TITLE:

Membrane potential measurements in cultured intestinal villi(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tsuchiya, Wako

CITATION:

Tsuchiya, Wako. Membrane potential measurements in
cultured intestinal villi. 京都大学, 1980, 医学博士

ISSUE DATE:

1980-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/222495>

RIGHT:

氏 名	土 屋 和 興 つち や わ こう
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 553 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Membrane potential measurements in cultured intestinal villi (培養小腸絨毛上皮細胞における膜電位測定)

論文調査委員 (主 査) 教 授 荒木辰之助 教 授 藤 原 元 始 教 授 佐々木和夫

論 文 内 容 の 要 旨

いわゆる興奮性膜といわれる筋肉や神経に関しては、いれまでに膨大な量の電気生理学的研究がなされてきた。一方、その他の上皮や間質の細胞に関する電気生理学的研究は比較的少ない。我々はこれまでに小腸上皮と培養線維芽細胞について主に電気生理学的手法を用い、これらの細胞の活動に伴う膜電位の変化について研究を行ってきた。

ここに述べるのは小腸における solute evoked potential を説明するために必要な測定、つまり、小腸上皮の粘膜側と漿膜側の膜電位を微小電極法によって正確に測定するという従来困難であった実験に組織培養法を導入してこれを可能ならしめた最初の報告であり、小腸上皮における糖・アミノ酸輸送の電気生理の基礎となる研究である。

従来の摘出標本による小腸上皮の膜電位は報告者により -9mV から -53mV と様々である。このように膜電位がばらつく原因として、小腸上皮が低酸素に弱く、血管系から切り離し、準備をする段階で細胞に損傷を与えていることが考えられる。我々の目的はインタクトで、しかも生体内と同じような上皮の構築を持った細胞系を培養によって実現することにあった。

新生ラットの腸絨毛を 199 培地中で培養すると、通常 2 日目において 2 つのグループに分けられる。その一つはシート型と名付けたもので、絨毛の開口端が培養シャーレの底面に接着し、周辺に一層となった上皮が伸展してゆくものであり、もう一つはグロビュル型と呼ばれる、絨毛の開口端が閉じて塞がり、基質に接着せず、浮遊したままで成長を続ける一層の球状上皮である。両者共に培養系で約 4 週間生存し続けるが、その後、急速に死滅する。

膜電位はこの両者において、殆んど全ての細胞から安定に記録出来た。シート型の上皮で培養中 (2 ～ 9 日目頃) に粘膜側膜電位を記録すると -70mV ～ -15mV の間にばらついた。このばらつきは絨毛の上における細胞の位置と明らかに関係があり、絨毛先端で大きく (約 -70mV) 陰窩部に近い所では低かった (約 -15mV)。同じような結論はグロビュル型においても得られた。この膜電位の違いは、通常培養日

数が進むにつれ小さくなり、殆ど全ての細胞が -70mV に近い膜電位を示すようになった。

次に膜電位の成因について調べる目的で一価イオン、二価イオンの効果、ならびに代謝依存性について検討をした。結論を述べると膜電位は外液の K^+ 濃度に強く依存しており、 Cl^- 、 Na^+ では余り大きな変化は見られない。高 K^+ 領域における膜電位のスロープは $46\text{mV}/10\text{倍 } \text{K}^+$ 濃度であった。また外液の Ca^{2+} 濃度に依存する膜電位成分が約 20mV 含まれていることも分かった。ウアバイン添加により短時間で約 20mV 脱分極することから起電性ポンプの膜電位への寄与が考えられた。低温 (6°C) にすることによって膜電位が急速に 40mV も脱分極すること、代謝阻害薬の効果などから細胞内代謝の関与する膜電位成分の大きさが分かった。

以上のデータに基づき、これまでの膜電位測定の実験ならびに、今後の培養絨毛細胞の有用な点、問題点につき考案を加えた。

論文審査の結果の要旨

従来、摘出標本による小腸上皮細胞の膜電位測定値は、報告者によって著しく異なり、その原因は明らかでなかった。著者は小腸絨毛上皮を培養して膜電位を測定することに始めて成功した。培養した新生ラットの小腸絨毛の構築は、シート型とグロビュル型に分けられたが、膜電位はこの両者において安定に記録され、培養開始後約1週間以内では、膜電位の値は絨毛上の細胞の位置に依存し、絨毛先端では大きく (約 -70mV)、陰窩部に近い場所では小さく (約 -15mV)、培養後2週間経過すると、膜電位の値は細胞の位置に関係なく約 -70mV であることが明らかにされた。この所見は、小腸上皮細胞の膜電位は細胞の分化あるいは成熟度に依存することを示唆している。また膜電位に対する細胞外液の1価および2価イオンの効果、温度、代謝阻害剤などの効果について詳細な解析が行なわれ、 K^+ 、 Ca^{2+} 、および代謝依存性の膜電位成分の存在が見出された。本論文は上皮細胞の培養による電気生理学的研究としては最初のものであって、多くの新知見が含まれ、今後、上皮細胞の輸送現象の解析に貢献するところが大である。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。