0.2Na₂HPO₄, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 8.3 d-glucose, 5 L-alanine, 単位mM)にて灌流した。

浴槽は特殊灌流システムを採用し3 ml/minの速度で灌流した。浴液は95% O₂, 5% CO₂で通気した。浴液は温度制御した循環外套を通して37°Cに保った。

2.2. 電気生理学的方法

2.2.1. 経管電位V_T

灌流ピペットは寒天ブリッジを介して、カロメル電極に接続し、他のカロメル電極も寒天ブリッジを介して浴槽と接続しエレクトロメータ(Duo 773, WPI)を用いてV_Tを測定し、ペンレコーダー(R-304, 理化電気)で記録した。

2.2.2. 膜電位V_B

芯入り硬質ガラス毛細管を垂直プラー(PD-5, 成茂)を用いて引き電極を作成した。電極は1M KClで満たし、銀-塩化銀電極を介して、エレクトロメータに接続した。電極は3次元油圧マニプレータ

で操作し、細胞内穿刺を行なった。

2.2.3. ケーブル解析

経管電気抵抗(R_T)、管腔側膜抵抗分画($fR_A=R_A/R_A+R_B$)を測定するためのケーブル解析を行なった。この目的のため、灌流ピペットには2連ガラス毛細管(テータ型硬質ガラス、毛細管、1402401, Hilgenberg)を用いた。詳細に関してはすでに報告してあるので概略を述べる(32)。 V_T は毛細管の1側で測定し、他側よりAg-AgCl線を介して、刺激装置(SEN-7103, 日本光電)より電流を流した。浴槽に入れたAg-AgCl線を接地することにより電流ループを閉じた。灌流した尿細管の遠位側に1M KCl寒天ブリッジを挿入し、電位変化を測定した。 R_T 及び fR_A は既に報告したように有限ケーブル解析によって求めた。灌流液の抵抗と中心抵抗とから求めた電氣的直径は実測値とよく一致した。

2.2.4. 統計解析

データは平均値 \pm SEMで表わした。2郡の比較は対応するサンプルによるt-テストで行ない、 $P<0.05$ をもって有意差ありと判定した。

3. 成績

3.1. 一般的な電気生理学的特性

100本のIMCD₂を灌流し、211の細胞内穿刺を行なった。 V_T の平均値は -0.1 ± 0.05 mV ($n=100$)で、この値は0と区別できなかった。細胞内穿刺に成功した場合、最初に急速な負の電位が得られ、5-10分かけて徐々に更に過分極が起こり、安定した電位に達した。このような V_B の緩徐な時間経過はMTALやLDL_uの場合と著しく異なっていた。図1に示すように V_B の頻度分布は単一のピークのガウス分布を示し、平均値は -81.7 ± 0.9 mVであった($n=221$)。16本の尿細管でケーブル解析を行なった。結果はTable 1にまとめてある。IMCD₂の R_T は $109\Omega\text{cm}^2$ であり、比較的電氣的にタイトな上皮に属すると云える。 fR_A は10例で行ない、 0.98 ± 0.003 で管腔側の膜抵抗が相対的に高いことを示している。

3.2 管腔側膜の特性

灌流液のイオン組成を急激に変化させ。 V_A の変化を観察することによって、管腔側膜の見かけのイオン透過性を検討した。Table 2に灌流液の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 濃度変化による V_A の変化をまとめてある。これより明らかなように、管腔側膜はこれらのイオンに対する透過性が低い。

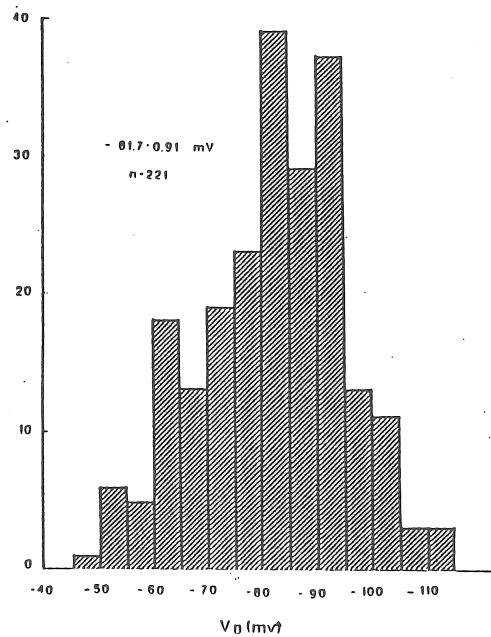


Fig. 1. Distribution of basolateral membrane voltage (V_b) in hamster IMCD₂. The ordinate shows the number of observations. The data are taken from 221 observations on 100 tubules

Table 1. Cable properties of IMCD₂ segment of hamster

Parameters	Mean \pm SEM
Number of experiments	16
Tubular length (μm)	554 \pm 54
Tubular radius (μm)	10.6 \pm 0.4
Length constant, λ (μm)	272 \pm 16
Transepithelial resistance (Ωcm^2)	109 \pm 11
Transepithelial conductance (mS cm^{-2})	10.7 \pm 1.0

Table 2. Effects of changes in luminal ion concentration on apical membrane voltage in hamster IMCD₂

Ion (mmol/l)	(n)	V_A (mV)		
		Control	Experimental	Δ
K ⁺ 5-50	(5)	-87 \pm 6.8	-88 \pm 6.7	-1 \pm 1.8
K ⁺ 5-0	(7)	-82 \pm 4.7	-84 \pm 5.1	-2 \pm 0.6
Ba ²⁺ 0-2	(5)	-86 \pm 4.3	-84 \pm 5.6	+2 \pm 2.4
Na ⁺ 250-25	(12)	-88 \pm 2.1	-86 \pm 1.9	+2 \pm 1.1
Cl ⁻ 210-10	(4)	-85 \pm 11.1	-85 \pm 11.5	+1 \pm 0.5

n = Number of experiments; V_A = apical membrane voltage; Δ = differences from the control values

Table 3. Effect of amiloride on parameters of cable analysis in normal hamster IMCD₂

	λ (μm)	R_T (Ωcm^2)	VDR	fR_A
Control	281 \pm 18	114 \pm 13	58.3 \pm 12.1	0.98 \pm 0.05
Amiloride (10 $\mu\text{mol/l}$)	270 \pm 16	126 \pm 14	66.8 \pm 11.0	0.98 \pm 0.03
P value	< 0.05	< 0.005	< 0.05	NS

Data are means \pm SEM of 13 paired experiments.
 λ = Length constant; R_T = transmural resistance; VDR = voltage divider ratio; fR_A = fraction apical membrane resistance; NS = not significant

Table 4. Effect of Ba²⁺ added to the bath on parameters of cable analysis

	λ (μm)	R_T (Ωcm^2)	VDR	fR_A
Control	270 \pm 27	111 \pm 21	52.5 \pm 11.5	0.98 \pm 0.005
Ba ²⁺ (2 mmol/l)	267 \pm 25	115 \pm 21	16.1 \pm 4.3	0.92 \pm 0.017
P value	NS	< 0.005	< 0.005	< 0.01

Data are means \pm SEM of seven paired experiments. Abbreviations are same as in Table 3

Table 2に併せて示すように、管腔側に Ba^{2+} 2 mMを加えても V_A は変化しなかった。 Na^+ チャンネル阻害薬であるアミロライド 10 μM を管腔内に加えても、 V_T , V_A は不変であった。皮質部集合管ではDOCA処理により V_T が深くなり、アミロライド感受性の Na^+ コンダクタンスが顕著になることが知られている。そこで、DOCA処置ハムスターのIMCD₂についてもアミロライドの作用の有無を検討した。対照時にごくわずかの負の V_T が認められた(-0.7 \pm 0.007 mV)。アミロライドにより V_T は0 \pm 0.06 mVに脱分極し、 V_T は-82 \pm 3.2mVから-84 \pm 3.0mVに有意の過分極を示したが、変化の過度は余りに小さかった。

管腔側膜の Na^+ チャンネルは小さすぎるため V_T や V_A の変化では証明が困難と思われたので、ケーブル解析を行なってアミロライドの効果を調べた。結果はTable 3に示す。13例で10 μM アミロライドは R_T を有意に増加させた。 fR_A は不変であったが、voltage divider ratioが58.3から66.8に有意に変化したことより、管腔側膜の抵抗は実際にはアミロライドで上昇したものと考えられる。以上の所見より小さいながらもアミロライド感受性 Na^+ -コンダクタンスが管腔側膜に存在するものと考えられる。

3.3. 基底側膜の特性

浴液のイオン濃度を変化させ V_B の変化を観察することにより、基底側膜のイオンコンダクタンスを調べた。Fig.2に示すように浴液の K^+ の変化によって V_B は著明に変化するのに対して、灌流液の K^+ を変化させても V_B は不変であった。Fig.3に浴液の K^+ 濃度を5から50 mMに増加させた場合の V_B の変化を観察した13例の結果をまとめている。この処置により V_B は39.4 mV脱分極した。一方、2 mM $BaCl_2$ によって V_B は28.8 mV脱分極した。これより、基底側膜には顕著な K^+ コンダクタンスが存在することがわかる。

これを更に確認するため、voltage divider ratio (VDR) に対する Ba^{2+} の効果を観察した。結果はTable 4に示すように Ba^{2+} により R_T , VDR, fR_A いずれも有意の変化を示し、 Ba^{2+} が基底側膜のコンダクタンスを減少させることが明らかである。

HCO_3^- コンダクタンスが、基底側膜に存在するかどうかを明らかにする目的で HCO_3^- 除去による V_B の変化を正常及びDOCA処理ハムスターのIMCD₂を用いて観察した。少数例において HCO_3^- 除去により V_B がわずかに脱分極を示したが(Fig.2)統計的には有意の変化は認めら

れなかった。また、1 mM SITSを浴液に加えても V_B は変化しなかった。しかしながら、 K^+ コンダクタンスが高いために HCO_3^- コンダクタンスが検出できない可能性もあるので Ba^{2+} 2 mM存在下では HCO_3^- の減少荷より、明らかな脱分極が認められた。8例の実験結果によれば HCO_3^- の低下により V_B は -49.9 ± 4.1 mVから -29.4 ± 5.7 mVと低下し、 20.4 ± 6.7 mVの脱分極がみられた。したがって、基底側膜には明らかに HCO_3^- コンダクタンスも存在する。

3.4. V_B に対するウワバインの効果

V_B の起源を明らかにする目的で、 Na^+ 、 K^+ ATPaseの阻害薬であるウワバインの効果を観察した。驚くべきことに、ウワバイン 1 mMを浴液に加えても V_B はごくわずかしか変化しなかった。一般にげっ歯類はウワバインに対する感受性が低いとされているので、ハムスターでもすべてのネフロンでウワバインに対する感受性が低いことが考えられる。そこで、 Na^+ 、 K^+ ATPase 活性が高いと考えられるMTAL とLDLuとについてウワバインの効果を観察し、比較検討した。代表的な記録をFig.5に示す。これより明らかなようにMTALやLDLuでは0.1 mMのウワバインにより著名な V_B の脱分極しか認められなかった。多数例についてのデータを Fig.6 にまとめてある。MTALとLDLu では 0.1 mM のウワバインによってそれぞれ 28.5 ± 2.0 mV ($n=16$), 22.5 ± 3.3 mV ($n=6$)の脱分極がみられた。これに対して、IMCD₂では同量のウワバインはわずか 5.5 ± 1.5 mV ($n=19$)の脱分極を起こしたに過ぎなかった。1 mMのウワバインでも脱分極の程度はほとんど変らなかった(3.1 ± 1.2 mV)。以上より、IMCD₂はウワバインに対する感受性が著しく低いことがわかる。

3.5. K^+ 除去液の V_B に対する効果

Na^+ - K^+ ATPase活性は浴液の K^+ によっても変化すると考えられるので、浴液の K^+ 除去による V_B の変化をIMCD₂、MTAL、LDLuについても比較した。これら3つの分節ではいずれも基底側に高い K^+ コンダクタンスがあるので、 K^+ 除去により、まず V_B が過分極し、ひきつずいて Na^+ 、 K^+ ATPaseの抑制による脱分極が起こることが期待された。MTALとLDLuとについては時間経過に多少の相違があるものの、基本的には上述の予測通りの結果が得られた (Fig.7)。これに反して、IMCD₂では、 K^+ 除去により大きな過分極が見られ、その後ごくわずかの脱分極がみられるに過ぎなかった。しかも、脱分極後の V_B が対照時の V_B より更に低くなる例はまれであった。このようにIMCD₂は

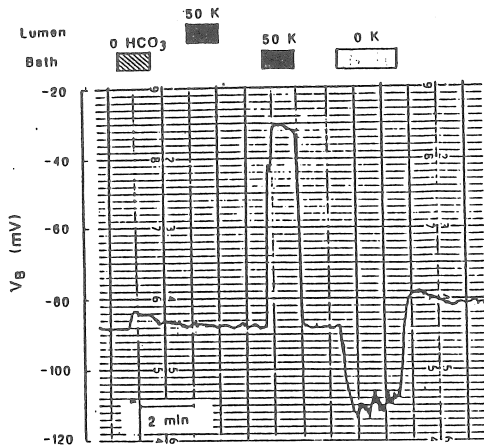


Fig. 2. A representative record of the V_B of hamster $IMCD_2$ showing the effects of changes in K^+ concentration in the bath

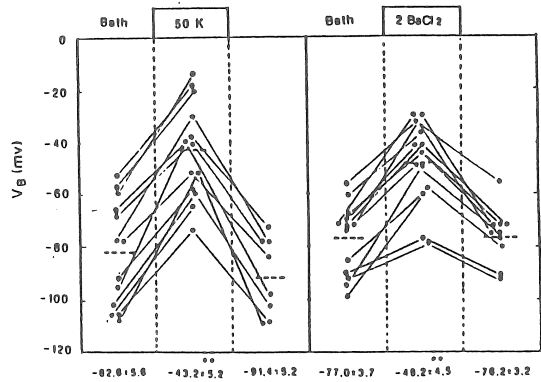


Fig. 3. Effects of a change in K^+ concentration in the bath from 0 to 50 mmol/l and 2 mmol/l Ba^{2+} added to the bath on the V_B of hamster $IMCD_2$

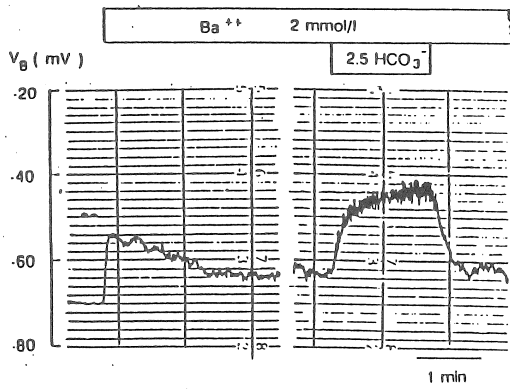


Fig. 4. A representative record of the V_B of hamster $IMCD_2$ showing the effect of reducing HCO_3^- concentration from 25 mmol/l to 2.5 mmol/l in the presence of Ba^{2+} in the bath

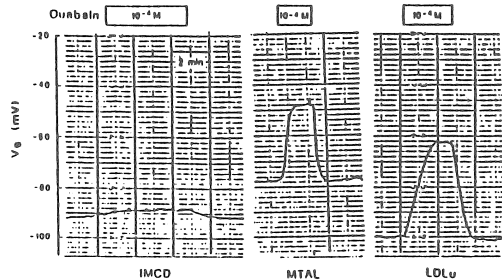


Fig. 5. Representative records comparing the effect of ouabain on the V_B of $IMCD_2$, medullary thick ascending limb ($MTAL$) and upper portion of the descending limb of long-looped nephron (LDL_u)

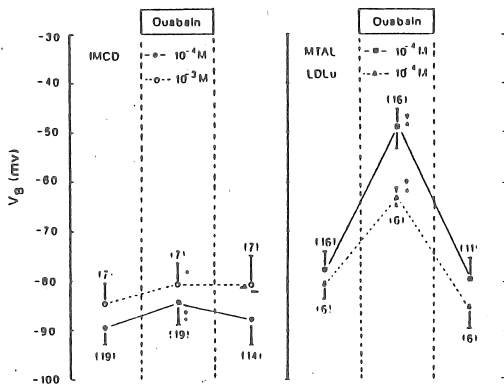


Fig. 6. Summary of the experiments showing the effect of ouabain on V_B of $IMCD_2$, $MTAL$ and LDL_u

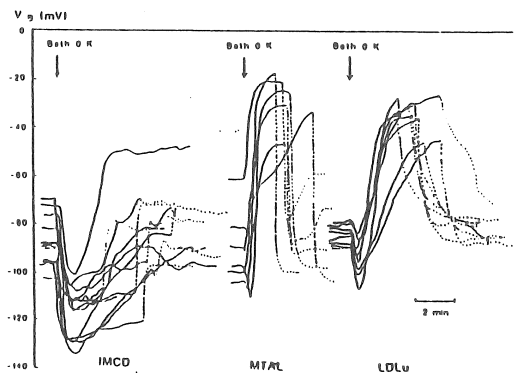


Fig. 7. Effects of K^+ elimination from the bath on V_B of $IMCD_2$, $MTAL$ and LDL_u . The original records were traced by synchronizing to the time of K^+ elimination. The dashed lines represent the recordings while K^+ concentration in the bath was returned to the control level

K⁺除去に対しても感受性が低いことがわかる。

4. 考察

4.1. 本研究で我々は V_T が0と区別がつかないという従来の報告を確認した(9, 20, 22)。しかし、この観察は1例を除いて(6)in vivoのマイクロ・パンクチャーの成績とは矛盾している(12, 15, 19, 21, 31)。大多数の論文ではハムスターやラットのin vivoでのIMCDの V_T は-10~-20 mVの範囲と報告されている。最近 Stanton(26)はラットのIMCDの V_T が-2~-3 mVであると報告している。現在のところ、我々にはこの矛盾の原因がわからない。多くのin vivoの実験では管腔内電位を測定する場合、動物の尾を切断し、生理的食塩水にひたし、これを基準にして電位を測定している。しかし、穿刺部位の近傍の間質のNa濃度は高いと推定されるので、生理的食塩水との間には液接続電位が存在するはずである。Na⁺濃度が5倍になっていると仮定すると、液接続電位はおよそ-8.6 mVと算定される。したがって、in vivoでの V_T のデータはこの分だけ見かけ上大きくなっている可能性がある。ところが Rau, Fromter (19)はハムスターのIMCDで V_T が-55 mVであることを報告しており、これは液接続電位を補正してもなおかつ明らかに負の電位が存在することを示すものである。

in vitroマイクロパーフュージョンではこのような液接続電位の補正が必要ないので観察データはより正確であると云えるが、用いた灌流液が非生理的であるとの批判をまぬがれることは出来ない。我々は腎髄質の間質液の組成に近づくよう高NaCl,高尿素の浴液を使用した。しかし、生理的条件下では管腔内のNaCl濃度は低く、リンの濃度はより高く、pHも酸性のはずである。我々はこのような条件について検討はおこなわなかったが、管腔のNaClを下げた予備的実験でも、 V_T は負にならなかった。しかしながら、負の電位を生じさせる何らかの因子が欠如しているかもしれないという可能性は残る。

ウサギの皮質部集合管では管腔側膜にあるアミロライド感受性のNa⁺チャンネルによって負の V_T が生ずると考えられている。したがって、我々のシステムでは管腔側のNa⁺チャンネルを発現させる因子が欠如しているのかもしれない。DOCAの慢性処置によって負の電位が生ずるとされているが(15, 18), 我々の成績ではハムスターのIMCD₂ではDOCA処置により負の V_T は生じなかった。ラットのIMCDで

も同様であるとされている(21, 26)。したがって、鉍質コルチコイドの欠如は負の電位がないこととは無関係である。ラットの皮質部集合管ではバソプレシンにより Na^+ コンダクタンスが刺激されると報告されている(23)が、ハムスターIMCD₂では $100 \mu\text{U/ml}$ のバソプレシンによっても負の電位は生じない(8)。

4.2. 管腔側膜

ハムスターのIMCD₂の fR_A が1に近いということは、管腔側膜のコンダクタンスが非常に低いということの意味する。我々は極めて小さいアミロライド感受性の Na^+ コンダクタンスが管腔側膜にあることを明らかにしたが、その生理的な意義はあまりないと考えられる。このことはラットの単離尿細管や単離上皮でアミロライド感受性の Na^+ コンダクタンスが大きいとする他の報告(13, 26, 33)とやや矛盾する。我々は単離灌流したラットのIMCD₂でもハムスターと同じであることを観察しているので(9)種差があるとは考えられない。IMCD₁とIMCD₂とでは性質が異なるという可能性がある。これはバソプレシンは尿素の透過性をIMCD₂では亢進させるが、IMCD₁では不変であるという事実(8, 22)を考え併せると必ずしも不合理なことではない。しかし、我々はラットのIMCD₂とでは V_T はいずれも0であることをみており(8),最終的な結論は今後の検討を待ちたい。

4.3. 基底側膜

基底側膜電位は -80 mV と著しく深いことを明らかにした。K濃度変化による膜電位応答からみても、基底側膜に高い K^+ コンダクタンスが存在する。 39.4 mV という電位変化から見かけ上の輪率は0.64となる。 Ba^{2+} によって基底膜は脱分極するので、 Ba^{2+} 感受性の K^+ チャンネルが存在すると考えられる。 Cl^- コンダクタンスは証明されなかった。一方、 HCO_3^- コンダクタンスは K^+ コンダクタンスを Ba^{2+} で抑制した条件下で証明することが出来た。 HCO_3^- を 25 mM に下げたときの電位変化 20.4 mV より、 HCO_3^- の輪率は0.33と算定される。したがって、基底側膜のイオンコンダクタンスは K^+ と HCO_3^- で大部分が占められていると云える。しかしながら、このほかに電氣的に中性なイオン輸送系が存在する可能性は否定できない。事実、Matsushimaら(16)はアミロライド感受性の Na^+/H^+ 交換輸送がハムスターIMCD₂の基底側膜に存在することを報告している。

Stanton(26)もラットのIMCDで HCO_3^- コンダクタンスを確認しており、 V_B がやや低いのは HCO_3^- コンダクタンスがあるためとしてい

る。しかし、ハムスターで V_B は -80 mVであり、上述の論旨は必ずしもあてはまらない。

V_B 負の電位の起源を明らかにするため、我々はウワバインや溶液からの K^+ 除去の効果を検討した。MTALやLDL α の場合と比べIMCD $_2$ ではウワバインや K^+ 除去に対する V_B の変化が著しく小さいことがわかった。一般にげっ歯類はウワバイン感受性が低いとされているが、これではIMCDのみが特別に感受性が低いことは説明できない。Doucet, Borlet (4)は髄質外層部集合管の Na^+ , K^+ ATPase活性が最もウワバイン感受性が高いことを報告しているが、IMCDに関しては調べていない。

腎にウワバイン感受性の低い Na^+ - K^+ ATPaseのアイソザイムが存在する可能性は否定できないが、腎のcDNAライブラリーからは単一の Na^+ - K^+ ATPaseしかクローンされていない(24)。 Na^+ - K^+ ATPase以外の第2のNaポンプの存在も否定できないが、最も単純な説明としては、IMCD $_2$ では Na^+ - K^+ ATPase活性そのものは低いが、 K^+ コンダクタンスが主要であるため、負の電位が形成されていることが考えられる。この考えは組織化学(10)や微量化学(28)的方法により、IMCDに Na^+ - K^+ ATPaseが証明されたという報告と一致する。

4.3. ICMD $_2$ のイオン輸送の細胞モデル

我々の成績をもとにIMCD $_2$ のイオン輸送のモデルをまとめるとFig.8のようになる。弱い活性がウワバイン抵抗性の Na^+ - K^+ ATPaseが基底側膜に存在し、高い K^+ コンダクタンスの共存により深い V_B を形成している。 Cl^- のコンダクタンスはなく、 HCO_3^- コンダクタンスがある。この役割は不明であるが、基底側膜には Na^+/H^+ 交換系も存在するので(16)、細胞内pHの調節に何らかの役割をはたしているのかもしれない。管腔側には Na^+ コンダクタンスが存在するが、正味の Na^+ 輸送にどの程度寄与しているか疑問である。

一般に尿細管のイオン輸送には細胞経路のみでなく、細胞間を経由する輸送も多かれ少なかれ関与しており、Fig.8の下の方に示すような電氣的等価回路が考えられる。詳細な理論は省略するが、ケーブル解析をもとに各々の抵抗値を求めることができる。これによれば、細胞間を経由する短絡路の抵抗は著しく高く、正味の輸送があるとすれば、主に細胞を経由することが考えられる。基底側膜の抵抗のみが著しく低いことは、イオン輸送は主として細胞組成の調節に関与しているであろうという推定の根拠となる。しかしながら、

管腔側の Na^+ コンダクタンスを上げる何らかの因子が欠如している可能性は残るので、これに関しては今後の検討が必要である。

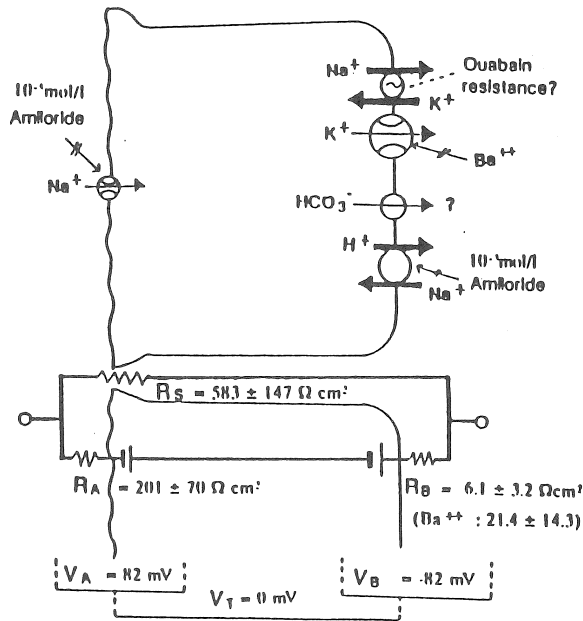


Fig. 8. A tentative cell model for ion transport in the hamster IMCD₂. R_A , R_B , and R_S are resistances of the apical membrane, basolateral membrane, and shunt pathway, respectively (mean \pm SEM of six paired data)

REFERENCES

1. Burg M, Grantham J, Abramow M, Orloff J (1966) Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol* 210:1293-1298
2. Clapp WL, Madsen KM, Verlander JW, Tisher CC (1987) Intercalated cells of the rat inner medullary collecting duct. *Kidney Int* 31:1080-1087
3. Diezi J, Michoud P, Aceves J, Giebisch G (1973) Micropuncture study of electrolyte transport across papillary collecting duct of the rat. *Am J Physiol* 224:623-634
4. Doucet A, Barlet C (1986) Evidence for difference in the sensitivity to ouabain of Na, K-ATPase along the nephrons of rabbit kidney. *J Biol Chem* 262:993-995
5. Gross J, Imai M, Kokko JP (1975) A functional comparison of the cortical collecting tubule and the distal convoluted tubule. *J Clin Invest* 55:1284-1294
6. Hayslett JP, Backman KA, Schon DA (1980) Electrical properties of the medullary collecting duct in the rat. *Am J Physiol* 239:F258-F264
7. Higashihara E, Carter NW, Pucacco L, Kokko JP (1984) Aldosterone effects on papillary collecting duct pH profile in rat. *Am J Physiol* 246:F725-F731
8. Imai M, Taniguchi J, Yoshitomi K (1988) Osmotic work across inner medullary collecting duct accomplished by difference in reflection coefficients for urea and NaCl. *Pflügers Arch* 412:557-567
9. Imai M, Kondo Y, Yoshitomi K (1989) Lack of effects of ANP on rat innermedullary collecting duct. *Peptides* (in press)
10. Kashgarian M, Biemesderfer D, Caplan M, Forbush B III (1985) Monoclonal antibody to Na, K-ATPase: Immunohistochemical localization along nephron segments. *Kidney Int* 28:899-913
11. Kondo Y, Imai M (1987) Effect of glutaraldehyde fixation on renal tubular function. I. Preservation of vasopressin-stimulated water and urea pathways in rat papillary collecting duct. *Pflügers Arch* 408:479-483
12. Laurence R, Marsh DJ (1971) Effect of diuretic states on

- hamster collecting duct electrical potential differences. Am J Physiol 220:1610-1616
13. Light DB, McCann FV, Keller TM, Stanton BA (1988) Amiloride-sensitive cation channel in apical membrane of inner medullary collecting duct. Am J Physiol 255:F278-F286
 14. Madsen KM, Tisher CC (1982) Structural-functional relationship along the distal nephron. Am J Physiol 250:F1-F15
 15. Marsh DJ, Solomon S (1965) Analysis of electrolyte movement in thin Henle's loops of hamster papilla. Am J Physiol 208:1119-1128
 16. Matsushima Y, Yoshitomi K, Koseki C, Imai M (1989) Basolateral Na/H exchange in the hamster inner medullary collecting duct (IMCD) Conference on Bicarbonate, Chloride, and Proton Transport, The New York Academy of Sciences. Jan 19-21, New York (abstract)
 17. Morgan T, Sakai F, Berliner RW (1968) *In vitro* permeability of medullary collecting ducts to water and urea. Am J Physiol 214:574-581
 18. O'Neill RG, Helman SI (1977) Transport characteristics of renal collecting tubules: influences of DOCA and diet. Am J Physiol 233:F544-F558
 19. Rau WS, Frömter E (1974) Electrical properties of the medullary collecting ducts of the golden hamster kidney. Pflügers Arch 354:99-111
 20. Rocha AS, Kudo LH (1982) Water, urea, sodium, chloride and potassium transport in the *in vitro* isolated perfused papillary collecting duct. Kidney Int 22:485-491
 21. Sakai F, Jamison RL, Berliner RW (1965) A method for exposing the rat renal medulla *in vivo*: micropuncture of the collecting duct. Am J Physiol 209:663-668
 22. Sands JM, Knepper MA (1987) Urea permeability of mammalian inner medullary collecting duct system and papillary surface epithelium. J Clin Invest 79:138-147
 23. Schlatter E, Schafer JA (1987) Electrophysiological studies in principal cells of rat cortical collecting tubules: ADH increases the apical membrane Na⁺ conductance. Pflügers Arch 409:81-92

24. Shull GE, Greeb J, Lingrel JB (1986) Molecular cloning of three distinct forms of Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit from rat brain. *Biochemistry* 25:8125-8132
25. Sonnenberg H (1974) Medullary collecting-duct function in antidiuretic and in salt- or water-diuretic rats. *Am J Physiol* 228:565-568
26. Stanton BA (1989) Characterization of apical and basolateral membrane conductances of rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 256:F862-F868
27. Stein JH, Osgood RW, Kunau RT Jr (1976) Direct measurement of papillary collecting duct sodium transport in the rat. Evidence for heterogeneity of nephron function during Ringer loading. *J Clin Invest* 58:767-773
28. Terada Y, Knepper MA (1989) Na⁺-K⁺-ATPase activities in renal tubule segments of rat inner medulla. *Am J Physiol* 256:F218-F223
29. Tomita K, Pisano JJ, Knepper MA (1985) Control of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct of the rat. Effects of bradykinin, vasopressin and deoxycorticosterone. *J Clin Invest* 76:132-136
30. Ullrich KJ, Papavassiliou F (1979) Sodium reabsorption in the papillary collecting ducts of rats effect of adrenalectomy, low Na⁺ diet, acetazolamide, HCO₃⁻ free solutions and amiloride. *Pflügers Arch* 379:49-52
31. Windhager EE (1964) Electrophysiological study of renal papilla of golden hamster. *Am J Physiol* 206:694-700
32. Yoshitomi K, Koseki C, Taniguchi J, Imai M (1987) Functional heterogeneity in the hamster medullary thick ascending limb of Henle's loop. *Pflügers Arch* 408:600-608
33. Zeidel ML, Kikeri D, Silva P, Burmova M, Brenner BM (1988) Atrial natriuretic peptide inhibits conductive sodium uptake by rabbit inner medullary collecting duct cells. *J Clin Invest* 82:1067-1074

MECHANISMS AND REGULATION OF NaCl TRANSPORT IN THE RENAL TUBULES

Electrophysiological study of inner medullary collecting duct of hamsters

Masashi Imai, and Koji Yoshitomi

Department of Pharmacology, Jichi Medical School

Summary

Electrophysiological properties of the hamster mid-inner medullary collecting duct (IMCD₂) cells were examined in isolated and perfused preparations by the intracellular impalement with conventional 1 M KCl microelectrodes and the cable analysis. The transmural voltage (V_T) was not different from 0 mV, and the basolateral membrane voltage (V_B) was -82 ± 0.9 mV ($n=221$). The transmural resistance (R_T) was $109 \pm 11 \Omega \text{ cm}^2$, indicating that the IMCD₂ consists of tight epithelia. The fractional apical membrane resistance (fR_A) was 0.98 ± 0.003 ($n=10$). Abrupt changes in luminal concentration of Na⁺, K⁺ or Cl⁻ did not alter the apical membrane voltage (V_A) and V_T . Neither 2 mM Ba⁺⁺ nor 10 mM amiloride in the lumen affected V_A and V_T . The pretreatment of hamsters with deoxycorticosterone acetate (5mg/kg, sc) for 10-14 days caused only very small negative V_T . Amiloride in the lumen increased RT voltage divider ratio very slightly. An abrupt increase in K⁺ concentration in the bath from 5 to 50 mM and an addition of 2 mM Ba⁺⁺ to the bath depolarized the basolateral membrane by 39 mV and 29 mV, respectively. Neither Cl⁻ nor HCO₃⁻ conductance was demonstrated in the basolateral membrane. Effects of ouabain added to the bath or elimination of K⁺ from the bath in decreasing V_B were very small in the IMCD₂ as compared to the marked responses observed in the medullary thick ascending limb of Henle's loop and in the upper portion of the descending limb of the long-looped nephron. These findings are compatible with the view that the weak Na⁺-K⁺ pump and K⁺ conductance in the basolateral membrane may mainly account for the maintenance of intracellular concentration of Na⁺ and K⁺. The IMCD₂ may little contribute to the transmural transport of Na⁺ and K⁺.