

9233 海水ウナギの食道における脱塩機構

助成研究者:安藤 正昭(広島大学 総合科学部)

共同研究者:長島 圭(広島大学)

ウナギは淡水から海水に移行すると海水を飲み始め、それを腸から吸収することによって浸透圧差による脱水に抗している。しかし腸に直接海水がはいったのでは腸は水を吸収できず、逆に脱水が促進される。そこで海水ウナギは飲んだ海水を食道で脱塩し、希釈した海水を腸に送り込んでいる。しかし食道における脱塩の機構については全く分かっていない。そこで今回海水ウナギの筋肉層を剥離し、上皮細胞層よりなる標本を作成し、この標本を用いて水の透過係数を求め、さらにNaClの輸送機構を調べた。

海水ウナギの食道は、正常リンガー液中ではイオンも水もほとんど吸収しないが、蔗糖を加えることにより浸透圧差を作ってやると水が動く。この時正味のイオンの動きはほとんどみられなかった。水の輸送量と浸透圧差から水の透過係数(P_{osm})を求めると、 3×10^{-6} ml/cm²·h·Osmという非常に低い値を得た。食道の組織抵抗は70 Ω·cm²と低いので、食道はイオンを通しやすいが、水は通しにくい性質を持っていると考えられる。一方粘膜側のNaCl濃度を正常リンガー液の3倍に高めると、Na⁺もCl⁻も粘膜側から漿膜側に輸送された(脱塩)。このNa⁺とCl⁻の輸送は、それぞれのイオンの電気化学的勾配に従うものであった。つまりNa⁺もCl⁻も拡散によって粘膜側から漿膜側へ動くと考えられる。しかしNa⁺の輸送にはCl⁻の濃度勾配が必要とされ、Cl⁻の輸送にはNa⁺の濃度勾配もまた必要であった。このように相互に依存し合ったNa⁺とCl⁻の拡散は単純な拡散とは考えられない。またNa⁺とCl⁻の輸送はCN⁻やOuabainによって約50%抑えられるので、輸送過程の一部にNa⁺-K⁺ ATPaseが関与していると考えられる。一方NaCl共輸送の阻害薬として知られているThiazideや、Na⁺-K⁺-Cl⁻共輸送の阻害薬として知られているBumetanideを粘膜側に加えると、NaClの輸送量が30-40%抑制された。またAmilorideやDIDSを粘膜側に加えるとNaClの輸送が30%抑えられることから、ウナギの食道の粘膜側にNa⁺/H⁺とCl⁻/HCO₃⁻のdouble exchangerが存在していると考えられる。ThiazideやBumetanideの効果はこのdouble exchangerに対するものだと考えれば一応の説明はつく。しかしdouble exchangerだけでは全脱塩量の30%しか説明できず、残りの70%はまだ知られていない新しい輸送系によるものと思われる。

9233 海水ウナギの食道における脱塩機構

助成研究者:安藤 正昭(広島大学 総合科学部)

共同研究者:長島 圭(広島大学)

目的

ウナギは淡水から海水に移行すると海水を飲み始め、それを腸から吸収することによって浸透圧差による脱水に抗している。しかし腸に直接海水が入ったのでは腸は水を吸収できず、逆に脱水が促進される。そこで海産のカレイやウナギの食道では飲んだ海水を脱塩し、希釈した海水を腸に送り込んでいる。(Hirano & Mayer-Gostan, 1976; Parmelee & Renfro, 1983)。しかし、これらの実験ではいずれも食道の粘膜側に海水を用いており、海水中のNaClが脱塩されることを見ている。海水中にはNaCl以外のイオンも多く含まれており、それらのイオンの影響も無視できない。そこで今回、正常リンガー液のNaClだけを3倍含むリンガー液を海水の代わりに用いて、脱塩の機構を調べることを目的とした。ところが食道で上皮輸送が行われているとは一般に考えられておらず、他の動物での報告もない。そこでまず海水ウナギの食道の性質を明らかにし、ついで脱塩の機構を考えることとした。

研究方法

Hirano & Mayer-Gostanは筋肉層をつけたままの食道をサック状にして用いているが、彼らの系だと筋肉の収縮によるイオンと水の動きが含まれる。そこで海水ウナギの食道の筋肉層を剥離し、上皮細胞層からなる標本をポリエチレン管にくくりつけて、粘膜側を内側にしたサック標本を作った。この標本だと筋肉層はないし、たとえ標本が収縮することがあっても、片側はポリエチレン管に開いているので内圧は逃がせる。これを正常リンガー液に浸し、内側に種々の実験液(Table 1)を満し、1時間後の内液のイオン濃度の変化と液量の変化からイオン及び水の移動速度を求めた。このとき同時に食道の経上皮電位も150 mM KCl寒天橋、カロメル電極を介してレコーダに記録した。なお組織抵抗は筋肉層剥離標本をシート状にしてUssing chamberに挟み、60 μ Aのパルスによる電位変化から求めた。

Table 1. Experimental solutions (mM/l)

	Normal	x3NaCl	High Na ⁺	High Cl ⁻	Sucrose
NaCl	118.5	355.4	118.5	118.5	118.5
NaGluconate	---	---	236.9	---	---
NMDGCl	---	---	---	236.9	---
Sucrose	---	---	---	---	473.8
KCl	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7
CaCl ₂	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
KH ₂ PO ₄	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
MgSO ₄	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
NaHCO ₃	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9
D-Glucose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
L-Alanine	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Osmolality (mOsm/kg)	285.9	702.2	678.6	696.5	787.0
	±3.5 (14)	±4.6 (45)	±8.7 (17)	±10.1 (16)	±8.6 (6)

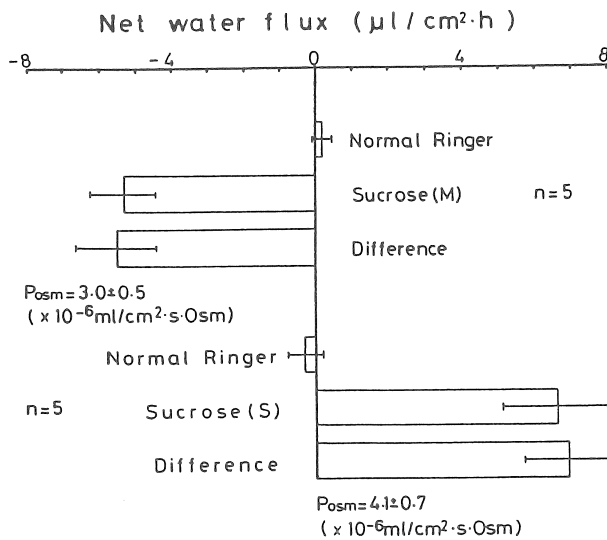


Fig. 1. Osmotic permeability (P_{osm}) in the seawater eel esophagus. Osmotic gradient was made by adding 473.8 mM sucrose into the mucosal (M) or serosal (S) fluid. Mean \pm SE.

研究結果

1. 海水ウナギの食道における水透過性

HiranoとMayer-Gostan (1976)は海水ウナギの食道は水を通さないと報告しているが、P armeleeとRenfro (1983)はカレイの食道は水を通すと言っている。そこでまず海水ウナギの食道で水の動きを測定し、水の透過定数(Posm)を求めることにした。海水ウナギの食道の片側の正常リンガー液に蔗糖を加えることにより、浸透圧差をつけてやると水は濃度勾配に従って動いた(Fig. 1)。粘膜側から漿膜側への水の動き(ms)と、その逆の水の動き(sm)と、その時の浸透圧差からPosmを求めると： $Posm^{ms} = 4.1 \pm 0.7 (x10^{-6} \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{h} \cdot 0\text{sm}, n = 5)$; $Posm^{sm} = 3.0 \pm 0.5 (x10^{-6} \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{h} \cdot 0\text{sm}, n = 5)$ であった。

2. 1. 食道におけるイオンと水の輸送

海水ウナギの食道の両側を正常リンガー液に浸すと、 Na^+ も Cl^- も水も全く正味には輸送されず、経上皮電位もゼロであった。ところが粘膜側の NaCl 濃度を正常リンガー液の3倍に高めると Na^+ と Cl^- がほぼ等量(約 $15 \mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h}$)粘膜側から漿膜側に動いた(脱塩)。また水は僅かに漿膜側から粘膜側に動いた。このとき漿膜側が約4 mV陰性の経上皮電位が記録できた(Fig. 2)。Na gluconateを用いて Na^+ 濃度のみを3倍に上昇させると、 Na^+ の吸収量は約 $4 \mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h}$ にしか上昇しなかった。同様の結果は NaCH_3SO_4 を用いても得られた。逆にNMDG Cl^- を用いて Cl^- 濃度のみを3倍に上昇させると Cl^- の吸収量は約 $5 \mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h}$ であった。NMDGのかわりにTrisを用いても同様の結果を得た。このとき水はいずれの場合も漿膜側より粘膜側へ約 $4 \mu\text{l/cm}^2 \cdot \text{h}$ 動いた(Fig. 3)。

3倍 NaCl リンガー液とhigh Na^+ リンガー液とを混合することによって粘膜側液の Na^+ 濃度を高く維持したままで、 Cl^- 濃度を段階的に減少させた。すると Cl^- の吸収量は粘膜側の Cl^- 濃度に比例して低下した。このとき Na^+ の吸収量も Cl^- 吸収量とほぼ平行して減少したが、 $[\text{Cl}^-]_m = 129.2 \text{ meq/l}$ の時に約 $5 \mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h}$ の吸収量が残った。 Na^+ と Cl^- の吸収が減少するのに伴ない、水は漿膜側から粘膜側へ分泌されるようになった(Fig. 4A)。

次に3倍 NaCl リンガー液とhigh Cl^- リンガー液を混合することによって、 Cl^- 濃度を高く維持したままで、 Na^+ 濃度を減少させると、 Na^+ の吸収量は $[\text{Na}^+]_m$ に比例して減少した。このとき Cl^- の吸収も Na^+ とほぼ平行して減少したが、 $[\text{Na}^+]_m = 143.4 \text{ meq/l}$ で約 $4 \mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h}$ の吸収量が残った。この場合も水の分泌は Na^+ と Cl^- の吸収が減少するのにもなって増大した(Fig. 4B)。

Figure 5はFig. 4で得られた結果をそれぞれのイオンの電気化学的勾配に対してプロットしたものである。粘膜側から漿膜側への 236.9 meq/l の Na^+ 濃度勾配があるとき、 Cl^- は粘

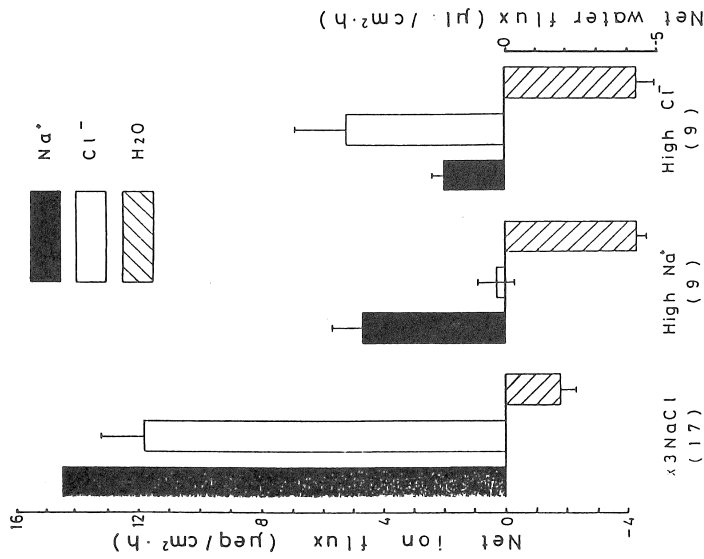


Fig. 3. Effects of Na⁺ or Cl⁻ gradient on the net Na⁺, Cl⁻ and water fluxes. The mucosal side of the esophagus was bathed with x3NaCl, high Na⁺ (Na gluconate) or high Cl⁻ (NMDG Cl) Ringer solution, while the serosal side was bathed with normal Ringer solution. Filled, open and striped columns show the net Na⁺, Cl⁻ and water fluxes, respectively. The value in the parenthesis indicates number of samples. Mean ± SE.

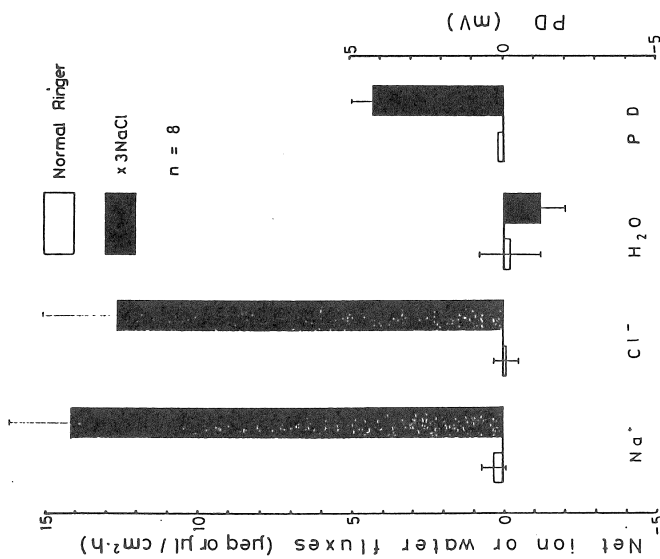


Fig. 2. Ion and water transport across the seawater eel esophagus. The serosal side of the esophagus was bathed in normal Ringer solution, while the mucosal side was bathed in normal Ringer solution (open column) or in x3NaCl Ringer solution (filled column). Mean ± SE.

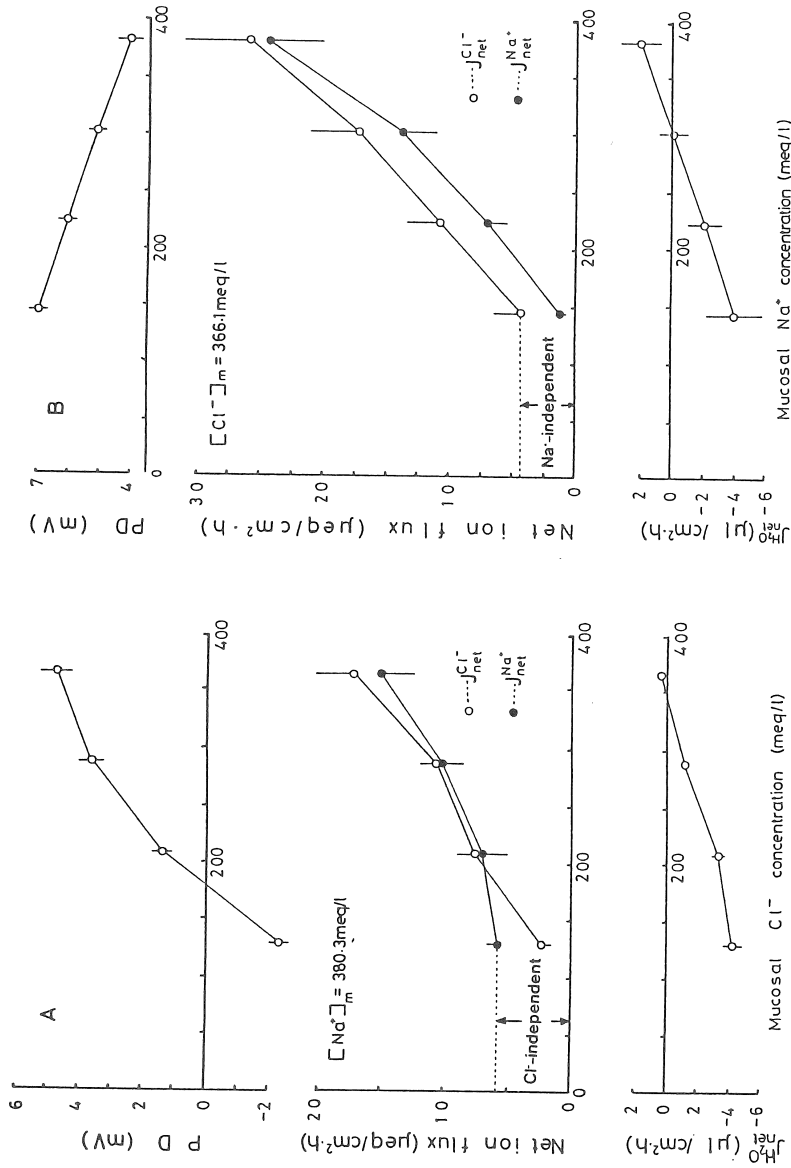


Fig. 4. Relationship between the net ion fluxes and ion concentration. A. Mucosal Cl^- concentration was altered by mixing x3NaCl and high Na^+ Ringer solution, while the serosal side was bathed in normal Ringer solution. B. Mucosal Na^+ concentration was altered by mixing x3NaCl and high Cl^- Ringer solution, while the serosal side was bathed with normal Ringer solution. Each point represents mean \pm SE ($n = 8$).

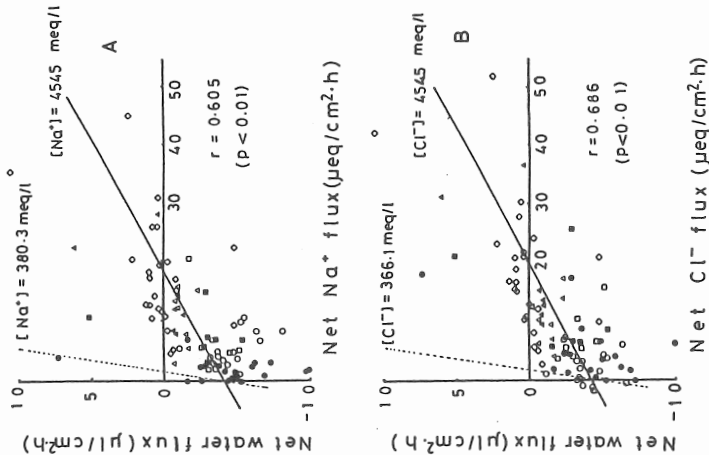


Fig. 6. Relationship between the net water and ion fluxes. A. Correlation between water and Na^+ fluxes. B. Correlation between water and Cl^- fluxes. Each point represents individual value obtained in Fig. 4. Different symbols indicate difference in experimental condition: mucosal $\times 3$ NaCl (\diamond), 287.2 meq/l Cl^- (Δ), 208.2 meq/l Cl^- (\square), high Na^+ (\circ) Ringer solution in Fig. 4A; mucosal 301.4 meq/l Na^+ (\blacktriangle), 222.4 meq/l Na^+ (\blacksquare), high Cl^- (\bullet) Ringer solution in Fig. 4B.

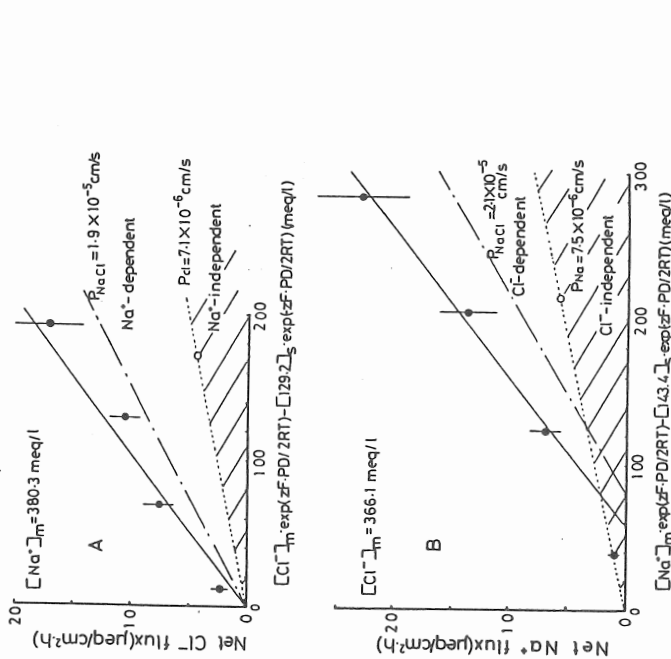


Fig. 5. Relationship between the net ion fluxes and electrochemical gradient. Each point was obtained from Fig. 4. A. The net Cl^- flux was plotted against its electrochemical gradient. Open circle shows the Na^+ -independent Cl^- flux obtained in Fig. 4B. B. The net Na^+ flux was plotted against its electrochemical gradient. Open circle indicates Cl^- -independent Na^+ flux obtained in Fig 4A.

膜側と漿膜側の間の電気化学的ポテンシャルの差にほぼ比例して動いている (Fig. 5A)。このことより Cl^- の動きの大部分は拡散によっているように思われる。しかし Fig. 4B で得られた、 Na^+ の濃度勾配がないときの Cl^- 輸送量をプロットすると (白丸)、 Na^+ の濃度勾配が存在しているときの値よりはるかに低くなった。この白丸で示された Cl^- 輸送は単純拡散によるものと考えられ、破線の傾きから Cl^- 透過係数 (P_{Cl}) が 7.1×10^{-6} cm/s と計算できる。この値はウサギの腸 (Frizzell & Schultz, 1972; Frizzell, Koch & Schultz, 1976) や牛の気管 (Vulliemmin, Durand-Arczynska & Durand, 1983) における Cl^- 透過性とほぼ同じである。更に全 Cl^- 輸送量からこの単純拡散成分を引くと、 Na^+ 依存性の Cl^- 輸送量が求まる (鎖線)。この鎖線の傾きから、 Na^+ 依存性の Cl^- 透過係数が 1.9×10^{-5} cm/s と求まる。同じようにして Na^+ の輸送量を Na^+ の電気化学的勾配に対してプロットすると Fig. 5B のようになる。 Na^+ 輸送に関しても 236.9 meq/l の Cl^- 濃度勾配存在下での値 (黒丸) が非存在下での値 (白丸) より高くなった。また Na^+ 電気化学的勾配の低い一点は白丸とゼロを結ぶ直線上に乗った (破線)。破線の傾きから Na^+ 透過性 (P_{Na}) は 7.5×10^{-6} cm/s と求まる。この値もウサギの腸や牛の気管で得られた値とほぼ同じのものであった (Frizzell & Schultz, 1972; Frizzell et al., 1976; Vulliemmin et al., 1983)。このことは Na^+ の電気化学的勾配の低いときは Cl^- の勾配があっても Na^+ は単純拡散をすることを示唆している。 Na^+ の電気化学的勾配が高くなると Cl^- にも依存した Na^+ の拡散が起こるものと考えられる。 Cl^- の場合と同様にして、 Cl^- 依存性の Na^+ 透過係数を求めると $P_{\text{NaCl}} = 2.1 \times 10^{-5}$ cm/s となった。

ここまでに用いた種々の実験条件下で得られた Na^+ の輸送量と水の輸送量との間には相関があった ($r = 0.605$, $P < 0.01$)。また Cl^- の輸送量と水の輸送量の間にも相関があった ($r = 0.686$, $P < 0.01$)。回帰直線の傾きから吸収された Na^+ と Cl^- の濃度を求めると、 $[\text{Na}^+] = 4545$ meq/l, $[\text{Cl}^-] = 4545$ meq/l となり、吸収された NaCl は粘膜側の NaCl 濃度の約 1.2 倍に濃縮されていることになる (Fig. 6)。

2. 2. イオン輸送に及ぼす阻害剤の効果

Figure 7 は今回用いた種々の阻害剤の効果を示したものである。ウナギの食道の粘膜側に 3 倍 NaCl リンガー液を入れると Na^+ と Cl^- がほぼ等量漿膜側に動くが、この輸送が能動的か受動的かをまず知るために、漿膜側に 10^{-4} M NaCN を与えた。すると Na^+ の輸送も Cl^- の輸送も 50-60% 抑制された。さらに 10^{-4} M Ouabain 処理によっても 60-70% の抑制がみられた。このことは少なくとも標準状態での全脱塩量の 60% 以上は Na^+ - K^+ ATPase に依存した能動的な過程であることを示唆している。次にイオン置換の実験から Na^+ と Cl^- の動きは互いに連結しているように見えたので、 Na^+ - K^+ - Cl^- または NaCl 共輸送系の阻害剤としていられている Bumetanide (10^{-5} M) や Hydrochlorothiazide (10^{-4} M) を粘膜側に加えると Na^+ も Cl^- も 30-40% 抑制された。一方 Na^+ / H^+ 逆輸送の阻害剤としていられている Am

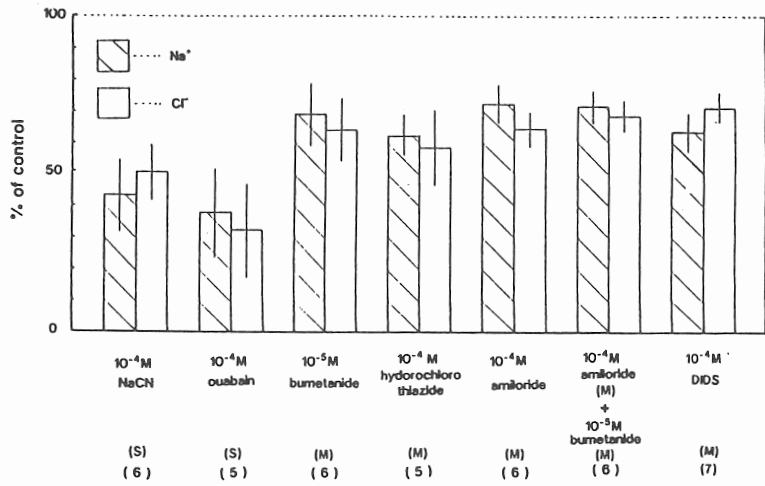


Fig. 7. Effect of various inhibitors on the net Na⁺ (striped column) and Cl⁻ (open column) fluxes across the seawater eel esophagus. The mucosal side was filled with x3NaCl Ringer solution, while the serosal side was bathed in normal Ringer solution. The control fluxes were obtained under such condition for 1 hr. After 1 hr each drug was applied to the serosal (S) or mucosal (M) fluid, and the net Na⁺ and Cl⁻ were calculated in the next 1 hr. The results were presented as a relative value against the control (100%). Mean ± SE.

Table 2. Characteristics of the esophagus of the seawater eel

Tissue	Water resistance (ohm cm ⁻²) (ml cm ⁻² s ⁻¹ Osm ⁻¹) (mV)	PD	Osmolarity ratio	Net water flux (μl cm ⁻² h ⁻¹)	
"Tight epithelia"					
Frog skin ^a	2000	1 x 10 ⁻⁵	100	2.1	1.1 ^f
Turtle urinary bladder ^a	650	8 x 10 ⁻⁶	70	1.6	5.2 ^g
Frog gastric mucosa ^a	500	2 x 10 ⁻⁵	30	1.3	-12 ^h
"Leaky epithelia"					
Rabbit gallbladder ^a	28	4 x 10 ⁻⁵	0	1.0	50 ⁱ
Rat jejunum ^a	30	2 x 10 ⁻⁴	11	1.0	27 ^j
Fish gallbladder ^a	113	1 x 10 ⁻⁴	0	1.0	15 ^k
Cottus intestine ^b	ND	6 x 10 ⁻⁵	0.6	2.3	8.1
Eel intestine (FW) ^c	88	1 x 10 ⁻⁵	-0.5	1.6	16
Eel intestine (SW) ^c	61	7 x 10 ⁻⁵	-2.5	1.2	45
Flounder esophagus ^d	83	ND	0	ND	ND
Eel esophagus ^e	77	3 x 10 ⁻⁶	-0.2	12.2	-0.2

ND, not determined

References: ^a Frömter & Diamond (1972), ^b House & Green (1965), ^c Ando (1975), ^d Parmelee & Renfro (1983), ^e Present study, ^f Huf et al. (1951), ^g Brodsky & Schilb (1965), ^h Villegas & Sananes (1968), ⁱ Diamond (1964), ^j Curran & Solomon (1957), ^k Diamond (1962)

iloride (10^{-4} M)や $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 逆輸送の阻害剤としていられているDIDS (10^{-4} M)を粘膜側に加えても約30%の抑制がみられた。またAmilorideとBumetanideを同時に加えても、AmilorideやBumetanide単独処理の時とイオン輸送量に差はなかった。このことはAmilorideとBumetanideが共通のイオン輸送系を阻害していることを暗示している。さらに Cl^- channelの阻害剤と考えられているN-phenylanthranilic acid (10^{-3} M)を粘膜側に加えても Na^+ と Cl^- の輸送量は約30%抑制された。

考察

海水ウナギの食道の組織抵抗は77 ohm. cm^2 でFrömter & Diamond (1972)の分類に従えば leaky epitheliaに属する(Table 2)。leaky epitheliaは一般に水透過性も高いが、ウナギの食道の水透過性は他のleaky epitheliaの1/10以下で、tight epitheliaよりも低い。このように水の透過性を低く抑えて、飲んだ海水をほぼ1.2倍に濃縮(Osmolarity ratio = 12.2)できることが今回の研究で示された。

ウナギの食道を介しての脱塩(NaCl の輸送)の内30-40%は互いに独立しており、かつ NaCN やOuabainに依っても抑えられないので、単純拡散によるものと考えられる。残りの60-70%は Na^+ と Cl^- の両方の濃度勾配が必要であり、片方みの勾配では不十分である。この互いに依存し合っている Na^+ と Cl^- の輸送はそれぞれの電気化学的勾配に従うので、互いに連結した拡散機構によるものだと考えられる。一方全脱塩量の約30%は粘膜側に加えたAmilorideやDIDSで抑えられることから、 $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ double exchangerがウナギの食道の粘膜側に存在すると考えられる。粘膜側のBumetanideやThiazideが NaCl 輸送を抑えるのも、これらの薬物がこのdouble exchangerに作用すると考えれば説明がつく。しかしdouble exchangerでは互いに依存し合った NaCl 輸送の50%しか説明できず、残り50%の輸送機構については全く見当もつかないのが現状である。

本研究で求めたウナギの食道における Na^+ と Cl^- の透過係数(P_{Na} と P_{Cl})は他の上皮組織で得られている値に近いものである。また互いに依存し合っている NaCl の透過係数(P_{NaCl})もウサギの腎尿細管上皮組織で得られている値と同じものであった(Shi et al., 1991)。このことは、本研究で得られた値がかなり正確であることを示唆している。海水ウナギの食道は Na^+ と Cl^- の動きを互いにカップルさせることにより、それぞれが単独で動くよりも約3倍も透過性を上げることが可能になっていると考えられる。またこの時水の透過性は低く抑えているので、脱水は非常に少ないと思われる。

今後の課題

種々の阻害剤を用いて、イオン輸送の機構を調べようとしたが、食道のNaCl輸送に対して有効に作用する薬物は見つからなかった。今後はX線マイクロアナリシスや細胞内電極法を用いて、食道上皮細胞内の情報を得ることによって、脱塩機構が明らかにされるものと期待している。今回の研究で、海水ウナギの食道は海水の12倍も濃いNaClを吸収していることが明らかとなったが、このように濃いNaClが血中に入ってもウナギが血液のホメオスタシスを維持する機構を次ぎに調べてみたい。その候補として心臓を考えている。ウナギの心臓は食道と密着しており、食道からの静脈は直ちに心房に帰ると考えられる。またウナギの心臓は一心房一心室であり、心室から出た血液はすべてエラを通過した後に全身に送られる。現在心臓の拍動に及ぼすNaClの効果を調べている。

Desalination in the Esophagus of the Seawater Eel

Masaaki Ando and Kei Nagashima

Laboratory of Physiology, Faculty of Integrated Arts and Sciences,
Hiroshima University, Kagamiyama 1-7-1, Higashihiroshima, Hiroshima 730,
Japan

Summary

The osmotic permeability coefficient (P_{osm}) was obtained in the seawater eel esophagus as 3×10^{-6} ml/cm².hr.Osm. This value was much lower than those in tight epithelia, though the eel esophagus belongs to leaky epithelia; the tissue resistance being 70 ohm.cm². When the esophagus was bathed in normal Ringer solutions, no net ion and water fluxes were observed. On the other hand, when mucosal NaCl concentration was increased, Na⁺ and Cl⁻ ions were transported from mucosa to serosa following their electrochemical gradients. However, only Na⁺ or Cl⁻ concentration was increased, the net Na⁺ or Cl⁻ flux was much lower than the expected from simple diffusion, indicating that most of the Na⁺ and Cl⁻ fluxes are coupled mutually. Since NaCN and ouabain inhibited the net Na⁺ and Cl⁻ fluxes by 50%, a part of this coupled process appears to be linked with Na⁺-K⁺ ATPase. Furthermore, mucosal thiazide, bumetanide, amiloride and DIDS also inhibited both Na⁺ and Cl⁻ transport by 30%. These results suggest that at least 30% of the coupled NaCl transport is due to Na⁺/H⁺-Cl⁻/HCO₃⁻ double exchanger on the apical membrane of the esophageal epithelium. However the rest 70% of desalination can not be explained by the known transport systems.