

成熟マウス心筋細胞の単離
と模擬虚血モデルの作成

西 田 昌 司
別 井 美 穂

Summary

Simulated Ischemia Model of Cardiac Myocytes Isolated from Adult Mice

NISHIDA Masashi, BETSUI Miho

Cultured cells are used for biochemical and physiological investigation of organ system, because they can supply relatively uniform experimental models. Cardiac myocytes have been also isolated and cultured for the use of heart studies. However, adult cardiac myocytes are sensitive to isolation condition and most studies utilized fetal or neonatal cardiac myocytes. Recently, several groups isolated adult cardiac myocytes from canine, rabbit and rat successfully. In this report, we tried to isolate myocytes from adult mice and to establish oxidative stress model of adult mouse myocytes.

Hearts were excised and retro-perfused through aorta by collagenase solution following physiological salt solution containing uncoupler of excitation-contraction coupling, butanedione. Thereafter, hearts were minced in 1–2 mm³ cube and myocytes were isolated by mechanical agitation. Isolated cells were transferred onto culture dishes pre-coated with laminine. Cells were cultured with Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum and bromodeoxyuridine.

Isolated myocytes showed rod shape with striation, typical morphology of adult cardiac myocytes. They attached on laminine-coated dishes and survived over 5 days without proliferation of contaminated non-cardiac myocytes. When cells were cultured more than a week, they changed their shape to spindle type and started spontaneous beating. To mimic oxidative stress to hearts, we added hydrogen peroxide to myocyte cultures. Myocytes released lactate dehydrogenase into culture medium dose and time dependently.

These data suggest that we successfully isolated and cultured cardiac myocytes from adult mouse hearts. They showed similar characteristics to the heart in situ in oxidative stress model by hydrogen peroxide.

序 論

心臓は血液循環を司るポンプ器官として生体のホメオスタシス（恒常性）維持において中心的な役割を担っている。そのために心血管系の研究は、解剖学、生理学、病理学などの広い医学分野において重要な研究領域を占めてきた。従来、心臓の研究は生体位の心臓や摘出心臓、心筋組織片を用い、臓器としての心臓の収縮性や代謝の研究が行われてきた。しかし、心臓が心筋細胞のみならず血管系、間質系など多くの細胞からなる臓器であることから、これらの研究のみによっては純粋に筋肉としての心筋の特性を検討することは困難であった。一方、細胞に対する理解が深まるにつれ、組織から細胞を単離し、均一な細胞集団を用いて臓器の特性を研究する事が可能となった。心臓においても、単離心筋細胞を用いて筋収縮蛋白質の分子運動やイオンチャネルの特性が解析され、また筋細胞のエネルギー供給系としての好氣的・嫌氣的代謝系の研究なども行われている。このように臓器としての心臓の機能を細胞・分子レベルで捉えることにより、現象論のみならず物質論的に心臓の生理や病態生理を解明することが可能になった。

心臓はポンプ器官として高度に分化した臓器であることから、心臓を構成する心筋細胞も特異な表現型を持つ。例えば、①カルシウム存在下に過収縮を起こしやすく容易に細胞が傷害される、②単離後の培養時に通常の培養容器には細胞が接着しにくい、③細胞が増殖能をもたない、などである。これらの表現型を持つために、心筋細胞を培養することは他の臓器由来の細胞に比べ困難とされてきた。一方、これらの表現型は心筋細胞の分化に伴って顕在化する事が明らかとなった。従って心臓から細胞を単離する試みには、これらの形質が明らかになる以前の幼若個体を用いた検討が多かった。実際、ニワトリ胚、ラット新生仔、マウス胎仔など発生早期の幼若な組織からは、蛋白質分解酵素処理により安定な細胞を比較的容易に単離する事が可能であった^{1,2)}。しかし幼若動物由来の心筋細胞は未分化細胞としての性質を持ち、成熟動物の心臓に存在する最終分化した細胞とは明らかに異なる。上述の①～③の成熟心筋細胞の特徴をもたないこと以外にも、ロッド型（長桿形）の形態を取らない、細胞内の収縮蛋白質の配列が未熟で横紋構造を持たない、ペースメーカーの存在なしに自律拍動を開始するなどの成熟心筋とは異なる特徴を持ち、成熟動物の心臓を解析するには十分な細胞モデルとはなり得なかった。

一方、近年、実験動物としてマウスが盛んに用いられている。その原因としては、マウスが脊椎動物の検討に必要な個体構造と実験手技が加えやすいサイズを持つこと、しかしながら大量の飼育が容易な個体サイズであること、また世代交代速度が速いために遺伝子改変動物を作成するのが容易であることなどがあげられる。これらの特徴から、種々の蛋白質を欠失させたノックアウトマウスや過剰発現させたトランスジェニックマウスの系統が作成され、個々の蛋白質の役割をピンポイントで検討する実験が行われている。従って、心筋細胞における各蛋白質の役割を分子レベルで検討するには、遺伝子改変マウスから心筋細胞を単離して検討を進め

る事が必須である。最近になり、ラット、ハムスターなどの成熟動物において心臓をコラーゲン分解酵素によって処理することにより心筋細胞を単離する方法が確立された³⁾。この方法により単離された細胞は、心筋組織に存在する時と同様の形態や微細構造をもち、ペースメーカーの存在により拍動を開始する機能的に分化した細胞である事が明らかになった。従って、成熟個体の心臓を検討するうえで適当なモデルを提供しうるものと考えられる。しかし、成熟マウスから培養心筋細胞を得る試みは種々の技術上の問題点から未だ確立されていない。

近年、日本人の疾病構造が変化しており、生活習慣病、中でも虚血性心疾患の発症頻度が増加している。特に女性では、高齢化の進行と共に死亡総数に占める虚血性心疾患（心筋梗塞、心突然死）の割合が著しく増加している^{4,5)}。虚血性心疾患の原因としては心臓を還流する冠状動脈の動脈硬化による血流減少と動脈硬化巣の破綻による血流の途絶が重要であることが指摘されている。しかし、これらの血管病変とは異なり、心筋細胞自体の虚血に対する耐性、感受性により虚血性障害の進展が規定されることも明らかとなっている^{6,7)}。従って、虚血性心疾患に対する治療法や予防策を検討するには、より生体心に近い表現型を持つ心筋細胞を用いて虚血性心疾患の細胞モデルを作ることが重要である。このような観点からも、成熟マウス心筋細胞の単離・培養系を確立することが出来れば、細胞・分子レベルで虚血性心疾患の病態を解明する優れたモデルを提供しうるものと考えられる。

目 的

本研究では、成熟マウスから心筋細胞を単離し、虚血性心疾患を模擬した細胞障害モデルを作成する事を目的とした。

先行研究より明らかとなった成熟マウスの心筋培養における問題点としては、心臓のサイズが微小であるため単離に用いる機械的灌流が困難である、単离心筋細胞が脆弱でありカルシウム存在下に過収縮を起こし傷害される、培養時に細胞を接着させることが困難である、細胞増殖能がないために混入した間質細胞が増殖して細胞数で心筋細胞を凌駕する、などが挙げられる。従って、今回の検討では上記の問題点に留意して、①成熟マウス心臓の機械的灌流系の作成、②心筋の過収縮抑制による細胞障害の軽減、③細胞外基質による細胞接着の亢進、④ BrdU による間質細胞増殖の抑制の四点を中心に単離法を検討した。

さらに、得られた心筋細胞を長期間培養して経時的な細胞の変化を追跡すると共に、模擬虚血を加えた細胞障害系において、LDH 遊出を指標とした定量的な心筋細胞障害モデルの作成を試みた。

方 法

1. 成熟マウス心筋細胞の単離⁸⁾

標準灌流溶液（133.5mM 塩化ナトリウム、4 mM 塩化カリウム、1.2mM リン酸一ナトリウム・二水和物、1.2mM 硫酸マグネシウム・七水和物、10mM HEPES、11mM D(+)-グルコース、pH7.4）をフィルター滅菌処理後、酸素を10分間通気して灌流液を作成した。C57BL/6J

雄性マウス (SPF グレード、8～9 週令、体重20g) にネンブタール (20 μ l/匹)、ヘパリン (200 μ l/匹) を腹腔内投与した後、開胸して下行大動脈近位端にて心臓を摘出した。実体顕微鏡下で大動脈起始部まで灌流針を挿入し、冠動脈分岐部と無名動脈分岐部の間で結紮した。37 $^{\circ}$ Cに温めた Ca(-) 溶液 (標準灌流液、0.1% 牛アルブミン V 分画 [重量/体積]、10mM 2,3-ブタンジオン-2-オキシム含有) を 2 ml/分の流速で 5 分間灌流後、コラゲナーゼ溶液 (標準灌流液、0.1% 牛アルブミン V 分画 [重量/体積]、25 μ M 塩化カルシウム、14 μ M 塩化マグネシウム・六水和物、185U/ml コラゲナーゼタイプ II [ウォーシントン] 含有) を 2 ml/分で 8～18 分灌流した。灌流後、心臓を心房心室間で切断し、心室側を Ca(+) 溶液 (標準灌流液、40 μ M 塩化カルシウム、22 μ M 塩化マグネシウム・六水和物含有) 中に回収した。以後、無菌的に操作を行った。眼科剪刀を用いて心室を 1～2 mm³ に細片化した後、パスツールピペットで攪拌して心筋細胞を遊離させた。100 μ m のメッシュフィルターで結合組織を取り除いた後、細胞を自然沈殿させた。上清を取り除き、心筋培養液 (DMEM [シグマ]、10% 牛胎仔血清 [体積/体積] [大日本製薬 #21104C]、100U/ml ペニシリン G 溶液、100 μ g/ml ストレプトマイシン含有) を加えて細胞を懸濁させた。心筋細胞を培養皿 (マウスラミニン [ギブコ] 150ng/cm² でプレコーティング) に播種し、炭酸ガスインキュベーターで培養を行った (炭酸ガス濃度 5%, 37 $^{\circ}$ C)。

2. 細胞増殖能の測定

生存細胞のミトコンドリア中に存在するコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素は、テトラゾリウム塩をホルマザン色素に変換する。生存細胞数が増加するとミトコンドリア脱水素酵素の活性が増大してホルマザン色素の生成を増加させることから、ホルマザン色素濃度と代謝活性を持つ細胞数とは直線的な相関を示す。この原理を応用した Premix WST-1 キット (宝酒造) を用いて、細胞増殖能、生存細胞数を測定した。測定の詳細は添付説明書に従った。

3. 細胞障害の測定

毒性物質添加によって障害を受けた細胞内から遊離した乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定し、死細胞数の指標とする。その後、界面活性剤 (Tween20) を添加して残存していた生存細胞を溶解し、遊離した LDH を測定して生細胞数の指標とする。LDH 活性の測定は、LDH による乳酸の酸化反応にジホルマザン合成を共役させて比色定量する MTX “LDH” キット (極東製薬) を用い、添付説明書に従って測定を行った。

4. 試薬

培養、測定用の一般試薬はギブコ、シグマ、和光純薬より購入した。

5. 画像解析

倒立顕微鏡 (ニコン DIAPHOTO200) と画像処理装置 (浜松ホトニクス AQUACOSMOS) に

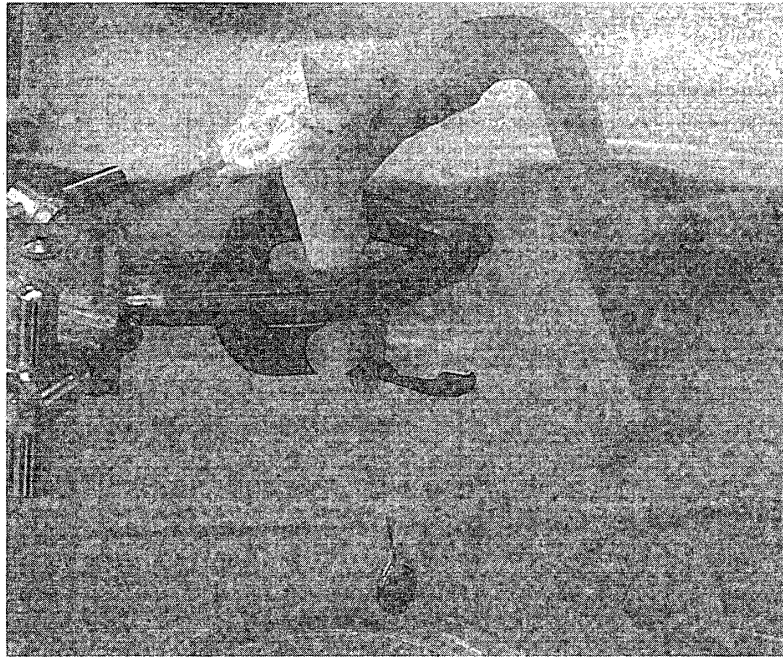


図1 大動脈逆行性灌流系作成

成熟マウスより摘出した心臓の大動脈逆行性灌流。大動脈断端部より灌流針を挿入し、灌流を行った。

て画像を撮影し、解析した。

6. 統計

統計ソフト JSTAT を用いて分散分析を行った後、Scheffe 法により多重比較を行った。

結果

1. マウス灌流心からのカルシウム耐性心筋細胞の単離

マウスより摘出した心臓の経大動脈逆行性灌流系を作成した (図1)。実体顕微鏡下に大動脈断端部より灌流針を挿入し、先端を大動脈起始部まですすめた。縫合糸により腕頭動脈の近位端で結紮を行い、Ca(-)溶液の灌流を開始した。灌流開始後、カニューレシヨンの深さを調整し、心臓表面の冠動脈、および心筋組織からの血液の洗い出しによる色調の変化で良好な冠灌流を確認した。この際、大動脈起始部より灌流針の先端までの距離は平均 1.5 ± 0.5 mmであった。灌流液をコラゲナーゼ溶液に変換すると、心筋細胞間の結合組織に存在するコラーゲンが分解されて心筋細胞間の結合が弱まり、心臓の体積が拡大した。

コラゲナーゼ灌流により拡大した心臓より心室部分を切離し、眼科剪刀を用いCa(+)溶液中にて $1 - 2 \text{ mm}^3$ に細片化した。この際、組織内の結合組織が脆弱化しているために、個々の心筋細胞が顕微鏡下に確認可能であった (図2a)。パストゥールピペットで吸引-排出を繰り返すことにより心筋組織の細片を機械的に攪拌すると、個々の心筋細胞が組織片より遊離してきた。遊離細胞はロッド型で、横紋構造を観察することが可能であった (図2b)。この際、単離心筋細胞の一部は自律的な収縮弛緩を繰り返し、次第に長径が短縮した。最終的には過収縮

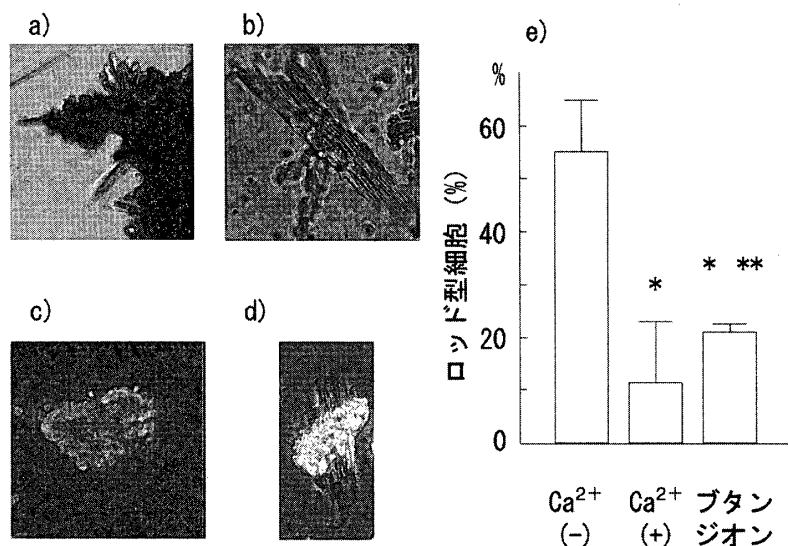


図2 コラーゲン処理による心筋細胞の単離

- a) コラーゲン灌流後の心筋組織。b) 機械的分散により単離されたロッド型心筋細胞。c) 過収縮を起こしたラウンド型細胞。d) 自律拍動を開始した紡錘形細胞。
 e) カルシウム濃度変化、興奮収縮連関を阻害するブタンジオン添加による過収縮細胞の割合の変化。*: $p < 0.05$ vs Ca²⁺(-), **:n.s. vs Ca²⁺(+)

を起こしてラウンド型の傷害された心筋細胞となった (図 2 c)。安定なロッド型的心筋細胞は単離直後には自動拍動を示さなかったが、数日間の培養後に顕微鏡下で観察を行うと多数の細胞が紡錘型の細胞に変化して拍動を開始した (図 2 d)。ラウンド型の過収縮細胞は単離操作により傷害を受けた細胞であり、以後の実験に用いる事が出来ない。単離時の細胞傷害は、カルシウム (Ca²⁺) 濃度変化による筋細胞の過収縮に続発する細胞膜障害と考えられている。従って、心筋の興奮収縮連関を遮断するブタンジオンが安定なロッド型細胞の収率を向上させるか否かを検討した。単離後のロッド型/ラウンド型細胞の比を検算盤で計測すると、灌流液、コラゲナーゼ溶液の全てに Ca²⁺ を含まない条件で心筋細胞を単離した後に Ca²⁺ 不含の培地に懸濁すると、全単离心筋細胞数に対して 50% のロッド型心筋細胞を単離できた。一方、灌流液を Ca²⁺ を含まない条件から徐々に生理的な Ca²⁺ 濃度に戻す条件で単離すると、ロッド型細胞の比率は 10% に減少した。この際に Ca²⁺ 不含灌流液に 10mM ブタンジオンを添加すると、ロッド型細胞は 2 倍に増加した (図 2 e)。

2. 単离心筋細胞の培養系への移行

単离心筋細胞を長期間の培養系に移行させるには培養皿へ接着させることが必要になる。臓器における細胞環境を模擬するために細胞外基質ラミニンを用い、ラミニンによる培養皿コーティングが心筋細胞接着に及ぼす影響を検討した。細胞培養用 96 穴マイクロテストプレートに 0、15、150、1500ng/cm² のラミニン溶液を添加して 1 時間インキュベートする事によりラミニンコーティングを行い、ラミニン溶液を吸引後に心筋培養液に懸濁した単离心筋細胞を 5 × 10⁴/well となるよう播種した。炭酸ガスインキュベーターにて 1 時間培養した後、培養液を交換することにより非接着細胞を除去した。プレート上に残存した生存接着心筋細胞を WST-

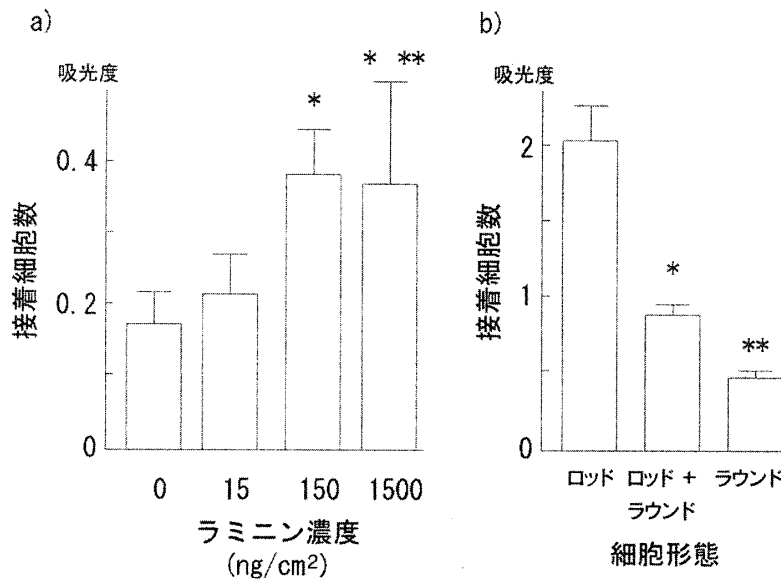


図3 単離心筋細胞の培養系への接着

a) 細胞外基質ラミニンによる培養皿コーティングの効果。

*: $p < 0.05$ vs ラミニン濃度 0 ng/cm^2 、** : n.s. vs ラミニン濃度 150 ng/cm^2

b) ラミニンコーティングによるロッド型細胞の選択的接着。

*: $p < 0.05$ vs ロッド、** : $p < 0.05$ vs ロッド+ラウンド

1を用いて定量すると、前処理したラミニン濃度が上昇するに連れて培養皿に接着する細胞数が増加し、 150 ng/cm^2 のラミニン濃度でプラトーに達した(図3a)。この結果より、 150 ng/cm^2 のラミニン濃度でプレコーティングした培養皿を用いて単離心筋細胞の形態による接着の差を検討した。ロッド型の正常細胞、ラウンド型の障害細胞、両者が混在した単離心筋細胞を培養皿に播種し1時間培養した。非接着細胞を洗浄により除去した後、生存接着心筋細胞をWST-1で定量した。ラウンド型の細胞は培養液交換後に培養皿に接着せず、培養液の交換によりロッド型の細胞を選択的に回収することが可能であった(図3b)。

単離心筋細胞の長期培養系を作成するに際して、心筋組織に存在する他の細胞群の混在が問題となる。心筋細胞は最終分化して増殖能を持たない細胞であるが、線維芽細胞、血管内皮細胞などの間質系の非心筋細胞は増殖能を持つ。従って培養期間が長期になるにつれて混在する非心筋細胞数が心筋細胞数を凌駕してしまう。そこで、DNA合成を阻害し、細胞分裂を抑制する臭化デオキシウリジン(BrdU)を培養液に添加することにより、非心筋細胞の増殖が抑制されるか否かを検討した。ブタンジオン含有の灌流液を用いて心筋細胞を単離した後、BrdU不含とBrdU含有($325 \mu\text{M}$)の心筋培養液にそれぞれ懸濁し、 $3.5 \times 10^4/\text{well}$ で細胞培養用96穴マイクロテストプレートに播種した。炭酸ガスインキュベーターにて培養し、1、3、5日後にWST-1を用いて細胞数を定量した。この際の培養プレートは、 150 ng/cm^2 のラミニンでプレコーティングしたものを使用した。BrdU不含の心筋培養液での培養では、培養日数を重ねるにつれて細胞数の増加が認められた。一方、BrdU含有心筋培養液を用いた培養では、培養後5日目まで細胞数の増加を認めなかった(図4)。

細胞分裂が可能な細胞は、培養細胞を得るための単離操作で障害を受けても、分裂により増殖し細胞数を回復する事が可能である。しかし、心筋細胞は細胞分裂をしないため一度障害を

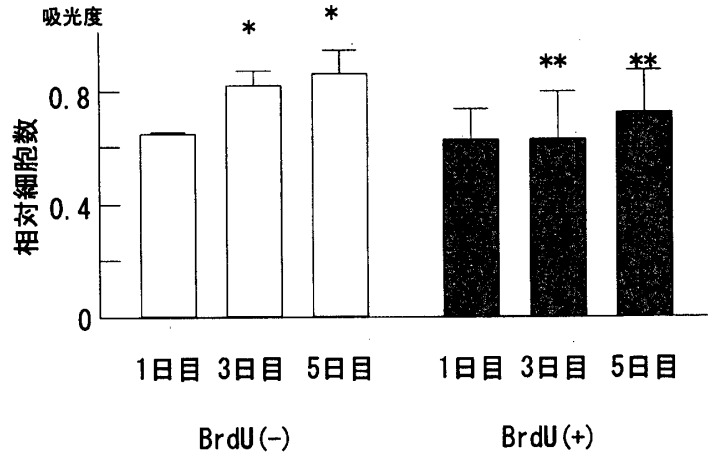


図4 成熟マウス心筋細胞の培養における BrdU の増殖抑制効果
*: $p < 0.05$ vs 1日目、**: n.s. vs 1日目

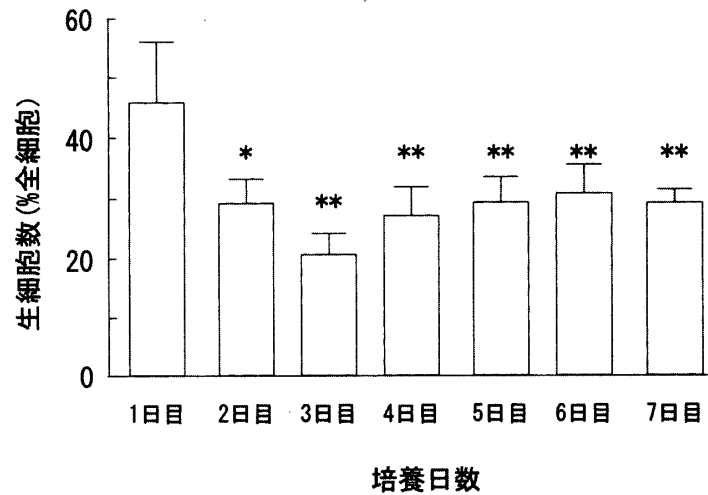


図5 成熟マウス培養心筋細胞の生存率の経時変化
*: $p < 0.05$ vs 1日目、**: n.s. vs 2日目

受けた細胞は細胞数を増加させて回復することは不可能である。従って、障害の少ない心筋細胞を単離し、長期間にわたって維持、培養することが必要となる。そこでラミニンでコートした培養皿上の正常心筋細胞数を長期にわたって検討した。BrdU 含有心筋培養液に懸濁した単離心筋細胞を 1×10^4 または 2×10^4 /well となるようにラミニンでプレコートした細胞培養用 96 穴マイクロテストプレートに播種した。炭酸ガスインキュベーターで 1 時間培養後（培養 0 日）、7 日目まで継時的に上清（死細胞 LDH 用）を採取した。上清と同量の 0.2% Tween20 を添加し 20 分後に回収した（生細胞 LDH 用）。回収した試料中の LDH を定量すると、培養後 1 日から 2 日にかけて生細胞数は半減した。しかし、以後、7 日目に至るまで、全細胞の 30% は安定した培養が可能であった（図 5）。この時点で顕微鏡下に培養心筋細胞を観察すると、図 2 d のようにロッド型細胞から紡錘型細胞に変化し、安定した自律拍動を開始していた。

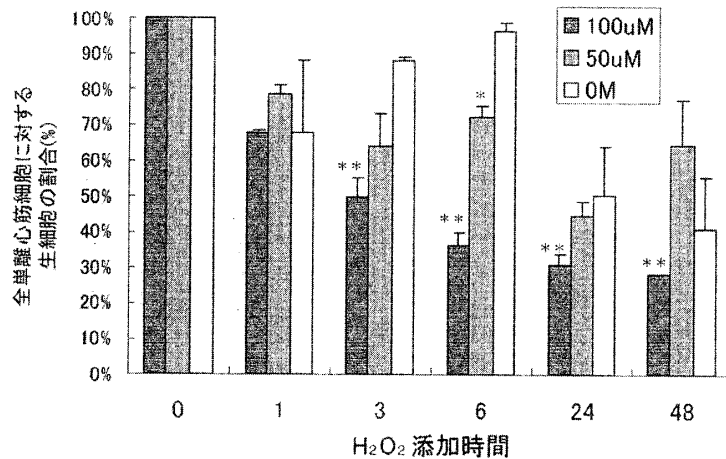


図6 過酸化水素添加による成熟マウス培養心筋細胞の細胞障害
 : p<0.01 vs 0時間、H₂O₂最終濃度100mM、: p<0.05 vs 6時間、H₂O₂最終濃度0M

3. 培養心筋細胞を用いた模擬心筋虚血モデルの作成

虚血性心疾患の細胞モデルを作成するため、虚血や虚血-再還流時に発生する過酸化水素(H₂O₂)を用いて、模擬心筋虚血(酸化ストレス負荷)モデルを作成し、細胞障害を検討した。BrdU含有心筋培養液に懸濁した単離心筋細胞を1×10⁴または2×10⁴/wellとなるようにラミニンでプレコートした細胞培養用96穴マイクロテストプレートに播種した。炭酸ガスインキュベーターで18時間培養した後にメディウムを交換し、well当たりの最終濃度が0μM, 50μM, 100μMとなるようH₂O₂を添加した。0、1、3、6、12、24、48時間後にそれぞれ上清(死細胞LDH用)を採取した。その後に上清と同量の0.2%Tween20を添加し、20分後に回収した(生細胞LDH用)。回収した試料中のLDHを定量し、H₂O₂添加後0時間での生細胞数を100%として生細胞数を規格化した。H₂O₂濃度100μMでは添加後の時間に比例して生細胞は減少した。一方、H₂O₂濃度50μMでは時間依存性に生細胞数の減少を認めたと、H₂O₂添加48時間以降は非心筋細胞(線維芽細胞)の増殖のために細胞の増加が認められた(図6)。また、300μM以上のH₂O₂濃度では添加した直後に生細胞は20%となり、以後一定であった(データ提示せず)。

考 察

1. マウス灌流心の作成

マウス心臓の灌流系を作成するにあたり、良好な灌流を得るための条件としてカニューレシヨンの深さと結紮部位が重要であった。灌流針の留置部位は、実体顕微鏡下に大動脈遠位断端から針先を挿入し、左鎖下動脈、左頸動脈、無名動脈の分枝を確認し、さらに心房に近い位置まで針先をすすめた。結紮は無名動脈より近位で結紮することにより、灌流溶液が左鎖骨下動脈、左頸動脈、無名動脈より漏出することなく冠動脈を逆行性に灌流することが可能であった。また、灌流が冠動脈起始部よりさらに近位まで達すると、針先で冠動脈を閉塞してしまうために心筋の灌流がなされず虚血状態となり、心臓が部分的に縮小・硬化し、暗褐色に変化するこ

とが認められた。しかし、結紮後でも早期に灌流針の先端を後退させることにより良好な心筋灌流が得られれば、心筋組織は再度膨化し色調も回復した。

2. Ca^{2+} 耐性心筋細胞の単離

成熟動物心由来の心筋細胞は、横紋構造を持つロッド型細胞であることが報告されている⁹⁾。心室筋から得られる単離ロッド型細胞は、i) 生理的濃度の Ca^{2+} 存在下に電気刺激を与えたときのみ拍動する無傷細胞、ii) 生理的濃度を含む種々の濃度の Ca^{2+} 存在下、波動状に自動収縮弛緩する軽度の膜損傷細胞、iii) 調整時、EGTA、サポニン処理をした細胞で、pCa 6 ~ 8 の液中で自律拍動する化学的 skinned cell、iv) 顕微鏡下に細胞膜を剥離した細胞で自律拍動する機械的 skinned cell、の4種類が考えられる。一方で細胞膜が損傷し細胞内微細構造が破壊されているラウンド型的心筋細胞も観察される。これらの細胞は収縮細胞としての心筋細胞の構造・機能上の特徴から、 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴って過収縮を起こし細胞膜の障害による膜胞（プレブ）を持った障害細胞に変化したものである。

心筋細胞単離においては、細胞外マトリックスのコラーゲンを分解するためのコラゲナーゼ灌流とともに Ca^{2+} 不含溶液の灌流を行う事が必要となる。 Ca^{2+} 不含液の灌流による細胞質の Ca^{2+} 濃度の低下に伴って膜に結合している Ca^{2+} が減少し、心筋細胞が長軸方向で隣りの細胞と接する末端部分である介在板に剥離間隙を生じる。その結果、心筋細胞同士の結合が弱くなり、個々の心筋細胞を分離することが可能となる。しかし、このような膜の組織学的変化は Ca^{2+} の透過性を高めるため、生理的な濃度の Ca^{2+} 含有溶液に戻しての処理に際して Ca^{2+} 流入が促進されると考えられている。急激な Ca^{2+} 流入は収縮バンド形成、ミトコンドリアの膨潤、細胞膜の崩壊、細胞外物質の流入などを起こし、心筋細胞はラウンド型細胞となる。このように心筋組織を Ca^{2+} を含まない溶液で短時間処理した後、再びもとの正常な濃度の Ca^{2+} を含む溶液に戻すと心筋に非可逆的な形態変性が生じることを、カルシウムパラドックスという¹⁰⁾。カルシウムパラドックスは、i) Ca^{2+} 再灌流に伴う心筋細胞への Ca^{2+} 大量流入と Ca^{2+} 過剰負荷、ii) 細胞膜破壊、筋原線維拘縮、ミトコンドリアの膨化と Ca^{2+} 沈着などに示される心筋細胞微細構築の爆発的破壊、iii) 高エネルギーリン酸化合物の消耗、iv) 細胞内成分（ミオグロビンなどの蛋白質）の細胞外逸脱を特徴とする。今回、 Ca^{2+} 濃度上昇による電気イオンの変化と収縮蛋白質の収縮との連動を阻害するブタンジオンを添加して、マウス心筋細胞の過収縮を阻止できるか否かを検討した。 Ca^{2+} 不含灌流溶液中へのブタンジオンの添加により、心筋細胞の過収縮を抑制することができ、ロッド型細胞の収率を向上させる事が可能であった。

3. 心筋細胞の培養系への移行

ロッド型的心筋細胞は構造上の特徴から細胞膜の一点で培養皿に接着し、他の接着細胞のように細胞面での強固な接着が困難である。よって安定した接着が得られない場合は長期の培養系への移行は困難となる。そこで、細胞外基質（細胞外マトリックス）を使い、接着率を上昇させるよう試みた。細胞外基質は細胞が分化を遂げて正常な機能を営むために重要な機能を担

っている。線維成分、基質および基底膜の三つの区分にわけられ、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの蛋白質からなる。今回はラミニンを使用し、心筋細胞の接着の促進を試みた。ラミニンは結合組織では線維性コラーゲンと細胞との連結役を果たし、上皮細胞では細胞膜にある細胞膜貫通受容体蛋白質であるインテグリン分子の接着部位として働く。培養系においても培養皿の基質に接着したラミニンが他端で細胞と接着し、細胞を培養皿に固着させると考えられる。培地のラミニンの最終濃度を変えて心筋細胞の接着を吸光度により測定すると、ラミニンの添加により接着率が上昇した。特に最終濃度 $150\text{ng}/\text{cm}^2$ のラミニンはロッド型細胞を選択的に接着させ、正常成熟心筋細胞の培養に最も適した条件であった。

心筋細胞を培養する際には、非心筋細胞である間質細胞の混入および増殖を最小限に抑えることが重要である。間質細胞が混入し増殖することにより、細胞間相互作用により培養心筋細胞の生理学的・生化学的特性に影響を与える。単離直後の細胞群では心筋細胞が多数を占め、顕微鏡下で他の細胞の混入を認めることは困難である。しかし長期の培養を試みると、間質細胞など増殖する細胞が多数を占めるようになる。そこで、BrdUを培養液に加えることにより細胞の選択を試みた。BrdUはDNA合成の際にDNAポリヌクレオチド鎖に組み込まれるが、ウリジンに臭素が結合しているために正常なDNA複製がなされず、間質細胞の増殖を抑制することができる。心筋細胞は細胞分裂を起こさないため、BrdU添加によるDNA合成の阻害は細胞の形質に影響を与えない。本研究においては、培地にBrdUを添加することによって間質細胞の増殖を抑制できた。今回の検討でBrdU非添加群において顕著な細胞増殖が見られないのは、心筋細胞と同時に単離された間質細胞の絶対数が少なく、5日間の観察期間で未だ対数増殖期に至っていないためと考えられる。

4. 心筋細胞の長期培養

心筋細胞からのLDH遊出の測定では、単離直後から2日目にかけて細胞から急激にLDHが遊出し、3日目以降は徐々に減少した。これは、単離による細胞膜障害のために0日目から2日目の間で生存細胞数は減少するが、それ以後は生き残った細胞が細胞死を起こさず30%前後の割合で生存していることを示している。培養後3日目から徐々に生存細胞率が上昇しているが、これには二つの理由が考えられる。第一は心筋細胞と同時に単離した間質細胞が増殖しているためである。間質細胞の増殖を抑制するために培地にBrdUを添加しているが、内因性のウリジンを用いて増殖を続ける間質細胞もわずかに存在する。第二には培養後早期に細胞から培地中に遊出したLDHは活性が低下するため、見かけのLDH活性が下がり細胞障害を少なく評価してしまうことが考えられる。今回の単離・培養法では、単離後2日目までに多くの細胞が障害を受けるため絶対数としての生存細胞数は少ないが、残存した細胞は長期培養に移行できることが示唆される。

培養一週間目に心筋細胞を観察すると、ロッド型心筋細胞は紡錘型に変化するとともに自律拍動を開始していた。成熟個体の心筋組織中の心筋細胞は、ペースメーカーからの刺激を受けない場合は静止したロッド型の細胞として存在する。一方、新生仔、または胎仔心臓から単離

した幼若心筋細胞は、不整型をとるとともに自律拍動を示すことが報告されている¹¹⁾。従って単離細胞を長期間培養した後の形態変化は、成熟心臓由来の心筋細胞が幼若化、または脱分化した可能性を示唆する。培養液中には心筋細胞の生存因子として10%牛胎仔血清を添加しており、血清中の増殖因子がこれらの脱分化をもたらした可能性が考えられる。現時点では心筋細胞の無血清培養法は確立されておらず、成熟心筋の表現型を保ったままで一週間以上の長期培養を行うにはさらに改良を加える必要がある。

5. 成熟心筋細胞の培養における問題点

以上のような細胞単離時の様々な工夫により、Ca²⁺耐性を持つロッド型成熟心筋細胞を接着培養し、一週間まで長期培養する事が可能であった。一方、今回得られた心筋細胞の正常性の評価に関しては、さらに解決すべき問題がある。すなわち、形態学的に確認したロッド型細胞が必ずしも障害を受けていない細胞とは限らず、また、WST-1 反応キットを用いてミトコンドリア活性で評価した生細胞もすべての細胞機能が保たれているとは断定できない。単離直後にこれらの指標を用いて正常細胞と判断して同一の密度で播種した細胞も、単離に用いたマウス間でのバッチの差が大きい。18時間後には異なる量のLDHを遊出することを見出しており(データ提示せず)、単離時にそれぞれ異なった細胞障害をこうむっていた事が推測される。現時点では、このような細胞障害を与える原因やそれを防ぐ方法に関してはいまだ結論を得られていない。従来、単離成熟細胞を用いた検討は、顕微鏡下の単一細胞を対象とした生理学的研究が行われており、バッチ間の差があまり問題となっていなかった。しかし今回の検討のように細胞集団を用いた生化学的検討で、なおかつ過酸化水素負荷などの侵襲を加えた系においては、バッチ間での微細な膜障害の差が大きな影響を与える可能性がある。この系でさらに種々の薬剤の効果を検討したところ、細胞の生存率や反応性に大きなバリエーションを生じ、安定した結果を得ることが出来なかった。

心臓は分化した複数の細胞種が集合してそれぞれの機能を分担し、その総和としてひとつの臓器としての機能を発現している。従って、各部位の細胞を単離して個々の細胞集団の働きを調べ、次に全体として細胞群が調和して発揮する機能を再構成して解明することが重要な研究手段となる。その第一歩として細胞障害を受けていないロッド型心筋細胞を高純度で単離し、心筋細胞の表現型が常に一定した状態で長期に培養できるようにすることが重要な課題となる。今回の検討の過程を踏まえ、初代単離培養系作成に伴う技術的問題点を今後さらに改善する必要がある。

参考文献

- 1) Moscona, A. 1952 Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.*, **3**, 535-539.
- 2) 永井誠, 有野亨1998「心筋細胞培養法(ラット新生児心筋細胞)」続心臓代謝実験法 六法出版社 274

- 3) Kono, T. 1969 Roles of collagenase and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta.*, **178**, 400-402.
- 4) Lerner, D. J., Kannel, W. B. 1986 Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes : A 26 year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J*, **111**, 383-390.
- 5) 上田一雄 1994 「循環器疾患の危険因子, 本邦における特徴とその変遷」日循協誌 **29**, 57-67.
- 6) Yamashita, N., Nishida, M., Hoshida, S., et al. 1994 Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *J Clin Invest*, **94**, 2193-2199.
- 7) Yamashita, N., Nishida, M., Hoshida, S., et al. 1997 The protective effect of exercise on acute myocardial infarction in rat. *J Am Coll Cardiol*, **29** (suppl), A 270.
- 8) Wolska, B. M., Salaro, R. J. 1996 Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. *Am J Physiol*, **271** (3 Pt 2), H 1250-1255.
- 9) 五島喜与太, 若林繁夫, 金子洋之, 増田彰 1985 「培養心筋からみた心筋障害」心筋障害をめぐる問題点 医歯薬出版130-149.
- 10) Zimmerman, A. N. E., Hulsmann, W. C. 1966 Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature*, **211**, 646-647
- 11) 五島喜与太 1987 機能細胞の分離と培養 丸善 340

(原稿受理 2003年4月11日)