

9021 尿細管におけるNaCl輸送機序とその制御

今井 正(自治医科大学)

長ループ下行脚上部(LDLu)は他の下行脚と比べてイオン透過性が高い。これには細胞間短絡路が関与する可能性が示唆されているが、直接的な証拠はない。プロタミンは他の上皮で細胞間短絡路を阻害することが報告されている。そこでLDLuで細胞間短絡路の寄与を検討するため、単離尿細管灌流法を用いて、拡散電位と経尿細管抵抗を測定し、プロタミンの作用を観察した。

プロタミン100 μ g/mlを管腔に加えると、灌流液のNaClを低下させた時生ずる電位(dVt)は 12.0 ± 1.4 mVから 7.3 ± 1.2 mVに低下した。プロタミンを灌流液から除いてもこの作用は持続したが、30 U/mlのヘパリンにより電位は元に戻った。プロタミンの作用は3-1000 μ g/mlの範囲で用量依存性が見られた。プロタミンは浴液からは作用しなかった。単一塩の希釈電位によりP(Na/Cl)を算定し、プロタミンの作用を見たところ、100及び300 μ g/mlのプロタミンによりP(Na/Cl)は 4.03 ± 0.38 から 2.14 ± 0.21 へ、 3.75 ± 0.37 から 1.36 ± 0.09 へ夫々抑制された。プロタミンはNa apparent transference numberを著明に抑制したが、Clのそれは軽度増加させた。プロタミンはK, Rb, Liに対する相対的な透過性に対してもほぼ同程度の抑制作用を示した。従って、プロタミンの作用はカチオン全般に対する作用であると考えられる。経尿細管ケーブル解析を行ったところ、プロタミンはRtを 14.4 ± 1.1 から 19.3 ± 1.2 Ohm cm²に増加させた。この作用はヘパリンで回復した。Rtや拡散電位に対するプロタミンの作用はウワバイン存在下でも同様に認められたことより、プロタミンの作用は主として細胞間短絡路を介するものと考えられた。細胞穿刺によるケーブル解析をBaの有無によって行うことにより、管腔側膜、基底側膜、細胞間短絡路の抵抗を夫々算出することが出来る。プロタミン100 μ g/mlにより細胞間短絡路抵抗は 34.0 ± 8.3 から 44.0 ± 10.5 Ohm cm²と有意に増加したが、管腔側膜および基底側膜抵抗は不変であった。以上より、LDLuの細胞間短絡路は全抵抗のおよそ50%を占め、カチオン選択性があることがわかった。プロタミンは細胞穿刺が困難な分節の細胞間短絡路の解析に役立つと考えられる。

9021 尿細管におけるNaCl輸送機序とその制御

今井 正 (自治医科大学)

1. 研究の背景と目的

Henleループは腎髄質を構成する主要なネフロン分節であり、尿濃縮機構にきわめて重要な役割を果していると考えられる(17)。Henleループの下行脚は水に対する透過性が著しく高く、高浸透圧の腎髄質を下降するにつれて水が再吸収されることにより管腔内液が濃縮される。ラット、マウス、ハムスター等ではHenleループ下行脚は長ループと短ループとでは形態学的に著しい相違があることが知られている(14, 17)。長ループ下行脚上部 (LDLu)は隣接する上皮細胞の間で著しく入組んだ接触をしており、タイトジャンクションはきわめて浅いのに反して、短ループ下行脚(SDL)は比較的平坦な接触をしている上に、タイトジャンクションは深い。このような形態の違いは、前者が漏洩性の、後者が非漏洩性の上皮であることを示唆している。

単離尿細管灌流法により、LDLuとSDLでは著しい透過性の違いがあることが明かにされた(13, 15, 25)。即ち、LDLuではイオン透過性が著しく高いのに反して、SDLではイオン透過性が低い。LDLuの高いイオン透過性はカチオン選択性があることが知られており(25)、NaClの濃度勾配を管腔内外でつけると拡散電位を生ずる。この拡散電位は濃度勾配の方向を変えるとほぼ対称的になることから、LDLuのカチオン透過性は主として細胞間短絡路に依存すると考えられた。しかしながら、最近LDLuの細胞を微小電極で穿刺することが可能になり、管腔側細胞膜にKのコンダクタンスがあることが明かにされた(26)。従って、細胞間短絡路がLDLuの全体のコンダクタンスにどの程度寄与しているかを明かにする必要がある。

これまで、他の漏洩性上皮で細胞間短絡路を選択的に阻害する様々な薬物が報告されている。例えば、2,4,6-triaminopyridinium(TAP)(19), plant cytokinin (4), alcian blue(7), protamine (1,3,8,9)などである。これらはいずれも細胞間短絡路の寄与を検討するのに有用と考えられるが、われわれは生理的溶液に

良く溶け、作用の発現が速く、かつheparinによって拮抗することが出来るという点で特にプロタミンに着目した。これまで両棲類の胆嚢(3,8,9,12)、鱒の鰓(10)、ラットの腸間膜(1)、ラット近位尿細管(23)、糸球体(24)等でプロタミンのイオン輸送に対する作用の研究報告がある。これらのうちのあるものは、プロタミンが明かに細胞間短絡路を抑制することを示している(1,3,8,9)。

そこで本研究ではハムスターのLDLuを単離灌流し、拡散電位、ケーブル解析を行い、プロタミンおよびヘパリンのイオンコンダクタンスに及ぼす影響を観察することにより、LDLuに於ける細胞間短絡路の役割について検討した。その結果、プロタミンは選択的に細胞間短絡路のカチオン透過性を阻害すること、LDLu全体の透過性のおよそ50%は細胞間短絡路によって規定されることが明かとなった。

2. 方法

2. 1 単離尿細管灌流法

雄または雌のゴールデンハムスター(体重60-120g)をギロチンにて断頭後、両側腎を摘出し、5°Cに冷却した高浸透圧細胞内液類似液にいれピンセットにて腎髄質部を摘出した。実体顕微鏡下に髄質外層部よりLDLuをピンセットにて単離した(13,15)。単離した尿細管はBurgらの方法(6)を改変して灌流した(13,15,26,27)。灌流液の組成はTable 1に示した。25mM HCO_3^- を含む溶液は95% O_2 , 5% CO_2 で、他の溶液は100% O_2 で通気した。

2. 2 電気生理学的方法

拡散電位:

経尿細管電位(V_t)は灌流液に接続した1M KCl 寒天ブリッジを飽和 KCl を介してcalomel電極につなぎ、エレクトロメータ(Duo773, WP Instrument, New Haven, CT)に接続し測定した。浴液は1M KCl 寒天ブリッジ、calomel電極を介して接地し基準電位とした。電位は4ペンレコーダ(R-304, 理化電気、東京)にて記録した。灌流開始時には灌流液、浴液ともに標準液を用いた。 V_t が安定した時点で灌流液(1プロトコールでは浴液)を低Na溶液に変え拡散電位を測定した。 V_t が安定した後、硫酸プロタミンまたはヘパリンを管腔または浴液に加えて V_t の変化を観察した。

相対的Na透過性($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$)を定量的に測るため、単純な塩溶液(100NaCl/200NaCl)による拡散電位を測定した。K, Rb, Liに対する相対的透過性も同様に

TABLE 1. *Composition of solutions*

	Control	Low NaCl	200C-Cl	100C-Cl	100 Na ⁺	100 Cl ⁻
NaCl	200	81.6	(200)*	(100)**	100	100
KCl	5	5	5	5	5	5
NaHCO ₃	25	25	0	0	0	0
Na ₂ HPO ₄	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
NaH ₂ PO ₄	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Na acetate	10	10	0	0	0	0
CaCl ₂	1.8	1.8	0	0	0	0
MgCl ₂	1.0	1.0	0	0	0	0
Ca acetate	0	0	1.5	1.5	1.5	1.5
Mg acetate	0	0	1.0	1.0	1.0	1.0
glucose	8.3	8.3	5	5	5	5
alanine	5	5	0	0	0	0
urea	100	318	100	100	100	100
HEPES	0	0	10	10	10	10
Tris	0	0	5	5	5	5
Sucrose	0	0	0	184	0	0
Choline Cl	0	0	0	0	100	0
Na cyclamate	0	0	0	0	0	100

* 200C-Cl and ** 100C-Cl represent each four kinds of solution, containing, 200 and 100mM NaCl, KCl, LiCl, or RbCl, respectively.

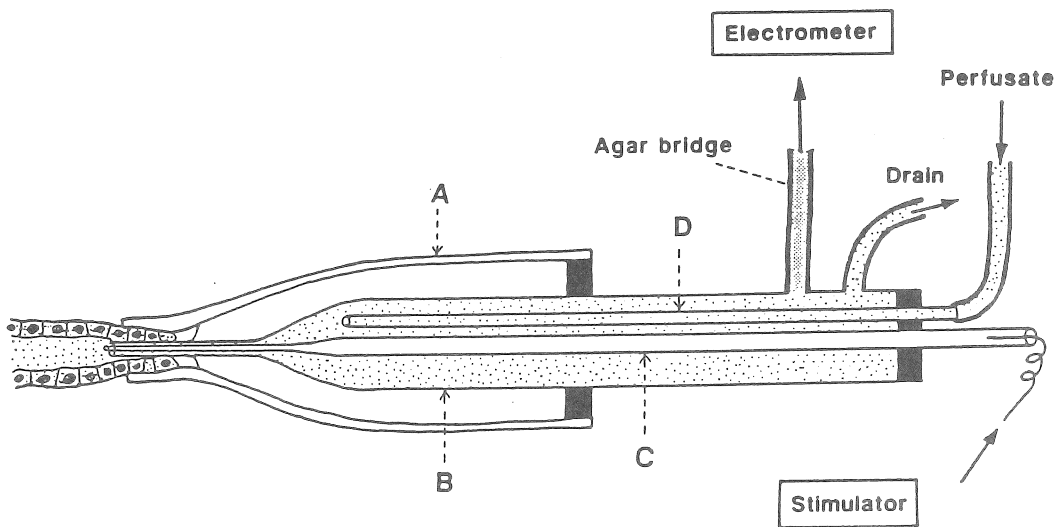


Fig. 1. Schematic illustration of the pipette setup used in this study.

単一塩溶液の希釈電位により求めた。相対的透過性は次の式で計算した。

$$\frac{P_C}{P_{Cl}} = \frac{[Cl]_b \exp(F cVt/RT) - [Cl]_l}{[C]_b - [C]_l \exp(F cVt/RT)}$$

ここで、cVtは補正した管腔電位、Cはカチオン、Pは透過係数、Rは気体定数、Tは絶対温度、Fはファラデー定数を示す。b、lは夫々浴液、管腔液を示す。イオンxに対する見かけのtransference numberはつぎの式で計算した。

$$t_x = dVt / \{(RT/F) \ln ([Xe]_b/[Xc]_b)\}$$

dVtは浴液のNaまたはCl濃度を対照([Xc]b)から[Xe]bに変えた時の電位変化を示す。これらの溶液の組成は表1に示してある。

ケーブル解析:

経上皮抵抗(Rt)を測定するため、両端が閉鎖していると仮定したケーブル解析を行った。LDLuの抵抗は極めて低いことが予測されるので、投入する電流が灌流ピペットで測定する電位変化に対して出来るだけ影響しないよう工夫する必要がある。このため灌流ピペット(Bピペット)として、従来隔壁型ガラス管が用いられた(26)。これにより比較的理想的な抵抗測定が出来たが、ピペット作成が技術的にかなり難しいこと、灌流液の迅速な交換が難しいことなどの問題点があった。これらを解決するため、我々はFig. 1に示すようにピペットシステムを改変した。即ち、Bピペットの中に、ひとまわり直径の小さいガラス管(OD=0.35mm, ID=0.30mm)より作成した電流投入用のピペットと灌流液交換用のピペットを挿入した。前者はAg-AgCl線を介して電気刺激装置(SEN-7103, S-1540, 日本工電)と接続した。灌流尿管遠位端の電位変化は採取ピペット中に挿入した寒天ブリッジに接続したcalomel電極を介して測定した。経尿管抵抗(Rt)及び経尿管コンダクタンス(Gt)は既報の式(27)によって算出した。

fractional apical resistance (fRa), voltage divider ratio (DVR)を測定するため、管腔内に電流を投入し、細胞内電極穿刺によって測定した基底側膜電位の変化を測定した。細胞内穿刺用電極は垂直型プラー(PE-2, 成茂)にて作成し、0.5M KClを充填した。

Reuss, Finn (22)によって報告された原理に従えば、管腔側膜抵抗(Ra)、基底側膜抵抗(Rb), 細胞間短絡路抵抗(Rs)を夫々測定することが出来る。このためには、これらのコンダクタンスのひとつを選択的にブロックする薬物をしよ

ることが必要である。Baは必ずしも理想的ではないが、従来より基底側膜のKコンダクタンスを選択的にブロックする目的で用いられている(14)。浴液の交換を迅速におこない、電位変化の初期のピークをとるという条件下でわれわれもBaを使用した。最近、Kottra, Fromter(18)はBaは両棲類の胆嚢上皮で2mM以上の濃度を用いると、細胞間短絡路の抵抗も増加させることを報告している。このため本研究では1mMのBaを使用した。

2. 3 溶液と薬品:

この研究で用いた溶液の組成はTable 1 にまとめてある。プロタミンは和光より購入した。ハパリンはNovo(Denmark)より、HEPES, ouabainはSigma (St.Louis, MO) より、TRISはBio-Rad (California)より夫々購入した。

2. 4 統計処理:

データは平均値 + 標準誤差で表した。2群間の有意差検定はt検定により、 $P < 0.05$ をもって有意水準とした。

3. 成 績

3. 1 プロタミンの拡散電位に及ぼす影響

Fig. 2 はLDLuのNaCl拡散電位に対するプロタミンの作用を観察した代表的なVtの記録を示す。灌流液と浴液の組成が同じ時はVtはゼロであった。灌流液を低Na液に置換すると、著明な正の電位が生じた。このような条件下に100ug/mlのプロタミンを灌流液に加えると、2分以内にプラトーに達する電位の抑制が見られた。このようなでんいの抑制はプロタミンを除いても持続した。しかし、30U/mlノヘパリンを加えると、電位は急速に元に復した。同量のプロタミンを浴液に加えた場合は全く何の作用も認められなかった。

用量依存性:

プロタミンの効果の用量依存性を3~1000ug/mlの範囲でしらべた。各用量の間の電位は30U/mlのヘパリンで前値に戻した。Fig. 3 に用量、反応関係をしめす。10-300ug/mlの範囲では反応に用量依存性が認められた。従って300ug/mlをsubm

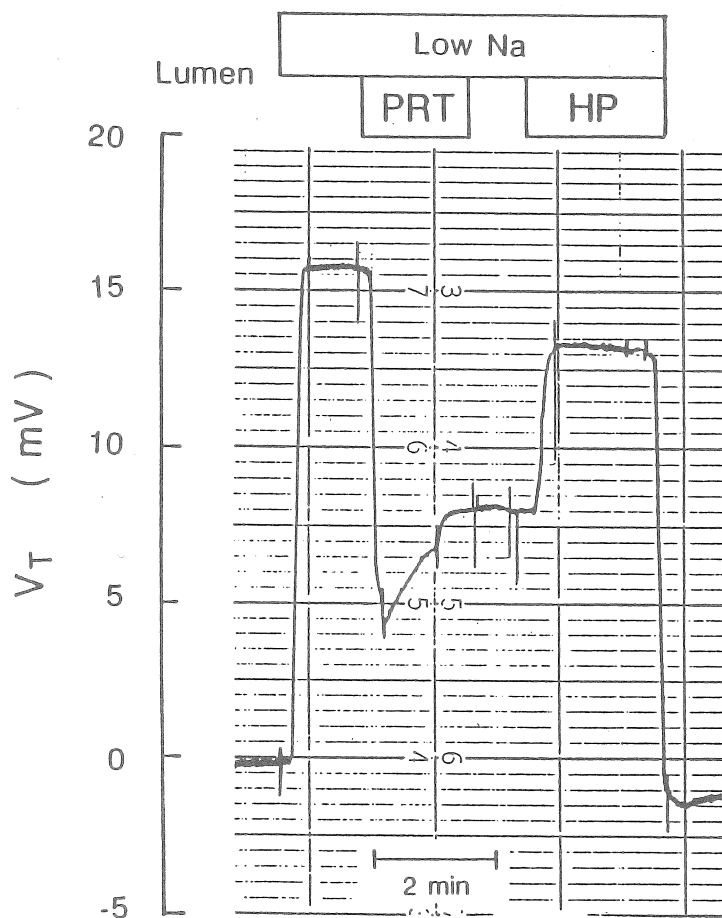


Fig. 2. A representative tracing of transmembrane NaCl diffusion voltage (V_T), showing effect of 100 μ g/ml protamine (PR_T) and 30 U/ml heparin (HP). Lumen positive V_T was generated by lowering NaCl concentration of the luminal fluid. Addition of protamine to the lumen rapidly decreased V_T . V_T did not return when protamine was eliminated. Addition of heparin increased V_T toward control level.

TABLE 2. *Effect of protamine and heparin on NaCl diffusion voltage in hamster LDLu*

Drugs added to	Solution		(n)	Period		
	P	B		Control	Low Na	
					Control	Protamine
Lumen	Control	Low Na(11)	0.1 ± 0.2	12.0 ± 1.4**	7.3 ± 1.2**	10.4 ± 1.2**
Lumen	Low Na	Control (5)	-0.2 ± 0.2	-7.7 ± 1.4**	-3.9 ± 1.0*	-5.3 ± 0.8**
Bath	Control	Low Na(5)	0.0 ± 0.1	9.9 ± 1.7**	9.8 ± 1.6	9.5 ± 1.5

Values are transmural voltage (V_T , mV) expressed as means ± SEM. Doses of protamine and heparin were added to the perfusate at 100 µg/ml, and 30 U/ml, respectively. Abbreviations: P, perfusate; B, bathing fluid; n, number of experiments. * P<0.05, **P<0.01 as compared to the preceding values.

TABLE 3. *Effect of protamine on relative cation/Cl⁻ permeabilities as determined by single salt dilution voltage*

Cation	n	Vlj (mV)	Control 1	Protamine 100 µ/ml	Control 2	Protamine 300 µg/ml
Na						
cVT(mV)	11	2.73	10.42 ± 0.54	5.99 ± 0.66***	9.90 ± 0.64*	2.46 ± 0.52***
PNa/PCl			4.03 ± 0.38	2.14 ± 0.21***	3.75 ± 0.37	1.36 ± 0.09***
% Inh.			45.78 ± 2.46		61.87 ± 2.67###	
K						
cVT(mV)	5	0.35	13.57 ± 0.66	9.23 ± 0.82*	12.25 ± 0.78	4.85 ± 0.54*
PK/PCl			8.87 ± 1.94	3.47 ± 0.54*	6.31 ± 1.23	1.80 ± 0.14*
% Inh.				58.90 ± 2.80		68.65 ± 4.12#
Li						
cVT(mV)	5	4.04	7.10 ± 1.18	2.42 ± 0.97*	6.92 ± 1.34	0.60 ± 0.77*
PLi/PCl			2.55 ± 0.51	1.36 ± 0.17*	2.57 ± 0.61	1.09 ± 0.11*
% Inh.				43.84 ± 4.41		54.72 ± 5.68#
Rb						
cVT(mV)	5	0.18	11.82 ± 0.61	8.22 ± 0.63**	10.04 ± 0.80	4.28 ± 0.50**
PRb/PCl			5.06 ± 0.62	2.71 ± 0.26**	3.71 ± 0.38	1.66 ± 0.09**
% Inh.				43.49 ± 3.05		55.84 ± 2.76#

Vlj, liquid junction voltage; cVT, transmural voltage corrected for liquid junction; % Inh., percent inhibition.

* P<0.05, **P<0.005, *** P<0.001 as compared to control values.

P<0.05, ### P<0.001 as compared to data for protamine 100µg/ml.

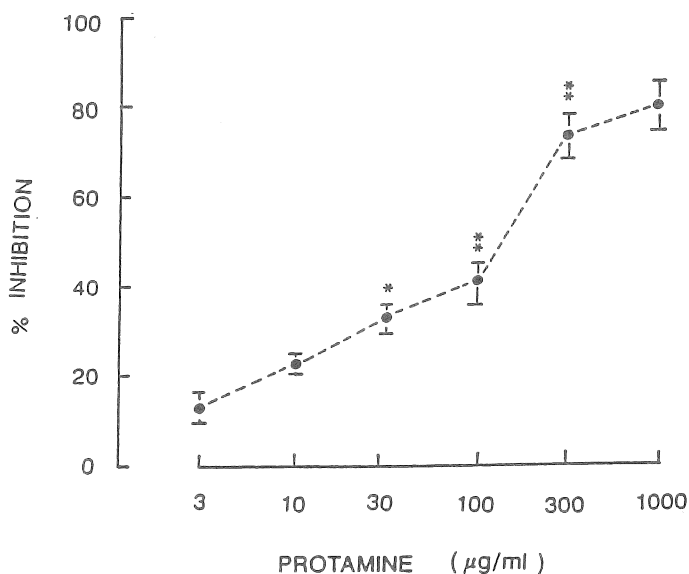


Fig. 3. Dose-response curve of inhibitory effect of protamine on NaCl diffusion voltage. The initial rapid deflection of V_T was used as a measure of the response. The data are shown as percent inhibition of V_T .
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared to values for lower doses.

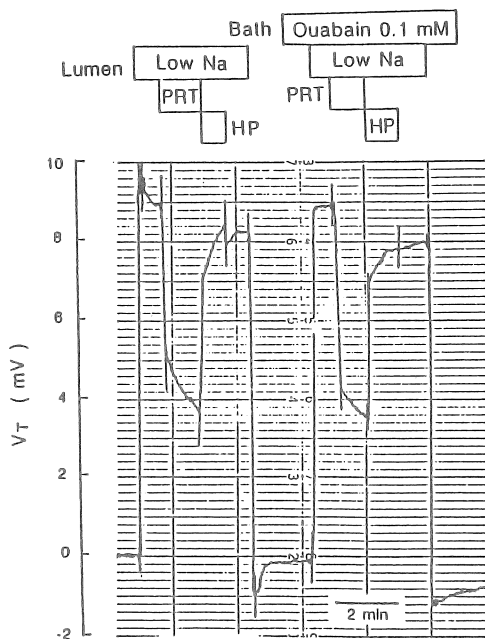


Fig. 4. A representative tracing of transmembrane NaCl diffusion voltage (V_T), showing effects of protamine and heparin in the absence or presence of ouabain. Abbreviations: PR_T, protamine 100 µg/ml; HP, heparin 30 U/ml.

ximal dose とした。

逆転拡散電位に対する作用：

NaCl勾配を逆にした時、拡散電位が対称性になるかどうか確認するとともに、プロタミンが逆向きの拡散電位に対しても同様の作用を示すかどうか検討した。Table 2 に示すように、拡散電位はほぼ対称的であり、プロタミンの作用もほぼ同様であった。

ウワバインの効果：

Yoshitomi, Imai (26) はハムスターのLDL_uの基底側膜電位がウワバインで抑制されることを報告した。もし、プロタミンの作用が細胞間短絡路に限定されるなら、プロタミンの作用はウワバインのよって左右されないはずである。Fig. 4 に典型的な実験結果を示す。まず最初に型どおり拡散電位に及ぼすプロタミンとヘパリンの作用を観察し、次いで0.1mM ウワバイン存在下で同じ操作を繰り返した。ウワバインによって拡散電位は変わらず、またプロタミン、ヘパリンの作用も対照時と変りなかった。5例の同様の実験プロトコールで結果はほぼ同じであった。このことより、プロタミンの作用は主として上皮を經由しないイオン輸送に限定されると推定される。

3. 2 単一塩の希釈電位に対するプロタミンの効果

上述のデータはいずれもプロタミンにより相対的なNa/Cl透過性が抑制されることを示唆するものであるが、用いた溶液の組成が複雑であるため定量的な解析が困難である。そこで単純な溶液を用いて希釈電位から相対的イオン透過性を算出し、プロタミンの作用を観察した。

相対的Na/Cl透過性に対する効果：

溶液に200NaClを用いて、灌流液を100NaClに変えると、10.4mVの希釈で電位が生じた。100 μ g/mlのプロタミンを加えるとVtは6.0mVに低下した。300 μ g/mlのプロタミンでは電位は9.9から2.5mVに低下した。相対的Na/Cl透過性を算出し、Table 3 にデータをまとめてある。プロタミン100 および300 μ g/mlによりPNa/PClは4.03 から2.14 および3.75 から1.36 に減少した。これはそれぞれ45.8% 及び61.9%の抑制率に相当する。

他のカチオン透過性に対する効果：

KCl, LiCl, RbClを夫々主とする溶液を用いて同様のプロトコールの実験を行い、

これらのカチオンの透過性に対するプロタミンの作用をしらべた。結果は同じく Table 3にまとめてある。従来の成績と同様、LDL_uはこれらカチオンに対していずれも透過性が高い。プロタミンはこれらのカチオンの相対的透過性に対してもNaに対すると同様の抑制効果を示した。

3. 3 見かけのtransference number に対するプロタミンの作用

PNa/PClのプロタミンによる低下はからは、1) PNaの低下、2) PClの増加、3)両者の変化の複合の3つの可能性が考えられる。このいずれが関与するかを明かにするために、Na, Clに対するtransference number を測定した。結果は Table 4 に示すように、プロタミンは用量依存性に t_{Na} を著明に抑制し、 t_{Cl} を僅かに促進することがわかる。

3. 4 ケーブル特性に対するプロタミンの作用

ケーブル解析により、プロタミンが経上皮抵抗に影響するかどうか調べた。Fig. 5 は100-200nAの電流を10秒間隔で流し、ケーブル解析を行ってプロタミン、ヘパリンの作用を観察した代表的実験データを示す。100 μ g/ml プロタミンによって入力抵抗が増大し、ヘパリンにより回復することがわかる。Table 5 は18実験の結果をまとめたものである。対照時には R_t は著しく低いが、プロタミン100 または300 μ g/mlによって143%または173%増加した。

プロタミンによる R_t または G_t の変化が主に細胞間短絡路の変化によることを明かにするため、ウワバインの効果を観察した。結果はTable 6 にまとめてある。これより明かなように、ウワバインの有無にかかわらず、プロタミンは R_t を増加させる。

プロタミンが細胞、及び細胞間短絡路の個々の抵抗に対してどのような影響を及ぼすかを知る目的で、細胞内穿刺を行い、Ba法を用いて各抵抗コンポーネントを測定した。Fig. 6 に典型的な基底側膜電位(V_b)の記録を示す。細胞穿刺により約-79mV の V_b が得られた。この条件下で100 μ g/mlのプロタミンを加えても、 R_t の変化にもかかわらず、 V_b や電流投入による電位スパイクの程度も不変であった。1mM Baによって V_b は38mV脱分極し、電位スパイクも増大したが、プロタミンはこれらのパラメータに影響を与えなかった。

ケーブル解析の詳細なデータはTable 7、8 にまとめてある。細胞間短絡路の抵抗は全抵抗のおよそ50%である。プロタミンは R_a 、 R_b に全く影響を与えず、 R_s 即ち細胞間短絡路抵抗のみを選択的に抑制することが分かる。

TABLE 4. *Effect of protamine on apparent transference numbers for Na⁺ and Cl⁻ apparent transference numbers*

Protamine (µg/ml)		0	100	300
Na ⁺ gradient (n=6)	dV _T	13.6 ± 0.69	10.11 ± 0.74 **	7.02 ± 0.71 ***
	t _{Na⁺}	0.74 ± 0.04	0.55 ± 0.04 **	0.38 ± 0.04 ***
Cl ⁻ gradient @ (n=6)	dV _T	3.30 ± 0.59	4.22 ± 0.57 **	4.95 ± 0.62 *
	t _{Cl⁻}	0.18 ± 0.03	0.23 ± 0.03 **	0.27 ± 0.03 *

A Na⁺ gradient was imposed by partially replacing NaCl in the bathing fluid with choline Cl, whereas a Cl⁻ gradient was imposed by replacing NaCl with Na cyclamate.

*P<0.005, **P<0.01, ***P<0.001 as compared to values in the absence of protamine.

TABLE 5. *Effects of protamine and heparin on transmural resistance (R_T) and conductance (G_T)*

	Control 1	Protamine (100µg/ml)	Heparin (30 U/ml)	Control 2	Protamine (300µg/ml)
R _T (Ohm cm ²)	14.0 ± 1.1	19.3 ± 1.2***	15.5 ± 1.1***	13.2 ± 1.8	22.0 ± 2.4***
R _T (%)		142.8 ± 6.2			172.8 ± 12.3
G _T (mS cm ⁻¹)	79.6 ± 6.3	55.4 ± 3.5***	70.2 ± 4.9***	82.4 ± 10.2	47.7 ± 5.2**
G _T (%)		72.0 ± 2.8			59.0 ± 3.6
n	18	18	18	5	5

Values are means ± SEM. n=number of experiments

** P<0.01, *** P<0.001 as compared to values in preceding periods.

TABLE 6. *Effects of protamine and heparin on transmural resistance (R_T) in the presence or absence of 0.1 mM ouabain in the bath*

	Control	Protamine (100 µg/ml)	Heparin (30U/ml)
Control	14.1 ± 2.9	17.5 ± 3.3 (127.3 ± 4.1%)	15.3 ± 2.9
Ouabain	14.3 ± 2.9	18.0 ± 3.4 (127.5 ± 7.0%)	15.1 ± 2.9

Values are R_T (Ohm cm²) expressed as means ± SEM (n = 6).

Numbers in parenthesis are percent to the control values.

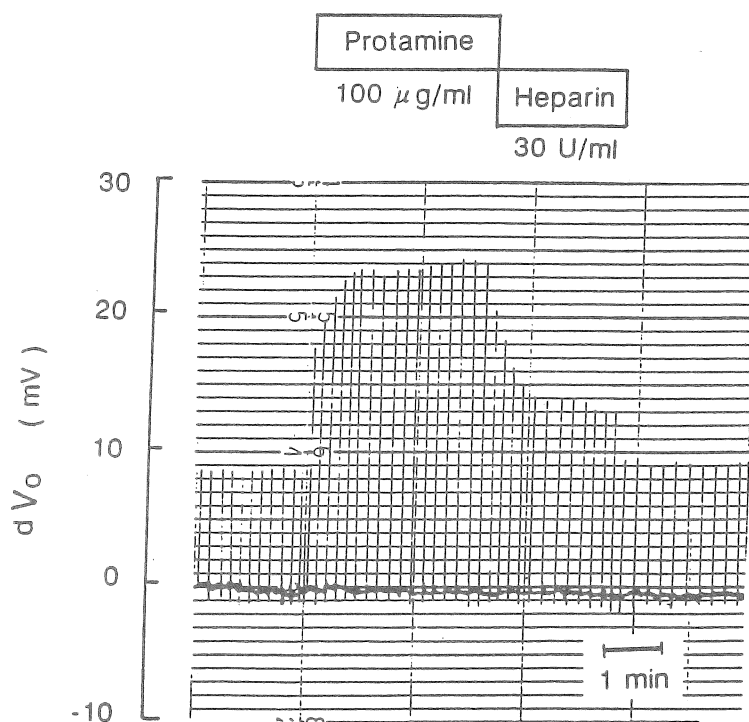


Fig. 5. A representative tracing of cable analysis, showing effects of protamine and heparin on input resistance. dV_0 means voltage deflection at perfusion site.

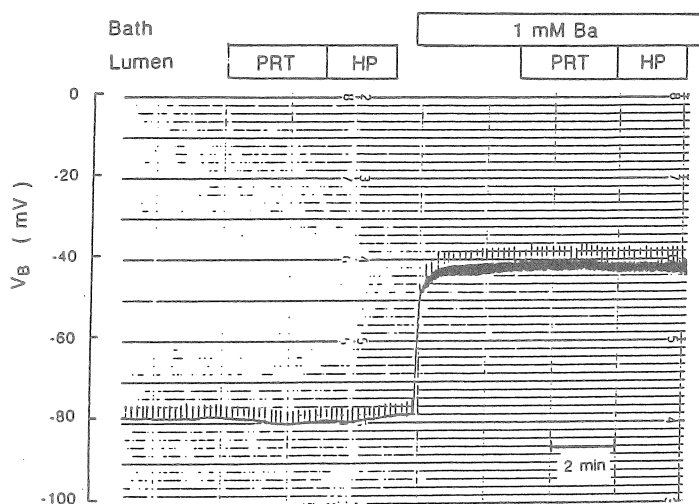


Fig. 6. Effects of protamine and heparin on basolateral membrane voltage (V_B). Effects of these drugs were observed in the presence or absence of Ba^{2+} in the bath. PRT, protamine 100 $\mu\text{g/ml}$; HP, heparin 30 U/ml.

TABLE 7. *Effects of protamine on parameters of cable analysis with intracellular puncture in the presence or absence of 1 mM Ba²⁺ in the bath*

	Control (n=5)				Ba ²⁺ (n=5)			
	V _B	R _T	VDR	fR _A	V _B	R _T	VDR	fR _A
	(mV)(Ohm cm ²)				(mV)(Ohm cm ²)			
Control	-82.4 ±1.9	11.7 ±0.4	14.9 ±1.9	0.94 ±0.01	-52.4 ^{##} ±3.1	12.7 [#] ±0.7	4.5 ^{##} ±0.4	0.81 ^{##} ±0.01
Protamine (100 µg/ml)	-77.6 ±5.6	15.3 ±1.5	20.6 ±3.7	0.95 ±0.01	-53.8 [#] ±2.8	16.2 [#] ±1.7	6.2 [#] ±0.8	0.85 ^{##} ±0.02
P value	ns	*	*	**	ns	*	*	**

Abbreviations: V_B, basolateral membrane voltage; R_T, transmural resistance; VDR, voltage divider ratio; fR_A, fractional apical resistance.

* P<0.05, **P<0.005, ns=not significant as compared control vs protamine period.

P<0.05, ## P<0.01 as compared control vs Ba²⁺ period.

TABLE 8. *Effects of protamine on cell membrane and paracellular resistances.*

	R _A	R _B	R _{B'}	R _S
Control	30.1 ± 13.4	1.8 ± 0.5	6.8 ± 2.6	34.0 ± 8.3
Protamine (100µg/ml)	29.3 ± 6.4	1.4 ± 0.2	5.0 ± 1.3	44.0 ± 10.5
P value	ns	ns	ns	<0.05

Values are Ohm cm² expressed as means ± SEM.

The values are calculated from the data presented in Table 6.

Abbreviations: R_A, apical membrane resistance; R_B, basolateral membrane resistance; R_{B'}, basolateral membrane resistance in the presence of 1 mM Ba²⁺ in the bath; R_S, paracellular shunt resistance.

4. 考 察

本研究の主な目的は細胞間短絡路がLDLuのイオン透過性にどの程度量的に寄与しているかを明らかにすることにある。この研究の結果LDLuの高いイオン透過性のおよそ50%は細胞間短絡路に依存していることが明らかとなった。さらに拡散電位の測定やケーブル解析にプロタミンを併用することにより細胞間短絡路のカチオン透過選択性の詳細な解析が可能である。

4. 1 方法論について

出来るだけ生理的な条件下でプロタミンの効果を調べるため、最初に我々は重炭酸を含む溶液を用いて実験を行なった。しかしこの条件下では溶液間電位の補正が困難であり、定量的解析が出来ない。管腔内のNaClを下げた場合溶液間電位は正となるので、観察された電位は実際より大きめに出る。しかしながらこれを補正したとしても、実際の電位が逆転するとは考えられない。したがって、これらのデータより少なくとも質的な解析は可能である。

相対的イオン透過性を測定するため、我々は単一塩溶液の希釈電位法を用いた。これらの溶液は非生理的であるが、実験の間、細胞の見掛けはほぼ正常であった。

方法の項でも述べたように、我々はケーブル解析の方法を改変した。Bピペットの中にもう一つのピペットを挿入することはさほど困難ではない。この様な方法の改変によって低い抵抗を測定することが可能になった。この方法は隔壁型ピペットと比べ灌流液の交換を迅速に行なえるという利点がある。

4. 2 カチオン選択性透過性に対するプロタミンの効果

灌流液のNaClを低下させると正の電位が生ずるのはLDLuがClよりNaに対して透過性が高いことを示す(13,15,25)。プロタミンを管腔に加えると拡散電位が急速に抑制された。この様な急速な作用からは代謝阻害作用は考え難く、単なる物理化学的作用が考えやすい。プロタミンを除いても作用は持続したが、ヘパリンによって作用が解除された。このことは、プロタミンの荷電が透過性抑制作用に重要であることを示唆する。プロタミンの作用は管腔側のみ認められる。これはプロタミンがタイトジャンクションに直接作用するためであろう。一方、両棲類の胆嚢上皮をプロタミンに数分間晒すとタイトジャンクションの形態が変化し、ヘパリンで元に復することが報告されている(2,7)。したがってLDLuでもこの様な変化

が起っている可能性は否定できない。

プロタミンの透過性抑制作用は 3~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で用量依存性があった。正確な定量的解析は不可能であるが、プロタミンのLDLuに対する親和性は胆嚢上皮に対するそれとほぼ等しいかやや低いと考えられる

単一塩の希釈電位を測定し、相対的なNa/Cl透過性に及ぼすプロタミンの効果を検討したところ、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロタミンによりPNa/PClは62%抑制されることが明らかになった。これはプロタミンがNa透過性を抑制したためであるが、プロタミンがClの透過性に影響を及ぼしている可能性は否定できない。しかしながら、プロタミンは明らかにRtを抑制しているので、単純にCl透過性が昂進したとは考えられない。実際にNaとClについて transference numberを測定したところ、プロタミンはt Naの著明な減少とt Clの軽度の増加をもたらすことが明らかとなった。

同様に単一塩溶液を用いて、K,Rb,Liに対する透過性を調べ、LDLuがカチオン透過選択性があることを再確認した(25)。更に我々はプロタミンがこれらのカチオンのいずれに対しても同様な抑制作用を示すことを明らかにした。

両棲類の胆嚢上皮ではプロタミンがRtを180~190%増加させることが報告されている(3,9)。これとほぼ同様にプロタミンはハムスターのLDLuでRtを172%増加させた。これは経上皮コンダクタンスを41%抑制したことになる。

4. 3 プロタミンが細胞間短絡路に作用する証拠

本研究において我々はまたLDLuのNaClによる拡散電位が対称的であることを再確認した(25)。このことは拡散電位のほとんどが細胞間短絡路に依存していることを示す。しかしながら、Yoshitomi, Imai(26)は小さいながら有意のKコンダクタンスが管腔膜に存在することを報告した。更にImaiら(16)はLDLuの水チャネルは同時にカチオン選択性があることを報告した。従って、プロタミンがはたして細胞膜に作用するのか、それとも細胞間短絡路に作用するのかを明らかにする必要がある。プロタミンが細胞膜に作用する可能性を除外するため、我々は0.1mM ウワバイン存在下にプロタミンの作用を観察した。ウワバインの有無に関わり無くプロタミンが拡散電位の抑制および経上皮抵抗の増加をもたらすことはプロタミンの作用は経上皮輸送と独立していることを意味する。

より直接的な証拠を示すため、我々は管腔側膜、基底側膜、細胞間短絡路のそれぞれの抵抗を測定した。1mM Baを浴液に加えると基底側膜のみの抵抗が増加すると仮定して、それぞれの抵抗を算定すると、細胞間短絡路の抵抗は経上皮抵抗の50%を占めることがわかった。そしてプロタミンは細胞間短絡路の抵抗のみ

を選択的に増加させることがわかった。

Table 8に示す夫々の膜の抵抗の絶対値は両棲類の近位尿細管のそれ(2, 12)と比べると驚くほど低いことがわかる。しかしながら、Rb以外の値に関しては兎の皮質部太い上行脚のそれとほぼ同じである(11)。ハムスターの髓質内層集合管のRbも低く、6.8 Ohm cm² である(13)。LDLuのRbの値はこれよりさらに小さい。プロタミンによりfRaが増加はするが、その絶対値は非常に小さい。Rbがわずかに減少するため、計算上Raは不変となる。

このように、プロタミンが主として細胞間短絡路のカチオン透過選択性を抑制することはFromm ら(9)が両棲類の胆嚢上皮での観察により導き出した結論に一致する。しかしながら、特定の実験条件下ではプロタミンが細胞膜の機能にも影響を及ぼすこともあり得る。Sato, Ullrich (23)はラットの近位尿細管でカチオン性のポリペプチド(polyornithine, teralysine, polyethyleneimine, polymixin B, protamine, histone) 等が細胞間短絡路に影響することなく刷子縁膜の抵抗を下げ、細胞の機能的障害をもたらすと報告している。近位尿細管の刷子縁膜はプロタミンに対して感受性が高いとも考えられるが、彼らが用いたプロタミンの用量は25mg/mlと著しく高いことに注意を喚起したい。これによって細胞膜の機質的な変化が起こった可能性もある。高濃度のプロタミンによって膜構造の障害が実際に起こることがラットの腸間膜について報告されている(1)。Poler, Reuss(21)も両棲類の胆嚢上皮で100mg/mlのプロタミンによって頂側膜のKコンダクタンスが低下し、Clコンダクタンスが増加することを報告している。したがって、プロタミンの細胞間短絡路に対する選択的な作用を期待するためには、低用量を用いることが肝要である。

総 論

要約すると、ハムスターのLDLuの高いイオン透過性と低い経上皮抵抗は主に細胞間短絡路の高いコンダクタンスに依存している。プロタミンはこのカチオン透過性を比較的選択的に抑制する。これらの所見は細胞間短絡路がヘンレループ下行脚のイオン輸送に重要な役割を演じていることを示唆している。本研究により、尿細管においても、プロタミンの使用は適切な濃度を用いれば細胞間短絡路の寄与の解明に有用な手段となることが明かになった。プロタミンは、とくに細胞穿刺が困難なネフロン分節の研究に役立つものと期待される。

REFERENCES

1. Alavi, N., E. Lianos, G. Andres, and C. J. Bentzel. Effect of protamine on the permeability and structure of rat peritoneum. *Kidney Int.* 21: 44-53, 1982
2. Anagnosto Poulos, T., J. Teulon, and A. Edelman. Conductive properties of the proximal tubule in *Necturus* kidney. *J. Gen. Physiol.* 75:553-587, 1980
3. Bentzel, C. J., M. Fromm, C. E. Palant, and U. Hegel. Protamine alters structure and conductance of *Necturus* gallbladder tight junctions without major electrical effects on the apical cell membrane. *J. Membrane Biol.* 95: 9-20, 1987
4. Bentzel, C. J., B. Hainau, S. Ho, S. W. Hui, A. Edelman, T. Anagnostopoulos, and E. L. Benedetti. Cytoplasmic regulation of tight-junction permeability: effect of plant cytokinins. *Am. J. Physiol.* 239 (Cell Physiol. 8): C75-C89, 1980
5. Boulpaep, E. L., and H. Sackin. Electrical analysis of intraepithelial barriers. In: *Current Topics in Membrane and Transport*. F. Bronner, A. Kreinzeller, and E. L. Boulpaep (editors) pp 169-197, Academic, New York 1980
6. Burg, M. B., J. Grantham, M. Abramow, and J. Orloff. Preparation and study of fragments of single rabbit nephron. *Am. J. Physiol.* 210: 1293-1298, 1966
7. Fredericksen, O., K. M_{llg}_rd, and J. Rostgaard. Lack of correlation between transepithelial transport capacity and paracellular pathway ultrastructure in alcian blue-treated rabbit gallbladders. *J. Cell Biol.* 83:383-393, 1979
8. Fromm, M., U. Hegel, C. J. Bentzel, and B. Hainau. Protamine alters cation permeability and ultrastructure of *Necturus* gallbladder tight junctions. Heparin reverses the effects. *Pflngers Arch.* 379: R31, 1979
9. Fromm, M., C. E. Palant, C. J. Bentzel, and U. Hegel. Protamine reversibly decreases paracellular cation permeability in *Necturus* gallbladder. *J. Membrane Biol.* 87: 141-150, 1985
10. Greenwald, L. E., and L. B. Kirschner. The effect of poly-l-lysine, amiloride and methyl-l-lysine on gill ion transport and permeability in the rainbow trout. *J. Membrane Biol.* 26: 371-383, 1976
11. Greger, R., and E. Schlatter. Properties of the luminal membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflngers Arch* 396:315-324, 1983
12. Guggino, W.B., E. E. Windhager, E. L. Boulpaep, and G. Giebisch. Cellular and paracellular resistances of *Necturus* proximal tubule. *J. Membrane Biol.* 67:143-154, 1982
13. Imai, M. Functional heterogeneity of the descending limbs of Henle's loop. II. Interspecies differences among rabbits, rats, and hamsters. *Pflngers Arch.* 402: 393-401, 1984
14. Imai, M., and K. Yoshitomi. Electrophysiological study of inner medullary collecting duct of hamsters. *Pflngers Arch.* 416: 180-188, 1990
15. Imai, M., M. Hayashi, and M. Araki. Functional heterogeneity of the descending limbs of Henle's loop. I. Internephron heterogeneity in the hamster kidney. *Pflngers Arch.* 402: 385-392, 1984
16. Imai, M., K. Yasoshima, and K. Yoshitomi. Mechanism of water transport across the upper portion of the descending thin limb of long-looped nephron of hamsters. *Pflngers Arch.* 415: 630-637, 1990
17. Jamison, R. L., W. Kriz. *Urinary Concentration Mechanism. Structure and Function.* Oxford Press, New York, 1982

18. Kottra G., and E. Fr_omter. Barium blocks cell membrane and tight junction conductances in *Necturus* gallbladder epithelium. Experiments with an extended impedance technique. *Pflngers Arch.* 415:718-725, 1990
19. Moreno, J. H. Blockage of gallbladder tight junction cation-selective channels by 2,4,6,-triaminopyridinium (TAP). *J. Gen. Physiol.* 66:97-115, 1975
20. Nagel, W., F. J. Garcia-Diaz, and A. Essig. Contribution of junctional conductance to the cellular voltage-divider ratio in frog skin. *Pflngers Arch.* 399:336-341, 1983
21. Poler, S. M., and L. Reuss. Protamine decreases apical membrane K^+ and increases apical membrane Cl^- conductance in *Necturus* gallbladder epithelium. *J. Gen. Physiol.* 86: 42a, 1985
22. Reuss L. and A.L. Finn. Passive electrical properties of toad urinary bladder epithelium. *J. Gen. Physiol.* 64: 1-25, 1974
23. Sato, K., and K. J. Ullrich. Mechanism of inhibition of the proximal tubular isotonic fluid absorption by polylysine and other cationic polyamino acids. *J. Membrane Biol.* 21: 311-334, 1975
24. Seiler, M. W., H. G. Rennke, M. A. Venkatachalam, and R. S. Cotran. Pathogenesis of polycation-induced alterations ("fusion") of glomerular epithelium. *Lab. Invest.* 36: 48-61, 1977
25. Tabei, K., and M. Imai. Permselectivity for cations over anions in the upper portion of the descending limbs of Henle's loop of long-loop nephron isolated from hamsters. *Pflngers Arch.* 406: 279-284, 1986
26. Yoshitomi, K., and M. Imai. Electrophysiological characterization of the upper portion of the descending limb of the long-looped nephron. *Am. J. Physiol.* (in press)
27. Yoshitomi, K., C. Koseki, J. Taniguchi, and M. Imai. Functional heterogeneity in the hamster medullary thick ascending limb of Henle's loop. *Pflngers Arch.* 408: 600-608, 1987

MECHANISM AND REGULATION OF NaCl TRANSPORT IN THE RENAL TUBULES

Effect of protamine on ion conductances in upper portion of long-looped nephron

Koyama, Shigeru, Koji Yoshitomi, and Masashi Imai.
Department of Pharmacology, Jichi Medical School

Summary

To estimate the contribution of paracellular shunt pathway to the cation selective permeability in the upper portion of the descending limb of long-looped nephron (LDLu) of hamsters, we observed effect of protamine on salt diffusion voltage (dV_T) and transmural resistance (R_T). dV_T generated upon reduction of lumen NaCl concentration was decreased from 12.0 ± 1.4 mV to 7.3 ± 1.2 mV when 100 μ g/ml protamine was added to the lumen. Although the effect of protamine was persisted after removal of the agent from the lumen, addition of 30 U/ml heparin reversed the dV_T toward the control level. The effect of protamine was dose-dependent in the range from 3 to 1000 μ g/ml. Protamine was without effect from the bath. Studies on single salt dilution voltage revealed that 100 and 300 μ g/ml protamine inhibited relative Na^+ to Cl^- permeability from 4.03 ± 0.38 to 2.14 ± 0.21 and from 3.75 ± 0.37 to 1.36 ± 0.09 , respectively. Protamine markedly decreased the apparent transference number for Na^+ but slightly increased the value for Cl^- . Protamine also inhibited permeabilities for K^+ , Rb^+ , and Li^+ relative to Cl^- , indicating that the inhibitory effect of protamine was not confined to Na^+ but was generalized to cations. Transmural cable analysis showed that 100 μ g/ml protamine increased R_T from $14.0 \pm 1.1 \Omega \text{ cm}^2$ to $19.3 \pm 1.2 \Omega \text{ cm}^2$, with the effect being reversed by 30 U/ml heparin. Because the effect of protamine on R_T was unaffected by ouabain in the bath, changes in R_T may mainly represent those of the paracellular shunt resistance. Cable analysis with cell puncture in combination with BaCl_2 effect further confirmed this view. Protamine at 100 μ g/ml increased shunt resistance (R_S) from $34.0 \pm 8.3 \Omega \text{ cm}^2$ to $44.0 \pm 10.5 \Omega \text{ cm}^2$ without affecting apical (R_A) and basolateral (R_B) membrane resistances. From these observations, we conclude that the use of protamine provides a useful tool to study contribution of the paracellular shunt pathway and that at least about 50 % of total conductance of the LDLu is accounted for by the cation selective paracellular permeability.