

単一心筋細胞の力学的特性の測定

内貴 猛 [北海道大学電子科学研究所／助教授]

背景・目的

心臓は血液を全身に送り出すポンプであり、ポンプシステムとしての性能、すなわちポンプ機能を調べる研究が古くから行われてきた。一方、筋細胞を構成する収縮蛋白の収縮機構が分子レベルの引張試験により明らかになってきた。しかし、それらの中間階層である細胞レベルでの力学的特性が不明であるため、心臓のポンプ機能に支障をきたすような各種心臓疾患と心筋細胞収縮性との関係がほとんどわかっていない。そこで、実際に心臓から単離した心筋細胞の収縮特性と弛緩時粘弾性特性を測定するために、本研究において単一の心筋細胞の力学的特性を測定する装置を開発する。

内容・方法

心筋細胞の力学的特性を測定する装置には、顕微鏡下細胞を操作できるマイクロマニピュレータを用いる。2つのマイクロマニピュレータで細胞の両端を持ち、片方のマイクロマニピュレータを動かして細胞の長さを調節し、もう一方のマイクロマニピュレータに取り付けたフォーストランスデューサで心筋細胞を電気刺激したときに発生する力を測定する。心筋細胞の長さや刺激強度、薬剤による収縮力調節と発生張力との関係を調べることにより心筋細胞の収縮特性を解析する。また、筋原線維の収縮によらない心筋細胞の粘弾性特性については、薬剤により筋原線維を完全に弛緩させた状態で、片方のマイクロマニピュレータを一定速度で動かした時の、心筋細胞の伸びと荷重を測定することにより求める。以上のような実験ができる心筋細胞力学特性測定システムを作製した。試料には成体ラット心臓から酵素法により単離した心筋細胞を用いるため、その単離方法についても検討した。心筋細胞は増殖せず、少しでも損傷すると直ぐに死んでしまうため、おののの実験環境に最適な方法を見つけなければならない。

結果・成果

生後15週以降の成体ラット心臓から細胞を損傷なく単離することがなかなかできず、方法を変えて様々な検討を加えた。その結果、下記の方法により、矩形をした正常な心筋細胞を多く単離することができるようになった。特に、コラゲナーゼ溶液で充分に心臓組織を溶解すること、また、その際に溶液中のカルシウム濃度が重要であることがわかった。

(1) ラットを麻酔して、100unitsのヘパリンを静注した後、心臓を露出する。(2) 大動脈にカテーテルを挿入し、心臓を摘出して、Langendorff灌流装置に取り付ける。(3) 1.8mMのCa²⁺を含むKrebs-Henseleit緩衝液(Sigma K3753)を5分程度冠動脈に灌流し、血液を洗い流す。(4) 無Ca²⁺の緩衝

液を3分程度心臓の拍動が止まるまで灌流する。(5) 25μMの濃度でカルシウムを含み、0.5mg/mLの濃度でコラーゲン分解酵素であるcollagenase(Worthington Biochem.Co., TypeII)を含む緩衝液を約1時間灌流する。(6) 心室を切り取り、細切し、心筋組織塊がなくなるまでcollagenase溶液中で振盪し、心筋細胞を分散させる。(7) メッシュサイズ約100μmのステンレスメッシュで濾過し、残っている組織片を取り除く。(8) 1mg/mLの濃度でウシ血清アルブミンを含む緩衝液を用い、遠心分離と溶液交換を繰り返して、カルシウム濃度を100、200、500μMと段階的に上げながら心筋細胞を洗浄する。(9) 最後に血清を含まないDMEM培養液に細胞を懸濁させ、培養ディッシュに播種し、5%CO₂、37°Cでインキュベートする。(10) 数時間後、矩形状の形の整った正常な細胞を力学試験に用いる。全ての溶液については、充分に温らせた95% O₂+5%CO₂ガスで、バーリングしながら30~37°Cの温度で用いた。

心筋細胞の発生する力と細胞骨格の粘弾性を測定するために、細胞引張試験機を作製した。防振台上に倒立顕微鏡(オリエンパス IX70)を置き、マイクロマニピュレータ(eppendorf5171、ナリシゲONW-135)とトランスジェクタ(eppendorf 5246)、マイクロピペットを組み合わせて細胞を把持する。マイクロピペットについては、先端内径約10μmになるようにマイクロピペット作製器(ナリシゲ PC-10)を用いて作製した。細胞の発生した力、あるいは細胞に負荷した力の測定には自作したフォーストランスデューサを用いた。マイクロピペットをフォーストランスデューサ内のカンチレバーに取り付け、伝わってきた力によるカンチレバーのたわみ量を、貼り付けた半導体ひずみゲージ(共和電業 KSP-2-120-E3)により計測した。具体的には、ゲージの出力をブリッジ回路に通し、ストレインアンプ(日本電気三栄 6M92)で增幅し、記録した。細胞の伸びについては、顕微鏡に取り付けたCCDカメラにより撮影した画像から計測した。心筋細胞は自動能を持たないため、通常の状態では拍動しない。そこで心筋細胞の収縮力を測定するために、Electronic Stimulator(日本光電 SEN-7203)で細胞を電気刺激して収縮させた。細胞を挟むように培養液中にワイヤ電極を配置し、5ms、0.1~5Hzのパルス電流を流した。刺激電圧については、心筋細胞の収縮力が最大値になる値とした。以上のような心筋細胞力学特性測定システムを作製することができた。

今後の展望

作製したフォーストランスデューサの較正曲線を求め、測定したひずみゲージ出力を力の値に変換しなければならない。また、細胞接着因子を用いるなどしてより強力にマイクロピペットで把持できるようにしなければならない。それらの課題を克服した後、細胞肥大による力学的特性の変化を検討する予定である。それには、大動脈に狭窄を作製する等の高血圧術をラットに施し、圧負荷を加えて肥大させたラット心臓の心筋細胞を試料として用いることを考えている。