

ラット心室筋細胞の初代培養

1. MED プローブへのシリコンリングの貼り付け

シリコンリングによる培養領域の制限は、細胞を記録電極周囲のみで培養したり、十分な細胞数を調製できない場合に有効です。

- 1) MED プローブの 64 電極を囲うシリコンリング (2 mm 高) をシリコンゴムシートから作ります。
- 2) 万能接着剤 (Shin-Etsu Chemical #KE45-100) により、シリコンリングを MED プローブに接着します。
- 3) 接着剤を乾燥させるため、埃が入らないように MED プローブを 90 mm ディッシュで上蓋をして、約 8 時間常温放置します。

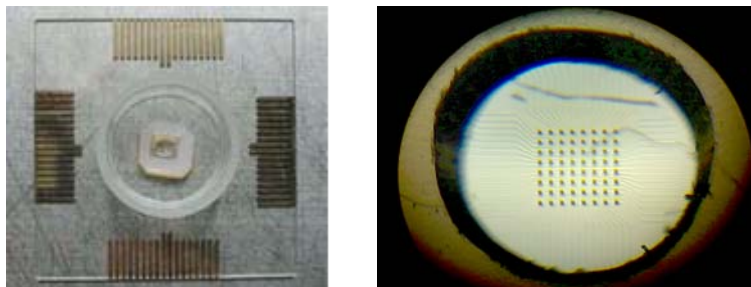


Fig.1. シリコンリングを貼り付けた MED プローブ (左) と中央部拡大写真 (右)。

2. MED プローブの前処理

電極上で心筋細胞を培養する上で最重要のステップが MED プローブ表面の前処理です。MED プローブの表面はやや疎水性を帯びているため、組織が密着しやすいように親水性を高めるコート処理が必要となります。たとえそれ以外の事前準備が完全であっても、大規模な凝集や、早期の細胞死が起こる可能性があります。その場合、MED プローブのコート処理に問題があることが多いようです。I 型コラーゲンは、心筋培養に関してはその効果と信頼性が高いコート剤です。I 型コラーゲンによるコート処理は以下の通りです。

- 1) シリコンリングを貼り付けた MED プローブを滅菌済み蒸留水 (SDW) で 3 回濯いだ後、70%エタノールに 15 分間浸し、クリーンベンチ内で乾燥させます。乾燥時に MED プローブ上に有機溶質が残らないよう、なるべく等級の高いエタノールをご使用ください。
- 2) MED プローブを SDW で 3 回濯いだ後、乾燥させ、15-30 分間紫外線 (UV) 殺菌します。以降、MED プローブは滅菌済み 90 mm ディッシュ内で保管します。
- 3) 64 電極全体を覆うように 40 mg/ml ラット尾由来コラーゲン溶液 (0.15 M 酢酸溶液にて希釈) を滴下し、37°C の CO₂ インキュベーター内に 30 分間放置します。
- 4) クリーンベンチ内でコラーゲン溶液を廃棄し、滅菌済み PBS (-) で MED プローブを 2 回濯いでから乾燥させます。
注: 残留した酢酸溶液により細胞を傷害することのないよう、丁寧に濯ぎます。またこの際、コート処理により電極表面が撥水性を失い、しっかりと濡れる状態になっていなければなりません。
- 5) MED プローブに 10%FBS・M199 培地を注いで 37°C の CO₂ インキュベーター内に 15 分間放置します。
- 6) MED プローブから培地を抜き取り、維持用培地 (p.3「Table1」をご参照ください) に交換して細胞を播種します。

3. ラット心室筋細胞の分散培養

本プロトコルでは、Neonatal Cardiomyocyte Isolation System (NCIS キット、Worthington Biochemical #LK003300) を利用します。以下の手順はオリジナルの使用方法を改変したものです。

3.1.1 日目

- 1) 手術器具 [外科剪刀 (x 2)、ピンセット (x 2)、30 ml ビーカー (x 1)、50 ml ビーカー (x 1)] を 250°C で 30 分間乾熱滅菌します。滅菌後の 2 つのビーカーには 70%エタノールを注ぎます。
- 2) 安楽死させた新生仔ラット (PND1) を、殺菌のため 70%エタノールに浸します。
- 3) 心臓を摘出し、4°C に氷冷したハンクス液 (HBSS、Vial #1) を満たした 90 mm ディッシュに移します。一腹のラット新生仔全てでこの処理を行います (**注: 90 mm ディッシュは氷上に置き、HBSS の温度を維持します**)。
- 4) 滅菌した外科剪刀を用いて心臓から心室を切除し、新鮮な HBSS を満たした 90 mm ディッシュに移します (**注: 赤血球を培養することのないように付着した血液は丁寧に拭きます**)。
- 5) 心室をミンチして、できる限り小さい断片にします。

6) ミンチした心室断片を 100 mg/ml トリプシン・HBSS 溶液に浸し、冷蔵庫で一晩反応させます。

3.2. 2 日目

- 1) NCIS キットに含まれる 20 ml の L-15 溶液と 1 瓶のコラゲナーゼ溶液 (Vial #2) を混合します。
- 2) 一晩反応させた心室断片を含むトリプシン溶液を 50 ml 遠沈管に移し、室温、1000 rpm で 5 分間遠心分離します。
- 3) 上清を抜き取り、1 の混合液を 20 ml 加えてからやさしくピペッティングして再懸濁し、懸濁液全量を 75 cm² 培養フラスコ (BD #353136) に移します。
- 4) フラスコを 37°C の恒温槽内に立てて置き、30-45 分間振とうします (注: 消化時間は細胞の状態に依存して変更します)。
- 5) 室温でやさしく 10-20 回ピペッティングして 3-4 分間放置した後、懸濁液を 70 μm のセルストレーナー (BD #352350) で濾過します。
- 6) 懸濁液を酸素で通気し、室温で 20 分間放置します (注: この手順は必ずしも必要ありません)。
- 7) やさしく振とうして、室温、1000 rpm で 5 分間遠心分離します。
- 8) 上清を抜き取り、L-15 溶液を 20 ml 加えてからやさしくピペッティングして再懸濁し、室温、1000 rpm で 5 分間遠心分離します。
- 9) 上清を抜き取り、L-15 溶液を 20 ml 加えてからやさしくピペッティングして再懸濁し、室温、1000 rpm で 5 分間遠心分離します。
- 10) 上清を抜き取り、10%FBS・M199 培地を 10 ml 加えてからやさしくピペッティングして再懸濁します。
- 11) 懸濁液を 25 cm² 培養フラスコ (Corning #430639) に移し、37°C の CO₂ インキュベーター内で 30 分間放置します (線維芽細胞を除去するための pre-plating 処理)。
- 12) フラスコ内の浮遊液を回収します。

3.3. 心筋細胞の播種

- 1) 浮遊液を MED プローブのシリコンリング内に注ぎます。シリコンリング内でコンフルエントな単層培養を行うのに適した細胞懸濁液 (1.5 x 10⁶ cells/ml に希釈した場合) の量は下記の通りです。

— 電極間距離 150 μm の場合 (シリコンリング内径約 3 mm) : 25-50 μl

— 電極間距離 450 μm の場合 (シリコンリング内径約 5 mm) : 50-100 μl

- 2) 細胞を接着させるため、MED プローブを 37°C の CO₂ インキュベーター内に 30-60 分間放置します。
- 3) 新鮮な維持用培地 (1.0-1.5 ml) をシリコンリング外からやさしく注ぎ、リング内の培地と混合させます。維持用培地は 2 日に 1 回全量交換します。

Table1. 維持用培地の組成。

M199 solution (Life Technologies #11150-059)	Fetal bovine serum (Life Technologies) ……	10%
Gentamicin sulfate (Sigma-Aldrich) ……		50 μg/ml

自発的活動電位は約 2 日後から、ペーシングによる誘発電位は約 3-5 日後から記録できるようになります。

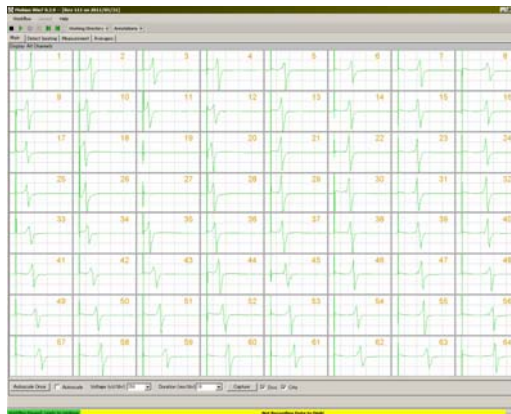


Fig.2. 19ch からの電気刺激による誘発電位が各 ch へと伝播する様子。

4. MED プローブの設置

- 1) 培養細胞を含む MED プローブを殺菌した MED コネクターに設置し、35 mm ディッシュの上蓋をかぶせます。

注 1: MED コネクタとケーブルは、100%湿度の CO₂ インキュベーター内に放置できます。これは、MED コネクタが受動的回路のみで構成されるためです。従って、CO₂ インキュベーター内の無菌環境で、適切な温度、湿度条件により長期間の記録を行うことができます。)

注 2: 記録中に MED コネクタを 100%湿度のインキュベーターに放置する際には、MED コネクタの接触ピンを清潔に保つよう十分な配慮をしてください。わずかな堆積物や塩類等の付着でさえも、低周波ノイズの原因になります。MED プローブを MED コネクタに設置する前に、そのターミナル部分をエタノールを滲み込ませたキムワイブで毎回拭ってください。

5. MED64 システム専用ソフトウェアによる自発活動の記録

詳しくは Mobius チュートリアルをご参照ください。

6. MED プローブの洗浄方法

電極の低インピーダンス (<50 kΩ) を維持することが S/N 比の良い信号を記録する上で非常に重要となるため、MED プローブは使い捨て使用を想定して製造されています。また、低インピーダンスを維持することは、刺激を印加する際にも重要となります。インピーダンスは MED プローブを繰り返し使用することで上昇します。これは MED プローブ自体の取り扱いや、(実験後に組織を取り除いた後) 組織からの有機物質の集積が原因で電極が損傷されるためです。組織をやさしく取り除き、丁寧に洗浄すれば MED プローブを繰り返し利用することができます (注: MED プローブの表面には触れないでください。電極と絶縁層を損傷する可能性があります)。

- 1) 培養切片や培養細胞が存在した状態で MED プローブに 0.5 mM EDTA (Life Technologies #25300-054) を注ぎ、1 時間放置します。
- 2) PBS でチャンバー内を 3 回濯ぎます。
- 3) PBS で I 型コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich #C0130) を溶解し、20 U/ml にします。
- 4) コラゲナーゼ溶液をチャンバーに注ぎ、37°C のインキュベーター内で 1 時間放置します。
- 5) 使用済のコラゲナーゼ溶液を廃棄し、プローブを純水で少なくとも 3 回は濯ぎます。
- 6) 洗浄後の MED プローブは SDW を満たした状態で 90 mm ディッシュに入れ、冷蔵保管します。

6.1. EDTA-コラゲナーゼ処理による洗浄後の MED プローブの性質

オス 5 週齢の C57/BL6 マウス海馬切片を使用しました。MED プローブは急性切片のための手順に記載した PEI コートを行いました。各実験日に切片を MED プローブに置き、EPSPs (刺激強度は 10-20 μA) を 10-15 分間記録し、30 秒間の自発活動の記録も実施しました。実験後、プローブを EDTA-コラゲナーゼ処理 (上述) で洗浄し、電極インピーダンスを測定しました。MED プローブはその後、翌日の実験に備えて急性実験用の PEI コートを行いました。Fig.2 は EDTA-コラゲナーゼ処理による洗浄後、電極インピーダンスが少なくとも 10 回以上は安定している結果を示しています。

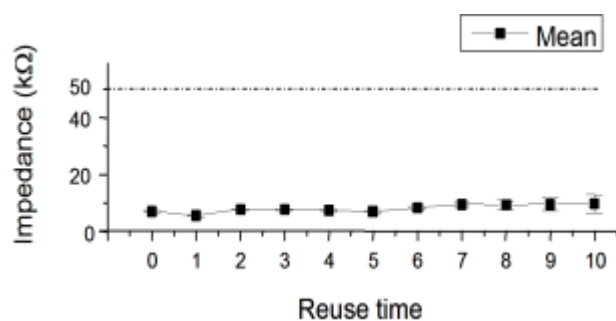


Fig.2. 再利用後のインピーダンス。

7. 指導・協力

李 鍾国 先生 (大阪大学大学院 医学系研究科 心血管再生医学寄付講座 准教授)

8. 参考文献

1. Inoue N, Ohkusa T, Nao T, Lee JK, Matsumoto T, Hisamatsu Y, Satoh T, Yano M, Yasui K, Kodama I, Matsuzaki M. Rapid electrical stimulation of contraction modulates gap junction protein in neonatal rat cultured cardiomyocytes: involvement of mitogen-activated protein kinases and effects of angiotensin II-receptor antagonist. J. Am. Coll. Cardiol., 44, 914-22, 2004.
2. Lee JK, Hidaka K, Miwa K, Shi RQ, Itoh G, Morisaki T, Kodama I. Cardiac myocytes derived from Nkx2.5-GFP knock-in murine embryonic stem cell: Electrophysiological differentiation and feasibility of transplantation. American Heart Association 75th Annual



Scientific Meeting, 2002.