

単離モルモット心筋細胞の作成方法とその電氣的活動

井上 省三, 松村 幹郎*, 田中 淳二, 田村 敬二, 豊田 弘子*,
奥山 博司*, 長谷川浩一, 鼠尾 祥三, 沢山 俊民

単離心筋細胞は様々な実験に用いられているが詳細な作成方法について記載したものは少ない。そこで、単離心筋細胞の作成手技について述べ、さらに得られた細胞の活動電位・短縮量を測定し、得られた細胞が電気生理学的実験の対象として適当か否かを検討した。

I. 単離細胞の採取率に関与する因子

[方法] 単離された細胞は、杆状 (rod shape) を示し明瞭な横紋が認められた。一部は球状 (round shape) で凹凸のある不規則な形を示した。横紋の明瞭な杆状の細胞が全細胞の中に占める割合を採取率とし、採取率を向上させるためのいくつかの条件を検討した。[成績] ①灌流液の温度は、37°Cで最も採取率が高かった。②灌流液のpHは7.4が至適であった。③collagenase溶液の濃度と灌流時間は、Yakult社製collagenaseを40U/mlの濃度で3~5分間が至適であった。④albumin添加の有無では差はなかった。⑤モルモットの週齢では差はなかった。⑥Milli-Qで作成した18M Ω 以上の水を利用すると採取率は向上し一定した。

II. 単離心筋細胞の性質

[方法] 活動電位は細胞内微小電極から1Hzで通電刺激し導出し、短縮は細胞外刺激を与え、細胞端の動きを顕微鏡ビデオカメラで分析した。[成績] 静止電位は-86mV、オーバーシュートは+30mV、活動電位の頂点からamplitudeが25%に減衰した時点の活動電位幅は平均280msecであり、自由短縮中の短縮率は8%であった。

[総括] 心筋細胞の単離法の手技について詳細に述べた。この際、より高い採取率を得ることを目的として、採取率に影響する因子について検討した。その結果、灌流液は温度が37°CでpHが7.4において採取率が高かった。しかしcollagenase溶液のalbumin添加や、モルモットの週齢が採取率に及ぼす影響は少なかった。その他の因子では水の純度の影響が大きかった。採取されたrod-shaped cellの活動電位・短縮量はともに細胞集団の試料や単離細胞について知られている値と同様であり、従って電気生理学的実験の対象として適当であることが判明した。

(平成4年5月7日採用)

A Method for Isolation of Guinea Pig Cardiac Myocytes and Their Electrical Activities

Shozo Inoue, Moto Matsumura*, Junji Tanaka, Keiji Tamura,
Hiroko Toyota*, Hiroshi Okuyama*, Kouichi Hasegawa, Shoso Nezu
and Toshitami Sawayama

川崎医科大学 内科循環器部門
〒701-01 倉敷市松島577

Division of Cardiology, Department of Medicine, Kawasaki
Medical School : 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama,
701-01 Japan
Department of Physiology

* 同 生理学教室

The conditions for preparing the well responding isolated single myocytes from guinea pig ventricles were examined. The ratio of rod-shaped cells to total ones was used as an index for obtaining preparations successfully. To use pure milli-pore filtered water was essential. Treatment time and concentration of collagenase were also very important. Living cells were more plentifully obtained during Langendorff's perfusion with the solutions of 37°C than 25, 30 or 40°C. Optimum pH of perfusing solution was 7.4, compared with pH of 7.0 or 8.0. It was not so important whether or not albumin was contained in the solution. Differences among ages of animals between 3 and 16 weeks were not taken part in this ratio. When the cells were electrically stimulated, they exhibited full-sized action potential with the amplitude of 110 mV and duration of 280 msec measured at 25% depolarized level. The amount of shortening was around 8% of the resting length. This method proved to be suitable for electrophysiological experiments. (Accepted on May 7, 1992) *Kawasaki Igakkaishi* 18(2): 81-86, 1992

Key Words ① Preparation for single cells ② Isolated cardiac myocytes

はじめに

心臓は神経・血管を含む性質の異なる100億ないし200億個の細胞から形成されている。この複雑な構築の組織で生じる現象をより単純な実験モデルで解明するため、単一の細胞を分離しようとする試みがなされるようになり、それは単離心筋細胞と呼ばれている。単離心筋細胞は、細胞相互の影響や神経系の影響がなく、薬剤の拡散も容易で、細胞間隙でのイオンの蓄積や濃縮・希釈を避けることができる。これらの利点のために現在単離心筋細胞は patch-clamp 法や Ca^{2+} transient の測定など様々な実験に用いられている。この興奮性を保持した単離心筋細胞の採取について Powell and Twist¹⁾ や Isenberg and Klöckner²⁾ 等の報告があるが、詳細な手技については記載したものは少ない。³⁾

そこで我々は、単離心筋細胞作成の詳細な手技について述べる。また手技以外の因子によって細胞の採取率が大きく異なるため、より高い採取率を得ることを目的として、採取率に影響する因子を検討した。さらに得られた細胞の活動電位・短縮量を測定し、電気生理学的実験の対象として適当か否かを検討した。

作成の手技

① 3~16週齢、体重250~650gのハートレー系モルモットを pentobarbital Na (50 mg/kg i. p.) で麻酔を行う。②前頸部を切開し甲状腺を上方に反転し気管を露出する。切開した気管にカニューレを挿入し、人工呼吸を開始する。一回換気量は2 ml、呼吸数は毎分80回とする。③胸部の皮膚を剣状突起部から上方および側方に切開し、前胸部の筋肉を露出する。④大胸筋を切断し、外側に剝離する。⑤胸骨を第2肋間部で挫滅後、内胸動脈に注意しながら切断し、さらに肋骨の上縁にそって腋窩まで開胸する。⑥大動脈前面の胸腺・脂肪組織をツッペルガーゼを用いて取り除き、心外膜を切開する。⑦大動脈と肺動脈の間から大動脈外側に糸を2本通す。⑧近位側の糸で大動脈を2重に巻き、軽く結び目を作成。近位・遠位両側の糸をもちあげ、肺動脈・大動脈の順に切開し、大動脈にカニューレを逆行性に挿入し、近位の糸で強く結紮する。この際カニューレ先端が大動脈弁の2~3 mm 遠位に位置するよう調節する。⁴⁾ 心臓を切り出し、Langendorff 法により逆行性に心室を灌流する。組成の異なる液を灌流するための液槽の配列を

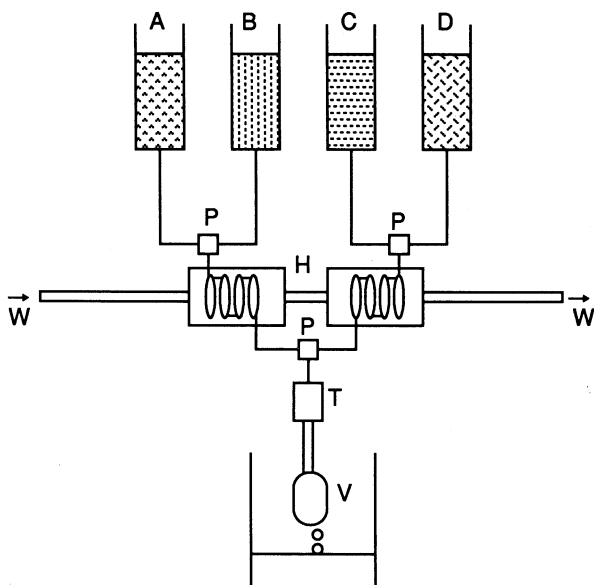


Fig. 1. Schematic diagram of Langendorff's perfusion apparatus with various solutions.

A: Tyrode solution B: Ca^{2+} -free Tyrode solution C: collagenase solution D: KB medium P: release valve W: circulating bath (37°C) H: heat exchanger T: air trap V: isolated heart

Table 1. Composition of the solutions

	Tyrode 液	Ca^{2+} -free Tyrode 液
NaCl	136.0 mM	136.0
KCl	5.4	5.4
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0	1.0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.33	0.33
CaCl_2	1.8	—
glucose	10.0	10.0
HEPES	5.0	5.0

(pH=7.4, adjusted by NaOH)

collagenase 溶液

Ca^{2+} -free Tyrode 液	50 ml
collagenase (Yakult)	2000 U

KB 溶液

KOH	70.0 mM
l-glutamic acid	50.0
KCl	40.0
taurin	20.0
KH_2PO_4	20.0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.0
glucose	10.0
HEPES	10.0
EGTA	0.5

(pH=7.4, adjusted by KOH)

Figure 1 に示す。⑨大動脈カニューレーションと同時に摂氏 37°C にコントロールした Tyrode 液を 1 分間灌流し血液を洗い流す。⑩つづいて灌流液を Ca^{2+} -free Tyrode 液に切り換え 4 分間灌流する。灌流後 1 分以内に心拍動は停止する。⑪次に collagenase 溶液 (40 U/ml) を 3~6 分間灌流すると心臓の膨化が観察される。⑫最後に、KB 溶液 40 ml を約 8 分間で灌流する。なお Tyrode 液・ Ca^{2+} -free Tyrode 液・KB 溶液は 100% O_2 を通気する。collagenase 溶液は O_2 による失活をさけるため液面に吹きつける。これら各種の灌流液の組成を Table 1 に示す。⁵⁾⑬灌流終了後心室を細切し、KB 溶液中で攪拌、 $120\mu\text{m}$ の金属メッシュで汙過し、100 ml の KB 溶液中に摂氏 4°C で保存する。単離心筋細胞は Ca^{2+} -free Tyrode 液中に保存すると、 Na^+ - Ca^{2+} 交換、 Na^+ - K^+ ポンプが影響されて細胞内 K^+ が漸次減少してゆくといわれる。⁶⁾これを防ぐために、細胞は単離後、高 K^+ で各種代謝基質を含む KB 溶液中に保存する。⁶⁾

上述の手技に基づき以下の検討を行った。

1. 単離細胞の採取率に関与する因子

方法

①灌流液の温度、②灌流液の pH、③ collagenase 溶液の濃度と灌流時間、④ collagenase 溶液の albumin 添加の有無、⑤モルモットの週齢、⑥その他、について細胞採取率を算出し検討した。

単離された細胞は Tyrode 液中に移すと、sarcomere が明瞭な rod-shaped cell と sarcomere が見られない round-shaped cell の 2 種の形態を示す (Fig. 2)。round-shaped cell は trypan blue で染色されるため死亡した細胞と考えられる。⁷⁾そこで細胞採取率は、rod-shaped cell / (rod-shaped cell + round-shaped cell) $\times 100\%$ とした。

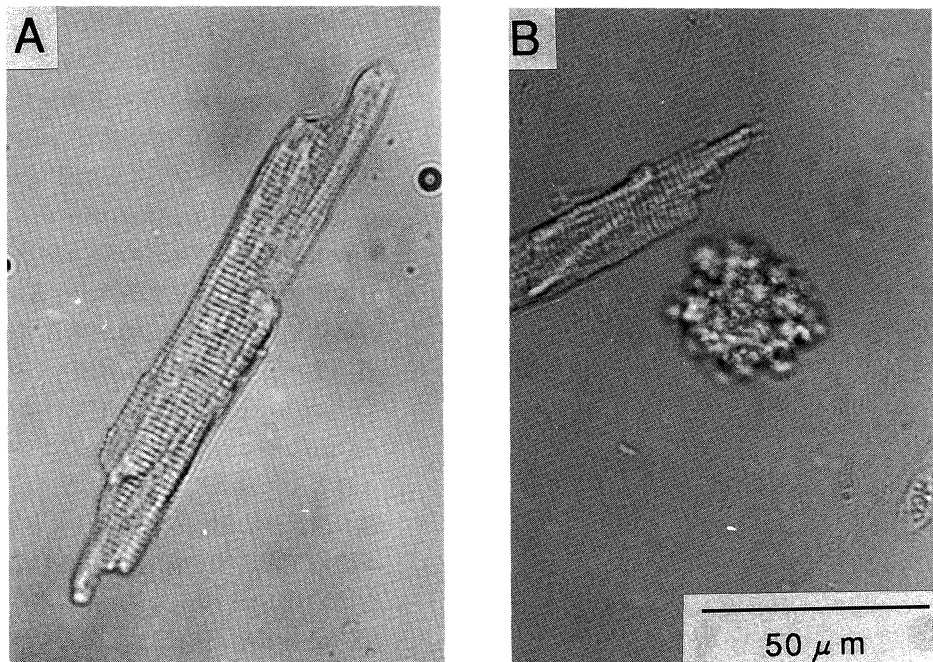


Fig. 2. Photographs taken in Tyrode solution. (A) Rod-shaped cell. Striations are seen clearly. (B) Round-shaped cell in the center and rod-shaped one in the left corner.

成績

① 灌流液の温度

灌流液の温度は、摂氏25・30・37・40°Cの4点で検討した。表の通り37°Cが最も採取率が高かった (Table 2, A)。

② 灌流液 (Tyrode 液, Ca²⁺-free Tyrode 液) の pH

灌流液の pH は、pH 7.0・7.4・8.0の3点で検討した。表のように pH 7.4の採取率が他に比し明らかに高かった (Table 2, B)。

③ collagenase 溶液の濃度と灌流時間

現在 Yakult 社から市販されている collagenase を 40 U/ml の濃度で 3～5 分間作用させている。

④ albumin 添加の有無

albumin 添加の有無では有意な差は見られなかった。(温度 37°C, pH 7.4, collagenase 40 U/ml) (Table 2, C)

⑤ モルモットの週齢

モルモットの週齢では有意な差は見られな

った。(温度 37°C, pH 7.4, collagenase 40 U/ml, albumin なし) (Table 2, D)

⑥ その他の因子

水は最も重要な因子で、普通の再蒸留水を使う時は単離細胞の採取率は低かった。Milli-Q (Millipore Corporation) で作成した 18MΩ 以上の水を利用すると採取率は向上し一定する。⁸⁾

collagenase は SIGMA・WAKO・Yakult の 3 種を試みたが、前 2 者は Lot No. によって酵素活性が異なるためか、採取率の変動が大きく、濃度や作用時間を実験の度ごとに調整しなければならなかった。従って我々は現在 Yakult 社製を使用している。

II. 単離心筋細胞の性質

rod-shaped cell を選び、以下の性質を検討した。

方法

活動電位は細胞内微小電極 (3 M KCl, 抵抗 30MΩ) から 1 Hz で通電刺激した。短縮は 1 Hz の細胞外刺激を与え、細胞端の動きを顕微鏡ビ

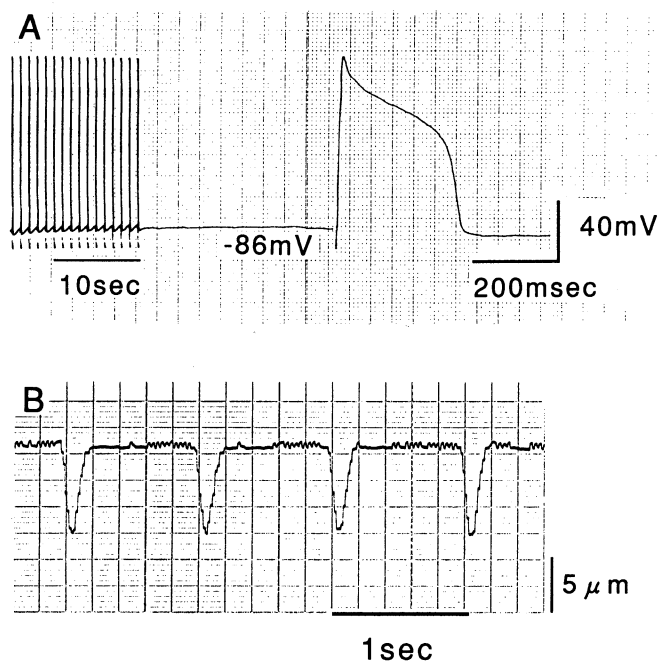
Table 2. The ratio of rod-shaped cells to total ones within a visual field under microscope

A		温度 °C	25	30	37*	40	
		Ratio %	3.0 ± 3.0	10.1 ± 6.1	51.7 ± 6.6	11.8 ± 5.8	

B		pH	7.0	7.4*	8.0	mean ± SD
		Ratio %	2.2 ± 3.9	51.7 ± 6.6	10.8 ± 14.9	*P < 0.05

C		albumin	あり	なし	
		Ratio %	50.7 ± 8.1	52.7 ± 9.2	NS

D		週齢	3-7	8-12	13-16	
		Ratio %	54.2 ± 8.9	50.7 ± 8.0	48.6 ± 10.1	NS

**Fig. 3.** (A) Action potential elicited by intracellular stimulation at 1Hz. (25°C) (B) Cell edge displacement by extracellular stimulation at 1Hz. Shortening is shown as a downward deflection. (37°C)

デオカメラで分析した。

成績

① 活動電位

静止電位は -86mV で amplitude は 110mV であった。活動電位の頂点から amplitude が 25% に減衰した時点の活動電位幅は平均 280msec であった (Fig. 3, A)。

② 短縮

短縮量は $8\mu\text{m}$ であり、測定部の間隔は $100\mu\text{m}$ であったので短縮率は 8% に相当する。多くの細胞において、短縮率は 5~10% であった (Fig. 3, B)。

考 察

I. 分離細胞の生存に関与する因子

① 灌流液の温度

モルモットの体温は 39°C のため 40°C で細胞採取率が最高と予測されたが、 37°C が最も成績がよかった。これは collagenase の酵素作用が 40°C で著明に亢進するためと思われる。⁹⁾

② 灌流液の pH

Table 2, B のごとく pH 7.0~8.0 では round-shaped cell がほとんどで灌流液の pH は重要な因子と思われた。⁹⁾

③ albumin の有無

albumin は細胞単離時の cytotoxic factor を除去する作用があるといわれている。⁴⁾ しかし albumin に混在している Ca^{2+} のため collagenase が cytotoxic に働くという可能性¹⁰⁾ もあり、現在我々は使用していない。

④ モルモットの週齢

週齢により細胞生存率には有意な差はみられなかった。しかし 3~5 週齢より 6 週齢以降の方が、実験による物理的・薬物的作用に対する耐

久性があり実験に適すると考えられる。⁸⁾

II. 単離心筋細胞の性質

我々が採取した単離心筋細胞の性質は、活動電位¹¹⁾・短縮量¹²⁾はともに細胞集団の試料や単離細胞について知られている値と同様であり、単離操作によって細胞の電氣的活動は障害されていないことが判明した。

総 括

心筋細胞の単離法の手技について詳細に述べた。この際、より高い採取率を得ることを目的として、採取率に影響する因子について検討し

た。その結果、灌流液は温度が37°CでpHが7.4において採取率が高かった。また collagenase 溶液の albumin 添加の有無や、モルモットの週齢が採取率に及ぼす影響は少なかった。その他の因子では水の純度の影響が大きかった。以上の手技を用い、これらの因子に注意すれば50%の率で rod-shaped cell が得られることが判明した。さらに採取された rod-shaped cell の活動電位および短縮量はともに細胞集団の試料や単離細胞について知られている値と同様であり、したがって電気生理学的実験の対象として適当であることが判明した。

文 献

- 1) Powell, T. and Twist, V. W. : A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72 : 327-333, 1976
- 2) Isenberg, G. and Klöckner, V. : Glycocalyx is not required for slow inward calcium current in isolated rat heart myocytes. *Nature* 284 : 358-360, 1980
- 3) 大地陸男 : 心筋資料作製法。『実験生物学講座10 運動生物学』(杉晴夫, 平本幸雄編), 第1版。東京, 丸善。1984, pp. 31-37
- 4) Jacobson, S. L. : Techniques for isolation and culture of adult cardiomyocytes. *In Isolated Adult Cardiomyocytes*. Vol. 2, ed. by Pipor, H. M. and Isenberg, G. 1st ed. Florida, CRC Press. 1989, pp. 43-80
- 5) Yazawa, K., Kaibara, M., Ohara, M. and Kameyama, M. : An improved method for isolating cardiac myocytes useful for patch-clamp studies. *Jpn. J. Physiol.* 40 : 157-163, 1990
- 6) Isenberg, G. and Klöckner, V. : Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB Medium". *Pflügers Arch.* 395 : 6-18, 1982
- 7) Trube, G. : Enzymatic dispersion of heart and other tissue. *In Single-Channel Recording*, ed. by Sakmann, B. and Neher, E. 1st ed. New York, Plenum Press. 1983, pp. 69-76
- 8) Lee, K. S. : Calcium and sodium channels of the heart as studied using the single heart-cell suction pipette method. *In Electrophysiology of Single Cardiac Cells*, ed. by Noble, D. and Powell, T. 1st ed. London, Academic Press. 1987, pp. 69-103
- 9) Dow, J. W., Harding, N. G. L. and Powell, T. : Isolated cardiomyocytes I Preparation of adult myocytes and their homology with the intact tissue. *Cardiovasc. Res.* 15 : 483-514, 1981
- 10) Glick, M. R., Burns, A. H. and Reddy, W. J. : Dispersion and isolation of beating cells from adult rat heart. *Annal. Biochem.* 61 : 32-42, 1974
- 11) Matsuda, H., Noma, A., Kurachi, Y. and Irisawa, H. : Transient depolarization and spontaneous voltage fluctuations in isolated single cells from guinea pig ventricles. Calcium-mediated membrane potential fluctuations. *Circ. Res.* 51 : 142-151, 1982
- 12) Borzak, S., Murphy, S. and Marsh, J. D. : Mechanism of rate staircase in rat ventricular cells. *Am. J. Physiol.* 260 : H884-H892, 1991