アスパラギン酸塩水溶液中におけるイオンの拡散および
ウシ水晶体カプセルに対する膜透過

中垣正幸, 小林征雄
京都大学薬学部¹⁾

**Ionic Diffusion and Membrane Permeability across Bovine Lens
Capsule in Aqueous Aspartate Solutions**

MASAYUKI NAKAGAKI and MASAO KOBAYASHI
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹⁾

(Received March 9, 1972)

Aqueous electrolytic solution of a mixture of potassium hydrogen aspartate (KHAsp) and magnesium hydrogen aspartate $[\text{Mg}(\text{HAsp})_2]$ was examined for the dispersion behavior of each ion and penetration through the vitreous capsule of bovine eye. Dispersion coefficient of K^+ increased with increasing fraction of Mg^{2+} in the solution, indicating that Mg ion accelerated the dispersion of K ion, while dispersion coefficient of Mg^{2+} decreased with increasing fraction of K^+ , indicating that K ion retarded the dispersion of Mg ion. This tendency was also observed in a mixed solution of KCl and MgCl_2 examined for the sake of comparison.

Examination of the behavior of the solution with vitreous capsule indicated that the parameter f that expresses the interaction between the membrane and ion was greater in KHAsp- $\text{Mg}(\text{HAsp})_2$ - H_2O system than in KCl- MgCl_2 - H_2O system, and there was a difference between K and Mg ions. It was found that the value of f_{Mg} of Mg ion increased in the presence of KHAsp.

医薬品として用いられるアスパラギン酸塩製剤は、一般にカリウム塩（以下 KHAsp）とマグネシウム塩（ $\text{Mg}(\text{HAsp})_2$ ）を同じ当量すなわちモル比にして 2:1 の割合で混合したものといわれる。両塩の混合物の投与はそれぞれを単独で投与するより薬理効果が大きいという報告があるが、両塩の物理化学的な相互作用についてはまだ不明な点が多い。²⁾

著者らはアスパラギン酸塩水溶液の導電率の測定を行ない各種金属イオンとアスパラギン酸との結合状態および 2 種の金属イオンを含む電解質の混合水溶液中における各イオンの相互作用について考察し前報に報告した。³⁾ 引き続き本報においては KHAsp および $\text{Mg}(\text{HAsp})_2$ の混合水溶液について K^+ , Mg^{2+} および HAsp^- イオンのそれぞれの拡散挙動を調べ、同時にそれぞれのイオンの生体膜透過挙動を知るためウシ眼球水晶体カプセルを用いて膜透過定数を測定した。また KCl と MgCl_2 が共存している水溶液中においても同様な実験を行ない HAsp^- イオンと Cl^- イオンのアニオンの相異がカチオンの拡散および生体膜透過におよぼす影響を研究し興味ある現象をみとめたので以下に報告する。

結 果 お よ び 考 察

A) KHAsp-Mg (HAsp)₂ および KCl-MgCl₂ の電解質共存水溶液中におけるイオンの拡散

以下の実験においてイオンの拡散係数 D_i は隔膜法を用いて測定した。この方法は Fig. 1 にモデル的に示したようにガラスフィルターで隔てられた室のうち、上部に密度の大きい試料溶液を入れ下部には水を入れて一定温度で t 時間静置し溶質の拡散を行なわせ、 t 時間後に上室のイオン濃度 $[i]_I$ および下室のイオン濃度 $[i]_{II}$ を測

1) Location: Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

2) a) H. Laborit, R. Moynier, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **151**, 1383 (1957); b) B. Weber, H. Laborit, *ibid.*, **152**, 1361 (1958); c) B. Weber, H. Laborit, *Press. Med.*, **66**, 2125 (1958).

3) 中垣正幸, 小林征雄, 薬誌, **92**, 1204 (1972).

定する. i イオンの拡散が Fick の式 (後述の式 (3)) に従う場合には拡散係数 $D_i(\text{cm/sec})$ は式 (1) によって求めることができる.⁴⁾

$$-KD_i = \frac{1}{t(1/V_I + 1/V_{II})} \ln \left\{ \frac{1 - [i]_{II}/[i]_I}{1 + (V_{II}/V_I)([i]_{II}/[i]_I)} \right\} \quad (1)$$

ただし V_I および V_{II} はそれぞれ上室および下室の容積であり K は拡散係数既知の電解質水溶液を用いて得られるセル定数である.

式 (1) によって測定される拡散係数 D_i は当然時間 t の大小にかかわらず一定の値となるはずである. Fig. 2 はこの点を確認したものであり $t=0$ における上室の KHA_{sp} の濃度が 0.1N である水溶液について時間 t をかえて D_i を測定した結果を示している. 各点は 5 つの隔膜セルを用いて測定した $D_k (=D_{\text{HA}sp} = D_{\text{KH}sp})$ の平均値を示したものであるが, 時間 t をほぼ 10 倍変えているにもかかわらず拡散係数はほとんど変化がない.

Fig. 1. Apparatus for Measurement of Diffusion Coefficient or Membrane Permeability

Fig. 2. Time Dependency of the Diffusion Coefficient of Aqueous 0.1N KHA_{sp} Solutions at 34°

次に KHA_{sp} 水溶液について拡散係数の濃度依存性を測定し Fig. 3 に示した. ここで横軸は $t=0$ における上室の濃度である. Fig. 3 より明らかなように KHA_{sp} 濃度を 0.05N より 0.2N の間では拡散係数はほとんど変化がない.

次に拡散におよぼす各イオンの相互作用を調べるため, アニオンを共通とし K^+ と Mg^{2+} イオンが共存する三成分共存電解質水溶液系 KHA_{sp}-Mg(HA_{sp})₂-H₂O および KCl-MgCl₂-H₂O 系について各イオンの拡散係数 $D_{\pm}$ を測定した. Fig. 1 の上室に 0.1N KHA_{sp} 水溶液, 0.1N Mg(HA_{sp})₂ 水溶液または 0.1N KCl 水溶液と 0.1N MgCl₂ 水溶液とを所定の割合で混合した水溶液を入れ, 下室には水を入れておよそ 40 時間, $34 \pm 0.05^\circ$ に静置したのちそれぞれの室の K^+ および Mg^{2+} イオンの濃度を定量し, それぞれのイオンの拡散係数を式 (1) より計算した. またアニオンについては水溶液中における電気中性条件,

$$[A^-] = [K^+] + 2[Mg^{2+}] \quad (2)$$

より上室および下室のアニオンの濃度を計算し, カチオンの場合と同様に式 (1) より拡散係数を計算した. ただし式 (2) において $[]$ はイオンの g-イオン濃度 (g-ion)

Fig. 3. Concentration Dependency of the Diffusion Coefficient of Aqueous KHA_{sp} Solution at 34°

- 4) a) 中垣正幸, 古賀直文, 岩田修三, 薬誌, 82, 1134 (1962); b) 中垣正幸, 古賀直文, 岩田修三, 薬誌 82, 1138 (1962); c) 中垣正幸, 古賀直文, 岩田修三, 薬誌, 83, 275 (1963); d) 中垣正幸, 古賀直文, 岩田修三, 薬誌, 83, 279 (1963); e) 中垣正幸, 古賀直文, 岩田修三, 薬誌, 83, 368 (1963); f) 中垣正幸, 古賀直文, 化学の領域, 増刊 61, 46 (1964); g) 中垣正幸編 “薬物の生体内移行” 南江堂, 1969.

オン/liter) をあらわし, A はアニオンでありこの場合 Cl^- または HAsp^- である.

ところで式 (1) はイオンについて Fick の拡散式,

$$\partial m_i / \partial t = -D_i \partial C_i / \partial x \quad (3)$$

が成立することを前提として導いたものであるが一般に多成分が共存する水溶液中における拡散は非平衡の熱力学による現象論的な方程式によって記述されている. すなわちここで扱っているように溶質 A および溶質 B が共存するような溶液系において, 溶質 A および B の流れは,

$$\partial m_A / \partial t = -D_{AA} \partial [A] / \partial x - D_{AB} \partial [B] / \partial x \quad (4)$$

$$\partial m_B / \partial t = -D_{BB} \partial [B] / \partial x - D_{BA} \partial [A] / \partial x \quad (5)$$

であらわされる.

Gosting, Dunlop らは Gouy の Diffusionmeter を用い, 上述の拡散係数 $D_{AA}, D_{AB}, D_{BA}, D_{BB}$ をいくつかの三成分共存水溶液系について測定し報告している.⁵⁾ しかし Dunlop らが採用している方法は装置が高価で操作技術も困難であり, 得られた拡散係数も直感性に乏しい. これに対しわれわれが今回採用したように三成分電解質水溶液系において各イオンについて式 (1) を適用して求めた拡散係数 D_i は, 各イオンの拡散が Fick の式 (3) に従う証明がないため見掛けの拡散定数と呼ぶべき性質のものであるが, それぞれのイオンの透過性の難易を直感的に示す値であり, 電解質間の相互作用を研究するような目的に対しては簡便かつ有効な方法であると考えられる.

Fig. 4 は 34° における $\text{KHAsp-Mg (HAsp)}_2\text{-H}_2\text{O}$ 系について各イオンの拡散係数 D_K, D_{Mg} および D_{HAsp} の測定値を示したものである. 横軸は $t=0$ における上室の Mg^{2+} イオンの当量分率 x_{Mg} であり式 (6) によって定義される.

$$x_{Mg} = 2[\text{Mg}^{2+}] / ([\text{K}^+] + 2[\text{Mg}^{2+}]) \quad (6)$$

Fig. 4 の D_{HAsp} の挙動より明らかなように HAsp^- イオンの拡散速度は x_{Mg} が大きくなり溶液中に Mg^{2+} イオンの割合が多くなるに従いほぼ直線的に減少している. これはすでに報告したように各イオンの当量導電率は $\lambda_{K^+} > \lambda_{Mg^{2+}} > \lambda_{HAsp^-}$ の順に減少し, K^+ イオンの方が Mg^{2+} イオンより易動度が大きく従ってイオンが拡散する方向に HAsp^- イオンを引張る力が強いためである. 一方 Fig. 4 の D_K および D_{Mg} の挙動より, 前者は水溶液中に K^+ イオンが少なくなり Mg^{2+} イオンが多くなるに従って大きくなり Mg^{2+} イオンは K^+ イオンの拡散速度を速めているのに対し, 後者は水溶液中に Mg^{2+} イオンが少なくなり K^+ イオンが多くなると小さくなっており K^+ イオンは Mg^{2+} イオンの拡散を妨げていることがわかる.

Fig. 4. Diffusion Coefficients of Ions Contained in Aqueous KHAsp-Mg (HAsp)₂ Solution at 34°

K^+ : ○; HAsp^- : ◐; Mg^{2+} : ●

Fig. 5. Diffusion Coefficients of Ions Contained in Aqueous KCl-MgCl_2 Solutions at 34°

K^+ : ○; Cl^- : ◐; Mg^{2+} : ●

- 5) a) J. Dunlop, J. Gosting, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5238 (1955); b) H. Fujita, J. Gosting, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1099 (1956); c) J. Dunlop, *J. Phys. Chem.*, **61**, 994 (1957); d) J. Dunlop, *J. Phys. Chem.*, **61**, 1619 (1957).

また $\text{KCl-MgCl}_2\text{-H}_2\text{O}$ 系について上記と同様な検討をし Fig. 5 にその結果を示した. Fig. 5 の結果によれば D_{Cl} は対応する D_{HAsp} にくらべ大きな値であることが示されているが, これは Cl^- イオンの当量導電率 λ_{Cl^-} が λ_{HAsp^-} より大きいためである. しかし D_{Cl} と D_{HAsp} の x_{Mg} に対する傾向はよく似ており x_{Mg} の増大とともに両者の値は直線的に減少している. また D_{K} および D_{Mg} も Fig. 4 の場合と同様な傾向を示している.

ここで Fig. 4 および Fig. 5 の結果をより深く考察するために, 各電解質が相互作用することなく拡散する場合について考える. いま混合電解質溶液の拡散に際して各イオン間に相互作用がないことをモデル的にあらわす仮想的な境界膜を考える. すなわち Fig. 6 に示すように拡散係数測定用のセルがきわめてうすい境界膜により第 I 室が小室 I_K , I_Mg に, 第 II 室が小室 II_K , II_Mg に分割されており, I_K , II_K 室には溶質として KA (A は一価アニオンを示す) のみが, I_Mg , II_Mg 室には MgA_2 のみが存在する場合を考える. この場合境界膜は,

$$V_\text{I} = V_{\text{IK}} + V_{\text{IMg}} \quad (7)$$

$$V_\text{II} = V_{\text{IIK}} + V_{\text{IIMg}} \quad (8)$$

$$x_{\text{Mg}} = V_{\text{IMg}}/V_\text{I} = V_{\text{IIMg}}/V_\text{II} \quad (9)$$

を満足しており, KA と MgA_2 はこの境界膜を通過できず両溶質は相互作用がないものとする.

拡散開始時における小室 I_K の K^+ イオンの濃度を $[\text{K}]^\circ_{\text{IK}}$ とし, t 時間後における小室 I_K , II_K の K^+ イオンの濃度をそれぞれ $[\text{K}]_{\text{IK}}$, $[\text{K}]_{\text{IIK}}$ とし第 I 室および第 II 室における K^+ イオンの平均濃度をそれぞれ $[\text{K}^+]_\text{I}$, $[\text{K}^+]_\text{II}$ とすると式 (1) より,

$$\begin{aligned} [\text{K}^+]_{\text{II}}/[\text{K}^+]_\text{I} &= ([\text{K}^+]_{\text{IIK}}V_{\text{IIK}}/V_\text{II})/([\text{K}^+]_{\text{IK}}V_{\text{IK}}/V_\text{I}) \\ &= (1-G_\text{K})/(1+V_\text{II}G_\text{K}/V_\text{I}) \end{aligned} \quad (10)$$

$$G_\text{K} = \exp(-KD_\text{K}t(1/V_\text{I}+1/V_\text{II})) \quad (11)$$

が得られ, また

$$[\text{K}]^\circ_{\text{IK}}V_{\text{IK}} = [\text{K}^+]_{\text{IK}}V_{\text{IK}} + [\text{K}^+]_{\text{IIK}}V_{\text{IIK}} \quad (12)$$

である.

上記のように KA と MgA_2 がお互いに混合しない場合においては x_{Mg} のいかんにかかわらず $D_\text{K}=D_{\text{KA}}$ かつ $D_{\text{Mg}}=D_{\text{MgA}_2}$ であり, K^+ イオンおよび Mg^{2+} イオンの拡散係数はそれぞれ溶質が単独で存在する場合の溶質の拡散定数に等しい. 溶質についての拡散係数は既知であるから時間 t を経過した場合の $[\text{K}^+]_\text{I}$ および $[\text{K}^+]_\text{II}$ を式 (10)―式(12) から計算でき, また $[\text{Mg}^{2+}]_\text{I}$ および $[\text{Mg}^{2+}]_\text{II}$ についても同様の方法により計算できる. 一方 I 室および II 室のアニオン濃度は電気中性条件,

$$[\text{A}^-]_\text{I} = [\text{K}^+]_\text{I} + 2[\text{Mg}^{2+}]_\text{I} \quad (13)$$

$$[\text{A}^-]_\text{II} = [\text{K}^+]_\text{II} + 2[\text{Mg}^{2+}]_\text{II} \quad (14)$$

より求めることができる. この $[\text{A}^-]_\text{I}$ と $[\text{A}^-]_\text{II}$ を式 (1) に代入して KA と MgA_2 との間に相互作用がないと仮定した場合のアニオンの拡散係数 D_A を求めることができる.

Fig. 4 に示した点線は $D_{\text{KA}}=D_{\text{KHAsp}}=1.26 \times 10^{-5}$, $D_{\text{MgA}_2}=D_{\text{Mg(HAsp)}_2}=0.87 \times 10^{-5}$ をまた時間 t に各 x_{Mg} に対して拡散係数を実測した時間 (約 40 時間) を用いたセル 1 を用いた場合の各イオンの拡散係数の計算値である. Fig. 5 の点線は同様に $D_{\text{KA}}=D_{\text{KCl}}=2.25 \times 10^{-5}$, $D_{\text{MgA}_2}=D_{\text{MgCl}_2}=1.06 \times 10^{-5}$ を用いて Fig. 4 の場合と同様な方法で計算した結果である. Fig. 4 および Fig. 5 より D_K はともに実測値は計算値より大きく D_{Mg} はともに実測値は計算値より小さく, またアニオンは D_{Cl} , D_{HAsp} ともに実測値と計算値はほぼ一致している. 従ってアニオンによって代表されるイオン全体としての流れは KA と MgA_2 が相互作用がないと考えた場合にほとんど一致しているが, カチオンについては K^+ イオンの拡散速度が速められるのと引きかえに, Mg^{2+} イオンの拡散速度は遅められることを示している.

Fig. 6. Hypothetical Diaphragm Cell

B) KHA₂SP-Mg (HA₂SP)₂ および KCl-MgCl₂ の共存電解質水溶液におけるイオンの膜透過

著者らは各イオンの拡散係数とともに, KHA₂SP-Mg(HA₂SP)₂-H₂O 系および KCl-MgCl₂-H₂O 系について各イオンの生体膜透過挙動をウシ眼球水晶体カプセルを用いて研究した. 測定方法はすでに中垣らが報告した通りであり⁴⁾ Fig. 1 の第 I 室と第 II 室の間に水晶体カプセルの前房側を試料溶液の入った第 I 室に接するようにはさみ, 第 II 室に水を入れ一定時間透過を行なわせたのち, 第 I 室および第 II 室のイオンの濃度を測定し式 (15) によって見掛けの膜透過係数 P_i (cm³ sec⁻¹) を求める.

$$P_i = \frac{-1}{At(1/V_I + 1/V_{II})} \ln \left\{ \frac{1 - ([i]_{II}/[i]_I)}{1 + (V_{II}/V_I)([i]_{II}/[i]_I)} \right\} \quad (15)$$

この P_i は濃度差に対して定義された膜透過定数であり A は膜の面積である.

Fig. 7. P Values of Ions Contained in Aqueous KHA₂SP-Mg(HA₂SP)₂ Solutions at 34°

K⁺: ○; HA₂SP⁻: ●; Mg²⁺: ◐

ところで式 (15) で定義される P_i 値はイオンそのものが有する拡散速度に著しく影響されイオンと膜との相互作用をあらわすパラメーターとしては不適當である. そこで P_i からイオンの拡散係数の影響をのぞいたパラメーター f_i を式 (16) によって定義する.

$$f_i = P_i/D_i \quad (16)$$

この f_i は膜の多孔度, 膜とイオンの親和性などを総括して含むパラメーターと考えられる. P_i および対応する D_i の実測値を用いて計算した f_i の値を KHA₂SP-Mg(HA₂SP)₂-H₂O 系および KCl-MgCl₂-H₂O 系について Fig. 9 に図示した.

Fig. 9 の結果より f_i の値は全般に KHA₂SP-Mg(HA₂SP)₂-H₂O 系の方が KCl-MgCl₂-H₂O 系より高い値を示し

Fig. 8. P Values of Ions Contained in Aqueous KCl-MgCl₂ Solutions at 34°

K⁺: ○; Cl⁻: ●; Mg²⁺: ◐

Fig. 9. f Values of Ions Contained in Aqueous KHA₂SP-MgHA₂SP Solutions and Aqueous KCl-MgCl₂ Solutions at 34°

K⁺: ○; HA₂SP⁻: ●; Mg²⁺: ◐
K⁺: ○; Cl⁻: ●; Mg²⁺: ◐

ている。これは HAsp^- イオンの方が Cl^- イオンより膜に対する親和性が強いことを示すものである。また $\text{KHAsp}-\text{Mg}(\text{HAsp})_2-\text{H}_2\text{O}$ 系において個々のイオンについては、 f_{HAsp^-} は x_{Mg} の値によらずほとんど一定であるが、 f_{Mg} は f_{K} より大きな値であり Mg^{2+} イオンは K^+ イオンより膜に対する親和性が強いことを示している。また $\text{KCl}-\text{MgCl}_2-\text{H}_2\text{O}$ 系については 3 イオン間に前者の場合ほど顕著な差はないが、 f_{Mg} は f_{K} より大きくまた f_{Cl} は x_{Mg} の値によらずほとんど一定の値を示している。

もし膜が各イオンに対して全く同じように作用するならば、 Cl^- イオン系および HAsp^- イオン系の如何にかかわらずすべての f_i の値は等しいはずであるが、Fig. 9 の結果は膜と各イオンの相互作用はそれぞれに異なることを示している。いずれの系においても溶液の pH は 5.3—5.6 の間にあり、この pH 領域において各イオンはほとんど電離していることは前報で報告した通りであり、イオン間に会合が起こり膜を通りやすくなるようなことはないと考えてよい。

K^+ イオンの共存によって Mg^{2+} イオンの拡散係数が減少することはすでに述べた通りであるが、それにもかかわらず f_{Mg} の値は KHAsp の共存によって増大する。受動輸送は膜を通しての拡散にはかならないという立場に立ってこれを見れば、 Mg^{2+} の膜透過は KHAsp の共存によって異常に促進されるということが出来る。この異常性の原因は現在のところ明らかでないが、今後さらに詳細な研究を予定している。

実 験 の 部

A) 拡散係数の測定 拡散係数測定用の隔膜セルは中垣らにしたがい作製した。⁴⁾ 測定は $34 \pm 0.05^\circ$ に調節した恒温槽中で行ない、拡散の時間は約 40 時間である。一つの条件について 4—6 個の測定を行ない拡散係数を平均したが、いずれの実測値も平均値に対する偏差は 4% 以内である。測定に用いたセルの特性を Table I に示す。セル定数は 34° における 0.1N KCl 溶液より求めた。この溶液の拡散係数は International Critical Table より $2.25 \times 10^{-5} \text{ (cm sec}^{-1}\text{)}$ とした。

TABLE I. Diaphragm Cells used in this Experiment for Measurement of Diffusion Coefficients

No.	V_I (ml)	V_{II} (ml)	K (cm ³)
1	7.235	6.853	1.293
2	7.092	7.145	1.040
3	7.521	7.389	1.367
4	7.425	7.682	1.118
5	7.186	7.230	0.979

B) 膜透過定数の測定 膜透過係数測定用セルは中垣らにしたがい作製した。⁴⁾ 測定温度はウシ眼球生体温度 34° とし透過時間は 3 時間とした。ウシ眼球は屠殺後数時間以内のものを $0-5^\circ$ の保温瓶中に保存しておき使用した。ただし保温瓶中での保存も一昼夜以上経過したものは使用しなかった。Table II に膜透過係数を測定したセルの特性を示す。

TABLE II. Membrane Permeability Measuring Cells used in this Experiment

No.	V_I (ml)	V_{II} (ml)	A (cm ³)
1	4.257	4.318	0.643
2	3.815	3.954	0.643
3	4.104	4.132	0.636
4	4.136	4.916	0.653
5	4.325	4.050	0.636
6	3.846	4.104	0.650
7	3.783	3.963	0.677

c) K^+ および Mg^{2+} イオンの定量 K^+ イオンは蛍光分析法によって定量した。試料は適当に希釈し 0—6 ppm の範囲で測定した。この濃度範囲で検量線は直線性が良好であった。検量線は試料溶液を定量するとき常に検定して用いた。

Mg^{2+} イオンは 0.02M EDTA 試液により指示薬をエリオクロムブラック T を用いて定量した。