

## オイル隔絶法による細胞内灌流下膜電流記録

光 家 保

(京大大学生理学教室)

単一心筋細胞の膜電流記録法としては、パッチ電極を用いた膜電位固定法が現在最も普及している。しかしながら、この方法を心筋細胞に応用するには、細胞内灌流と膜電位固定についていろいろな限界があった。オイル隔絶法では、このパッチクランプ法と同様のギガーオーム隔絶抵抗下で、数10から100倍早い膜電位固定が可能で、同時に約20秒間で細胞内液の交換が可能である。この効果的な細胞内灌流のため、従来のパッチ電極を用いた細胞内灌流では不完全であった細胞内環境のコントロールが可能となった。しかし、オイル隔絶法はパッチクランプ法に比べ習得に若干時間を要する為、目的をはっきりして適用する事が必要であろう。ここではまず、パッチクランプ法の膜電位固定の限界を考えてみたい。

パッチ電極の抵抗は一般に  $1\text{ M}\Omega$  から数  $\text{M}\Omega$  であるが、理想的には90%程度まで電気的に補正可能であり、直列抵抗補正後  $100\text{ k}\Omega$  の実効直列抵抗が期待される。しかし直列抵抗成分の内、細胞内抵抗に起因する成分は細胞全長に連続的に分布するため補正できない。複雑な計算を避け、簡便にこの細胞内抵抗の膜電位固定に及ぼす影響を推定してみる。心室筋スキンドファイバーの長軸方向の電気抵抗(細胞内抵抗)は、細胞長軸方向  $20\text{ }\mu\text{m}$  あたり  $500\text{ k}\Omega$  にも相当する。細胞の中心にパッチ電極を当て、 $100\text{ }\mu\text{m}$  の心筋細胞を膜電位固定した場合、細胞両端各  $30\text{ }\mu\text{m}$  即ち細胞の60%の部分の膜電流に相当する電流がクランプ下で最低  $500\text{ k}\Omega$  の細胞内抵抗を横切ることが予想される。いま細胞全体で内向きのナトリウム電流が  $100\text{ nA}$  流れるとすると、細胞両端各  $30\text{ }\mu\text{m}$  の部分は  $60\text{ nA}$  の膜電流を発生しその結果、パッチ部分

とパッチ部分からわずか  $20\text{ }\mu\text{m}$  離れた部分の細胞内膜電位の差は  $30\text{ mV}$  にもなることになる。仮に細胞外のナトリウム濃度を減らして、電流値を10分の1にしても  $3\text{ mV}$  の電位差がわずか  $20\text{ }\mu\text{m}$  の距離に発生する。そのような膜電位固定下での電流測定から電位依存性のカインेटックスを正確に決定する事は困難であるといえる。

### 1. 簡便オイル隔絶法

とりあえず、オイル隔絶法による早い膜電位固定で電流を記録する事から始めるとすると、実体顕微鏡 ( $40\sim 100\text{ X}$ ) と図1に示すようなチャンバーがあれば充分である。あらかじめカバーガラス2枚をいずれも図に示すような形に手で割り、先端を  $30\text{ }\mu\text{m}$  ほど離して容器の底に接着剤で固定する。ベビーオイルを容器に満たす。左のカバーガラスの上に細胞外液を、右のカバーガラスの上に細胞内液を共に先端まで盛り、何れの溶液にも  $\text{Ag-AgCl}$  寒天電極を溶液に接触させる。左の寒天電極はアンプのグランドに、右の寒天電極はアンプの入力に接続する。以下の操作を実体顕微鏡下で行う。まず、 $3\text{ MKCl}$  を含む寒天を詰めたガラス管の両端を2つのプレートに橋渡しし、電気的に2つの溶液を接続し膜電位固定アンプのゼロ調整を行う。次に細胞の懸濁液を左の細胞外液中に1滴落とす。マニピュレーターに固定した吸引ガラス管(先端口径  $4\sim 6\text{ }\mu\text{m}$ ) に細胞外液を満たし、吸引で細胞を吸い付け、細胞を細胞内液から細胞外液にオイルを跨いで橋渡しする。次に、吸引電極の陰圧を解除し、軽く陽圧にして細胞から離す。細胞内液に浸かった部分の膜に、これまで細胞を操作するのに用いたと同じ吸引電

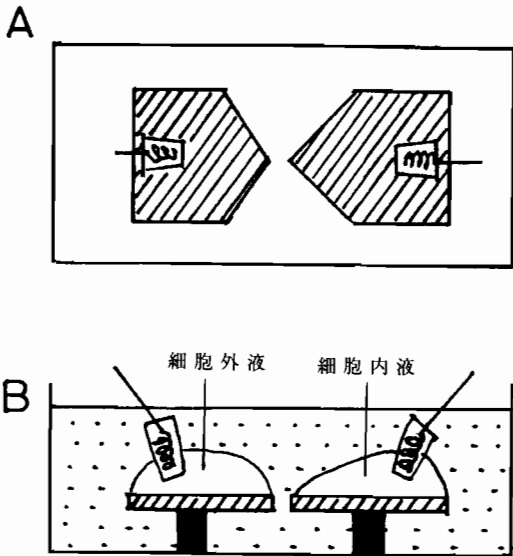


図1. 簡便オイル隔絶法に用いるチャンバー。オイル槽と2枚のカバーガラス及び2つの寒天電極から成る。Aは上からみた時、Bは側面からみたときの図を示し、Bでは2枚のカバーガラス(斜線部)に細胞内液及び細胞外液を先端まで盛りベビーオイル(点々部分)を入れた状態を示している。細胞の懸濁液を左の細胞外液中に1滴落とす。吸引ガラス管で細胞を吸い付け、細胞を細胞外液から細胞内液にオイルを跨いで橋渡した後、細胞内液に浸かった部分の膜を完全に破壊し、この破壊部分を介して通電し膜電位固定を行う。詳しくは本文参照。

極を何回も押しつけ、この部分の膜を完全に破壊する。この破壊部分を介して通電し膜電位固定を行う。この方法では、隔絶抵抗は心室筋で30~50 M $\Omega$ で、次に述べる改良法と比較してはるかに小さい。この場合、記録された電流の一部はギャップ部分に含まれる膜を介する電流とリーク電流であり、この点を考慮する必要がある。いわゆるルーズパッチ法での記録に類似する。したがって直列抵抗を電氣的に補正するには限界がある。

## 2. ギガシールオイル隔絶法

図2(a)~(d)はオイル隔絶法の操作手順を模式的に示したものである。図には示されていないがすべての操作は実体顕微鏡(40~100X)下で行う。また各装置部分は4台のハンドマニピュレーターに各々独立に固定する。具体的には、細胞内液槽と細胞外液槽をおおの相

対する2台のマニピュレーターに固定する。また、オイル槽および細胞を操作するためのガラス吸引電極を残し2台のマニピュレーターに固定する。細胞内液槽および細胞外液槽はまったく同じ構造で、図に示すように口径が200~500  $\mu\text{m}$ と大きい事を除けば、構造的にはパッチ細胞内灌流装置とほぼ同一であり、パイペット先端の液はポリエチレンチューブから導入される。細胞内液槽、細胞外液槽共にAg-AgCl寒天電極が挿入されている。左の寒天電極はアンプのグラウンドに、右の寒天電極はアンプの入力に接続する。以下(a)~(e)の順に手順を説明する。

(a) オイル槽にベビーオイル(点々部分)を入れる。細胞の懸濁液をオイル槽の中に1滴落とし、細胞内液槽(左のパイペット)をその中に浸ける。このとき細胞懸濁液と細胞内液間で液がパイペット内へ流入あるいはパイペット内から流出しないようにパイペット先端の水圧をアウトレットの高さを変えてあらかじめ調節しておく。次にガラス吸引電極(移動用パイペット)で細胞を吸引固定しその一部を細胞外液槽の中に挿入する。ガラス吸引電極は簡便法で用いた物と同じである。

(b) オイル槽を図では左に移動する。これによって、細胞の一部は細胞外液に、残り部分はオイルに浸かった状態になる。このままの状態ですら1~2分間待つ。オイルに浸かった部分の細胞が透明に見えるようになると膜とオイルが完全に接着している。これが高い隔絶抵抗を得るために必要なことである。

(c) 細胞内液槽を細胞のオイルに浸かった部分に接触させる。この時細胞を吸引電極で押しつける事により、細胞を右の溶液槽パイペットのガラス底に接着する。

(d) まず吸引電極の陰圧を解除し、軽く陽圧にして細胞から離す。膜電位固定下で容量性電流を観察しながら、細胞内液に浸かった部分の膜に、これまで細胞を操作するのに用いたと同じ吸引電極を何回も押しつけてこの部分の膜

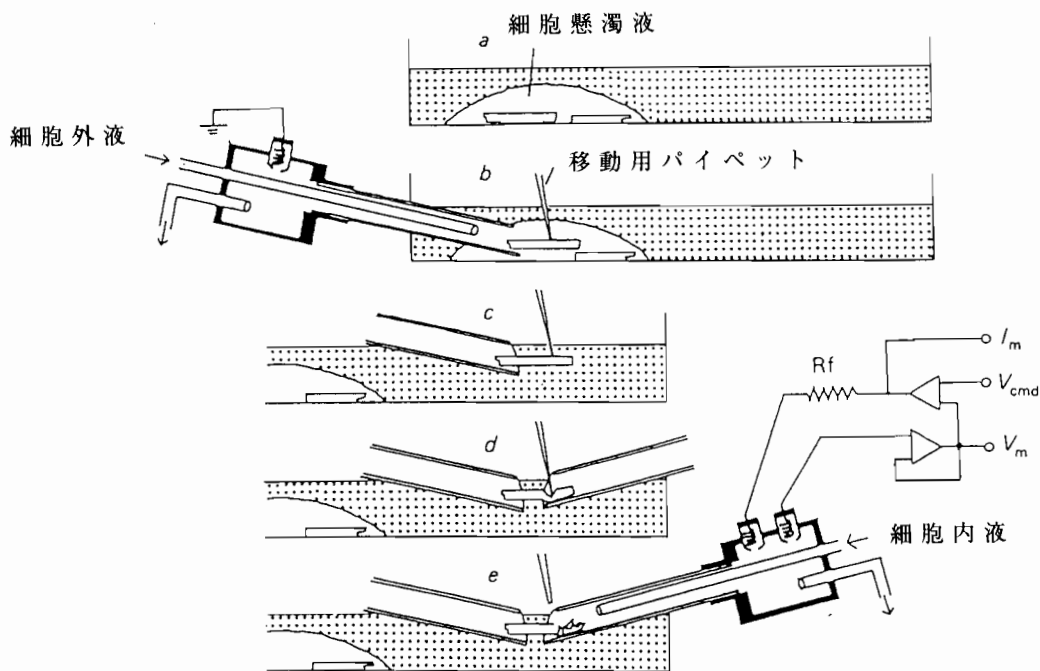


図2. ギガシールオイル隔絶法 (a)–(e)の順で操作する。点々はベビーオイル。詳しくは本文参照。

を完全に破壊する。膜の破壊が進むにつれて容量性電流の時間経過は速くなる。その後、右のパイペットを移動してオイル間隙の長さを約  $20\mu\text{m}$  に調節する(e)。膜にあけた大きな穴を通して通電および細胞内灌流が可能になるのである。なお、膜電位固定アンプのゼロ調整は3MKClを含む寒天を詰めたガラス管の両端に溶液槽パイペットを接触させて行う。

### 3. オイル隔絶法での膜電位空間固定

図3に示す実験では実際に記録部分の細胞膜に3MKCl電極を挿入し、膜電位を記録している。Aは直列抵抗を補正する前、Bは補正した後の膜電流記録および膜電位記録を示す。A、B共にナトリウム電流のピーク電流値は約30nAであるが、Aでは記録部位の膜電位はナトリウム電流のピークで約15mVコマンド電位より脱分極側にある。即ちわずか  $20\sim 30\mu\text{m}$  のオイル部分の細胞内抵抗が大きな電圧降下をもたらしているのである。直列抵抗補正下(B)

では膜電位はほぼコマンド電位と同様の矩形波を示している。トレースの下に示したプロットは縦軸が命令電位との差、横軸が膜電流値を示しており、その勾配が実効直列抵抗値を示す。直列抵抗非補正下では実効直列抵抗値は485k $\Omega$ 、直列抵抗補正後には実効直列抵抗値は41k $\Omega$ であった。約90%の直列抵抗が電的に補正できたことが示唆される。この低い直列抵抗と小さな記録膜面積のため、 $30\sim 80\mu\text{sec}$  以内に容量性電流は消失し、膜電位はコマンド電位に固定される。

### 4. ナトリウム電流記録

実際にオイル隔絶法を用いて記録したナトリウム電流を図4Aに示す。ここでは細胞内液、細胞外液共に無K溶液を用い、保持電位  $-100\text{mV}$  から異なる大きさの脱分極パルス加えて記録した電流を重ね合わせて示している。aはリニアサブトラクション法で容量性電流を差し引いて求めた記録を、bは  $40\mu\text{MTTX}$  感受性電

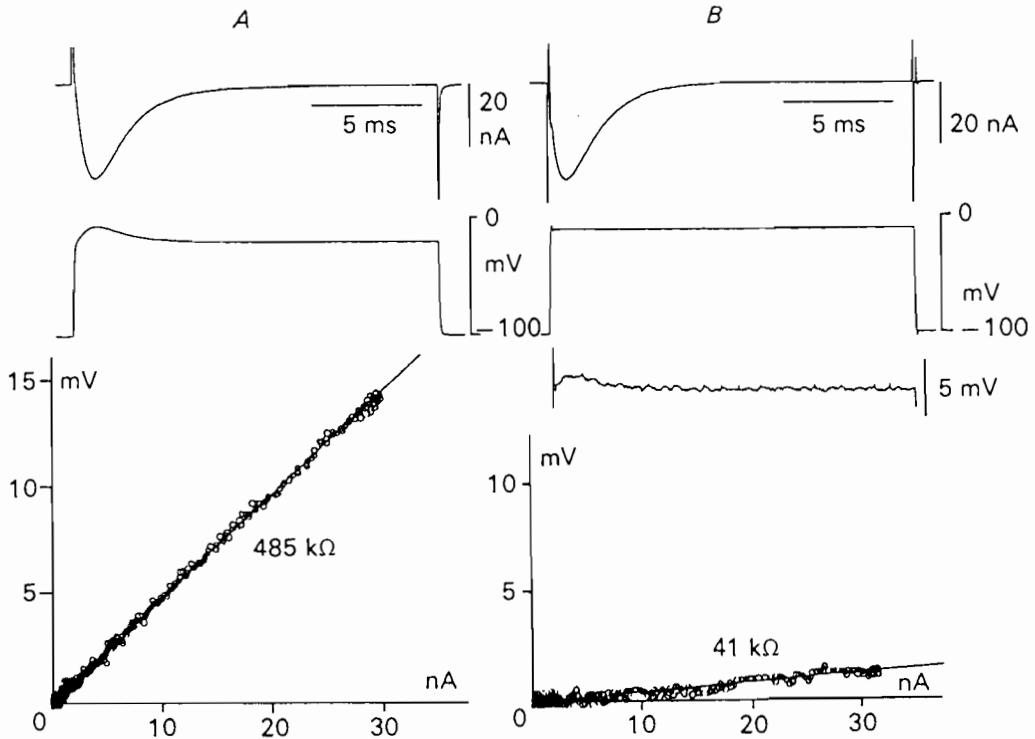


図3. Aは直列抵抗の非補正下, Bは補正後の膜電流記録および膜電位記録を示す. 膜電位は記録部分の細胞膜に3 MKCl電極を挿入し記録した. 下のプロットは縦軸が命令電位との差, 横軸が膜電流値を示しており, その勾配が実効直列抵抗値を示す. 直列抵抗非補正下では実効直列抵抗値は485 k $\Omega$ (A), 直列抵抗補正後には実効直列抵抗値は41 k $\Omega$ (B)であった. 詳しくは本文.

流として求めたナトリウム電流記録を示してある. Bにはピーク電流値と脱分極後9.5 msecでの電流値を電圧横軸に示してある. 記録から明らかなように従来シグモイダルに遅延を持って活性化されるとされていた心筋ナトリウム電流の活性化が指数関数的であることに着目されたい. 実際, ホジキン-ハクスレータイプの式を電流記録に当てはめると $m^3h$ 式でフィットできた. 直列抵抗の非補正下で記録したナトリウム電流は, 従来の報告の様にホジキン-ハクスレーの $m^3$ 活性化モデルを当てはめる事ができることから, 従来の方法での電流記録では直列抵抗の影響が大きかったことが予想された.

##### 5. オイル隔絶法による細胞内液交換

オイル隔絶法では, 細胞内液に浸った部分に

開けた大きな穴から細胞内液が拡散によって置き変わるため, 効果的な細胞内灌流が可能である. 実際の灌流効率を示す実験結果を図5に示す. 挿入図に示すように, あらかじめ2つのポリエチレンチューブを細胞内液槽のパイペットに導入して置き, それらを交互に閉じる事により, 細胞内液の交換が可能である. この実験では20 mMのNaイオンを含む細胞内溶液灌流下で, +20 mVへの脱分極パルスで内向きのナトリウム電流を記録した後, 140 mMのNaイオンを含む細胞内液を細胞内液相に流した. 黒丸はピーク電流値をプロットした結果である. 実際の電流記録は右に重ねて示してある. 溶液交換後すぐに内向き電流は外向き電流に変化し, 約20秒間で一定の電流値を示した(A). 溶液をもとに戻すと同様の時間経過で電流はコ

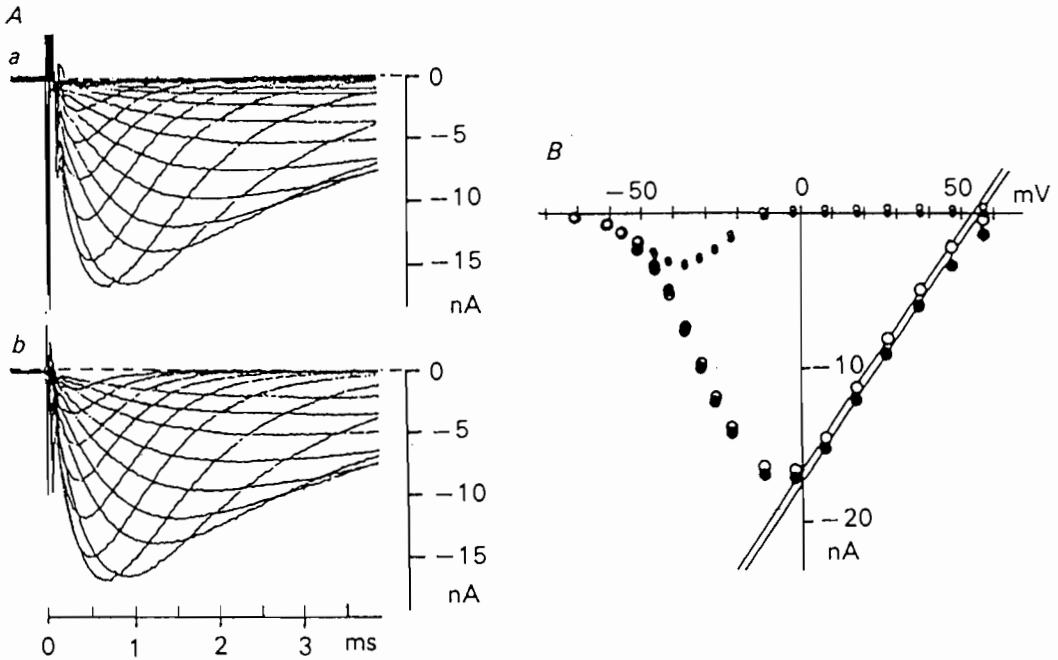


図4. オイル隔絶法を用いて記録したナトリウム電流. 保持電位  $-100$  mV から異なる大きさの脱分極パルス加えて記録した電流を重ね合わせて示している. A, a はリニアサブトラックション法で容量性電流を差し引いて求めた記録を, b は  $40 \mu\text{M}$  MTX 感受性電流として求めた膜電流記録を示してある. B にはピーク電流値と脱分極後  $9.5$  msec での電流値を電圧横軸に示してある. 白丸は Aa, 黒丸は Ab の記録から求めた電流値を示す. 詳しくは本文.

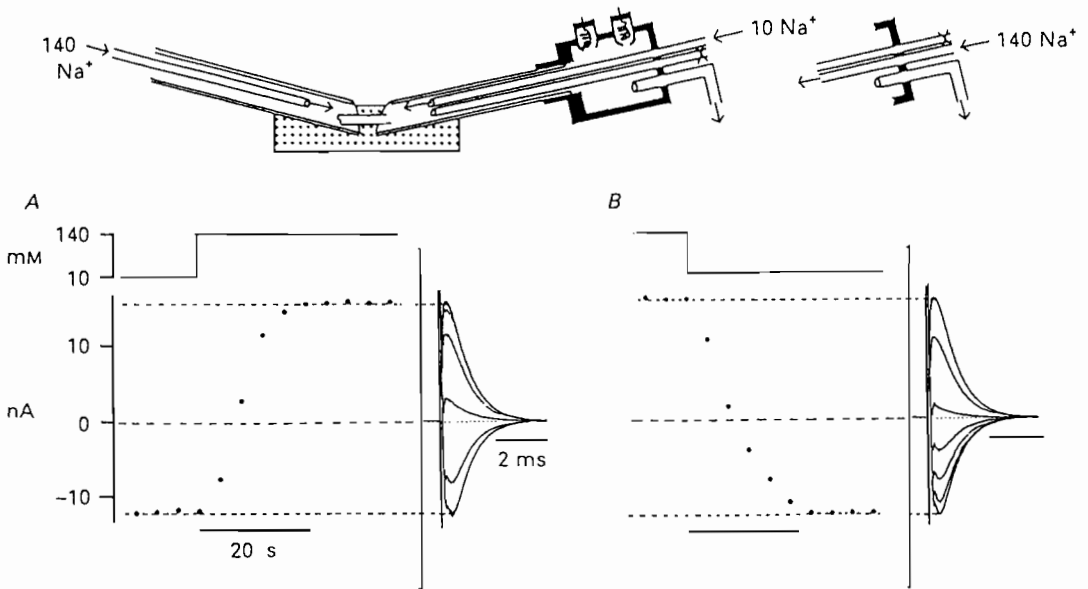


図5. 細胞内液交換. あらかじめ2つのポリエチレンチューブを細胞内液槽のパイペットに導入して置き, それらをクレンメで交互に閉じる事により, 細胞内液の  $\text{Na}$  イオン濃度を  $20 \text{ mM}$  から  $140 \text{ mM}$  に増加させ(A)後もとに戻した(B). 電流は保持電位  $-100$  mV から  $+20$  mV への脱分極パルスで4秒毎に記録した. 黒丸はピーク電流値をプロットした結果である. 実際の電流記録は右に重ねて示してある.

ントロールレベルに戻った(B). 図に示された細胞内液の交換速度は実際には細胞内液槽の溶液の細胞部分の溶液が入れ替わる時間を示していると思われるので細胞内灌流効率はパッチ電極を用いた方法よりはるかに良いことが示唆される. 細胞内液の交換方法には, まだ改良の余地があると考えている.

## 6. 考 察

以上おもにオイル隔絶法の方法論について述べたが, 直列抵抗や細胞内灌流効率以外にも, この方法での記録とガラス電極を用いた方法とは相違が認められた. オイル隔絶法でモルモット心室筋ナトリウム電流の定常不活性化曲線を求めると, 生理的な静止電位である  $-90$  mV 付近では定常不活性化は殆ど認められない. また完全な不活性化は  $-50$  mV 付近で観察された. 不活性化曲線は実験開始後時間が経っても変化しなかった. 同様の結果はいち早くオイル隔絶法を導入した他のグループによってもカエル心室筋で確認されている. これらの結果は2本差し膜電位固定法で心筋多細胞標本から得られた結果と一致する. 一方, ガラスパッチ電極を用いて記録する方法では, 通常のパッチクランプ電極で約  $20$  mV の不活性化曲線の過分極側へのシフトが観察され,  $-90$  mV 付近でも定常状態で数10%のチャンネルは不活性化された状態になる. 大口径のガラス電極を用いた方法ではシフトは  $-40$  mV にも達する. 同様のシフトはパッチ単一電流記録でも観察される. また活性化曲線も同様に負電位側にシフトすることが観察される. 問題なのは, シフトは実験開始後時間依存性に進展する事である. このため本来電位依存性のチャンネルであるナトリウムチャンネルのカイネティックスが電位のみならず実験開始後の時間との関数としてしか決定できなくなる. この電位依存性のカイネティックスシフトの発生機序については未だ解ってい

ないが, これがオイル隔絶法では観察されないことは, ガラス電極を用いた電流記録方法では吸引による細胞内圧の変化あるいは膜への機械的な刺激が原因となり細胞内構造おそらく細胞内骨格が侵襲を受ける事を示唆していると考えられる.

我々は現在まで主として心筋細胞を用いてオイル隔絶法による膜電位固定を行ってきた. 一般に細長い細胞, 例えば骨格筋細胞や平滑筋細胞では, 細胞内抵抗のため細胞全体の膜電位空間固定は困難であるとされている. これらの細胞でオイル隔絶法は有用と考えられる. 実際, 最近試みにラット骨格筋細胞にオイル隔絶法を適用して細胞のごく一部から膜電流記録を行ってみた所, ナトリウム電流がうまく記録できた. 同様に平滑筋細胞の膜電流記録にも本法は有用と思われる.

## 参 考 文 献

- Mitsuiye, T & Noma, A (1987). A new oil-gap method for internal perfusion and voltage clamp of single cardiac cells. *Pflügers Archiv* **410**, 7-14.
- Ishihara, K., Mitsuiye, T., Noma, A & Takano, M (1989). The  $Mg^{2+}$  block and intrinsic gating underlying inward rectification of the  $K^+$  current in guinea-pig cardiac myocytes. *Journal of Physiology* **419**, 297-320.
- Kimitsuki, T., Mitsuiye, T & Noma, A (1990). Negative shift of cardiac  $Na^+$  channel kinetics in cell-attached patch recordings. *American Journal of Physiology*. **258**, H 247-254
- Mitsuiye, T & Noma, A (1992). Exponential activation of the cardiac  $Na^+$  current in single guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology*, **453**, 261-277.
- Mitsuiye, T & Noma, A (1993). Quantification of the exponential activation of the cardiac  $Na^+$  current in N-bromoacetamide-treated cardiac myocytes of guinea-pig. *Journal of Physiology*, **465**, 245-263
- Mitsuiye, T & Noma, A (1995). Inactivation of the cardiac  $Na^+$  channels in guinea-pig ventricular cells through the open state. *Journal of Physiology*, **485**, 581-594