口腔消化器系粘膜上皮の単一細胞間の 電氣的低抵抗結合の様式に関する研究

菅 野 義 信 森 田 之 大 松 井 洋 一 郎
かん の よし のぶ もり た ゆき とも まつ い よう いち ろう

広島大学歯学部 口腔生理学教室*

長 沢 亨
なが さわ とおる

広島大学歯学部 歯科補綴学第1教室*

〔受付：昭和46年9月25日〕

緒 言

口腔および消化管の粘膜上皮組織の1つの細胞に微小電極で細胞内から細胞外の不関電極に向け通電する。通電電流は内むき・外むきの別を問わず、また流入電流量の大小は細胞によって異なるが、多かれ少なかれ隣接する細胞内にも流入する。これは通電した細胞と隣接の細胞内にそれぞれ電極を刺入して、細胞膜を隔てて不関電極との間の電位差を調べることで実証される。電流は更に次々とあい接して並ぶ細胞にも流入し、通電した細胞からいくつかの細胞を経て少し離れた細胞中にも達していることは、その細胞からも通電による電位変化を取得できることから明らかである。従って細胞静止膜電位を目標にすれば、電極がある細胞内に細胞膜を大きく損傷することなく刺入されたことがわかり、その後細胞内通電電極としても利用することができる。またこの1本の電極で通電と電位記録の両者の働きを行わせる電気生理学的手法もすでに開発され、これで通電細胞の電位記録も可能になる。通電細胞からある距離はなれた、例えば50 μ の位置の細胞に2本目の記録電極を刺入し、もし通電による電位変化が少しでも検出できれば、その間にいくつかある細

胞内を細胞から細胞へと通電電流が流入し、記録電極の刺入された細胞にも電流が到達していると考えることができる。短く云いかえれば、1個1個の細胞を顕微鏡下で必ずしも確認できなくとも、細胞と細胞が電氣的に低抵抗で結合されていることは確認できる。消化器系器官でもイモリの胃と小腸の粘膜上皮細胞は一層に、しかも比較的規則正しく配列され、細胞から細胞への電流の流入様式を調べるのにまことに都合がよい。イモリ消化器系粘膜上皮細胞のうち、胃では細胞間の電氣的結合はほぼ一様であり、小腸ではその程度に著しい変動があることはすでに述べた⁹⁾。しかし隣りあう1個1個の細胞相互間の結合状態については必ずしも詳細な検討は加えられていない。

本実験では、特殊な顕微鏡の強拡大下でイモリ胃および小腸粘膜上皮の個々の細胞を確認して微小電極を刺入し、かつ互に隣接する細胞の電氣的低抵抗結合の相違を測定した。将来電子顕微鏡による微細構造との対応を考察する必要性から、胃および小腸における電気生理学的結合様式の相違を特に詳しく調べた。

材料と方法

本邦に広く生息するイモリ *Triturus pyrrhoga*-

The electrophysiological study on low resistance coupling between cells in digestive epithelia of newt, *Triturus pyrrhogaster*

Y. KANNO, Y. MORITA, Y. MATSUI (Department of Oral Physiology, Hiroshima University School of Dentistry, Kasumi 1-chome, Hiroshima, Japan) and T. NAGASAWA (Department of Complete and Partial Denture Prosthodontics, Hiroshima University School of Dentistry, Kasumi 1-chome, Hiroshima, Japan)

* 広島市霞1丁目 2-3(〒734)

ster を広島市周辺から採集して実験に用いた。室温 (20~25°C) で飼育し、胃および小腸粘膜を切り出し、顕微鏡観察用として作製した透明な平板上の小箱に、粘膜面を上、漿膜面を裏に組織片を適度に伸展して固定した。生理的塩類溶液としては NaCl : 111.3mM, KCl : 1.3mM, CaCl_2 : 1.4mM を NaHCO_3 により pH 7.2 に調節したものを選んだ。室温では、消化管の摘出後かなりさかんな粘液分泌と粘膜筋板の平滑筋による律動的収縮を認め、顕微鏡下での細胞の確認、また殊に目的とする細胞への電極の刺入が困難である。3~6°C に冷却した生理的塩類溶液中に組織片を保てば、律動的収縮のみならず粘液分泌も抑制され、細胞の位置が確認し易く、かつ電極の刺入も容易である。なおこの程度の低温では、組織を摘出してから短時間では粘膜上皮細胞の静止膜電位、実効膜抵抗に著しい変化が見られない。しかし、後述する如く、低温中に長時間保てば時間経過に伴う静止膜電位、実効膜抵抗に変化を生じた。従って実験は低温による変化が出現する前に終るように配慮した。

長焦点対物レンズ (UM32) を装着したライツマンプレーター用ラボラックス顕微鏡強拡大下では、透過光により粘膜上皮細胞の1個1個がきわめてよくみえる。図1はイモリ胃粘膜上皮細胞の生体標本を粘膜管腔側より見たものである。ほぼ等しい大きさの細胞が六角形に近く規則的に配列している。組織学的には、絨毛のないほぼ一様な大きさの単層立方上皮細胞が並び、深く陥入する胃腺の分化は見られない。電子顕微鏡による所見では全ての細胞に分泌顆粒が見られる³⁾。

小腸粘膜上皮の生体標本では粘膜のヒダの凸部と凹部とでは細胞の大きさ、配列に相違がある。ヒダの凸部は一般に大型の細胞が多く、配列もほぼ六角形に近く比較的規則正しい。一方凹部は大小種々の細胞が不規則に配列している。固定染色標本では凹部に杯細胞、Paneth 細胞等分泌に関与する細胞が凸部より比較的多く散在するが、生体標本ではそれら細胞の区別が困難であった。

電氣的測定方法の概略は図2に図示した。細胞

図1 イモリ胃粘膜上皮細胞生体標本の管腔側よりみた顕微鏡写真。ほぼ一様な大きさの上皮細胞群が規則的に並んでいる。長さの目盛 50 μ 。

図2 電氣的測定方法の概略。摘出した組織片は粘膜面を上にして円形にくりぬいた蜜ろうに針で固定してある。M: ライツマンプレーター用ラボラックスII型顕微鏡。長焦点対物レンズ UM32 装着。Es: 細胞内通電電極。Er: 細胞内電位記録電極。Eg: 銀—塩化銀不分極不関電極。C: 顕微鏡付属集光器。

内通電電極 (Es) および細胞内電位記録電極 (Er) には 3M KCl を充たし、先端の直径約 0.5 μ 以下、電極抵抗 15~30M Ω のものを選択して用いた。通電・記録電極はそれぞれ2台のマイクロマンプレーター (ライツ型とペテルヒ型) に取り付け、顕微鏡 (ライツ製・ラボラックス II 型) (M) 強拡大下 (320 倍) で相互に隣接する細胞を確認し、同一細胞内に、あるいは隣接する細胞内に刺入した。銀—塩化銀不分極不関電極 (Eg) に対する記録電極からの単極誘導方式で得られた細胞内電位は、cathode-follower 型微小電極用増幅器 (日本光電製・MZ-3B) を介し、ブラウン管オシロ

スコープ（日本光電製・VC-7）に接続して観察あるいは記録した。細胞内通電量は最高 5×10^{-8} Amp まで、大部分内向き電流を用いた。

一定量の通電により得られる電位変化が小さく、測定が困難な場合は CAT 型電子計算機（日本光電製・ATAC 501-20）の加算平均法を併用した。

通電電極と記録電極を同時に同一細胞内に刺入して得られる一定の通電量に対する電位変化 (V_I) と、隣接細胞内に記録電極を刺入して得られる電位変化 (V_{II}) との比 (V_{II}/V_I) を結合比 (coupling ratio)⁶⁾ と称し、細胞間連絡の程度を知るための 1 つの指標と考えられる。接面膜を越えて隣接細胞に流入する電流量が大であればあるほど結合比は大きくなり、接面膜の電気的抵抗は低いことを意味する。

実験結果

1. 低温による基礎対照実験

顕微鏡下の実験用透明小箱中に粘膜面を上、漿膜側を下に固定した粘膜上皮は、筋板層を含むので適度に伸展して固定しても平滑筋による間歇的律動的収縮をまぬがれない⁹⁾。高等動物では atropine 等副交感神経系の遮断剤が腸管の律動的収縮をよく制御するので、硫酸 atropine も使用してみたが、普通量では実験が満足におこなわれるまでに律動的収縮を停止することは不可能であった。細胞間の低抵抗性結合、すなわち細胞間連絡が、ある種のイオンや 2 価陽イオンの量、薬物等にかかなり敏感に反応し、主として細胞間連絡の低下として出現するので⁷⁾、多量の薬物の使用には消極的にならざるを得ない。

低温という処理方法も、ユスリカの唾液腺細胞の細胞間連絡を可逆的に低下させるという報告があるが¹⁰⁾、実験方法の項にも述べた如く、低温が粘液分泌を抑制し、しかも律動的収縮による標本の動きを著明に抑制するので、イモリの消化管の低温に対する反応を先ず調べた。先の論文⁹⁾の如く、同じ細胞間連絡を測定するにしても、2本の電極をある微小距離に固定して測定する場合は、比

図3 摘出したイモリ胃粘膜を $3^{\circ}\sim 6^{\circ}\text{C}$ に冷却した生理的塩類溶液中で測定した静止膜電位、実効膜抵抗および結合比の経時の変化。—○—：静止膜電位 (R.P.)，—●—：実効膜抵抗 (R)，—△—：結合比 (C.R.)。右 2 本の縦軸は結合比および実効膜抵抗 (kΩ)，左縦軸は静止膜電位 (—mV) および横軸は組織摘出後冷却した生理的塩類溶液中に保ってからの経過時間を時間 (hour) で示している。各点の測定値は 10～18 測定例数の平均値を示す。標準誤差は各印の中に入る程度に小さい。

較的短時間で実験を終了することができるが、1 個 1 個の細胞を確認して電極を刺入し、しかも一連の隣接する細胞に次々に電極を刺入して測定する実験では、少なくとも十数分間は収縮による動きを停止させることが必要不可欠の条件である。

図 3 は $3^{\circ}\sim 6^{\circ}\text{C}$ の生理的塩類溶液中にイモリの胃粘膜を保って、経時的に変化する静止膜電位、実効膜抵抗および結合比を測定した 1 例を示している。摘出後 30 分以内では、静止膜電位は平均 48.1 ± 9.2 (S.D.) mV であり、室温中で測定した値 46.2 ± 6.7 (S.D.) mV と有意の差はない。実効膜抵抗は平均 533 KΩ，結合比の平均は 0.57 であった。摘出後 2.5 時間では、静止膜電位は平均 38.1 mV とかなり減少の傾向を示すが、実効膜抵抗は平均 547 KΩ，結合比は 0.53 と殆んど変わらない。以後静止膜電位、実効膜抵抗ともに漸次減少するが、結合比の著しい減少はみられない。ユスリカ唾液腺細胞、マウスの肝細胞でも低温の溶液中では結合比の変動は静止膜電位や実効膜抵抗の変動に先んずることが知られている^{4, 10)}。しかし、イモリ胃粘膜上皮細胞は低温下でも結合比が比較

的安定な傾向がみられ、摘出後4.5時間以内ではほぼ変化しないといえる。この摘出後低温に保って行なう実験でも、2時間程度で先ず静止膜電位の脱分極が始まり、2.5時間ごろからはやや急激に実効膜抵抗が減少し始めるが、少なくとも低温中で1.5時間ぐらいまでは静止膜電位も実効膜抵抗も細胞間結合比もあまり大きな変動を示していない。幸い一連の実験を手際よく行なえば、およそ1.5時間ほどで終了し得るので、平滑筋による律動的収縮を抑制し、しかも粘液分泌も減少させ、1個1個の細胞の確認を容易にできる低温法で以下の実験を行った。低温による人工的処置の大きな影響はないと確信している。

2. ある1細胞の通電により単層平面にならぶ上皮細胞の電位分布

イモリ消化器系粘膜上皮では、他の多くの上皮細胞⁶⁾と同様に、細胞内に通電すると細胞表面膜、接面膜および原形質の電気的抵抗による電位変化と通電量との間には直線的関係があり、膜に整流性・興奮性はない⁹⁾。従って通電量を一定とし、換算して得られる細胞内電位変化を比較することが可能である。 5×10^{-8} Amp 一定の電流を細胞内通電し、通電電極を刺入した細胞より隣り合って一連に並ぶ細胞に電位記録電極を遠位より順次刺入し、接面膜を越えて流入する電流により膜抵抗に基づく電位変化を測定した。図4は胃粘膜上皮における結果の2例を示している。1例では通電細胞(図中では通電電極を刺入した細胞を横軸上の0で示し、それに隣接する細胞を近位より遠位に向かって順次1, 2, 3……として示す。以下本文中では0, 1, 2……細胞と表現する。)に記録電極を刺入すると53.0mVの電位変化が認められたが、これに隣接する細胞(1細胞)からは21.0mVが得られた。2, 3, 4, 5, 6, 7, 8細胞と遠位になるに従いそれぞれ14.4, 10.0, 8.4, 6.2, 5.6, 5.3, 4.9mVと取得電位は漸次減少する。もう1例の0細胞では36.7mV, 1細胞では24.8mVの電位変化があり、以下2, 3……細胞と遠位になるほど上記の例と同様減少する。この2例とも取得電位の対数に関し、指数関

図4 胃粘膜上皮細胞において、一定の通電量に対する通電点より一連に隣接する細胞からの取得電位の2例。縦軸は通電量 5×10^{-8} Amp に対する取得電位 (mV) を対数で表示。横軸は通電細胞を0, 順次隣接する細胞を通電点に近いものから順に1, 2, 3……, 8細胞まで表示してある。

数的に減少した。生体標本では、胃粘膜上皮細胞の大きさは粘膜上面よりみて短径約 15μ 、長径約 20μ であるから、通電点より8細胞すなわち $120 \sim 160\mu$ の遠位にあってもなお 5×10^{-8} Amp 通電量に対し1例では4.9mV, もう1例では5.6mVの電位変化を得た。

ショウジョウバエの唾液腺細胞の如く⁵⁾, 細胞間連絡の程度が甚だ高く、しかも唾液腺全体が円柱状である場合には、縦軸の電位変化を対数目盛にとり、横軸にそのまま距離をとると、細長い神経細胞における cable theory¹⁶⁾による直線的減少に近似する。更に唾液腺自体が長さの割に直径が大きいので縦軸に単なる対数目盛でなく hyperbolic cosine function 目盛に表示すると、ほとんど直線上に並ぶ。しかし一層ではあるが2次元の、すなわち平面上に細胞が配列し、しかも細胞間連絡の程度が必ずしも上記昆虫の例ほど高くない場合は縦軸を対数目盛にとっても hyperbolic cosine function 目盛にとっても直線上には並んでこない。しかし図4をみると距離による電位の

図5 小腸粘膜上皮細胞において、一定の通電量に対する通電点より一連に隣接する細胞からの取得電位の4例。左aは通電点より遠位の細胞になるに伴い取得電位が急速に減少した2例。右bはより遠位の細胞からの取得電位が大きかった2例。縦軸および横軸の目盛は図4と同様に表示してある。

減少は、イモリの胃に関するかぎり直線的でこそないがほぼ一定の規則性ある減少の仕方をしているようにみえる。おそらく各細胞間の低抵抗結合（細胞間連絡）の程度が比較的一定で、しかも一層にほぼ同じ大きさの細胞が並んでいるためこのような電位減少曲線を示しているものと思われる。

図5は小腸粘膜上皮細胞より得た結果を上述の胃粘膜の場合と同様に図示したものである。図5aは通電点より遠位になるに従い 5×10^{-8} Amp 通電量に対する取得電位が急速に減少した2例を示す。0細胞からはそれぞれ 172.9 mV と 154.3 mV, それに隣接する1細胞からは 8.7 mV と 10.5 mV を測定した。細胞の大きさは短径 20μ , 長径 30μ であるから、通電点より4細胞の $80 \sim 120\mu$ の遠位からは 0.13 mV, 0.19 mV の電位変化を記録した。

一方、通電点より遠位にある細胞よりの取得電

位がこれより1つ近位に位置する細胞からの取得電位より大きい場合がしばしば観察された。例えば図5bの白丸実線（—○—）で示す例では、2細胞よりの電位変化は 29.5 mV, 1細胞からは 15.0 mV とほぼ2倍も大きい。この場合1細胞の静止膜電位は充分に保たれており（-38 mV）、従って記録電極を刺入する際1細胞に生じた細胞膜の損傷による電流の漏洩によって低い値の電位変化を測定した結果とは思われない。また通電点より記録電極を遠ざけても、逆に遠位より順次近づけても上述のような例はしばしば観察された。イモリ小腸粘膜上皮では、すでに述べたように、凸部においては同じ上皮細胞でも吸収を主とした機能とする細胞の間に杯細胞、Paneth 細胞等の分泌機能を持つ細胞が散在している。生体標本ではこれら細胞の区別は困難である。一見同様の粘膜上皮細胞でも、異なる機能を持つ細胞の故か、接面膜の抵抗に著明な差異のある細胞に通電・記録電極が刺入されたため上記のような結果を生じたものと考えられる。例えば図5bの白丸実線の例で0細胞と1細胞間の接面膜の抵抗が比較的高く、1細胞に十分多量の電流は流入しないが、粘膜上皮細胞は2次元的拡がりを持つため、0細胞より非常に低い抵抗で結合する細胞内を通して2細胞へ流入する。しかも2細胞と3細胞との間の結合が比較的高抵抗であるような場合十分起りうる測定結果である。

3. 個々の細胞間の結合比

結合比の本来の主旨からいっても、互に平面上に隣接して並ぶ粘膜上皮細胞の結合比を直接に測定することが望ましい。

まず任意にある細胞を選び、それに隣接する細胞との結合比をできるだけ多く測定してみた。任意に細胞を選択する場合、どうしても電極を刺入し易い大型の細胞を選ぶ傾向が出てくる。そこで電極を顕微鏡下視野の中央で、平面に並ぶ粘膜細胞上の細胞外液中におき、先ず標本を適当に動かして止め、顕微鏡で観察しながらそのまま通電電極をマニプレーターで進行させ、刺入した細胞を通電細胞とする。それに隣接する細胞に記録電極

図6 胃および小腸粘膜上皮細胞の結合比の分布を示すヒストグラム。図のAは胃、Bは小腸における結合比の分布を示す。縦軸(N)は測定例数、横軸は結合比を0.2間隔で表示してある。

を刺入、次いで通電細胞にも刺入してそれぞれの細胞で得た電位から結合比を測定した。しかしそれでもとにかく大型細胞に刺入し易い傾向が残ったことは否定できない。このようにして得た結合比の分布を図6 (A: 胃、B: 小腸) に表わした。胃では (図6 A) 測定例数50の結合比は平均 0.53 ± 0.02 (S.E.), 最低0.32~最高0.77の幅を持つ正規分布を示し、比較的值が一定している。一方小腸では (図6 B), 平均 0.18 ± 0.33 (S.E.), 最低0.04~最高0.69と偏差が大きい。云かえれば、胃粘膜上皮細胞では細胞相互間の機能的結合の程度はほぼ等しく、小腸では著しい差異がある。特に小腸では低抵抗に結合していない細胞の存在が見立つ。

図7 胃および小腸粘膜上皮細胞の配列と結合比を示す模式図。Aは胃、Bは小腸の上皮細胞の配列を示し、図中の数値は模式図中央の細胞(A、B)と周辺の細胞(a、b、c、d、e、f)との結合比を示している。

次にある1つの細胞に着目し、1平面上でその細胞に隣接している全周囲の細胞との間の結合比を測定した。これはひとつには大型細胞のみ選択する可能性を避けるためもあるが、ある細胞が周囲に隣接する細胞と如何なる結合状態で細胞間連絡を保っているかを確める最良の方法でもある。胃および小腸のヒダ凸部の粘膜上皮細胞は粘膜上面より見て互に六角形に近く配列している。図7 Aは胃、Bは小腸における上皮細胞の配列を模式的に示し、通電細胞AおよびBとその周辺に隣接する6個の細胞との結合比の1例ずつを示したものである。胃の場合 (図7 A) の結合比は0.52~0.59とほとんど等しいが一方小腸 (図7 B) では0.09~0.53と結合比に1桁の偏差があった。胃および小腸では細胞間連絡の程度に著明な差があることは明らかである。

考 察

電気生理学的に簡単に検出でき、かつ低温による生体膜 (細胞膜) の変化として先ず考えられるのは静止膜電位である。静止膜電位が膜の両側の電解質の不等分布に基づくことは Hodgkin 等^{1,2)} の活動電位を発生させる興奮性膜の研究で明らかにされている。すなわち膜の両側の電位差 V は

$$V = \frac{RT}{F} \log_e \left\{ \frac{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o}{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i} \right\}$$

で表わされる。ここで R : 気体常数で $1.98719 \pm 0.00013 \text{ cal/}^\circ\text{C} \cdot \text{mole}$, F : ファラデー常数 $23.06 \pm 0.002 \text{ Cal/abs} \cdot \text{coul/g 当量}$, T : 絶対温度, $[K]_i$,

[K]。はそれぞれ細胞内、細胞外のKイオン濃度、以下 Na, Cl についても同様、 P_K : K イオンの透過常数、以下 P_{Na} , P_{Cl} はそれぞれ Na イオン、Cl イオンの透過常数である。

一般に伝導性活動電位を発生する興奮性膜では静止時 P_{Na} に対して P_K が 25 倍程度大きい。すなわち細胞内へ Na イオンが細胞膜を透過して侵入できず、従ってKイオンのみが細胞質内の蛋白質の陰イオンに引き入れられ、細胞膜の内側でKイオンの濃度が高く、外側では Na イオンの濃度が高い。伝導性活動電位を発生しない上皮細胞のような非興奮性細胞では P_K が P_{Na} より数倍程度大であるにとどまり、一般に興奮性膜より静止膜電位の値が小さい⁸⁾。

室温25°C で測定された静止膜電位 -46.2mV は

$$46.2 \pm 6.7 = \frac{1.987 \times (273 + 25)}{23.06} \times 2.30 \log_e \left\{ \frac{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o}{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i} \right\}$$

$$= (273 + 25) \times 0.1982 \log_e \left\{ \frac{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o}{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i} \right\}$$

と表わされる。故に

$$\log_e \left\{ \frac{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o}{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i} \right\} = 0.7823$$

となる。従って 5°C では

$$0.1982 \times (273 + 5) \times 0.7823 = 43.1 \pm 6.3\text{mV}$$

と約 3mV 脱分極することになる。しかし実際 5°C に胃粘膜上皮細胞を30分間保っての測定では $-48.1 \pm 9.2(\text{S.D.})\text{mV}$ とむしろ過分極方向に変化した値を得た。これを前記と同様の計算方法で 25°C に保った場合期待される理論値は $51.6 \pm 9.7(\text{S.D.})\text{mV}$ である。このことは実測値に変化を与える要因として温度以外の他のより大きな影響を考慮しないわけにはいかない。

電極1本を短時間に細胞内に刺入して測定すれば静止膜電位の記録は 25°C でも可能である。しかし静止膜電位の測定でも、筋板層の平滑筋の律動的収縮による標本の動きや、粘液分泌による1個1個の細胞の確認の困難さにより、電極を刺入

する時生じた膜のより大きい傷害によって電流漏洩が増大する可能性は否定できない。興奮性膜では静止膜電位を測定した細胞膜が、もし十分活動電位を発生することができれば、電極刺入時の膜の傷害による電流漏洩で大きく脱分極していないことを証明できる。すなわち電極刺入時に大きく細胞膜を損傷することなく静止膜電位を測定したと云える。しかし上皮細胞のような非興奮性膜は活動電位をもともと発生しないので、測定した静止膜電位が果して本当に殆んど細胞膜に傷害を与えず測定されたものかいつも不安が残る。従って値の大きい静止膜電位ほど細胞膜に与えた傷害が少なく、生体の本来の状態に近いということもできる。それ故、ここでは 5°C の時測定された静止膜電位 $-48.1 \pm 9.2(\text{S.D.})\text{mV}$ が一番信頼のおける測定値であると言えよう。

細胞膜の特定イオンに対する選択的透過性、また一度細胞内部に入った Na を外に押し出す能動輸送力は膜の代謝に密接な関係があることはよく知られている¹⁵⁾。細胞膜の顕微鏡下、また時に電子顕微鏡下における形態に大した変化がなくとも代謝阻害剤等で静止膜電位が著しく脱分極すなわち電位が消失してくることも知られている。5°C の低温で2時間程度まで静止膜電位が減少するのは、組織を体外に切り出したことによる酸素不足の他、低温による代謝の低下が影響してくることが十分考えられる。

静止膜電位に対して実効膜抵抗は低温30分後の $533\text{K}\Omega$ から 2.5時間後の $547\text{K}\Omega$ とむしろ僅かではあるが上昇している。測定誤差を考えると殆んど変化していないと云った方がよいかもしれない。

結合比は 5°C の低温30分後の 0.57 から 2.5時間後 0.53 と僅かであるが減少している。もし細胞膜の単位面積当りの抵抗が変化していないと仮定すれば、結合比の減少は細胞表面膜面積の減少と同様な測定上の効果を来す。従って細胞膜そのものに殆んど著変がないとすれば、結合比の減少傾向は実効膜抵抗の上昇傾向を示すことになる。実測値を説明するに甚だ都合がよい。低温2時間

程度で静止膜電位が最も変動することに対しては、イモリの消化管粘膜上皮細胞は低温度に対し静止膜電位が最も敏感であるという以外満足すべき説明ができない。

ユスリカの唾液腺¹⁰⁾ およびマウスの肝細胞⁴⁾ では低温処理の場合、結合比に先ず変化が出現し、次いで膜抵抗が変化し、静止膜電位が最も遅れて影響をうける。恒温高等動物の細胞膜が酸素不足や低温に比較的敏感なことは理解できる。昆虫も動物自体は比較的溫度に敏感で、例えばユスリカは5℃では生息し得ない。しかしイモリは5℃程度では運動等の活動性は著しく低下するが、溫度が上ってくれば再び活動を開始できるように、低温下でも十分生息できること等から粘膜細胞自体は比較的低温に変化せず耐えられると考えることもできよう。2.5時間以後5時間程度まで静止膜電位が変化しないのは、冬眠状態で安定すれば細胞膜も低温ながらやや安定した状態を保ちうる可能性もある。

神経細胞の、特に神経線維の部分は細胞膜が特殊である。すなわち興奮して活動電位を発生するのみならず、その形はきわめて一般の細胞と異なり、円柱状であるが直径に対して高さが極端に長い。今、神経線維中のある一点に微小電極を刺入して通電すると、細胞質の電気的抵抗はほぼ一定でしかも比較的低いので、電流は通電点より立体的に四方八方へ流れる。円柱の長軸に対する横断方向、すなわち神経線維の長軸に対する横断方向に流れた電流は直ちに抵抗の高い細胞膜に遮られることになり、従って大部分の電流は長軸方向の比較的抵抗の低い細胞質中を流れることになる。しかし細胞質の抵抗は低いといっても0ではなく(実際には50~100 Ωcm)、距離に応じて抵抗は増大し、一部の電流は抵抗の高い細胞膜を横切ることになり、そこでは細胞内外に電位差を生じる。従って細胞質の抵抗が低いほど、また細胞膜の抵抗が高いほど(あるいは両者の比が大きいほど)電流は通電点より遠い位置まで流れることになり、遠い位置に刺入した記録用電極で電位を検出できる。検出される電位は勿論通電点に近いほど

大きく、通電点より遠ざかるにつれて減少するが、神経線維の如く細胞質の抵抗が一樣に低く、細胞膜の抵抗が高い場合、しかも形が細長い円柱状の場合には、通電点より距離による電位の減少は甚だ規則的である。グラフ上縦軸に電位を対数に、横軸に通電点からの距離をとると、完全な直線状になり、指数函数曲線となる。これは cable theory により数学的にも見事に解決されている^{11,16)}。これを最初に公式化したのは Rushton¹¹⁾ で、通電電極から距離 x なる点の細胞内外の電位差 V_x は

$$V_x = V_0 e^{-x/\lambda}$$

で与えられる。 V_0 は通電電極刺入点すなわち通電位置の細胞内外の電位差であり、 λ は

$$\lambda = \left(\frac{r_m}{r_e + r_i} \right)^{1/2}$$

で与えられる常数である。ここで r_m は膜の単位面積当りの抵抗、 r_e , r_i は外液と細胞質の単位長さ当りの抵抗である。細胞外をとりかこむ塩類溶液は、細胞質の量に比しはるかに大量なので $r_e \ll r_i$ であるから、およそ

$$\lambda = \left(\frac{r_m}{r_i} \right)^{1/2}$$

となり、 λ は前述の細胞膜の抵抗と細胞質の抵抗の比の平方根に一致することになる。 λ を長さ常数(space constant)と称し、細胞の電気的性質を表現する一つの指標となっている。 λ が大きいことは、細胞質の抵抗に比べ細胞膜の抵抗が大きく、電気緊張電位は遠くまで到達することができる。

ショウジョウバエの唾液腺は、腺自体200余りの細胞からなるが、組織全体として円柱状であり、直径に対して円柱長軸は神経線維ほど長くない。しかし細胞間の接触部の抵抗は細胞質そのものと同様に低く、かつ唾液腺の外側で円柱状の表面を構成している部分の細胞膜(細胞表面膜・surface membrane)は十分抵抗が高いので、ある点で唾液腺細胞内に通電すると、電位の分布はおおよそ指数函数的に減少する。円柱の直径に対し長軸が神経線維のように長くないので、通電点を唾液腺の一端におかないと解析が困難である。この

場合 hyperbolic cosine function の式を用いた理論値と実験値が甚だよく一致する⁵⁾。神経細胞の如く、1 個の細胞の事象でなく、細胞がいくつか集った組織でもこのような取扱いが成り立つ。これは細胞表面膜の抵抗、細胞質の抵抗に加えて細胞接面膜の性質を加えた 1 組織としての性質を表わす 1 つの重要な電気的指標である。

イモリ胃の粘膜上皮細胞群では、細胞間接触部の抵抗は十分低いが、細胞の配列が 2 次的に平面上に並び、上述の 2 つの組織とかなり異なる。この 2 次的に平面上に並ぶ細胞に対しても長さの常数 λ を求める解析がいくつか試みられている。Shiba^{12,13,14)} らによれば、平面上に低抵抗結合で並ぶ細胞をもつ組織では

$$\lambda = (\Delta R_m / 2\rho)^{1/2}$$

で表わされるという。ここで R_m は細胞表面膜の単位面積当りの抵抗、 Δ は組織の層の厚さ（一層に並ぶ細胞の配列の場合は 1 個の細胞の高さにあたる）。 ρ は細胞質の抵抗と細胞接面膜の抵抗を加えたものである。これは Heaviside の Bessel 函数を用いて解を求めたものであるが、通電点より任意の位置の電位は

$$V(X, \infty) = (\rho / 2\pi\Delta) K_0(X)$$

$$X = r / (\Delta R_m / 2\rho)^{1/2}$$

で与えられる。 r は通電点からの距離を示すが、通電点よりどの方向にとってもよいので、放射状の距離である。この式による理論値と実測値はかなりよく一致する¹³⁾。理論計算値と実測値が一致することは、細胞同士の接合部の抵抗が比較的低く、しかもほぼ一定していることである。云いかえれば胃の粘膜上皮の細胞間の結合様式は低抵抗でしかも一様であることを意味している。このように一様な細胞間連絡にどのような膜構造が対応しているか興味ある問題である。

胃の粘膜上皮に反し、小腸粘膜上皮の細胞間連絡の程度は細胞によりかなり異っている。生きた状態で摘出した細胞を粘膜面から顕微鏡で観察しただけでも、胃のように一様な大きさの細胞が並んで見えるのではなく、所々に小さい細胞がはさまれている。これは管腔側にみえる部分だけが小

さく見えて、下の方は太く広がっている徳利型であるのか、また管腔側で見える部分がそのまま下で円柱状に連なっているのか、云いかえれば細長い細胞であるのか形だけでも明らかでない。いわずやという働きをする細胞であるかその機能は全くわからない。電気的測定では、このような細胞も全部同一集団として取扱われることになる。

固定染色標本では、胃粘膜と異なり、小腸粘膜上皮細胞間にはかなり高頻度に明るい細胞がみえ、形も徳利型で下方が太く上方が細い。これは杯細胞と思われ、その他にも Paneth 細胞と思われるものが存在し、少なくとも 3 種の細胞を簡単に区別できる。3 種の異なる細胞同士の結合状態が全く同じであることは、むしろ不自然であるように考えられ、小腸における膜の微細構造が如何なる形のものか興味深い。何れにしても胃と小腸の粘膜上皮細胞間の接合部が電気生理学的にかなり異なることから、今後、機能的結合様式と微細構造との関連を考慮しながら精査することは、微細構造と機能の問題を一步近ずけることになりそうである。

要 約

イモリ (*Triturus pyrrhogaster*) の胃および小腸粘膜上皮細胞について、顕微鏡強拡大下で細胞の 1 個 1 個を確認した。通電電極および電位記録電極を同一あるいは隣接する細胞にそれぞれ刺入し、電子管装置による矩形波直流電流により細胞膜の電気抵抗を測定する方法で、細胞間連絡を中心に膜の電気的性質を詳細に調べた。

1. イモリ 消化器系粘膜上皮の細胞は、室温 25°C に比し 5°C 程度の低温下、1.5 時間以内では電気的性質にあまり大きな変化を示さなかった。

2. 通電量を 5×10^{-8} Amp として細胞内通電を行い、通電点より順次遠位に隣接する細胞からの膜抵抗に基づく電位変化を測定した。胃粘膜では、一層の粘膜上皮細胞間を電流の 2 次的に一樣な拡がりが見られ、電位変化は Bessel 函数の理論値に一致する緩やかな減少を示した。胃上皮

細胞相互の結合比は最低0.32, 最高0.77, 平均 0.53 ± 0.02 (S.E.) の正規分布を示す。

3. 小腸粘膜上皮では, 通電点より順次遠位よりの取得電位が急速に減少する場合と, 遠位の細胞からの取得電位がそれより1つ近位の細胞からの取得電位より大きい場合が測定された。結合比は最低0.04, 最高0.69, 平均 0.18 ± 0.03 (S.E.) とその偏差は著しい。

通電細胞と周辺に隣接する細胞との結合比も胃では一様であるが, 小腸では結合の程度の差が著しい。胃と小腸とでは粘膜上皮細胞相互間の機能的結合状態に大きな相違がある。微細膜構造を膜の機能的研究所との関連において捉えることの重要性を示唆した。

本実験は当教室の野村蟻助手, 渡辺清研究生, 柴芳樹副手の協力を得た。また本論文の作成および実験動物の飼育にあたっては河野ユキエ嬢, 須山忠治君の助力に感謝する。実験動物の採集に便宜を与えられた本学理学部両生類研究施設西岡みどり講師に謝意を表する。

なお本研究の成果は文部省科学研究費昭42-71010, 昭45-8860に負うところが大きい。感謝する。

本研究の一部は日本動物学会第41回大会において口演した。

文 献

- 1) HODGKIN, A. L. and KATZ, B.: The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.*, **108**: 37-77, 1949.
- 2) HODGKIN, A. L. and KATZ, B.: The effect of temperature on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.*, **109**: 240-249, 1949.
- 3) 菅野義信, 森田之大, 渡辺清, 野村蟻: 口腔消化器系上皮細胞の細胞接合様式に関する微細構造. 広大歯誌, **3**: 印刷中, 1971.
- 4) 菅野義信, 森田之大, 松井洋一郎: 消化器系上皮細胞の細胞間機能的結合に及ぼす影響・切出し標本での研究. 広大歯誌, **3**: 印刷中, 1972.
- 5) LOEWENSTEIN, W. R. and KANNO, Y.: Studies on an epithelial (gland) cell junction. I. Modifications of surface membrane permeability. *J. Cell Biol.*, **22**: 565-586, 1964.
- 6) LOEWENSTEIN, W. R., SOCOLAR, S. J., HIGASHINO, S., KANNO, Y. and DAVIDSON, N.: Intercellular communication: Renal, urinary bladder, sensory, and salivary gland cells. *Science*, **149**: 295-298, 1965.
- 7) LOEWENSTEIN, W. R.: Permeability of membrane junction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **137**: 441-472, 1966.
- 8) 松井洋一郎: 消化器系臓器の肝に由来する実験腫瘍細胞 MH134 腹水型の静止膜電位の成因に関する研究. 広大歯誌, **1**: 121-129, 1969.
- 9) 森田之大, 松井洋一郎, 菅野義信: 消化器系粘膜上皮の生理学的研究. 歯基礎誌, **9**: 87-95, 1968.
- 10) POLITOFF, A. L., SOCOLAR, S. J. and LOEWENSTEIN, W. R.: Permeability of a cell membrane junction. Dependence on energy metabolism. *J. Gen. Physiol.*, **53**: 498-515, 1969.
- 11) RUSHTON, W. A. H.: A physical analysis of the relation between threshold and inter-polar length in the electric excitation of medullated nerve. *J. Physiol.*, **82**: 332-352, 1934.
- 12) SHIBA, H.: An electrical model for flat simple epithelial cells with low resistive junctional membrane. A mathematical supplement. *Jap. J. Applied Physics*, **9**: 1405-1409, 1970.
- 13) SHIBA, H.: Heaviside's "Bessel Cable" as an electric model for flat simple epithelial cells with low resistive junctional membranes. *J. theor. Biol.*, **30**: 59-68, 1971.
- 14) SHIBA, H. and KANNO, Y.: Further study of the two-dimensional cable theory: An electric model for a flat thin association of cells with a directional intercellular communication. *Biophysik*, **7**: 295-301, 1971.
- 15) 竹中敏文: 神経・筋細胞の能動輸送. 能動輸送 (井上章・品川嘉也編), 185-203頁, 南江堂, 東京・京都, 1969.
- 16) TAYLOR, R. E.: Cable Theory. *Physical Techniques in Biological Research VI* (edited by Nastuk, W. L.), pp. 219-262, Academic Press, New York and London, 1963.