



Effects of Aging on the Regulation of Intracellular pH of the Rat Small Intestine

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊熊, 睦博 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1030

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 177号	学位授与年月日	平成 7年 3月27日
氏 名	伊 熊 睦 博		
論文題目	Effects of Aging on the Regulation of Intracellular pH of the Rat Small Intestine (ラット小腸細胞内 pH 制御に対する加齢の影響)		

博士(医学) 伊 熊 睦 博

論文題目

Effects of Aging on the Regulation of Intracellular pH of the Rat Small Intestine

(ラット小腸細胞内 pH 制御に対する加齢の影響)

論文の内容の要旨

緒言

小腸吸収上皮細胞内 pH は、管腔側と血管側の二つの異なった pH 環境にはさまれて、その調節が行われる。細胞内酸負荷からの pH 回復機転は、主に Na^+/H^+ 交換輸送の活性に負うと考えられる。 Na^+/H^+ 交換輸送による H^+ 分泌は微小環境 pH (microclimate pH) の維持に重要な役割を果たすと共にカルシウム吸収、ペプチドの担体輸送、脂肪酸の吸収等に関与している。カルシウムをはじめとする腸管吸収は加齢により変化をきたすが、その機構については、充分には明らかにされていない。加齢による小腸吸収上皮細胞内 pH 調節能の変化について検討した。

方法

Wistar 系雄性ラット 6 カ月 (若齢) 群と、24 カ月 (老齢) 群の空腸細胞を用い、蛍光測定法により評価した。Urethane (1 g/Kg, i.p.) 麻酔下に開腹、上部空腸を取り出し、絨毛先端部を実体顕微鏡直視下に剪刀で切離、Dispase 含有代用液で 5 分間 37°C 孵置して細胞を単離した。pH 感受性色素 BCECF-AM 8 μM を室温で 5 分間負荷後、予め Cell TakTM を塗布した灌流用小槽に固定した。蛍光測定は、代用液 (NaCl 100 mM, mannitol 77.5 mM, CaCl_2 1.5 mM, MgCl_2 1.0 mM, KCl 5 mM, l-glutamine 2.5 mM, HEPES 5.0 mM/pH 7.4) にて灌流しながら倒立顕微鏡上で行った。励起は 440 nm、500 nm の二波長で行い、520~560 nm の波長幅で測光した。細胞内 pH 較正は Nigericine- K^+ 法により、細胞内酸負荷は塩化アンモニウム負荷法により行った。

結果

小腸吸収上皮細胞内 pH (pHi) は、6 カ月 (若齢) 群で 7.25 ± 0.05 、24 カ月 (老齢) 群で 7.22 ± 0.03 となり両群間に差を認めなかった。両群間において細胞内 pH 調節の緩衝能力 (buffer capacity) にも差は見られなかった。 pHi は、灌流液中への Amiloride 5 mM 添加、または灌流液からの Na^+ 除去により、0.4~0.6 pH の範囲で酸性化を示し、これは正常代用液の再灌流により復帰した。塩化アンモニウム 40 mM 負荷による細胞内アルカリ負荷後酸性化からの pHi 回復機転は、Amiloride 5 mM 添加または灌流液からの Na^+ 除去により障害され、 Na^+/H^+ 交換輸送に負うことが示された。細胞内アルカリ負荷後酸性化からの pHi 回復の初期速度は、負荷後灌流する液の Na^+ 濃度に従い、 Na^+/H^+ 交換輸送の活性を表すと考えられた。この活性の V_{max} は、若齢群で $0.227 \pm 0.033 \text{ pH unit/min}$ 、老齢群で $0.297 \pm 0.024 \text{ pH unit/min}$ となり老齢群に於て有意に ($P < 0.05$) 低下していた。一方、 Na^+ に対する K_m は、若齢群で $17.2 \pm 0.9 \text{ mM}$ 、老齢群で $15.4 \pm 2.1 \text{ mM}$ となり両群間に差を認めなかった。

考察

細胞内 pH (pHi) の調節に於ては、 Na^+/H^+ 交換輸送の役割が重要であり、小腸吸収上皮細胞に於ても、 Na^+/H^+ 交換輸送を中心とした調節系が pHi 恒常性を維持していることが確認された。本研究では、酸負荷後の回復で見る小腸吸収上皮細胞内 pH の調節能、即ち Na^+/H^+ 交換輸送活性が、加齢に伴い低下することを明らかとした。小腸吸収上皮細胞管腔側表面には、粘液に被覆された不攪拌層 (unstirred water layer) が存在し、微小環境 pH (microclimate pH) と呼ばれる酸性側に傾く

pH 勾配を形成し、これは種々の H^+ 依存性輸送機構に関与する。著者は、ラット小腸微小環境 pH 勾配が加齢により低下すること、及び、その一因が、不攪拌層の厚さの低下にあることを報告した（副論文）。管腔側への H^+ 供給には、 Na^+/H^+ 交換輸送の寄与が考えられ、ここに報告した Na^+/H^+ 交換輸送活性の低下は、小腸吸収機能の加齢に伴う変化の一因となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

細胞内 pH はその中で行われる物質代謝と細胞内外間の物質輸送にとってきわめて重要な因子である。小腸吸収細胞の場合吸収という大量の物質輸送があるために細胞内 pH のホメオスタシスには大きい関心がもたれる。またその維持能力が加齢によりどのような影響を受けるかは重要な問題である。

従来、この細胞内 pH 調節機構には Na^+/H^+ 交換輸送、 Na^+ 依存性及び同非依存性 HCO_3^-/Cl^- 交換輸送が関与するとされている。他の輸送系も pH 調節に関与すると思われるが、おそらくその重要性は低いと考えられる。

申請者は 6 ケ月ラットと 24 ケ月ラットの空腸吸収細胞について緩衝能力を調べた。細胞内 pH の指標として pH 感受性色素を利用し、細胞の緩衝能力と Na^+/H^+ 交換輸送の影響を調べた。緩衝能力は amiloride 添加または外液からの Na^+ の除去によって細胞内 pH を低下させたあと段階的に異なる塩基濃度に曝露しえられた pH 変化を一定の式で計算することにより求められた。その結果、加齢による有意な影響はみられなかった。この結果に一致して定常状態の細胞内 pH にも加齢による変化は認められなかった。外液からの Na^+ の除去による細胞内 pH の低下は Na^+/H^+ 交換輸送が細胞内 pH のホメオスタシスに重要な役割を果たしていることを示しているが、外液を標準液と置き換えることによる細胞内 pH の回復過程は Na^+/H^+ 交換輸送の関与の程度を反映していると考えられる。この回復の初期過程における速度論的解析から、細胞外 Na^+ 濃度に対する K_m には加齢による有意の差は認められなかったが、細胞内 pH の回復（上昇）の V_{max} は老化ラットにおいて有意に低下していた。これは老化ラットの細胞内 pH の恒常性維持能力（おそらく細胞あたりの Na^+/H^+ 交換輸送活性）が低下していることを示唆しているものと解釈された。

発表に引き続き以下のような質疑がなされた。

- 1) 電極の進入角度及び先端の外径について
- 2) 電極が不攪拌層にあたえる影響について
- 3) 細胞表面 pH 値の統計処理について
- 4) 実験中の nutrient の選択の指針はなにか
- 5) 灌流液の pH について
- 6) Na^+ のかわりにコリンを用いた理由は
- 7) 標準液の組成について
- 8) アルカリとして重炭酸イオンを用いればどうか
- 9) DTT (dithiothreitol) そのものは pH に影響をあたえないか

以上の質疑に対し申請者はおおむね適切な解答をあたえ研究内容も博士（医学）の学位授与の水準に達していると全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 道 也

副査 教授 高 田 明 和 副査 教授 馬 場 正 三

副査 助教授 小 田 敏 明 副査 講師 花 井 洋 行