

モルモット肝細胞内 acidosis の 細胞膜 K⁺ channel に与える影響

別所 偉光

近畿大学医学部第2外科学教室

Effects of intracellular acidification on K⁺ channel
in guinea pig hepatocytes

Hideaki Bessho

Second Department of Surgery, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

Both the whole cell patch clamp technique and single channel recording were used to investigate the voltage dependent outward current in enzymatically dissociated guinea pig hepatocytes. A voltage-gated outward current with an outward rectifier component was observed. The single channel behavior of this channel was also studied. The delayed rectifying outward current was activated at membrane potentials over -10 mV. More pronounced effect was seen at more positive depolarizing potentials under both whole cell patch clamp mode and single channel recordings. That is, with a patch attached to the cell and with +40 mV depolarizing pulses from RP-20 mV, slow inactivating channel activities were observed. After external application of 20 μ M quinidine under conditions of cell attached patch, or after external application of 0.1 μ M apamin under conditions of whole cell patch clamp, the outward component was reversibly blocked under conditions of both whole cell and single channel patch clamp techniques. Furthermore, after external application of 1 mM nicorandil, the outward component increased under conditions of whole cell patch clamp techniques, supporting the hypothesis that this current component belongs to the K⁺ channel. When the pH in the external solution was changed from 7.2 to 6.2, the K⁺ current was not inhibited with extracellular acidosis. When the pH in the pipette solution was changed from 7.2 to 6.2 the K⁺ current was significantly inhibited. Therefore, we assume that some kind of buffer system is involved in the hepatocytes. The presence of a K⁺ channel and Na⁺-H⁺ exchange mechanism was clarified in guinea pig hepatocytes and the mechanism responded to intracellular acidification to a clinical significance.

Key words : patch clamp, K⁺ channel, quinidine, apamin, Na⁺-H⁺ exchange, acidosis

緒 言

近年、肝癌に対する切除症例は増加しているが、本邦の原発性肝癌に高頻度で肝硬変が併存することを考慮すると、術中出血を最小限にとどめることが肝要である。肝臓外科手術において肝血流遮断は、肝切離面よりの出血を制御するために繁用される必須の手技である。しかし、術前の肝の状態、言い換えれば肝の予備能によっては肝血流遮断時間が20分を越えると、肝ミトコンドリアにおける磷酸化能は不可逆的に障害を受け、術後残存肝機能は破綻し、肝不全が起こることも報告されている¹。臨床的にも都築らは肝脈管遮断開始後20分を過ぎると循環動態は極めて不安定となり、心拍出量の低下や hypovolemic shock に陥る傾向があり、この原因として、肝鬱血とこれに伴う出血量の増加が考えられるとし、特に outflow block による高度の鬱血が認められる²と報告している。

一方、肝細胞膜における K^+ チャンネル (channel) の存在は、肝細胞の生理機能の維持にとって重要であり、その役割は膜電位の差を作り出すことに依存している。この膜電位の差は肝細胞における多くの生理調節機能の維持に不可欠である³。

近年、パッチクランプ⁴ (patch clamp) 法が導入されたことにより、多くの組織の電気生理学についての実験研究をより一層行い易くなった。電圧依存性 K^+ チャンネルについては、マクロファージ⁴、リンパ球⁵、あるいはナチュラルキラー細胞⁶ を用いて報告がなされている。しかし、肝細胞に関する報告はほとんど見られない。

临床上、前述のように肝切除術の術中、肝への血流遮断によって肝細胞内の低酸素の結果、アシドーシス (acidosis) の状態が推測されることも多い。この種のアシドーシスの状態において、肝細胞膜レベルでは、 K^+ チャンネルがどのような影響を受けているかはほとんど知られていない。

今回、著者はパッチクランプ法を用いて、単一生理学的モルモット肝細胞の電圧依存性外向き K 電流の存在を証明した。そして、このチャンネルが細胞内 Ca^{2+} の上昇およびその結果として膜電位の脱分極によって活性化され、このことが細胞内アシドーシスなどに対する細胞の生理機能の維持にとって重要な働きを持つことを明らかにしたので、ここに報告する。

材料と方法

1. 細胞の準備

分離肝細胞は、Berry ら⁷ および Tarlow ら⁸ の開発した酵素解離法により、モルモットの肝から調製した。大略を述べると、5~6週令で、体重 350~400 g の雄性の Hartley モルモット (日本エスエルシー) をペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg 体重) の腹腔内注入により麻酔した。門脈にカニューレを挿入し⁹、肝に ethylene glycol -bis (b-aminoethyl ether) N,N,N',N' -tetra acetic acid (EGTA) を含有する第1液 (表1) を、蠕動ポンプを用いて 25 ml/min で灌流し、デスモソームの血液および Ca^{2+} を洗い出した (図1)。この後、肝に Ca^{2+} および コラゲナーゼ¹⁰ (50 μ g/100 ml) を含有する第2液 (表1) を 30 ml/min でさらに10分間再循環させた。再灌流終了後、肝を切除し、室温下で表1に示した Hank's buffer saline solution (Hank's BSS) ですすぎ、ハサミで細切りした。このミンチを、150-メッシュナイロンのスクリーンで濾過し、未消化の組織を除去し、得られた濾過物を 100 r.p.m で1分間遠沈した。細胞ペレーを Hank's BSS に再懸濁した。この操作を3回繰り返した。単離した肝細胞は、倒立位相差顕微鏡 (Diaphoto-TMD, NIKON) のステージにとりつけた記録チェインバーに入れた。

酵素を用いた解離により、平均直径 20 μ m の単一円形細胞が得られた。これらの細胞の一部は、カップリングしていた。解離1時間後の細胞の写真を、図2に示した。これらの細胞は、6時間の短期間培養の期間内に使用した。

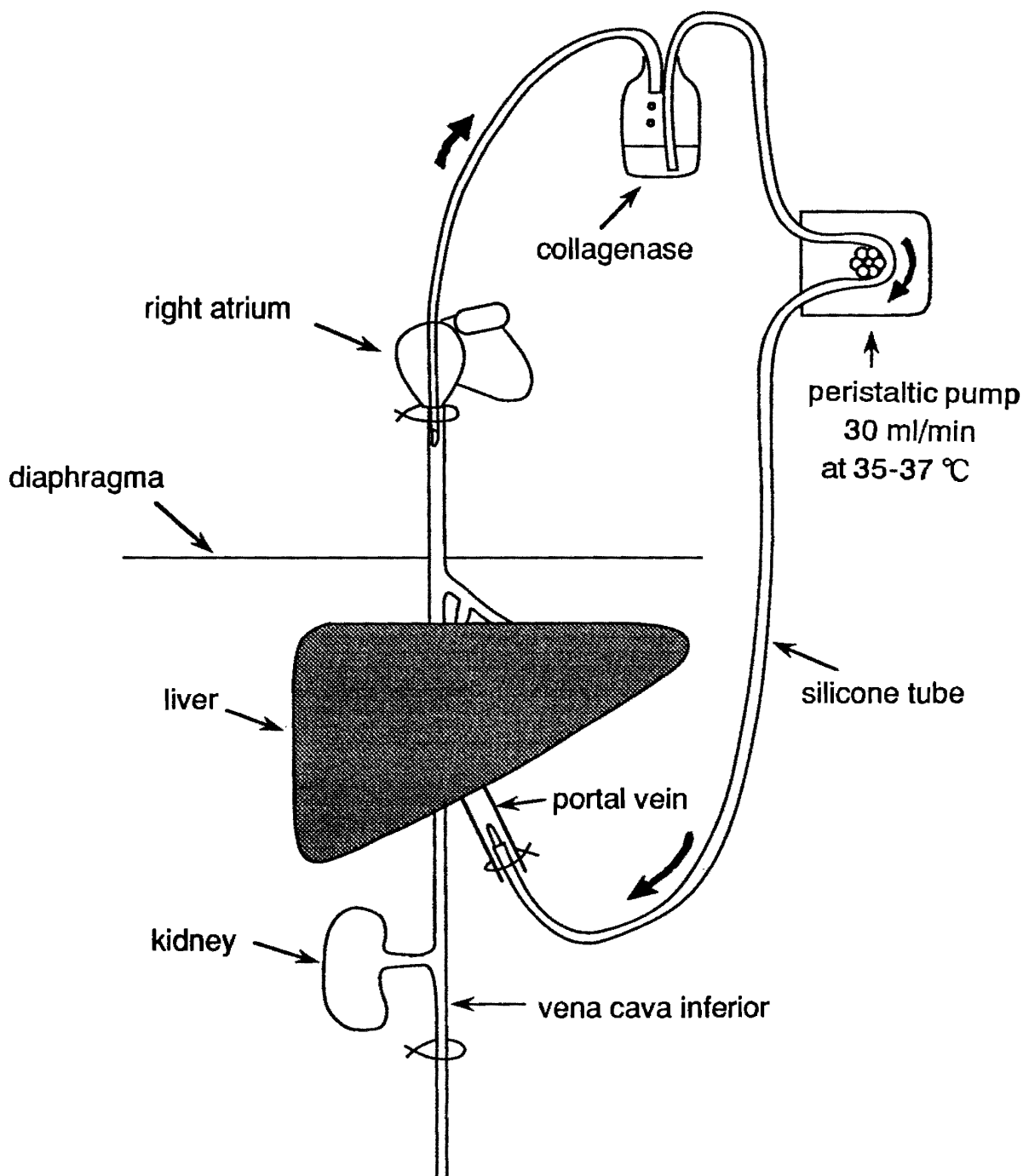


Fig. 1 Schema for cannulation in guinea pig under in situ perfusion

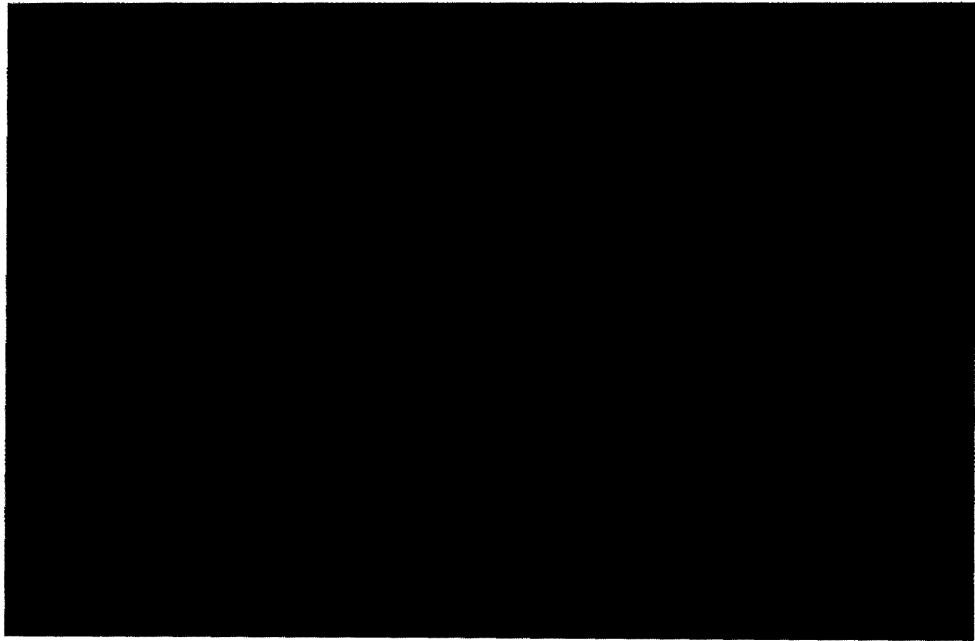
電氣的記録に適している細胞は、円形で、カップリングをしておらず、細胞表面のプレブを形成していない細胞であった。

2. 溶液および薬剤

使用した溶液は、表 1～3 に示した。細胞の単離および調製に用いた溶液を表 1 に示し、電流的記録に用いた溶液は表 2～3 に示した。ほとんどの実験は、標準外液および内液を用いて

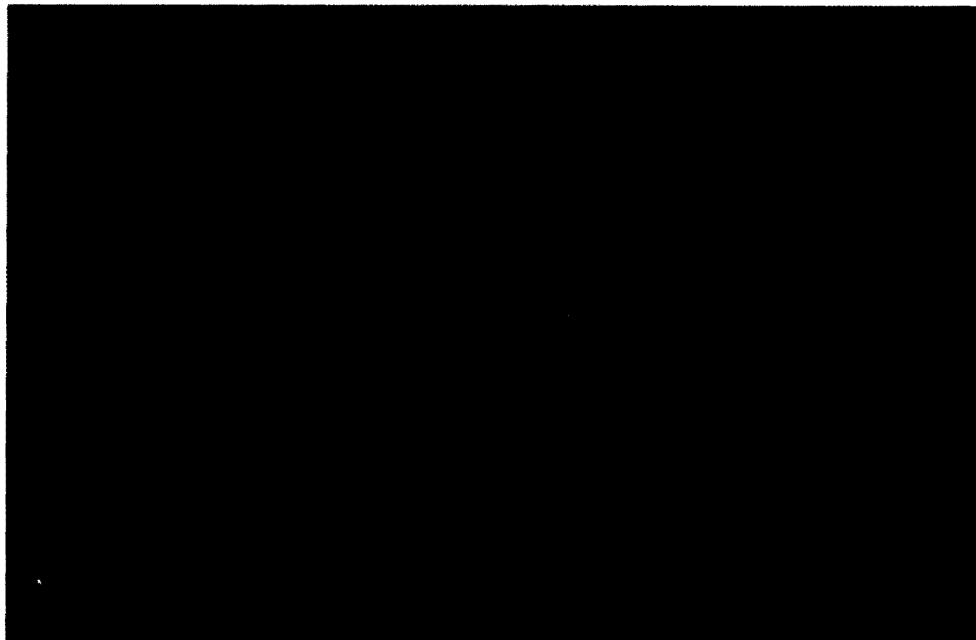
行った。今回の実験で用いた薬剤は、コラゲナーゼ (Collagenase) およびキニジン (Quinidine) を含め全て、Sigma Chemical 社から購入した。これらの薬剤を、対照液を用いて望みの濃度に調整し、連続的灌流を行い、洗い流した。

Cell attached patch clamp で細胞外液 pH 7.3 で保持電位 -30 mV、クランプ時間は 100

A

┌───┐
200 μ m

x100

B

┌───┐
20 μ m

x400

Fig. 2 Microphotographs of dissociated guinea pig hepatocytes prepared with collagenase by treatment. Photographs were taken after 1 hour incubation.
A. Magnification: $\times 100$ B. Magnification: $\times 400$
This shows the tip of the patch pipette is in the right side of the figure.

Table 1 Solutions for cell preparations

| Solution | 1st perfusion | 2nd perfusion | Hanks' BSS |
|----------------------------------|---------------|---------------|------------|
| NaCl | 140 | 140 | 140 |
| KCl | 5.4 | 5.4 | 5.4 |
| CaCl ₂ | — | 4.0 | 1.3 |
| MgCl ₂ | — | — | 1.0 |
| MgSO ₄ | — | — | 1.7 |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| HEPES | 9.6 | 9.6 | — |
| Collagenase | — | 0.5 | — |
| EGTA | 0.5 | — | — |
| NaHCO ₃ | 4.2 | 4.2 | 4.2 |
| Glucose | 5.0 | — | 5.0 |
| pH | 7.2 | 7.5 | 7.2 |

Table 2 Solutions for whole cell patch clamp

| External solution | NaCl | KCl | CaCl ₂ | MgSO ₄ | Glucose | HEPES | EGTA |
|------------------------|------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|-------|------|
| Standard external | 142 | 5.4 | 1.8 | 8 | 11 | 8 | — |
| pH was adjusted to 7.3 | | | | | | | |
| Internal solution | KCl | MgCl ₂ | EGTA | HEPES | | | |
| Standard internal | 150 | 1 | — | 8 | | | |

pH was adjusted to 7.3

All values are in millimolar units

Table 3 Solutions for single channel recordings (cell attached patch)

| External solution | NaCl | KCl | CaCl ₂ | EGTA |
|------------------------|------|------|-------------------|------|
| Standard external | 142 | 5.4 | 1.8 | — |
| pH was adjusted to 7.3 | | | | |
| Internal solution | KCl | EGTA | | |
| Standard internal | 150 | — | | |

pH was adjusted to 7.3

All values are in millimolar units

mS で -60 mV から +60 mV まで 10 mV ずつ変化させ測定した。次に細胞外液に K⁺ チャンネル阻害剤であるキニジンを 20 μM 細胞外液に投与し測定を行った。

オリジナル・カレント・トレースより K⁺ 電

流の開口時間および閉口時間ヒストグラムを作成し、単一指数関数曲線にフィットさせた。チャンネルの動力学に関するこの分析では、ヒストグラムの first bin は省いた。なぜなら、first bin はチャンネルの解析不能な短時間の開口または閉口 (<0.2 msec) を表しているからである。

アシドーシスの時の条件としては whole cell patch clamp にて、パルス・プロトコールは保持電位 -40 mV クランプ時間は 1,200 msec で -120 mV から +100 mV まで膜電位を 10 mV ずつ変化させた (図 5-A, 図 6-A)。細胞外液の pH を 7.2 および 6.2 に調整し、さらに pH 6.2 の溶液に K⁺ チャンネル阻害剤であるアパミン (Apamin) を 0.1 μM 投与した 3 種類の溶液を作成しそれぞれについて測定を行な

い電流—電圧 (I—V) 曲線を作成した。次に細胞外液の pH 7.2 の状態で測定した後、細胞外液に K^+ チャンネルオープナーであるニコランジル (Nicorandil) を 1 mM 投与してから測定を行い、電流—電圧曲線を作成した。

そして細胞内液の pH をピペット電極内の溶液を変化させることにより pH 7.2 と pH 6.2 に調整しそれぞれについて測定した。同様に電流—電圧曲線を作成した。

3. 電氣的記録

Hank's BSS に浮遊させた単離肝細胞は、外液を灌流してある記録チェインバーに入れた。膜電流の測定は、標準的内液を満たした時の抵抗が 2.0~4.0 M Ω の電極を使用し、Hamillら¹¹の方法を用い標準 whole cell patch clamp configuration により whole cell あるいは、シングルチャンネル (約 10 M Ω) について行った。ピペット電極はガラス製毛細管 (GC150-10225PCS, Clark Electro-medical Instruments) を、垂直マイクロ電極プラー (PD-83型, 成茂) を用いて、2期的に引いた。電圧クランプ回路のヘッドステージは、ultra-low bias 電流操作 アンプリファイアーにより設定した。ピペット電極は、100 M Ω のフィードバック抵抗器により、マイナス入力に接続した。主として電極先端に生じてきた一連の抵抗に対しては、操作アンプリファイアーのプラス入力に供給されるコマンドに対しシングルである変換電流のフラクシオンを集めることにより代償した。ピペット電極は、記録チェインバーの中の標準外液中で電流がゼロになるよう電極を調整し、標準内液で満たした。(アンプは AXO-PATCH-1D, Axon Instruments)

ピペット電極を細胞表面に接触するように置いた後に、約 20~50 cm H₂O の軽度の吸引により、giga-ohm (G Ω) シールが得られた。ピペット内の液が完全に変化するのを待つために数分間を置いてから、細胞膜を短時間強く吸引して破った。細胞膜が破れたか否かは、(膜) 容量電流の大幅な増加が生じるかどうかで確認した。

電圧および電流の信号は、storage oscilloscope (VC-6025 型, 日立) に表示し、カメラ (F-301 型, NIKON) で写真を撮るか、あるいは記録計 (Thermal Assay Recorder, RTA: 1100M; 日本光電) で記録した。実験は全て、室温下 (20~22°C) で行なった。

結 果

G Ω シール形成直後の cell attached patch 標本から得られたオリジナル・カレント・トレースを示した (図 3-A)。

電流—電圧関係式の勾配から算出した平均シングル・チャンネル・コンダクタンスは、37 \pm 1 pS (3個の patch について測定した。) であり、静止 (膜) 電位でのチャンネル1個あたりの電流の振幅は 2 pA であった。 K^+ チャンネルを選択的に抑制するキニジン 20 μ M を外液に投与した場合に、(膜) 容量電流がまだ存在している間に外向き電流に及ぼす影響を large patch で測定した。

キニジンの投与後約10分後のチャンネルの活動性は完全に抑制されている (図 3-B-b)。

また、オリジナル・カレント・トレース (図 3-A) より K^+ チャンネル電流の開口時間および閉口時間のヒストグラムを作成した。双方のヒストグラムとも、単一指数関数曲線にフィットさせた。開口時間のヒストグラム (図 4-A) からは、 τ_o は 1.75 msec であることが明らかとなり、一方閉口時間のヒストグラムでは、バースト (burst) 期間の τ_o は 0.47 msec であった。

バーストの開口時間および閉口時間のヒストグラムは両者とも、単一指数関数曲線にフィットすることが認められ、チャンネルはバースト期間には一つの開いた状態および一つの閉じた状態を示すことが明らかとなった¹²。

バーストの発生には規則性はみられず、一つのバーストから次のバーストまでの間に休止期があり、この間には膜電流は静止レベルになる (インターバースト・インターバル)。場合によっては、個々のバーストの開始時および終了時

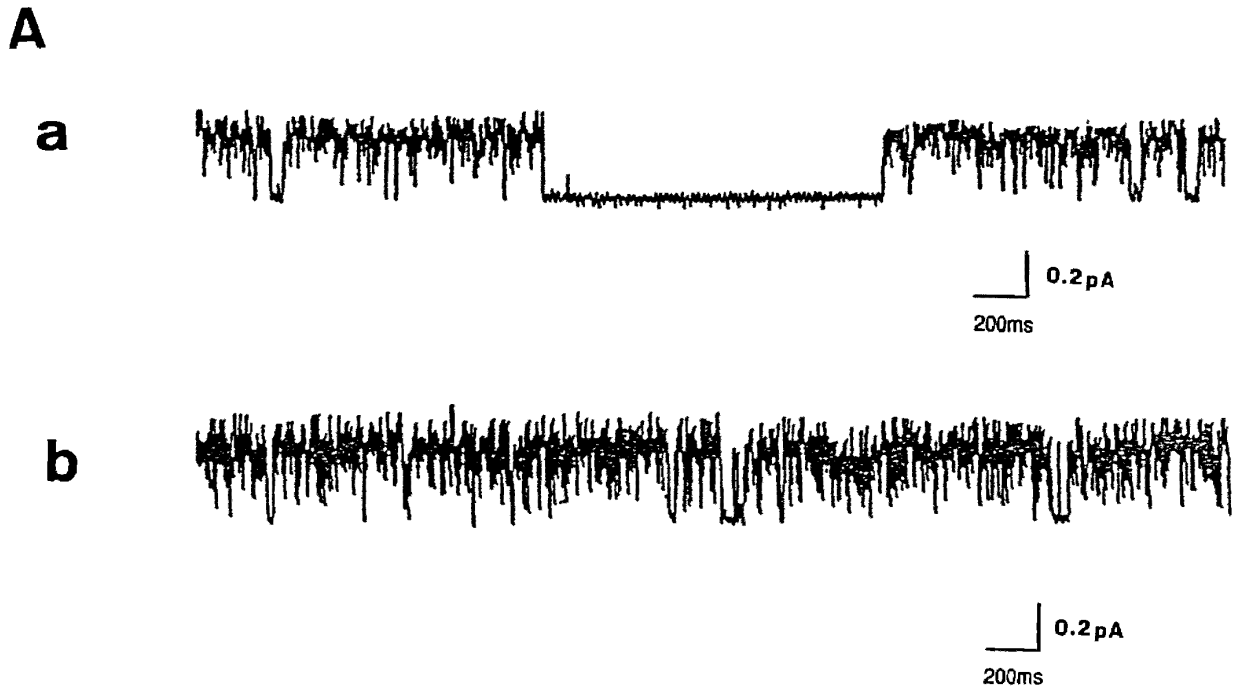


Fig. 3 A. Membrane currents recorded from dissociated guinea pig hepatocytes using the cell attached patch mode of the patch clamp technique. Holding potential was maintained at -30mV , and test pulses of 100 msec duration were applied between -60mV and $+60\text{mV}$ in 10mV steps.
 a: Original current trace at -30mV b: Original current trace at -60mV

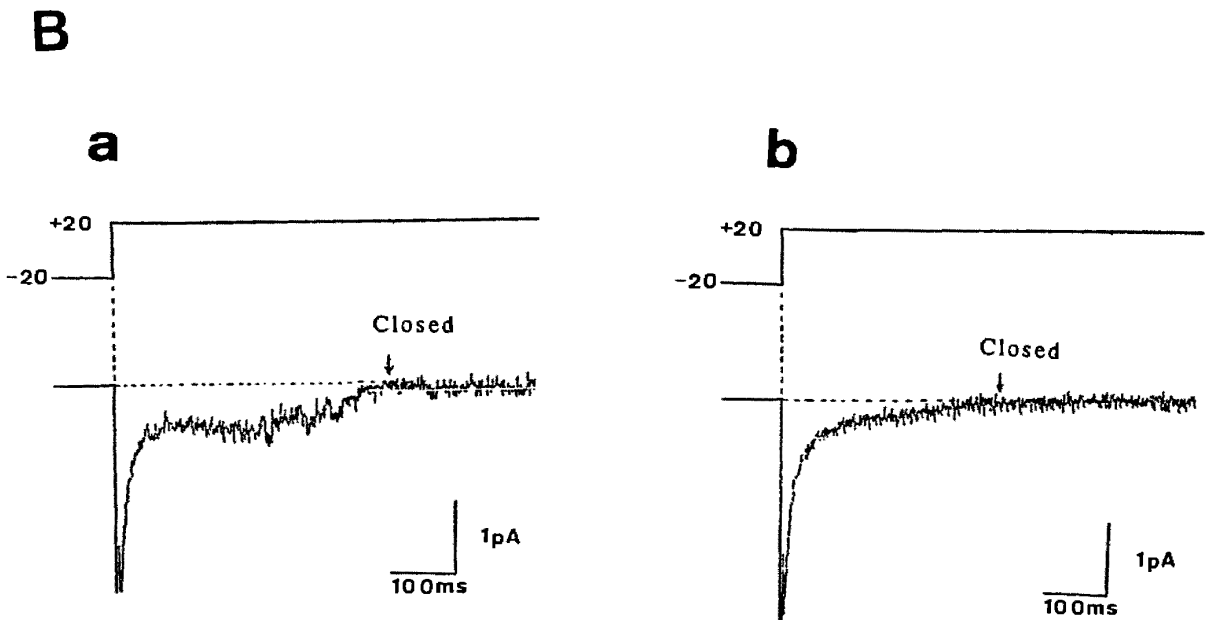


Fig. 3 B. Blocking effect of external application of $20\mu\text{M}$ quinidine on outward current.
 a: control.
 b: A trace obtained after application of quinidine. After 10 minutes, the time dependent component was almost completely suppressed.

を明確に指定することが困難であったりあるいは不可能であったりすることもあった。

K⁺ チャンネル電流の振幅のヒストグラムを

示した (図 4-B)。この K⁺ チャンネル振幅は静止 (膜) 電位において、 1.6pA であることが示唆された。

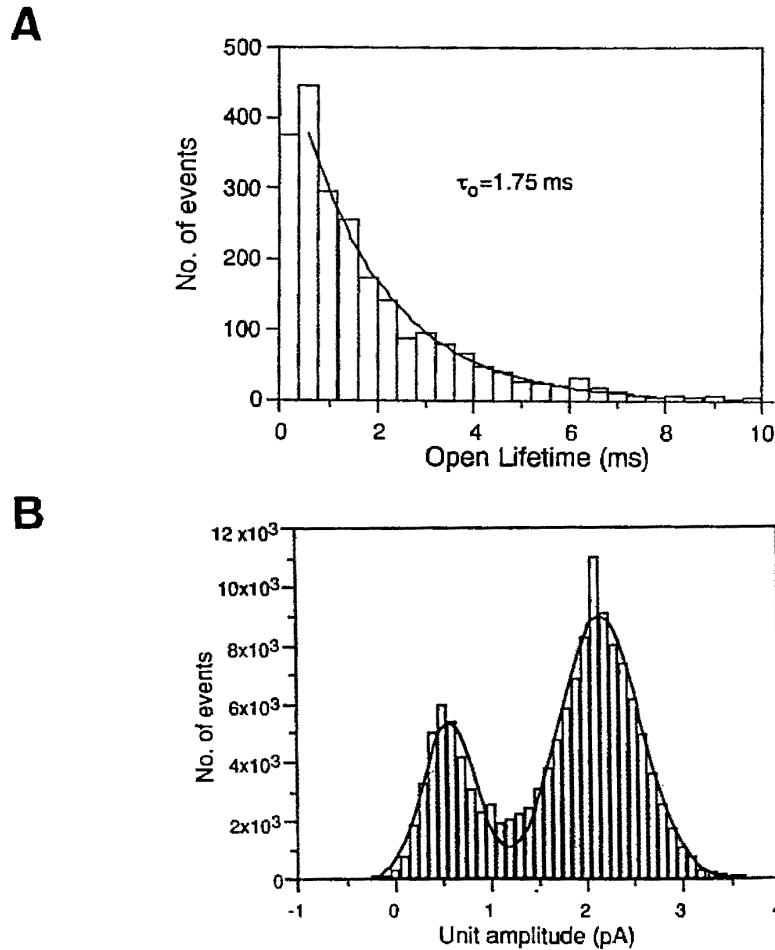


Fig. 4 A. An open time histogram of K⁺ channel in guinea pig hepatocytes.
 B. The amplitude histogram of K⁺ channel currents in guinea pig hepatocytes.
 (1.6 pA at the resting potential level)

Whole cell patch clamp 法で細胞外液を pH 7.2 から 6.2 に変化させた時、外向き電流は抑制されなかったが、K⁺ ネンネル阻害剤であるアパミン¹³ を 0.1 μM 投与すると明らかに外向き電流は抑制された。膜電流のオリジナル・カレント・トレースおよび電流—電圧曲線を示す (図 5-B, C)。

細胞外液の pH を 7.2 のままで、K⁺ チャンネルオプナーであるニコランジル 1 mM を細胞外液に投与した場合に外向き電流に対して及ぼす影響を示した (図 5-D)。K⁺ チャンネルの外向き電流は膜電位依存性に増加した。

さらに whole cell patch clamp 法でピペット内液を pH 7.2 から 6.2 に変化させ、細胞内アシドーシスの影響を検討した。膜電流のオリジナル・カレント・トレースを示す (図 6-

B)。ピペット内液の pH が 6.2 の時は外向き電流は、ほぼ完全に抑制された。それぞれの条件における膜電流の電流—電圧曲線を図に示すと、図 6-C のようなカーブとなった。

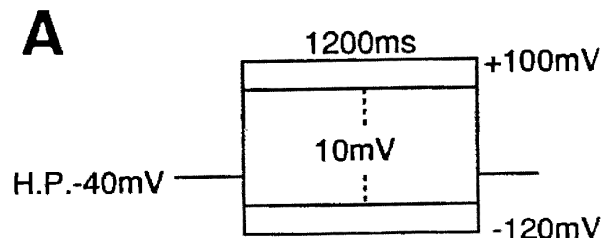


Fig. 5 The effects of extracellular acidification on membrane currents under condition of whole cell patch clamp techniques.
 A. Pulse protocol

B

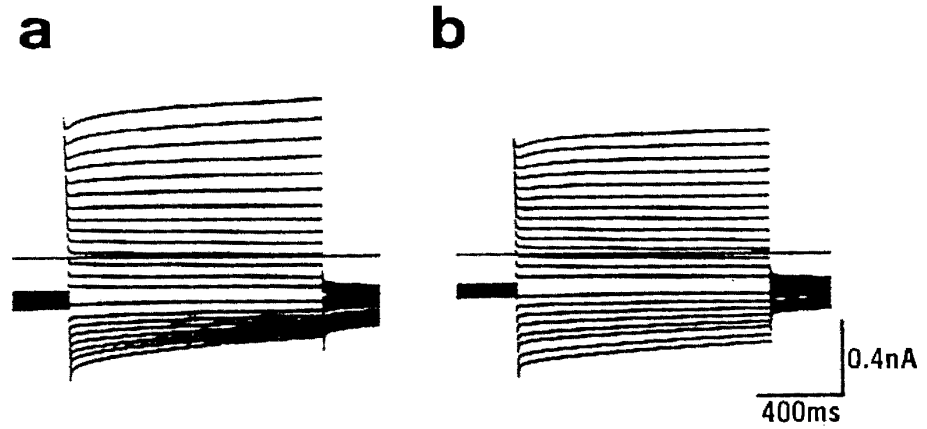


Fig. 5 B. Original current trace of membrane currents
a: control (pHo=7.2) b: apamin 0.1 μ M with pHo=6.2

C

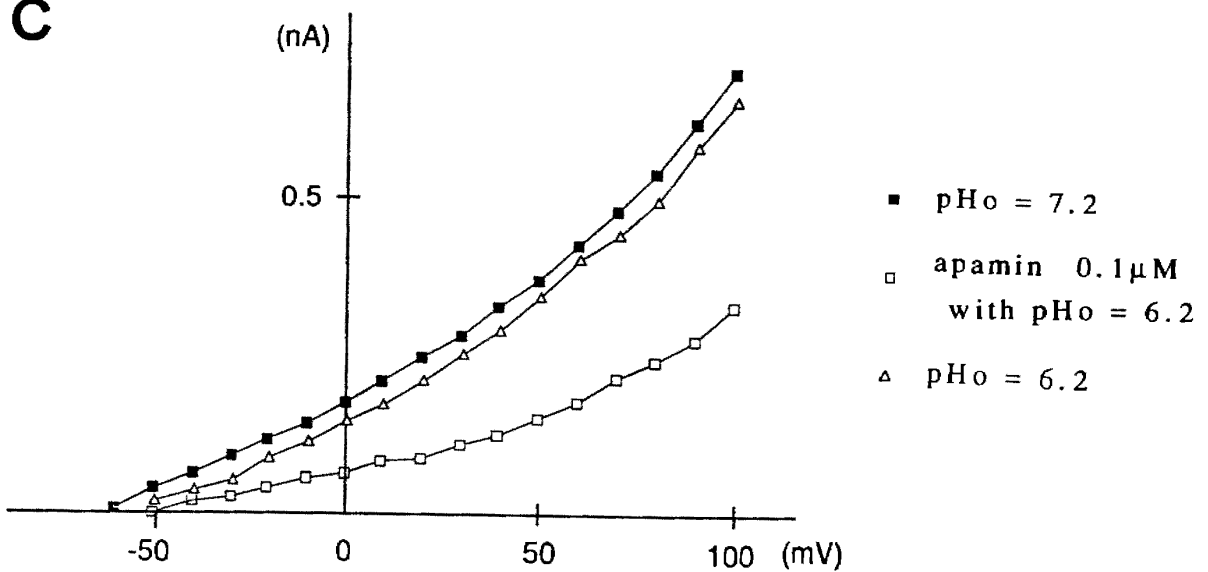


Fig. 5 C. I-V curves, when the pH in the external solution was changed from 7.2 to 6.2

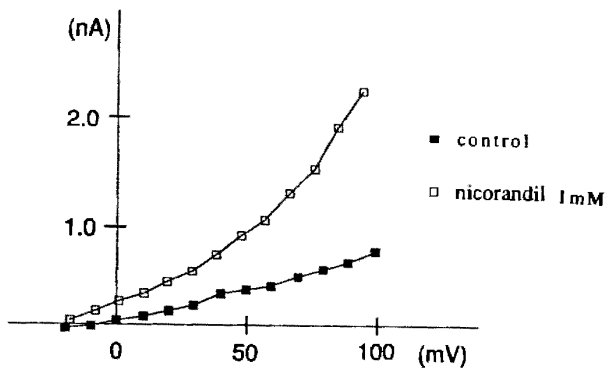


Fig. 5 D. The effects of 1mM nicorandil applied to the external solution on the outward current at pHo=7.2

A

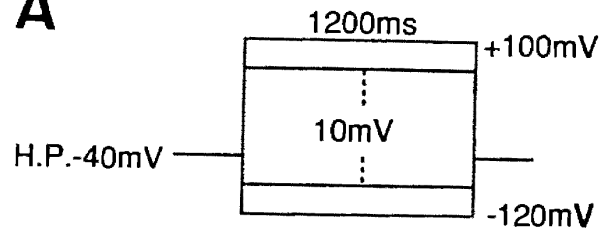


Fig. 6 The effects of intracellular acidification on membrane currents under the conditions of whole cell patch clamp technique.

A. Pulse protocol

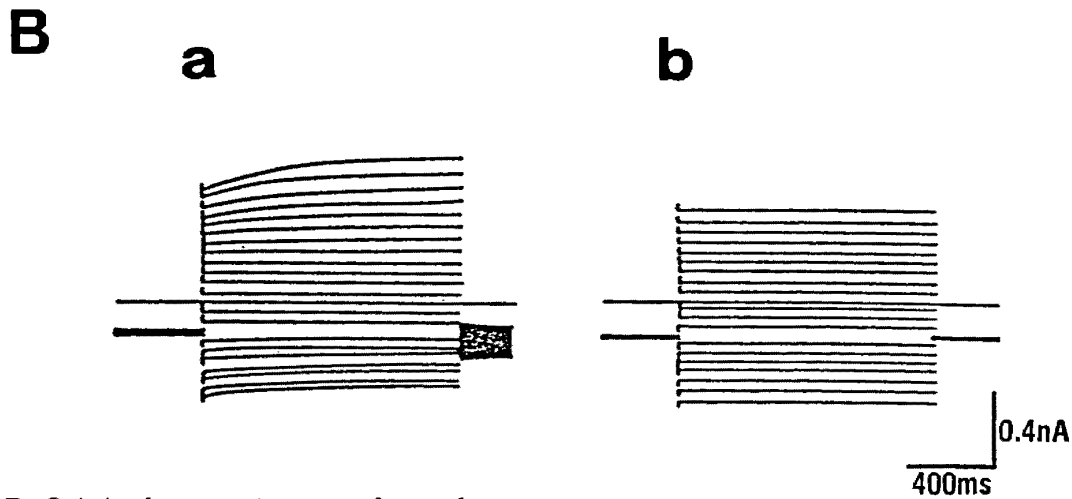


Fig. 6 B. Original current trace of membrane currents
a: control (pHin=7.2) b: pHin=6.2

C

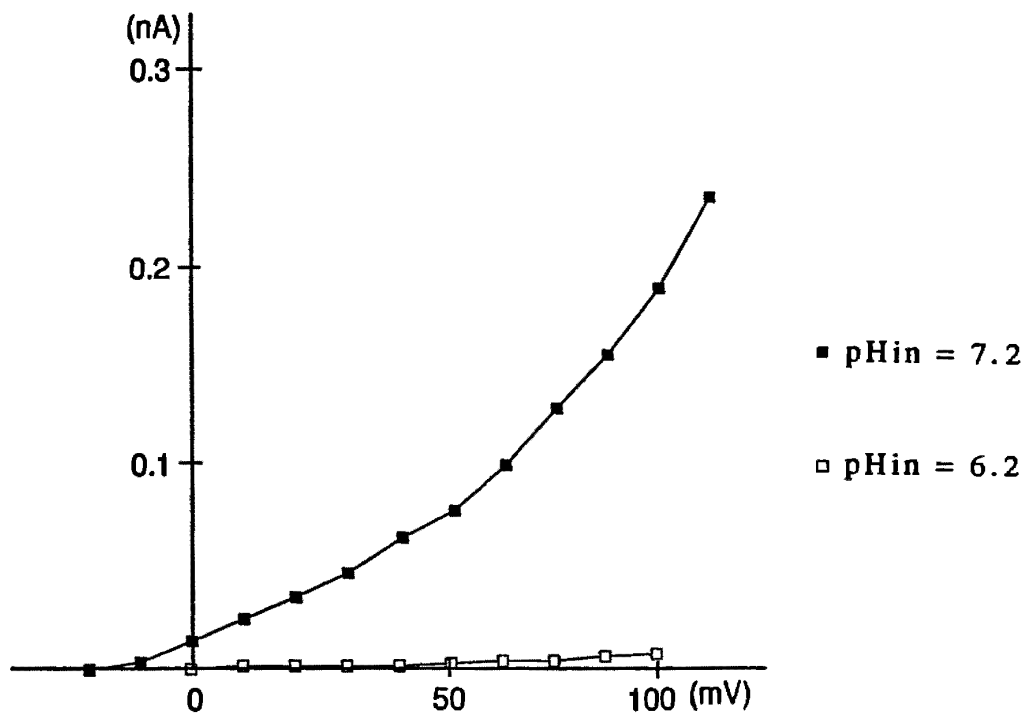


Fig. 6 C. I-V curves, when the pH in the internal solution was changed from 7.2 to 6.2

考 察

肝臓外科手術において繁用される肝血流遮断は必然的に肝細胞の虚血を来す。その虚血により起こる肝細胞障害は、特に肝予備能の低下した症例において致命的となり、肝臓外科における手術成績向上の大きな障壁となっている。

虚血による肝細胞障害は、無酸素下でのATPの消費とミトコンドリアの障害による

ATP産生不足が主因とされる¹⁴⁻¹⁶。すなわち、虚血によって引き起こされた低酸素状態が細胞内ATPレベルを低下させ、細胞膜におけるイオンの能動輸送を阻害する。その結果、ライソゾーム酵素が逸脱し、また血管攣縮と血小板凝集が起こりやすくなるとされている¹⁷⁻¹⁹。

これらのことから、阻血が細胞膜の膜電位、すなわちNernstの平衡電位を規定する細胞内外のイオン分布に影響する可能性が想定され

る。しかし、肝細胞膜の生理的状況下で重要な役割を演じている膜電位の維持に K⁺ チャンネルが中心的な役割を果たす²⁰ ことが知られているが、肝細胞において、虚血が K⁺ チャンネルにどのような影響を及ぼすのかは明らかにされていない。

虚血による細胞障害モデルとしては 1. 低酸素症 (hypoxia), 2. 高カリウム血症 (hyperkalemia), 3. アシドーシスが trias として取り扱われている。したがって、今回は特に虚血時における肝細胞膜 K⁺ チャンネルの活動に対する細胞内外アシドーシスの影響に着目し検討する。

まず、単離したモルモット肝細胞の large patch 測定法で、平均シングルチャンネルのスロープ・コンダクタンスは 37 ± 1 pS (3 個の patch について測定した。) であり、キニジンにより外向き電流が完全に遮断され、チャンネルの (膜) 容量電流のみが観察されるようになった。このことから、この膜電位依存性のイオンチャンネルの主たる担体 (carrier) は K⁺ であることが証明された。

次に、オリジナル・カレント・トレースよりみた肝細胞膜の K⁺ チャンネルの unit amplitude は 1.6 pA であり、さらに K⁺ 電流の開口時間のヒストグラムは単一の指数関数にフィットされた。これらのことから、観察された電流現象は単一のチャンネル (K⁺ チャンネル) の活動によるものであることが判る。この結果は同様にシングルチャンネル記録においても観察された。以上の結果を総合すると、この電圧依存性外向き K⁺ 電流が、肝細胞膜生理機能に重要な役割を果たしていることが推測される²¹⁻²²。

ついで、病態時の細胞膜 K⁺ チャンネルの動きについて検討する。今回の研究で、細胞外液の pH (pHo) を 7.2 から 6.2 に変化させても外向き K⁺ 電流は抑制されなかった。一方、ピペット内液の pH (pHin) を 7.2 から 6.2 に変化させると外向き K⁺ 電流は著明に抑制された。すなわち、細胞外の H⁺ は K⁺ 電流を抑制する

ことはできなかったが、ピペット内液により細胞内に H⁺ を直接作用させることによってこの電流は抑制された。このように H⁺ による効果が細胞内外で異なる現象 (Asymmetrical block with proton)²³ がいかなる機序で生じるのかが問題となる。心臓プルキンエ繊維における実験で、Deitmer らは細胞外 pH が 1 下がることによって pHin が約 0.23 変化すること²⁴ を報告している。今回の著者の実験成績に彼らの結果をあわせると、生理的な細胞では、細胞内は H⁺ buffer によって急激な pH 低下から防御されていると考えられる。言い替えれば、虚血時における細胞外アシドーシスにおいて Na⁺-H⁺ exchange が生理的状況下とは逆に回転して、細胞内に急速な H⁺ の流入がおきても、健康な細胞における pHin は細胞外に比べておよそ 5 分の 1 しか低下しないと推測される。

しかし、虚血時における細胞外のアシドーシスが長時間に及ぶと、不可逆的な変化が K⁺ チャンネル蛋白自体に引き起され、pHin は非生理的な値へと低下する。この様な pHin の急激な低下は肝細胞膜電位の急激な脱分極、急速な Ca²⁺ の流入を来し、結果的に細胞膜の障害を招来する。この細胞膜の障害により、細胞内にさらに Ca²⁺ が蓄積し膜の脱分極を遷延させ、いわゆる malignant cycle に陥り、細胞は致死的な変化を来す²⁵⁻²⁸。また pHin の低下は ATP 依存性の Na⁺-K⁺ pump の抑制をも引き起こすことが知られている²⁹ が、その結果、細胞内 K⁺ はさらに低下し、K⁺ チャンネルの活動性はますます抑制される。

このように長時間にわたる肝血流遮断は、肝細胞の細胞外の pH の低下を引き起こし、さらには細胞内の pH をも低下させる可能性がある。細胞内アシドーシスにより、著者が初めて明らかにしたように、K⁺ チャンネルが障害され、膜電位を生理的な値に維持できなくなる。このような状況下では、致死的な肝細胞障害が起こることが考えられ、肝臓外科手術においては、術前の肝予備能を考慮し、阻血時間を最小限にとどめる必要があると考える。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました、恩師大柳治正教授に深甚の謝意を捧げます。さらに、終始、御助言と御指導を頂いた佐藤良一講師(第1内科学教室)、河村正生講師に対して心から感謝いたします。

文 献

- Raffucci FL. The effects of temporary occlusion of the afferent hepatic circulation in dogs. *Surg* 1953 ; 33 : 342-351.
- 都築俊治, 尾形佳郎, 飯田修平ら. 門脈・肝部脈・下大部脈の腫瘍血栓を有する肝癌の手術. *手術* 1986 ; 40 : 1941-1948.
- Sato R, Hisatome I, Wasserstrom JA, Arentzen CE, Singer DH. Acetylcholine-sensitive potassium channels in human atrial myocytes. *Am J Physiol* 1990 ; 1730-1735.
- Ypey DL, Clapham DE. Development of a delayed outward-rectifying K^+ conductance in cultured mouse peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 3083-3087.
- Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S. A voltage-gated K^+ channel in human T lymphocytes. *J Physiol* 1985 ; 358 : 197-237.
- Schlichter L, Sidell N, Hagiwara S. Potassium channels mediate killing by human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 451-455.
- Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969 ; 43 : 506-520.
- Tarlow DM, Watkins PA, Reed RE, Miller RS, Zwergel EE, Lane MD. Lipogenesis and the synthesis and secretion of very low density lipoprotein by avian liver cells in nonproliferating monolayer culture. *J Cell Biol* 1977 ; 73 : 332-353.
- 小平輝朋, 中村敏一. 肝細胞の初代培養. 岡田善雄編. *実験医学—各論—*. 東京: 羊土社, 1989 ; 1488-1496.
- Seglen PO. Preparation of Isolated Rat Liver Cells. *Methods Cell Biol* 1976 ; 13 : 29-83.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981 ; 391 : 85-100.
- Heyer CB, Lux HD. Control of the delayed outward potassium currents in bursting pacemaker neurones of the snail. *J Physiol* 1976 ; 262 : 349-382.
- Burgess GM, Claret M, Jenkinson DH. Effect of quinine and apamin on the Ca-dependent potassium permeability of mammalian hepatocytes and red cells. *J Physiol* 1981 ; 317 : 67-90.
- 笹瀬 信也. 肝阻血後の機能的・形体的回復過程に関する実験的研究. *日外会誌* 1989 ; 11 : 1899-1905.
- Nishida T, Sibata H, Koseki M, et al. Peroxidative injury of the mitochondrial respiratory chain during reperfusion of hypothermic rat liver. *Biochim, Biophys, Acta* 1987 ; 890 : 82-88.
- Lin SH, Russel WE. Two Ca^{2+} -dependent ATPases in rat liver plasma membrane. *Am J Physiol* 1988 ; 12253-12258.
- 藤井芳郎. 肝切除術後のグルカゴン・インスリン療法におけるラット肝臓核内 poly (ADP-ribose) 合成酵素活性の変動. *日外会誌* 1989 ; 90 : 385-395.
- 西田俊明, 川島康生, 田川邦夫. 虚血障害の分子機作. *代謝* 1987 ; 24 : 379-387.
- Burgess GM, Claret M, Jenkinson DH. Effects of catecholamines, ATP and ionophore A23187 on potassium and calcium movement in isolated hepatocytes. *Nature* 1979 ; 279 : 544-546.
- Meier PJ. Transport polarity of hepatocytes. *Seminars in Liver Disease* 1988 ; 8 : 293-307.
- Marchetti C, Premont RT, Brown AM. A whole-cell and single-channel study of the voltage-dependent outward potassium current in avian hepatocytes. *J Physiol* 1988 ; 91 : 255-274.
- Koumi S, Sato R, Kushikata Y, Horikawa T, Aramaki T, Okumura H. The properties of voltage gated delayed rectifier outward current in guinea pig hepatocytes. *Biophys J* 1990 ; 57 : 315a.
- Blatz AL. Asymmetric proton block of inward rectifier K channels in skeletal muscle. *Pflugers Arch* 1984 ; 401 : 402-407.
- Deitmer JW, Ellis D. Interactions between

- the regulation of the intracellular pH and sodium activity of sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1980 ; 304 : 471-488.
25. Kyte J. Molecular considerations relevant to the mechanism of active transport. *Nature* 1981 ; 292 : 201-204.
26. Sweadner KJ, Goldin SM. Active transport of sodium and potassium ions: Mechanisms, function, and regulation. *N Engl J Med* 1980 ; 302 : 773-783.
27. Petersen OH, Maruyama Y. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 1984 ; 307 : 693-696.
28. 木谷健一. 胆汁分泌の生理と病態. *治療* 1984 ; 66 : 997-1002.
29. Sato R, Noma A, Kurachi Y, Irisawa H. Effects of intracellular acidification on membrane currents in ventricular cells of the guinea pig. *Circ Res* 1985 ; 57 : 553-561.