微小膜透過性測定装置の開発

高 橋 裕 子・山 本 信 和・石 井 哲 夫

目 的

メニエール病の特徴的な側頭骨病理所見は内リンパ水腫である¹⁾。この変化が内・外リンパ液間の圧平衡の障害による内リンパ液の容積が増量し発生すると仮定すると、膜迷路のイオン交換の状況を観察する必要がある。生体膜の輸送様式は大別すると、受動輸送・能動輸送・蛋白質の膜透過・膜動輸送の4種に分類される²⁾ことが知られている。さらにこれを膜迷路に应用すると、ライスネル膜や球形囊膜では細胞間隙からのイオン輸送の可能性も考えられる。膜迷路内のイオン輸送動態の検討には生体の膜迷路内にマイクロベットを用いて直接薬剤を注入する方法が施行されている。この方法の有用性については種々の報告があるが³⁾⁴⁾、これでは肝心のイオン交換が膜迷路のどの部位で行われているのかを判定することは困難であろう。そのため我々は微小な膜の透過性を測定可能な装置を開発し、その有効性を検討した。

材料及び方法

膜迷路のイオン受動輸送を検討するために Ussing chamber⁵⁾を応用した micro chamber を製作した(高研, 1989)(図1)。膜接触面の直径を 1-10 mm の間に設定し, chamber 間に隔壁として人工膜を挿入した。膜は酢酸セルロース膜(厚さ 20 μm の人工透析膜の平膜)を用いた。膜をはさんだ各回路には, 生理食塩水と 5%

ブドウ糖液各 10 ml を使用し, 測定回路内の溶液濃度をより均一にするために, 回路の途中に容量 5 ml のタンクを設置した。各溶液は, 最小速度 1.0 ml/min から最

図1 製作した micro chamber

図2 膜の単純拡散の回路図

†Measurement of Passive Ion Transport in a Micro Chamber Unit
Yuko Takahashi, Nobukazu Yamamoto and Tetsuo Ishii
東京女子医科大学耳鼻咽喉科学教室

大速度 20 ml/min で循環するように定量ポンプを設置した。[回路を図2に示す。このタンクより溶液を採取し、ナトリウムイオン濃度の経時の変化を測定した。

実験1として、膜接触面が直径1 mm、循環速度 1.0 ml/min で chamber 間に人工膜を挿入しない状態での特性を検討した。実験2では、chamber の膜接触面の直径を 10 mm とし、間に酢酸セルロース膜を挿入し、循環速度を 2.5 ml/min, 5 ml/min, 10 ml/min, 20 ml/min と変化させた時の、各 chamber 内のナトリウムイオン濃度の経時の変化を測定した。実験3として、循環速度を 10 ml/min に固定し、膜接触面の直径を 10 mm, 9

図3 膜のない時のナトリウムイオン濃度の経時の変化。膜接触面の直径を 1 mm、循環速度 1 ml/min のとき約 8 時間で平衡に達した。

図4 酢酸セルロース膜を挿入し、chamber の膜接触面の直径を10 mm、循環速度 20 ml/min にした時のナトリウムイオン濃度の経時の変化。約 6 時間で平衡に達した。

mm, 7 mm, 5 mm と変化させ、chamber 間に酢酸セルロース膜を挿入した時のナトリウムイオン濃度の経時の変化を測定した。

結果

実験1の膜接触面の直径を 1 mm としたときの測定結果を図3に示す。膜のない状態では約 8 時間で拡散濃

図5 酢酸セルロース膜を挿入し、chamber の膜接触面の直径を10 mm 循環速度を2.5 ml/min, 10 ml/min にした時のナトリウムイオン濃度の経時の変化。10 ml/min では約 7 時間で平衡に達したが 2.5 ml/min では 24 時間経過しても平衡に達しなかった。

図6 酢酸セルロース膜を挿入し、循環速度を 10 ml/min にした時、膜接触面の直径を 10 mm, 7 mm, 5 mm と変化させた時のナトリウムイオン濃度の経時の変化。直径 7 mm 以上では濃度が平衡に達する時間に有意差はなかったが直径 5 mm では 12 時間経っても平衡には達しなかった。

度が平衡に達した。

実験2では、図4、5に示したように、循環速度を20 ml/min に設定した時、約6時間で拡散濃度が平衡に達し、10 ml/min では約7時間を要した。2.5 ml/min では24時間経過しても平衡に達しなかった。

実験3の循環速度を10 ml/min とし、膜面を直径10 mm, 9 mm, 7 mm, 5 mm と小さくした時は図6に示すように、直径7 mm までは、約7~12時間かけると拡散濃度が平衡になった。しかし、直径5 mm では12時間経っても平衡に達しなかった。

考 察

外リンパ液と内リンパ液のイオン濃度は、特にナトリウムとカリウムイオンに特徴があり、この濃度差を作成しているのは $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase と言われている。これは血管条に大量に存在するが、ライスネル膜などにも少量ながら存在する⁹⁾。内・外リンパ液の静水圧や浸透圧の平衡障害により、内リンパ液が増量して内リンパ水腫が発生すると仮定すると、膜迷路の膜自体はどんなイオン交換や圧調整をしているのであろうか。膜の能動・受動輸送に関しては、気管上皮粘膜⁷⁾、透析膜⁸⁾などで研究されているが、膜迷路では対象が微細なためにほとんど知られていない。そのため今回我々は微小な膜のイオン受動輸送(単純拡散)を測定するため Ussing chamber を応用した micro chamber を製作し、回路を構成した。この測定器を用いて、膜の受動輸送が測定可能な膜の大きさと循環速度を検討した。

膜が挿入されていない場合、接触面の直径が1 mm でもここを介するイオン拡散は、8時間で平衡に達することが判明した。しかし昨年の我々の報告⁹⁾のとうり、この直径では膜を挿入すると拡散濃度が平衡に達するのに24時間以上も要してしまい、実際の膜迷路には応用できないと判断された。また当実験の際 chamber の両面を蒸留水と生理食塩水で灌流すると、正確な容量は測定できなかったが、生理食塩水側の容積増加と蒸留水側の容積減少を認め、これは両溶液間の浸透圧の差位によるものと考えられた。従って内リンパ水腫を引き起こす原因の一つに、浸透圧差が関与するものと思われた。このため、以降の検討では、蒸留水のかわりに、生理食塩水と浸透圧の同じ5%ブドウ糖液に変更した。直径10 mm の chamber では循環速度20 ml/min のとき約6時間で平衡に達したが、この時は回路のチューブ自体が拍動をおこしており、膜迷路に応用するためには不適當と思われた。また2.5 ml/min では24時間経っても平衡に達せず、これも適切な速度ではなかった。

循環速度を10 ml/min にすると膜面を直径10 mm, 9 mm, 7 mm に縮小しても、濃度が平衡に達する時間に

有意差はなかった。しかし直径5 mm では12時間経っても平衡には達しなかった。

今回の検討は micro chamber の測定可能な膜の大きさと循環速度を調べることであったが、直径7 mm, 循環速度10 ml/min までは可能であった。しかし、膜迷路の膜を対象とした場合、直径2 mm までは小さくする必要がある。そのためには、この回路をさらに発展させ、膜の一侧のみに溶液を循環させるとか、イオン濃度の測定精度を上げるなども考慮しなくてはならないと思われる。我々の膜迷路の力学的性質の検討によると、最も弱い球形囊膜でも膜破断に64 mmHg 必要であった¹⁰⁾。以上の結果をまとめると、内リンパ水腫が生じるためには、内・外リンパ腔間にある圧力差が必要であり、これには内・外リンパ液間のイオン濃度や浸透圧が関与していると判断された。

謝 辞

この研究は、厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班の補助金により行われたものである。

文 献

- 1) Hallpike CS, Cairns H: Observation on the pathology of Meniere-Syndrome. J Laryng Otol 53: 625-655, 1938
- 2) 香川靖雄: 生体膜と人工膜. 星 猛・香川靖雄編. 新生理学体系3. 1-9頁, 医学書院, 東京, 1987
- 3) Fernandez C: Dimensions of the cochlea (guinea pig). J Acoust Soc Am 24: 519-523, 1952
- 4) Takeuchi S, Takeda T, Saito H: Pressure relationship between perilymph and endolymph in guinea pigs. Acta Otolaryngol (Stockh) 109: 93-100, 1990
- 5) Ussing HH, Zerahn K: Active transport of electric current in shortcircuited isolated frog skin. Acta Physiol Scand 23: 110-127, 1951
- 6) 岩野 正, 他: ラット蝸牛管外壁における (Na^+ , K^+) ATPase の局在. 免疫電子顕微鏡法による検討. Ear Res Jpn 18: 84-86, 1987
- 7) Widdicombe JH: Electrical methods for studying ion and fluid transport across airway epithelia. In ed Braga PC, et al: Methods in Bronchial Mucology. pp. 335-344, Raven Press, New York, 1988
- 8) Mineshima M, et al: Diffusive and convective mass transport characteristics in β_2 -microglobulin removal. Trans Am Soc Artif Intern Organs 10: 103-106, 1987

- 9) 石井哲夫・高橋裕子・山本信和：微小膜透過性測定装置に関する研究。厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班，平成元年度研究報告書。75-76，1990
- 10) Ishii T, et al: The Physical Strength of the Membranous Labyrinth and Its Relation to Endolymphatic Hydrops. In ed M. Kitahara: Meniere's Disease. pp 23-33, Springer-Verlag Press, 1990

Abstract

To measure ion transport through a membranous labyrinth, we devised a micro chamber unit consisting of a micro chamber, a circulation pump and a storage tank. A cellulose triacetate membrane was inserted to divide the chamber into two circuits. One

circuit was filled with physiological saline, the other with 5 % glucose solution. We measured the passive transport of Na^+ through the membrane, then tested it under various conditions simulating those in the human membranous labyrinth. The suitable conditions were 7 mm for the diameter of the chamber and 10 ml/min for the circulation rate.

Key words: ion transport, passive transport, micro chamber unit

（原稿到着：平成3年2月28日
別刷請求先：高橋裕子
〒162 東京都新宿区河田町8番1号
東京女子医大耳鼻咽喉科学教室）