

第 2 章 材料および方法

1. 細胞培養

神経標本として、ラット脊椎に存在する背根神経節細胞 (dorsal root ganglion neuron; 以後 DRG ニューロン) を用いた。DRG ニューロンは末梢神経系に属する神経細胞で、過去にパッチクランプ法を適用した神経生理学的研究例が多く、同細胞の一次培養系はすでに確立された手法である。DRG ニューロンに存在するイオンチャンネルは、電位依存性の Na^+ チャンネル、 K^+ チャンネル、 Ca^{2+} チャンネル、リガンド作動性の GABA_A レセプター等である (Ogata et al., 1988, Ogata and Tatebayashi, 1992, 1993)。

実験には生後 1 から 5 日目のラットを使用した。DRG はラット脊椎の神経節に 2 対ずつ存在し、1 匹のラットから得られる DRG の数は 20 から 30 個程である。取り出した DRG は Ca^{2+} と Mg^{2+} を含まない 33 mM (6 g/l) のグルコースを溶解したリン酸緩衝液 (Life Technologies, Inc.) に移した。DRG は薄い膜で覆われており、単一の DRG 中に 50 から 100 個程度のニューロンが存在する。パッチクランプ法の適用にあたってはこの皮膜を除去する必要があるため、トリプシンを使った化学的処理と、機械的な圧力により膜を取り除く物理的処理の二段階により行った。化学的処理では、2.5 mg/ml のトリプシンを含むリン酸緩衝液を作成し、これに単離した DRG を浸漬して恒温槽内で 37 °C に保った。酵素処理時間はラットの日齢と DRG の大きさにより、17 から 22 分とした。酵素処理後、DRG を 0.1 mg/ml のウシ胎児血清 (Newbone Calf Serum, Technologies, Inc.) と 0.08 mg/ml のゲンタマイシンを含む培養液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, Inc.) で速やかに 3 回繰り返し洗浄した。この後の物理的処理では、培養液中に浮遊している DRG を先端口径を約 800 μm に加工したパステルピペットで繰り返し出し入れし、ピペット先端を通過するときに生じる圧力を利用して DRG 表面の膜を取り除きニューロンを単離した。得られたニューロンは poly-L-lysine で表面加工されたカバーガラス (直径 1.2 cm) (Biocoat, Becton Dickinson) 上に移し、37 °C、 CO_2 濃度 10 % の条件下で 1 から 5 日間培

養し実験に使用した。

2. ホールセルおよびシングルチャネル法

膜電流はホールセル (whole-cell) およびアウトサイドアウト (outside-out) のシングルチャネルパッチクランプ法で記録した (Hamill et al., 1981)。Fig. 3 に電流記録に用いた細胞標本作成法を示した。ホールセル電流記録を行うための細胞標本の作成には、初めにパッチピペットを細胞に密着させた状態であるセル・アタッチ (cell-attached) を作る。続いて、パッチピペット側から陰圧を加えることによりピペット内部の細胞膜を貫通させると、細胞とパッチピペットが一体となった状態であるホールセルが完成する。ホールセル法は単一の細胞膜上に存在するすべてのイオンチャネル (この場合 $GABA_A$ レセプター) を、イオンが通過する際に生じる電流を測定する方法である。従って、測定される電流は個々のチャネルから発生したイオン電流の総和となる。アウトサイドアウトのシングルチャネル法を適用するための細胞膜標本は、ホールセルの状態を作った後に作成する。ホールセルの状態から、ピペット電極と細胞を引きはなすことによりピペットと細胞を分離する。この際、ピペット先端には細胞膜切片が残留しているため、ピペット先端を塞ぐ様に膜は互いに融合する。膜はピペットの先端を覆うようにして付着しているため、膜切片上に存在するイオンチャネルより発生する電流が記録できる。ここで示したシングルチャネル記録法は、膜外面がピペット電極に対して外側を向いていることから、アウトサイドアウト法と呼ばれる。

3. パッチクランプ用電流増幅器と電流記録

二つのオペレーショナルアンプのうち一つが膜の電位固定と、膜を通過する微小なイオン電流の電圧への変換を行う仕組みになっている (Fig. 4)。それらを可能にしているのが高抵抗を間においたフィードバック回路である。 Cl^- 電流を測定する目的から、外液と内液は Na^+ および K^+ 電流の発生を抑えた組成とした。膜電位は -60 mV に固定し、 Ca^{2+} 電流はこの条件では発生しない。イオン

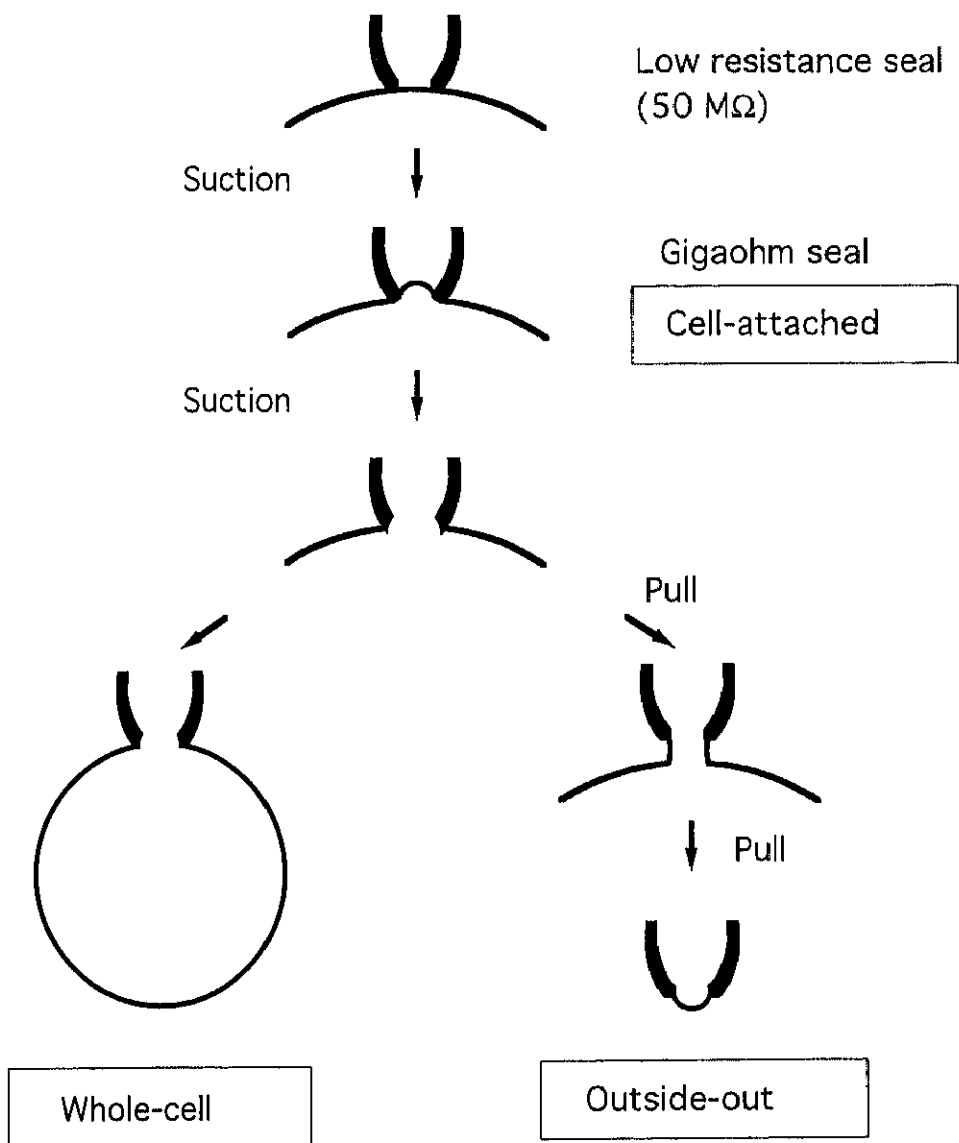


Fig. 3. Schematic representation of the procedures which lead to recording configurations. The whole-cell and outside-out configurations were employed in the present studies (From Hamill et al., 1981).

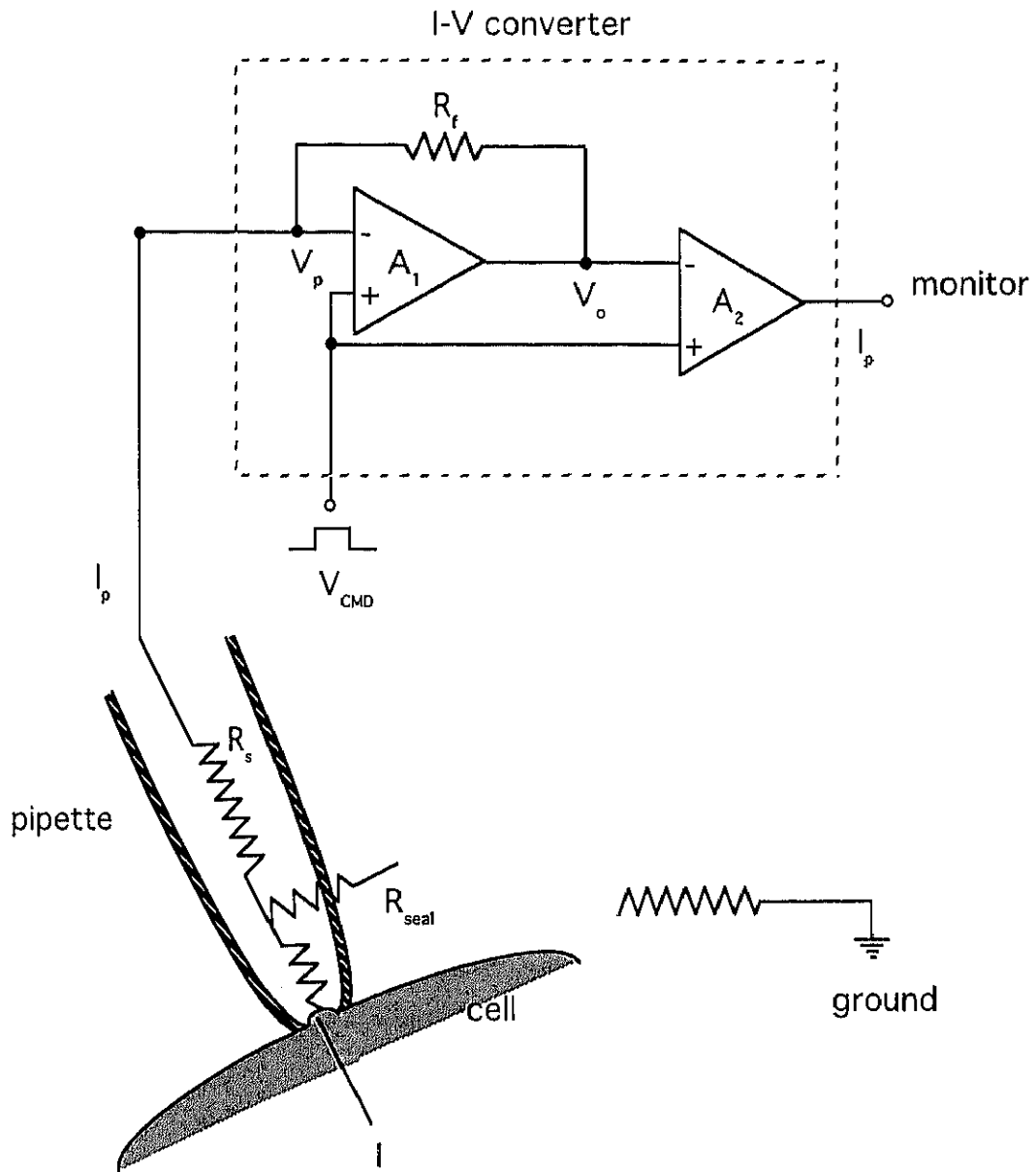


Fig. 4. Current measurement circuits for patch clamp experiment. Two operational amplifiers are used. The current flow through the cell membrane measured by the voltage change between V_o and V_p .

電流はパッチクランプ用アンプの Axopatch 200 または 200B (Axon instruments, Foster City, CA) を用いて、2 kHz のフィルターを通して電圧に変換し、コンピュータに記録した。シングルチャネル電流記録を行う際にはチャネルの速い現象を解析する目的から、20 kHz のサンプリング周波数で 2 kHz のフィルター (four-pole lowpass Bessel filter) を通して電圧に変換し、コンピュータに記録した。

細胞内液は、CsCl (140 mM)、MgCl₂ (1 mM)、ethylene glycol bis (2-aminorthylether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) (5 mM)、および 2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) (10 mM) を蒸留水に溶解して調整した。細胞外液は、choline chloride (136 mM)、CaCl₂ (2 mM)、MgCl₂ (1 mM)、および HEPES (10 mM) を蒸留水に溶解して調整した。いずれの溶液も、水素イオン濃度は Tris (hydroxymethyl) aminomethane で pH 7.3 に、浸透圧はショ糖で 290 mOsm に調整した。

ホールセル電流記録に用いたピペット電極は、内径 0.80 mm、外径 1.10 mm のガラスキャピラリー管 (Kimble Products, Vineland, NJ) を用いて、電極内に内液を満たした状態で 2 から 3 MΩ の抵抗値を示す様に微小電極作成装置 (PP-83, Narishige, Tokyo, Japan) で作製した。シングルチャネル電流記録に用いたピペット電極は、ホールセル電流記録に用いたものと同様のガラスキャピラリー管を用いて作成した。パッチ膜内に複数のチャネルが入ることを防ぐためと、背景ノイズレベルを低くするために、先端の経が小さくなるように作成し、ピペット電極内に内液を満たした状態で 10 から 12 MΩ の抵抗値を示したものを実験に使用した。ピペット電極と細胞膜の間に高抵抗のシールを得るため、先端をマイクロフォーシ (Narishige, Tokyo, Japan) で熱して加工した。

4. 化合物

実験に用いた各種化合物は以下の通りである。フィプロニルは Rhône-Poulenc Yuka Agro K.K. (Akeno, Japan) から譲渡された、純度 95 % のものを用いた (Fig. 2A)。ディルドリンは東京化成販売株式会社から購入した、純度 85 % のものを用いた (Fig. 2B)。ピクロトキシニンピクロトキシニンを構成している成分

であり、それ自身一つの化合物である (Fig. 2C)。ピクロトキシンはピクロトキシニンと生物活性のないピクロチンそれぞれ 1 分子から構成されている分子化合物であることから、本研究ではピクロトキシニン (Sigma) を使用した。アニサチンは千葉大学薬学部、奥山恵美博士らにより譲渡されたサンプルを用いた (Fig. 2D)。各種化合物は、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解して高濃度の保存溶液とし、各種化合物を外液に溶解して細胞に処理する際には、溶液中の DMSO 濃度が 0.1 % (v/v) 以下になるよう所定濃度に調整した。

GABA (Sigma) は、蒸留水に溶解して高濃度の保存溶液とし、実験に用いる際には細胞外液に溶解して所定濃度に調整した。

5. 薬剤処理法

ホールセル法では 2 種類の薬剤処理法を使った。一つは GABA を短時間細胞に処理する方法である (Fig. 5A)。この方法では、300 μ M の GABA 溶液をピコスプレッツアー (World Precision Instruments, New Haven, CT) で 10 msec 細胞に処理することにより GABA 誘導性のイオン電流を記録した。各種化合物は外液に溶解して処理し、細胞と外液流入口を近づけ流速を早めることにより、チャンバー内の外液交換が速やかに行われるようにした。もう一方は、GABA を長時間細胞に処理する方法である (Fig. 5B)。これは U チューブ薬剤処理装置を使って各種化合物を細胞に処理する方法である。ピコスプレッツアーおよび U チューブ薬剤処理装置は、コンピュータにより制御されたプロトコールにより操作した。

シングルチャンネル法では、各種化合物は外液に溶解して処理した。

6. ホールセルデータ解析

薬剤の効果を評価するために、半抑制濃度である IC_{50} 値を用いた。同値は以下の式により推定した。

$$I = I_{\max} C^n / (C^n + IC_{50}^n)$$

(I: イオン電流、 I_{\max} : 最大イオン電流、C: 濃度、n: ヒル定数)

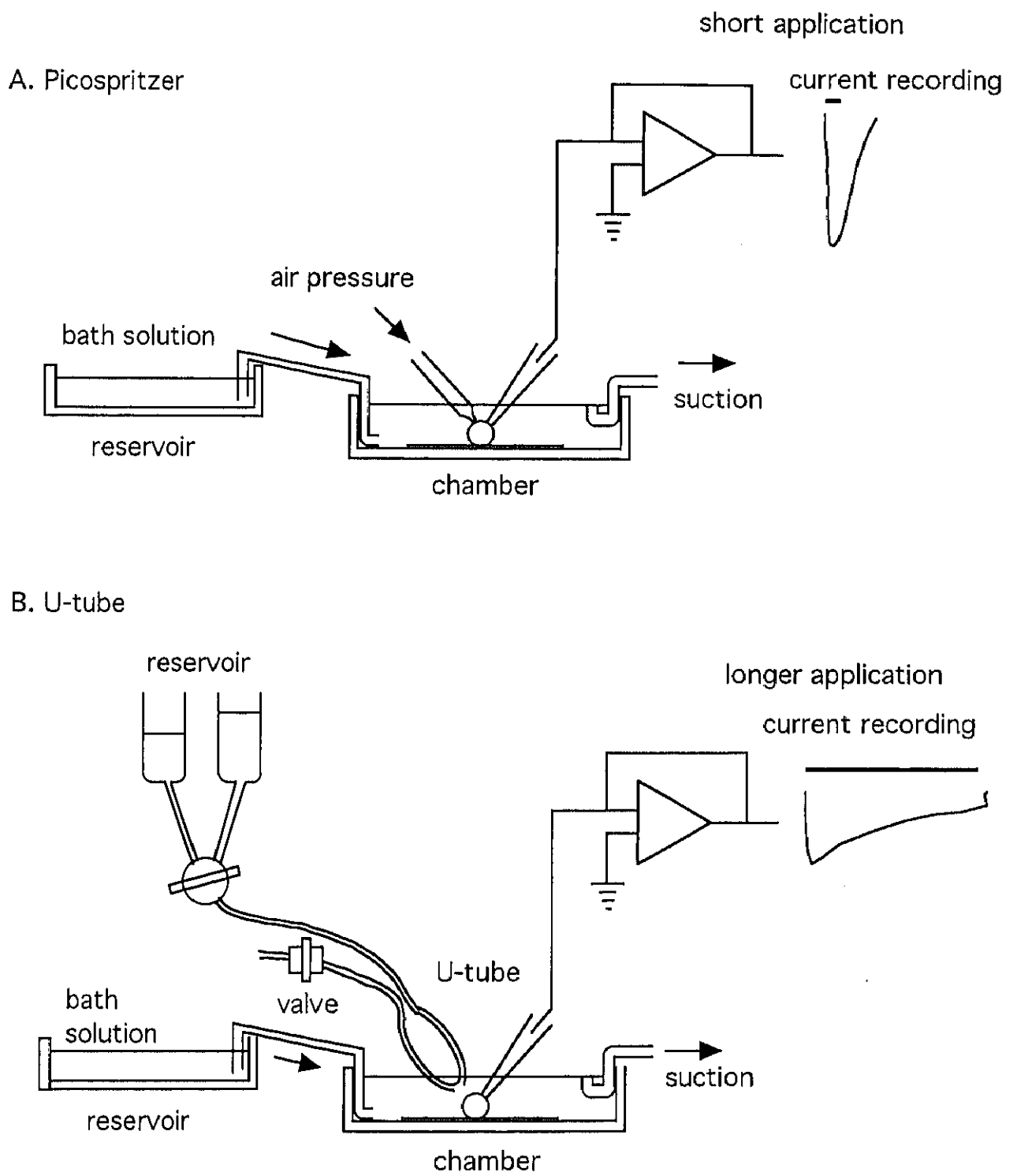


Fig. 5. Schematic diagram of drug application system.

回帰曲線の分析は最小二乗法により推定した (Simplex, SYSTAT: Statistics, Version 5.2 Edition)。イオン電流はコンピューターに記録され、pClamp version 6.0 (Axon instruments) で解析した。

7. シングルチャンネルデータ解析

コンピューターに記録したシングルチャンネルイオン電流は、pClamp version 6.0 (Axon instruments) を用いてコンピュータ上で解析した。電流記録はノイズ成分を除外する目的で、pClamp ソフトウェアにより 1 kHz のフィルターを通した後解析した。チャンネル開閉遷移の検出にはチャンネルコンダクタンス 50 % 限界基準 (Colquhoun and Sigworth, 1995) をもとに検出した。1 kHz のフィルターを通したことから、ヒストグラム作成の際、330 μ sec 以下の短い開閉は除外した。開閉時間解析時に生じる誤差を防ぐ目的で、一つのパッチ膜に複数個のチャンネルが入った記録は除外した。

GABA 処理によりチャンネルは開閉を繰り返すことから、チャンネルが開いてイオン電流が流れている状態の開時間、チャンネルが閉じてイオン電流が流れていない状態の閉時間を解析した。さらに、短い閉時間で区切られた一つの開時間の集合体をバースト持続時間として解析した。それぞれの事項 (開時間、閉時間、およびバースト持続時間) について、横軸に対数表示した時間を、縦軸に事象数を示したヒストグラムを作成した。臨界値 t_c よりも短い閉状態により分離している繰り返しの開状態を 1 つのバーストとした (Colquhoun and Sakmann, 1985)。閉時間ヒストグラムから得られた 2 つの短い閉成分をバースト間の閉状態とし、誤って分類される事象数を最小にする Jackson et al. (1983) の方法を用いて t_c を算出した。

チャンネルの開閉反応はマルコフ連鎖過程とみなせるので、開閉持続時間の頻度分布ヒストグラムは $f(t)=(1/\tau)\exp(-t/\tau)$ で近似される ($f(t)$: 持続時間 t の事象が出現する確率を表す確率密度関数、 τ : 持続時間の平均値に相当する時定数)。基本的にはチャンネルは開と閉の 2 つの状態を持つが、アゴニストや薬剤の結合様式により複数の状態をとるため、コンダクタンス (抵抗の逆数で定義される

イオンの通りやすさを表す指標) が区別できない開 (閉) 状態を複数個持つと考えられている。そのため一般に開 (閉) 状態のヒストグラムは状態数 (n) に応じた複数の指数関数の重ねあわせとなり、理論曲線は $f(t)=\sum(a_i/t_i)\exp(-t/\tau_i)$ で表される (a_i : 各成分の総事象数に対する相対頻度) (Sigworth and Sine, 1987)。各ヒストグラムの一次指数関数への回帰は最小二乗法を用いた。