単一植物細胞の電気的特性に関する研究 I

インピーダンスの測定及びその新しい解析方法について*

岸 本 卯 一 郎**

Uichirô KISHIMOTO: Studies on Electric Properties of a Single Plant Cell I
A New Method of Analysis in Impedance Measurements

1954 年 8 月 27 日受付

細胞の電気抵抗とその生理的活動との間には密接な関係のあることが知られているが、その測定と解析の方法或は具体的な意義に関してはなほ多くの問題が残されている。筆者は車軸藻類の節間細胞を材料として、原形質膜及び細胞液の電気抵抗の変化を各々同時に且つ独立に計算しうる方法を見出したので、まず本報でその測定と解析法の概略を記し、各種の条件下でこれらの値がそれぞれいかに変化するかを続報に於てのべようと思ふ。

材 料

実験にはもつばらヒメフラスモ(*Nitella flexilis*)の節間細胞を用いた***。この細胞は直径 4~5 mm, 長さは 3~5 cm が普通であるが時には 10 cm 以上のものもある。このことはその電気的特性を研究する上に技術的に甚だ都合であり、既に 1920 年頃より Osterhout, Blinks, Umrath, Auger, Cole, Curtis 等の人々によつて数多くの電気生理学的な研究がなされている。

この細胞の容積の大部分は液胞で占められ、細胞膜と液胞との間には厚さ約 10μ の比較的薄い原形質の層がある。この原形質層の内外は液胞膜と原形質膜によつてそれぞれ液胞と外液に接している。これらの内外の膜は原形質自身に比して高い電気抵抗と高い電気容量をもち、選択的透過性の膜と考えられている。こゝでは便宜上、原形質

膜、原形質層、液胞膜の抵抗を一つにして“原形質膜”の抵抗と呼ぶことにする。原形質膜の直流抵抗は空気中或は温室中での測定によると、 $250\text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ (Blinks, 1930), 容量は約 $1.0\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Blinks, 1930; Cole & Curtis, 1937) であり、細膜液の比抵抗は約 $60\Omega\cdot\text{cm}$, 原形質膜自身のインピーダンスの位相角は約 80° (Cole & Curtis 1937) である。これらの抵抗値は外液の組成、濃度によつて変化するが、位相角は殆んど一定である。

装 置

測定には Fig. 1 に示すようなパラフィン製の容器を用いた。これらの容器は 2 つ又は 3 つのプールに分れ、各プール間の隔壁には巾 1 mm, 深さ 4 mm の溝が設けられている。この間に細胞を入れ、溝の

部分をワセリンで封ずる。この操作によつて細胞は 2 つ又は 3 つに仕切られる。各プールには普通 10^{-2} M KCl の水溶液を入れるが、溝に沿つての電気的な leakage を出来るだけ少くするために、ワセリ

Fig. 1a

Fig. 1b

Fig. 1a, 1b. Vessels for measuring impedance change of an internodal cell of *Nitella*.

* 昭和 29 年度文部省科学研究助成補助金の援助による。

** 大阪大学理学部生物学教室

*** この材料は京都大学植物学教室の好意により附属植物園より提供されたものである。

ンで封ずるとき予め細胞の表面の水分を濾紙で軽く拭い去る。2つのプールをもつ容器は、細胞全体が特定の条件で一様に処理を受けた際の影響を見るに用いるもので、各プールには白金黒付けをした白金電極が設けられている。3つのプールをもつ容器では、隣り合った2つのプールに白金電極が設けられている、この容器は細胞が局部的に処理された際の影響を調べるに用いる。外液を交換するとき、電極のある2つのプールは常に同一の溶液によつて充され、これらの2つのプール間には電位差の発生が起らないようにする。実験に用いるフラスコの節間細胞は、隣りの細胞から切り離して実験に供する迄、少くとも3~4時間 10^{-2} M KCl 水溶液中に保つておく。

このような形式で測定する場合まず考慮すべきことは、細胞膜或は原形質層に沿つての leakage の問題である。実際に細胞を切つて細胞液と原形質を除いた細胞膜のみの抵抗の実測値は、単位長さ当り $2\sim 3$ M Ω 或はそれ以上あつた。この場合溝の中以外は 10^{-2} M KCl 水溶液に接している。Cole と Curtis (1937) によれば、この細胞のセルロース膜の比抵抗は $1000 \Omega \cdot \text{cm}$ であり、しかもこの値は外液の電気伝導度の大きい変化に対して余り変化しない。この値を実際の抵抗値に換算すると、単位長さで $8 \times 10^6 \Omega$ 程度となる。之等の値は水道水での測定値であるが、外液が 10^{-2} M KCl 水溶液の場合と比して実際余り大きくは変つていない。原形質自体の比抵抗については余り信頼するに足る実測値はないが、細胞液と比べると大きく、少くとも $300 \Omega \cdot \text{cm}$ 以上はあると考えられる (Gelfan, 1928)。原形質層の厚さを 10μ として、単位長さの抵抗値に換算すると $2 \times 10^6 \Omega$ となる。後述のようにインピーダンスの実測値は $Z_R = 5 \times 10^4 \Omega$ であるから、結局細胞膜及び原形質層に沿

つての電氣的な leakage は無視してよいことが判る。

外液として 10^{-2} M KCl 水溶液を用いた理由の一つは、この濃度では外液の抵抗が 300Ω 程度であるから、たとえ外液と細胞間に多少のイオンの出入があつても、それ起因する外液の抵抗の変動は $Z_R = 5 \times 10^4 \Omega$ に比して充分無視できるためである。第二にこの濃度では、細胞内外の電位差が殆んど零であるから (Osterhout, 1935)、外部条件の変化によつて発生する恐れのある電位差の変動 (活動電流など) がインピーダンス測定 of 誤差になることを避けるためである。

インピーダンスの測定は Fig. 2 に示すような Wheatstone bridge 法によつた。bridge の一边に容器をおき、対称辺は並列の抵抗 (R_p) と容量 (C_p) とし、これらを調節して bridge の出力を零ならしめ、それらの値より細胞のインピーダンス

Fig. 2. Diagram of the circuit for impedance measurements.

Fig. 3. Distribution of electric line of force through a *Nitella* cell (Diagrammatic representation).

スを計算する。周波数は 1000 c/s のみを用い、その出力は 10 mV 以下にする。この程度の電圧では細胞にはなんら影響を与えない。bridge の出力は四段増巾して陰極線オシロスコープの垂直軸に入れ、そのフレが零になったときを bridge の平衡とする。このような方法では、装置自体の精度を 1% 以下の誤差に保つことが容易であるから、先にのべたような容器内で生ずると思われる誤差も含めて、全体として 2~3% の誤差内で測定が出来る。

解析の方法

上述の容器でこの細胞のインピーダンスを測定する場合、電力線は模式的に描けば Fig. 3 に示すような分布をしていると考えられる。従つてその等価回路は Fig. 4 に示すような形で表現でき

Fig. 4. Equivalent circuit for an internodal cell of *Nitella*.

$$Z = Z_R - jZ_X \quad (1)$$

$$Z_R = r \left[1 - \frac{r(r+r_3)\omega^2 c_3^2}{1 + \omega^2 c_3^2 (r+r_3)^2} \right] + r' \left[1 - \frac{r'(r'+r_3')\omega^2 c_3'^2}{1 + \omega^2 c_3'^2 (r'+r_3')^2} \right] + r_2 + p + p' \quad (2)$$

$$Z_X = \frac{r(r\omega c_3)}{1 + \omega^2 c_3^2 (r+r_3)^2} + \frac{r'(r'\omega c_3')}{1 + \omega^2 c_3'^2 (r'+r_3')^2} \quad (3)$$

こゝに ω は周波数に 2π を掛けたものである。bridge が平衡したときの R_b , C_b より計算した値はそれぞれ次のようになる。

$$Z_R = \frac{R_b}{1 + \omega^2 C_b^2 R_b^2} \quad (4)$$

$$Z_X = \frac{R_b(\omega C_b R_b)}{1 + \omega^2 C_b^2 R_b^2} \quad (5)$$

前にのべたように、 p , p' は他の項に比して無視できるので、この項は除いて考える。周波数一定で測定した場合の (2), (3) 式の変化の様子を調べると、 r が非常に大きくなつたとき、つまり原形質膜が殆んどイオンを透過しなくなつたときに最大値をとる。即ち

$$(Z_R)_{r \rightarrow \infty} = r_3 + r_3' + r_2$$

る。実際にプールに浸っている部分の細胞の長さ、従つてその表面積が各プールで異なっている場合には、それぞれの比抵抗は等しくても実際の抵抗値は各プールで違つてくるために、これらを (') を附して区別する。プール内の外液の抵抗を p , p' 、細胞液の抵抗を r_2 で表わす。次に原形質膜のインピーダンスを、周波数によつて変化しない部分と変化する部分とに分けて考える。この周波数によつて変化しない部分は直流抵抗 r , r' で、この逆数は原形質膜のイオン透過率に比例する量である。周波数によつて変化する部分は直列の抵抗 r_3 , r_3' と、直列の容量 c_3 , c_3' で示されている。これらの量は原形質膜の分子構造に関するもので、イオンの透過性に直接結びついている r , r' とは切り離して考えるべきものである。この r_3 , c_3 の値は周波数が増すと減少し (Fricke, H., 1932), 例えば 1000 c/s では r_3 は数百オームとなる。しかし周波数以外の条件の変化に対しては殆んど変らないと考えられている。このような等価回路の全体のインピーダンス (Z) は次のように計算される。

$$(Z_X)_{r \rightarrow \infty} = \frac{1}{\omega c_3} + \frac{1}{\omega c_3'}$$

之に対して r が非常に小さくなつたとき、つまり原形質膜がイオンを自由に透過するようになったときには最小値をとる。即ち

$$(Z_R)_{r \rightarrow 0} = r_2$$

$$(Z_X)_{r \rightarrow 0} = 0$$

Z_R , Z_X なる函数は r に関しては単調に変化する函数であるから、途中に極値はない。つまり実測値は常にこれらの上限、下限の中間の値をとるわけである。 Z_R の実測値は後述のように $5 \times 10^4 \Omega$ 程度であり、 r_3 , r_3' は先にのべたように数百オームであるから、近似的に $Z_R \doteq r_2$ としても

Fig. 5. Changes in impedance ($Z = Z_R - jZ_X$) of an internodal cell of *Nitella* in 10^{-2} M KCl solution. Measurements were done at the frequency of 1000 c/s.

よいことが判る。細胞液柱の直径を 0.4 mm として、この値より細胞液の比抵抗を計算すると $60 \Omega \cdot \text{cm}$ となり、Cole, Curtis の得た $58 \Omega \cdot \text{cm} \pm 8\%$ と非常によく一致している。従つて (4) 式によつて Z_R を計算すれば之は近似的に細胞液の電気抵抗を表しており、又 Z_R の変化を追跡すると次式によつて細胞液の抵抗の変化率が計算される。

$$\frac{\Delta r_2}{r_2} = \frac{\Delta Z_R}{Z_R} \quad (6)$$

次に原形質膜のインピーダンスの位相角が 80° ということから

$$(\omega c_3 r_3)^2 = \left(\frac{1}{\tan 80^\circ} \right)^2 \ll 1 \quad (7)$$

であることが判る。この関係を用いると (3) 式より次の式を導くことが出来る。

$$\frac{\Delta r}{r} = \frac{1}{2 - \omega c_3 Z_X} \cdot \frac{\Delta Z_X}{Z_X} \quad (8)$$

この式は Z_X がその上限 $\frac{2}{\omega c_3}$ に非常に近いとき以外には成立する。従つて Z_X を測定すればこの式によつて原形質膜の抵抗の変化を計算することが出来る。 c_3 についてはこの実験からは直

接には知ることは出来ないが、 Z_X の実測値よりみて (上限 $2/\omega c_3$ を後述の結果より 25000Ω 以上として) $0.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (或は之より幾分低いかも知れない) と見積ることが出来る。この値は Blinks, Cole & Curtis の $1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ に比して小さいが、本実験では 1000 c/s で実験していること、又電力線が全体として必ずしも原形質層を細胞の面に対して垂直に通つていないことのために小さくなつてゐるものと考えられる。原形質膜の電気抵抗が非常に大きくなつたとき、 Z_X は漸次上限に近づくが、(8) 式を見れば原形質膜の抵抗の変化に比べて Z_X は非常に緩やかに変化することが判る。逆に原形質膜の抵抗が非常に小さくなれば、(8) 式に於る $\Delta Z_X/Z_X$ の係数は $1/2$ となり、 Z_X の変化率の半分が原形質膜の抵抗の変化率を表すことが

判る。本実験のように普通 Z_X が 8000Ω 程度であれば、(8) 式は近似的に次のように書ける。

$$\frac{\Delta r}{r} = 0.74 \frac{\Delta Z_X}{Z_X}$$

結局上記のような方法でインピーダンスを測定すると、その実数部分 (Z_R) の変化は細胞液の電気抵抗の変化を示しており、虚数部分 (Z_X) の変化より原形質膜の電気抵抗の変化が計算できることになる。

温度係数の測定

Fig. 1 に示した容器にフラスコの節間細胞を入れ、外液には 10^{-2} M KCl を用いた。この容器を定温器に入れ、温度の昇降を慎重に行い、容器自身の熱容量による誤差が起らないように、測定は定常状態に達するのを待つて行つた。結果は Fig. 5 に示すように、 $11 \sim 32^\circ\text{C}$ の範囲内では Z_R, Z_X 共に温度の上昇に対して直線的に減少している。原形質膜の抵抗の逆数はイオンの透過率に比例し、細胞液の抵抗の逆数は細胞液内のイオンの電気伝導度に比例するから、それぞれの温度係数を計算すると、何れも (Q_{10}) 20°C として約 1.2 となる。

これらの値は一般の化学反応の温度係数に比しては小さいが、イオンが原形質膜、原形質層或は細胞液内を通過するとき、これらの構成分子との間の静電的な力、van der Waals 力、或は水素結合の力等に打ち勝たなければならないために、理想的な稀薄溶液の場合の $(Q_{10})_{20^{\circ}\text{C}}=1.02$ よりは大い。細胞液の電気伝導度の Q_{10} が 1.2 であることはうなずけるが、原形質膜のイオン透過性の温度係数が 1.2 ということは注目すべき事実である。

考 察

細胞のインピーダンスを測定するとき、並列の抵抗 (R_p)、容量 (C_p) を調節して bridge を平衡させ、それらの値よりインピーダンスを計算することが出来るが従来原形質膜の抵抗と細胞液の抵抗とは厳密に分離できていなかったため、いろいろな矛盾が生じている場合が少なくない。例えばこの解析で明らかにされたように、並列の抵抗 (R_p) をもつて簡単に原形質膜の抵抗を示していると考えてはならない。こゝに述べた解析方法によつてはじめて、原形質膜と細胞液の抵抗をはつきりと分離して考察出来るわけである。しかし乍らこの方法は、どんな細胞に対してもこのまゝで適用できるとは限らない。つまり材料の幾何学的な条件の他に、この解析をするに当つて用いた条件、即ち原形質膜の固有インピーダンスの位相角が大きい $(\omega c_3 r_3)^2 \ll 1$ と見なしうること、細胞膜、原形質層に沿つての電気的な leakage が無

視できること等が充たされなければならない。この始めの条件は周波数を広範囲に変え、いわゆるインピーダンス軌跡を作ることによつて判定できるが、後の条件については実際の材料について実測しなければ判らない。これらの条件が充されないときには又別の解析方法をとらなければならない。

この細胞の原形質膜の比抵抗は、緒言にものべたように、外液として水道水を用いたとき $250 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ 或はそれ以上であるが、本実験のように 10^{-2} M KCl 水溶液としたときは非常に低くなり、 Z_X の測定値より見積つて $10^3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度であり、又原形質膜のイオン透過性の温度係数も低い。しかも細胞液中で K が $0.05 \sim 0.1 \text{ M}$ の高濃度に保持されているという事実は、細胞内では K が大部分解離恒数の小さい有機化合物を作っていること (bound form で存在していること) を暗示している。之に関連して材料は違うが、最近 Rosenberg (1950) は放射性の K^{42} , Na^{24} を用いて、人工海水中でのイカの巨大神経についてそれぞれのイオン透過性を調べ、 $(Q_{10})_{20^{\circ}\text{C}}$ として 1.33 及び 1.22 を得ている。又イオン交換の絶対量から Axoplasm 中の K の $1/10$ が容易に交換し、残りの大部分は結合状態にあり容易に交換し得ないと結論しているが、之は筆者の実験結果に支持を与えるものと考えられる。

この実験を行うに当つて、終始鞭撻と助言を戴いた、神谷宣郎教授に厚く御礼申し上げる。

Summary

In the present report a new method of analysis concerning the impedance of an internodal cell of *Nitella* is introduced. When we measure parallel resistance R_p and parallel capacity C_p with Wheatstone bridge method, the total impedance ($Z = Z_R - jZ_X$) of the cell can be calculated from the following two equations:

$$Z_R = \frac{R_p}{1 + \omega^2 C_p^2 R_p^2}; \quad Z_X = \frac{R_p(\omega C_p R_p)}{1 + \omega^2 C_p^2 R_p^2}$$

The resistance of cell sap (r_2) and that of protoplasmic membrane (r) are related to Z_R and Z_X by the two equations;

$$\frac{4r_2}{r} = \frac{4Z_R}{Z_X}; \quad \frac{4r}{r} = \frac{1}{2 - \omega c_3 Z_X} \cdot \frac{4Z_X}{Z_X}$$

Generally the coefficient of $4Z_X/Z_X$ in the second relation takes a value of 0.74 but

it become 0.5 when Z_X is very small and it will become very large when Z_X approaches the upper limit $2/\omega c_3$. With these equations we can follow the time course of changes in resistance under varied physiological conditions without subjecting the cell to any harmful effect.

The temperature coefficient (Q_{10} at 20°C) of ionic conductivity of cell sap and of ionic permeability of protoplasmic membrane are 1.2 respectively and specific resistance of protoplasmic membrane is about 10^3 to $10^4 \cdot \Omega \text{ cm}$. These values are very near to these of squid giant axon cell. Although the resistance of protoplasm is very large when tap water is used as the external medium, it decreases considerably when concentration of external KCl increases.

引用文献

1. Auger, D. Comparaison entre la rhythmicité des courant d'action cellulaires (Hermann & Cie, Editeurs, Paris 1935)
L'activité protoplasmique des cellules végétales (Hermann & Cie, Editeurs, Paris 1939)
2. Blinks, L. R. J. Gen. Physiol. 13: 495 (1930); 20: 229 (1936)
3. Bozler, E. & Cole, K. S. J. Cell & Comp. Physiol. 2: 229 (1935)
4. Brooks, S. C. J. Gen. Physiol. 7: 327 (1925)
5. Cole, K. S. J. Gen. Physiol. 15: 641 (1932)
6. —. Tabulae biol., Cell: 19 (2): 24 (1941)
7. Cole, K. S. & Baker, R. F. J. Gen. Physiol. 24: 771 (1941)
8. Cole, K. S. & Curtis, H. J. Cold Spring Harbor Symposia 4: 73 (1936)
9. —. & —. J. Gen. Physiol. 22: 37 (1938)
10. —. & —. J. Gen. Physiol. 23: 649 (1939)
11. —. & —. Medical Physics 2: (Chicago. Year Book Publisher) 82 (1950)
12. Curtis, H. J. & Cole, K. S. J. Gen. Physiol. 21: 189 (1937)
13. —. & —. J. Gen. Physiol. 22: 757 (1938)
14. Fricke, H. Phil. Mag. 7: 14, 310 (1932)
15. Gelfan, S. Protoplasma 4: 192 (1928)
16. Kamiya, N. & Kuroda, K. (in preparation)
17. Kamiya, N. & Tazawa, M. (in preparation)
18. Osterhout, W. J. V. J. Gen. Physiol. 18: 215 (1935)
19. Rothenberg, M. A. Biochimica et Biophysica Acta 4: 96 (1950)
20. Umrath, K. Protoplasma 36: 584 (1942)