

学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 論文審査担当者 |
|---|---|
| 貴島 源一 | 主査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 窪 田 隆 裕 副査 教授 勝 間 田 敬 弘 副査 教授 古 谷 榮 助 |
| 主論文題名 ラット肺胞Ⅱ型細胞における NH_4^+ パルスによる酸負荷後の pH_i 回復: HCO_3^- 流入 (Intracellular pH recovery after acid loading by the NH_4^+ pulse method in rat alveolar type II cells: HCO_3^- entry) | |
| 学位論文内容の要旨 | |
| <p>《目的》</p> <p>細胞内 pH (pH_i) は細胞機能の調節因子である。肺胞上皮は呼吸に伴う CO_2 分圧の変動にさらされ、pH_i は絶えず変動している。酸性化した pH_i の調節には、イオン輸送体による、1) H^+ の汲み出し (Na^+/H^+ 交換輸送 [NHE] - $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送 [AE]、H^+ チャンネル、H^+-pump [細胞膜、細胞内顆粒]) か、あるいは 2) 細胞内への HCO_3^- の取り込み ($\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ 共輸送 [NBC]、Cl^- チャンネル) が必要である。しかし、酸負荷後の pH_i 回復にどのようなメカニズムが関与しているかは必ずしも明らかではない。</p> <p>本研究では、肺胞上皮における酸負荷後の pH_i 回復メカニズムを明らかにするため、ラット単離肺胞Ⅱ型細胞 (AT-II cell) を用い、NH_4^+ パルス法による酸負荷後の pH_i 回復過程に対する各種イオン輸送阻害剤の効果について検討した。</p> <p>《方法》</p> <p>溶液の組成 (mM) は、95 % O_2、5 % CO_2 混合ガスを通じた NaCl 121、KCl 4.5、MgCl_2 1.0、CaCl_2 1.5、NaHCO_3 25、NaHEPES 5、HHEPES 5、glucose 5 (pH 7.4) であり、実験は 37°C でおこなった。NH_4^+ パルスには NaCl (25 mM) を NH_4Cl (25 mM) に置き換えた溶液を用いた。また、高 HCO_3^- 溶液 (50 mM HCO_3^-) は 25 mM NaCl を NaHCO_3 に置換し、90 % O_2、10 % CO_2 混合ガスを通じた。</p> <p>ネブプタール (50~70 mg/kg) 腹腔内投与により麻酔したラット (雄性 slc:Wistar/ST、250~300g) より取り出した肺をエラスターゼ処理し、AT-II cell を単離した。酸負荷には NH_4^+ パルス法を用い、pH_i は pH 感受性蛍光色素 (BCECF) の蛍光強度比 (励起波長 450/490nm、測定波長 535 nm) から計算した。</p> <p>細胞容積は、カバースリップに接着した AT-II cell をビデオ画像として記録し、ビデオ画面上でトレースして細胞面積 (A) を求め、静止時の値を A_0 とした。細胞容積は $\{V/V_0 = (A/A_0)^{1.5}\}$ の式より求めた相対値として表した。</p> <p>《結果》</p> <p>静止時 AT-II cell の pH_i は 7.3~7.5 であった。NH_4^+ (25 mM) を加えると pH_i は直ちに 8.0~8.5 まで上昇した。NH_4^+ を取り除く (NH_4^+ パルス) と pH_i は直ちに 6.2~6.4 に低下し、その後約 10 分で元のレベルに回復した。この酸負荷後の pH_i 回復過程は、2 つの成分 (rapid phase と slow phase) により構成されていた。</p> <p>まず、H^+ の汲み出し機構について検討した。NHE の阻害剤、methyl-isobutyl amiloride (10 μM MIA)</p> | |

は slow phase を著明に抑制したが、rapid phase は抑制しなかった。また、slow phase の抑制は NHE と連結して働いている AE の阻害剤 diisothiocyanostilben disulfonic acid (DIDS) を用いても観察された。次に、 H^+ -ATPase 阻害剤である concanamycin A と bafilomycin A_1 を用い細胞内顆粒への H^+ の取り込みについて検討したが、rapid phase と slow phase はいずれも変化しなかった。これらの結果から、slow phase は NHE による H^+ の細胞外への汲み出しによるものであることが明らかになった。

HCO_3^- の取り込みについて検討した。 HCO_3^- の流入経路としては、 Cl^- チャンネルと NBC の可能性がある。 Cl^- チャンネル阻害剤である NPPB (20 μM) は rapid phase を抑制したが、slow phase には影響を及ぼさなかった。同様の結果は、CFTR- Cl^- チャンネル阻害剤である glybenclamide (200 μM) でも得られた。次に、NBC の阻害剤である DIDS (200 μM) は rapid phase と slow phase の回復速度をともに抑制した。しかし、その抑制の程度は、 Cl^- チャンネル阻害剤に比較して小さいものであった。また、slow phase の抑制は、前述した AE 阻害によるものと考えられた。これらの結果から、rapid phase は Cl^- チャンネルと NBC を介した HCO_3^- の流入によるものであることが明らかになった。

さらに、細胞外 HCO_3^- 濃度 ($[HCO_3^-]_o$) を 25 mM から 50 mM に増加させると、rapid phase の速度が上昇したことより、rapid phase における HCO_3^- の流入が確認された。

HCO_3^- の流入は、細胞容積の増加を引き起こすことが予想される。そこで、AT-II cell の NH_4^+ パルスによる細胞容積変化を測定した。 NH_4^+ を加えると細胞容積は増加し、 NH_4^+ を取り除くと急激に細胞容積は減少した後、速やかに元のレベルに回復した。DIDS あるいは NPPB 存在下では NH_4^+ パルス後の細胞容積減少そのものが抑制されたが、 NH_4^+ パルス後の速やかな細胞容積増加は認められなかった。この結果から、 NH_4^+ パルス後の細胞容積変化は、 Cl^- チャンネルと NBC による HCO_3^- の流入によることが支持された。

《考 察》

本研究により、AT-II cell における酸負荷後の pH_i 回復課程は 2 つの成分 (rapid phase と slow phase) からなることが明らかとなった。このうち rapid phase は Cl^- チャンネルと NBC による HCO_3^- の流入に、また slow phase は NHE による H^+ の汲み出しによるものであった。

一方で、AT-II cell に流入した HCO_3^- は炭酸脱水酵素により直ちに H^+ とともに処理され CO_2 となり、 CO_2 分圧の低い肺胞腔へ拡散すると考えられる。このように、AT-II cell における HCO_3^- の流入は、 pH_i 調節系として機能していると同時に、肺における CO_2 排泄のためのメカニズムとしても重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

審査結果の要旨および担当者

| 報告番号 | 乙 第 号 | 氏 名 | 貴島 源一 |
|--|-------|------------------|-------|
| 論文審査担当者 | | 主 査 教授 花 房 俊 昭 | |
| | | 副 査 教授 林 秀 行 | |
| | | 副 査 教授 窪 田 隆 裕 | |
| | | 副 査 教授 勝 間 田 敬 弘 | |
| | | 副 査 教授 古 谷 榮 助 | |
| <p>主論文題名</p> <p>ラット肺胞Ⅱ型細胞における NH_4^+パルスによる酸負荷後の pH_i回復：HCO_3^-流入 (Intracellular pH recovery after acid loading by the NH_4^+ pulse method in rat alveolar type II cells: HCO_3^- entry)</p> | | | |
| 論文審査結果の要旨 | | | |
| <p>申請者は、ラット単離肺胞Ⅱ型細胞(AT-II cell)を用いて酸負荷後の細胞内 pH(pH_i)回復メカニズムを検討している。まず、NH_4^+パルス法にて酸負荷を行い、pH_iの回復過程が二相性(rapid phaseとslow phase)であることを見出した。次いで、その回復過程に対する各種イオン輸送阻害剤の効果について検討し、rapid phaseは Cl^-チャンネルと $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$共輸送(NBC)を経由した HCO_3^-の流入により引き起こされ、slow phaseは Na^+/H^+交換輸送(NHE)による H^+の汲み出しにより引き起こされている事を明らかにした。特に、AT-II cellにおける速い pH_i調節には HCO_3^-の流入が重要であることを見出したことは、細胞生理学的に大きな成果である。さらに申請者は、これらの結果の考察から、AT-II cellでは HCO_3^-を取り込むことにより CO_2排泄の一端を担っている可能性を示唆している。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) 大阪医科大学雑誌 64(3): 11-22, 2005</p> | | | |