

蛍光イメージング法によるマウスおよびモルモット心室筋細胞内のNa⁺濃度測定

関口可菜、濱口正悟、行方衣由紀、田中光

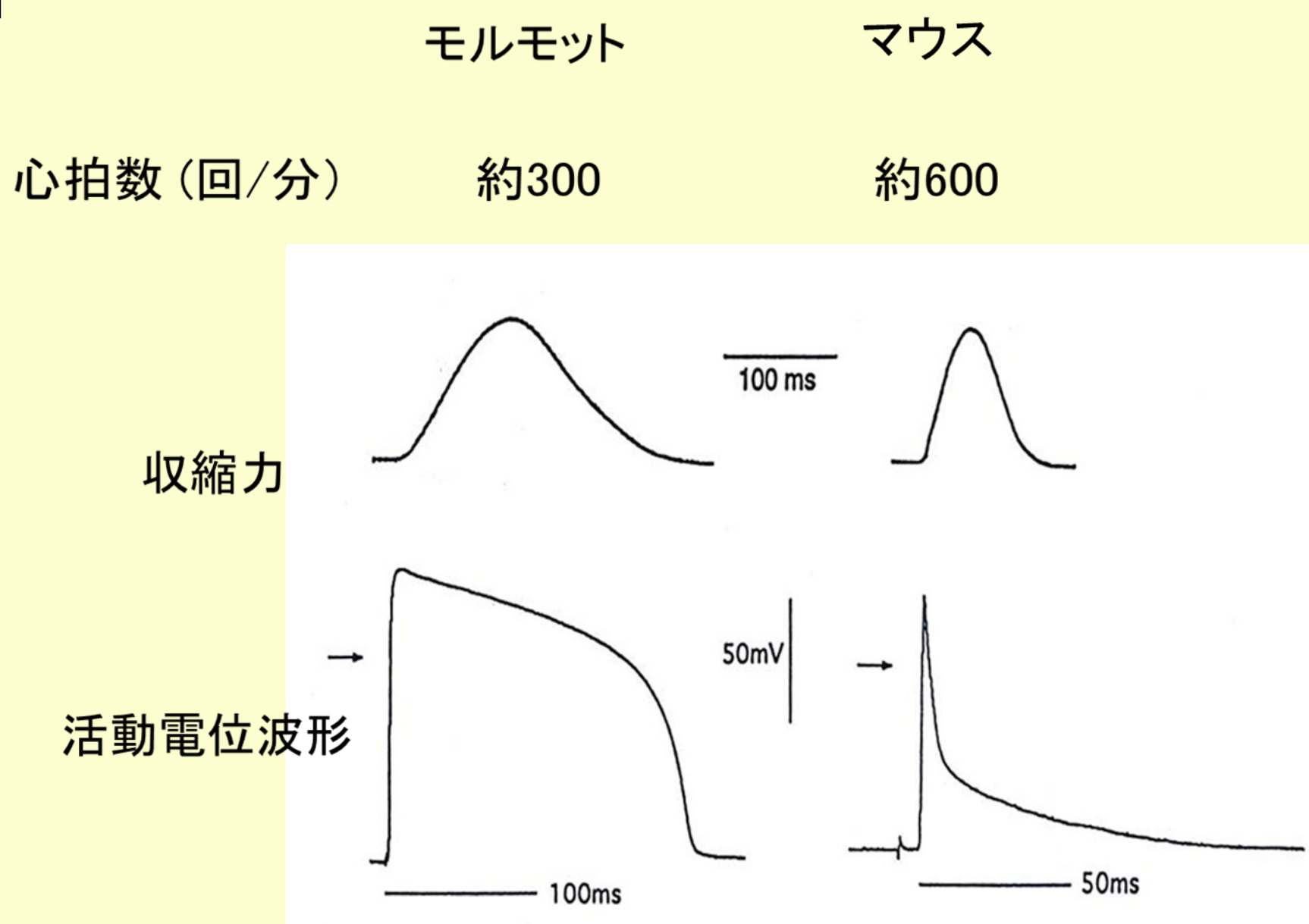
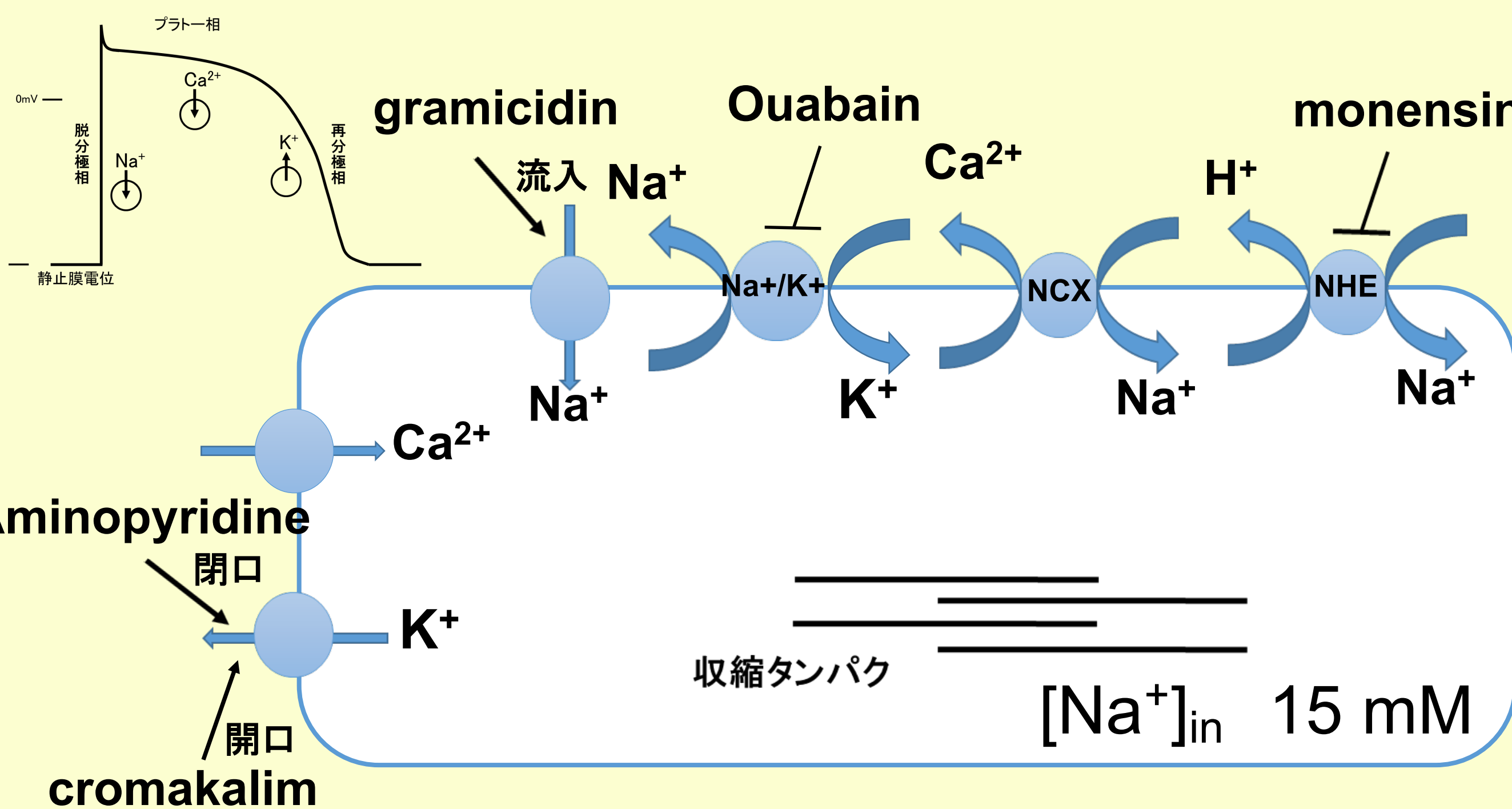
東邦大・薬・薬物



東邦大学

背景

- ・心臓の収縮・弛緩は細胞内外のイオンによって制御されている。Na⁺濃度はNa⁺/K⁺ポンプの働きによって細胞内よりも細胞外の方が高くなるように制御されており、この濃度勾配によってイオンチャネルや様々なトランスポーターが駆動している。
- ・Na⁺濃度に関与する分子は薬物の作用点にもなっている。例えば、強心配糖体はNa⁺/K⁺ポンプの阻害を介して強心作用を示す。
- ・当研究室では実験動物として汎用されるモルモットとマウスでは活動電位波形や薬理学的性質が異なることを報告している。しかし、Ca²⁺動態に関する検討はされているが、Na⁺に関する情報はない。
- ・Na⁺濃度を測定する方法には様々なものがあるが、蛍光プローブを使ったNa⁺濃度の測定法は簡便に行うことができる利点がある。



[Na⁺]_{out} 140 mM

目的

蛍光イメージング法を用いた細胞内Na⁺濃度を計測する方法を確立し、以下の点を明らかにする。

- ①【ウアバインを用いた薬理作用の検出】
- ②【成体期モルモット及び成体期マウスの心室筋細胞内Na⁺濃度の測定】
- ③【活動電位を変化させたときのNa⁺濃度の変化】

総括

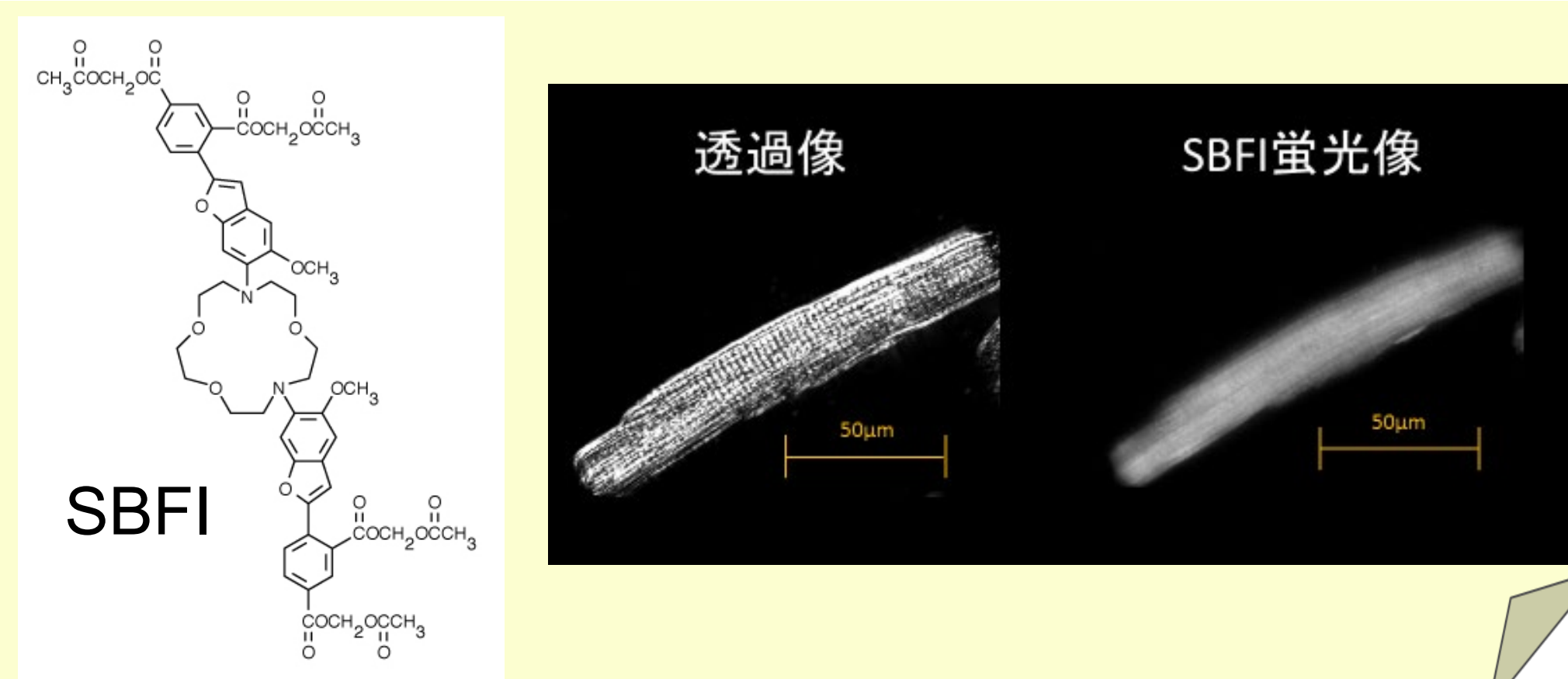
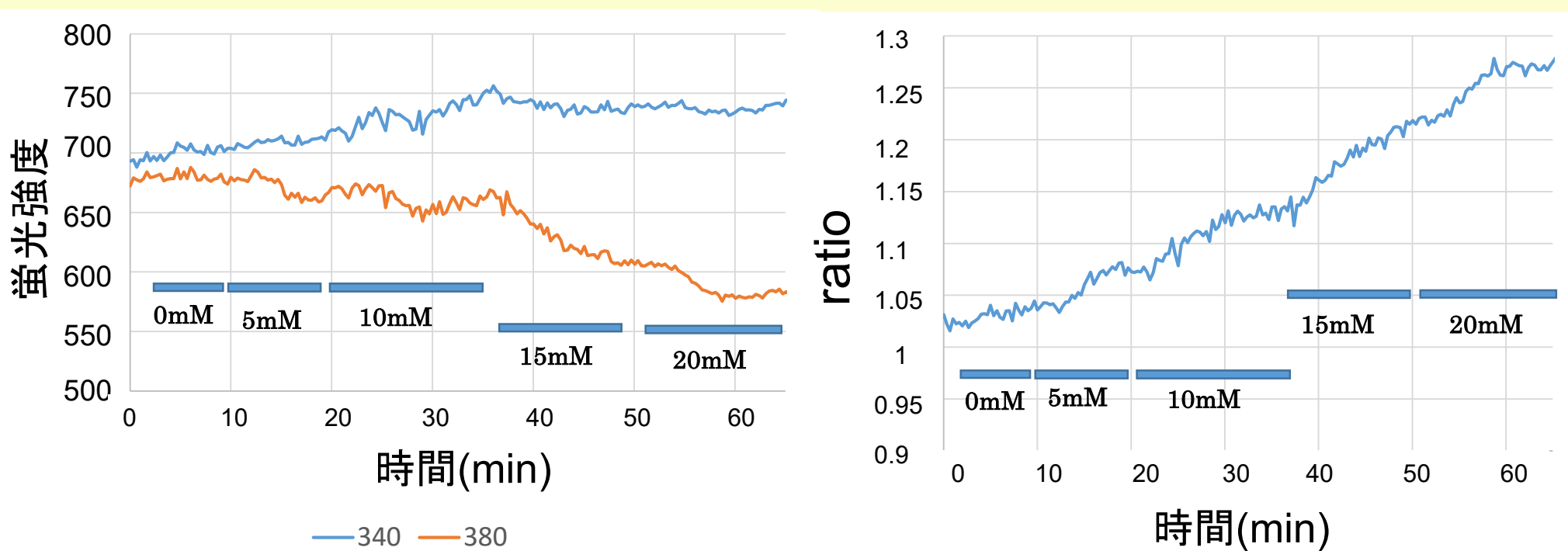
SBFIを使った蛍光イメージング法によるNa⁺濃度の測定法を確立し、

- ①ouabainにより細胞内Na⁺濃度が上昇することを確認した。
- ②心室筋細胞内Na⁺濃度はマウス>モルモットであった。
- ③細胞内Na⁺濃度の違いは活動電位波形によるものではない。

本測定法は生きた心筋細胞の興奮収縮機構や薬理作用の研究に有用である。

実験方法

Na⁺濃度の絶対値が算出可能な蛍光プローブSBFIをモルモットおよびマウス単離心室筋細胞にとりこませ、落射蛍光顕微鏡で観察した。まず正常Tyrode液中で細胞に2つの異なる波長の励起光を照射したときのSBFIの蛍光強度比(340 nm/380 nm)を測定した。次にその細胞において細胞内Na⁺濃度を段階的に変化させて蛍光強度比との関係性(検量線)を求め、それに基づいてTyrode液中での細胞内Na⁺濃度を計算した。細胞内Na⁺濃度を変化させる際には、まず細胞をNa⁺ ionophoreであるgramicidin (2 μM), Na⁺-K⁺ ATPaseの阻害薬である ouabain(10 μM), Na⁺/H⁺ アンチポートであるmonensin (40 μM)を含むNa⁺-free溶液中で安定化させ、その後以外液Na⁺濃度を5, 10, 15, 20 mMと段階的にキャリアブレーションした。



正常Tyrode液(mM)
132 NaCl, 4.8 KCl, 2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 glucose, pH 7.4

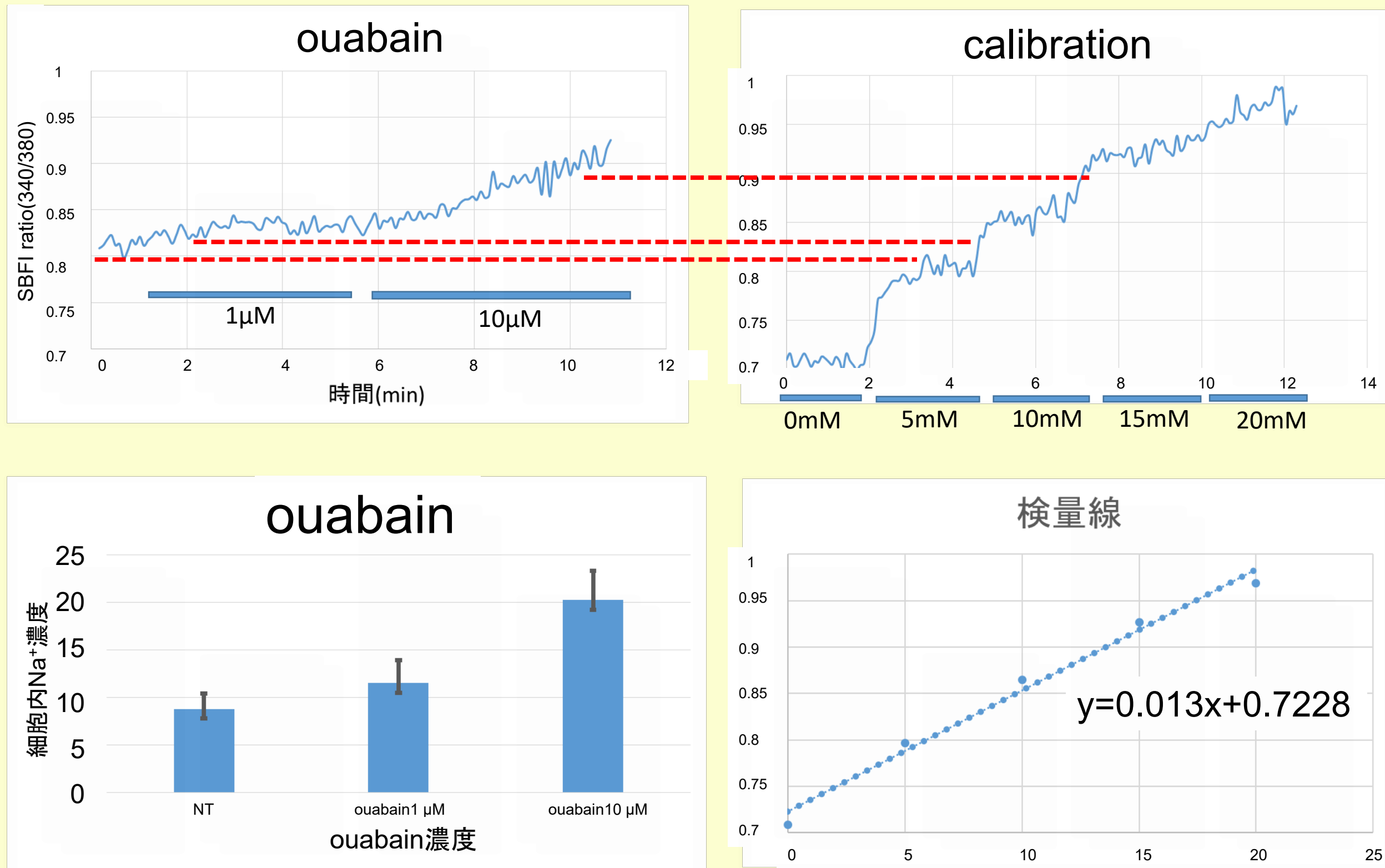
Na⁺濃度の異なる外液は、以下の2種類の液を混合することによって作成した。

140mM K 溶液(mM)
135KCl, 10Glucose, 10HEPES,2EGTA-KOH,pH7.2

140mM Na溶液(mM)
135 NaCl,10 Glucose,10 HEPES,0.4 EGTA-NaOH, pH 7.2

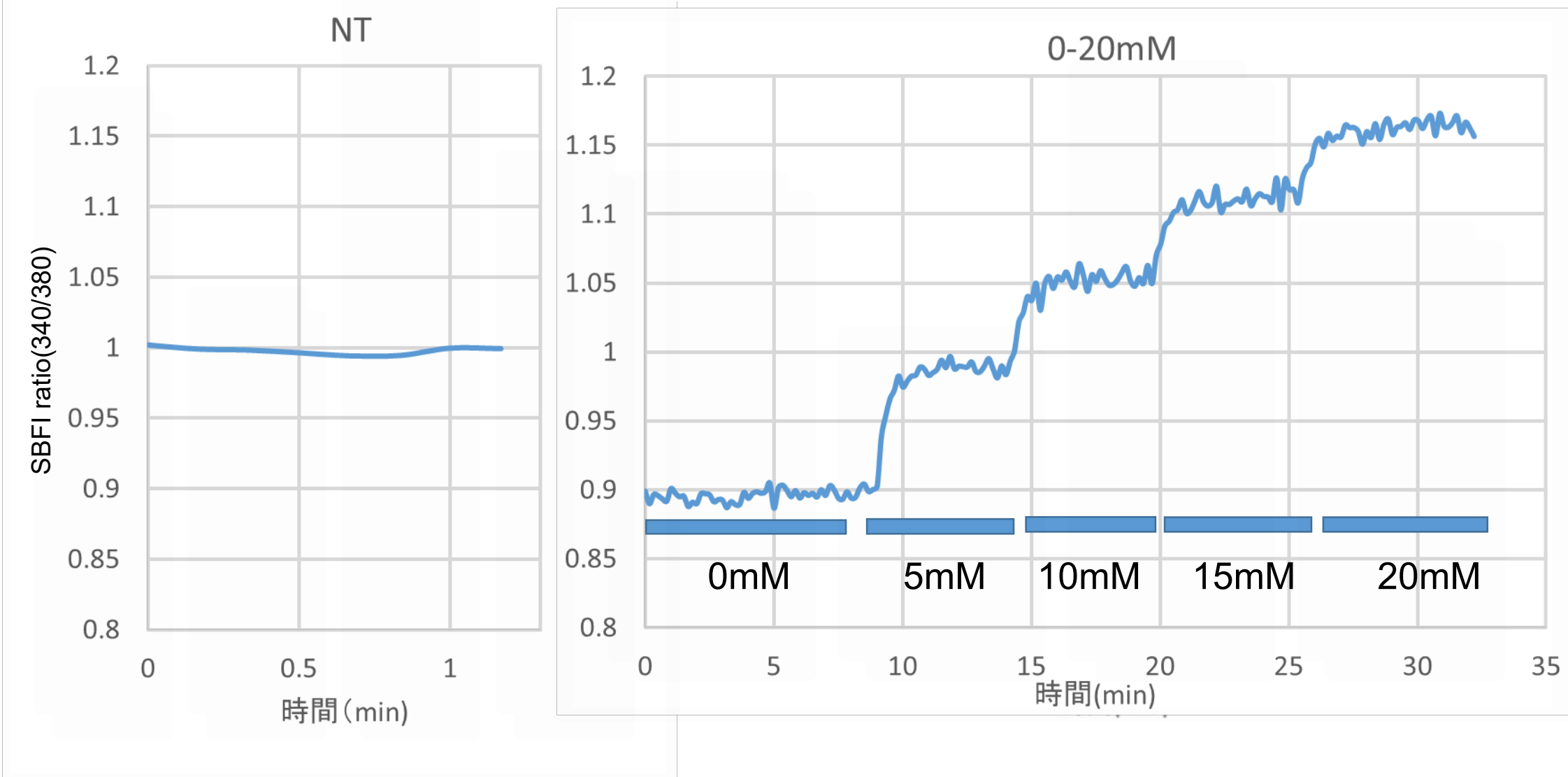
結果①: ouabainによってNa⁺は上昇した

正常Tyrodeにouabain1 μM及びouabain10 μMを加えた溶液を用いてモルモットの細胞内Na⁺濃度の測定し、その後キャリアブレーションを行い、検量線により濃度を求めた。結果、通常の正常Tyrodeの場合のNa⁺濃度は7.64 mM±1.63、ouabain1 μMの場合のNa⁺濃度は8.49 mM±2.38、Ouabain10 μMの場合のNa⁺濃度は14.04 mM±3.13であり、ouabainの濃度をあげるとともに細胞内Na⁺濃度の上昇がみられた。(n=8)

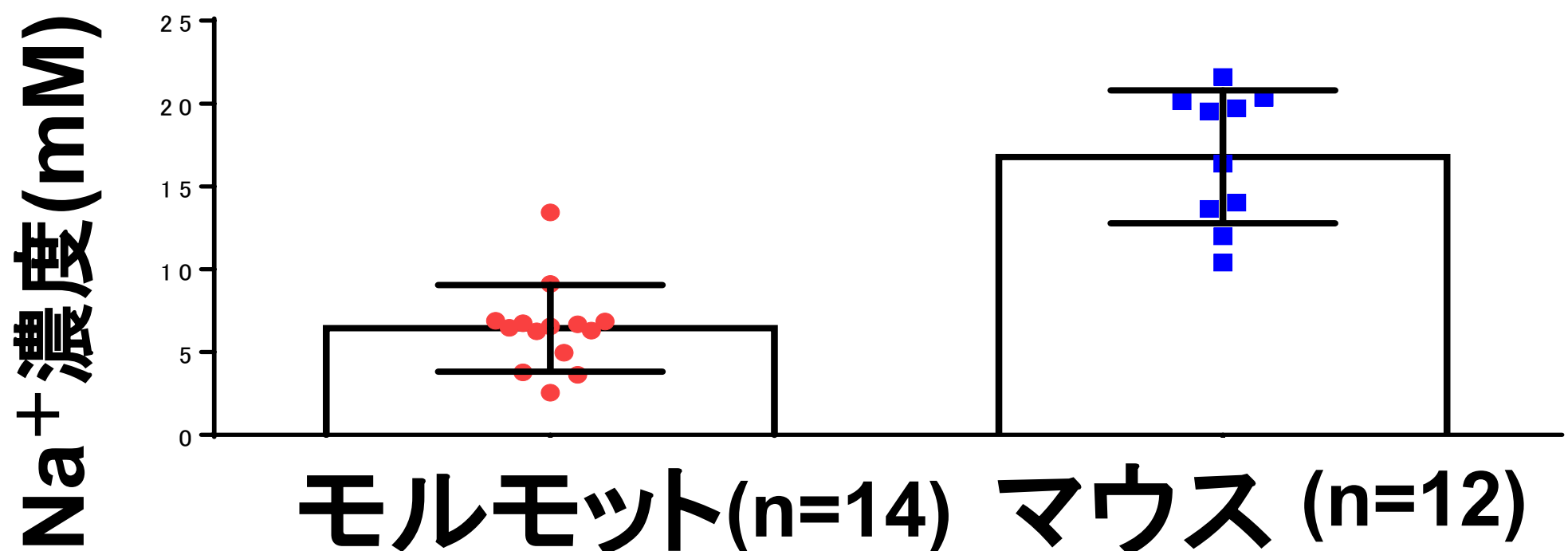
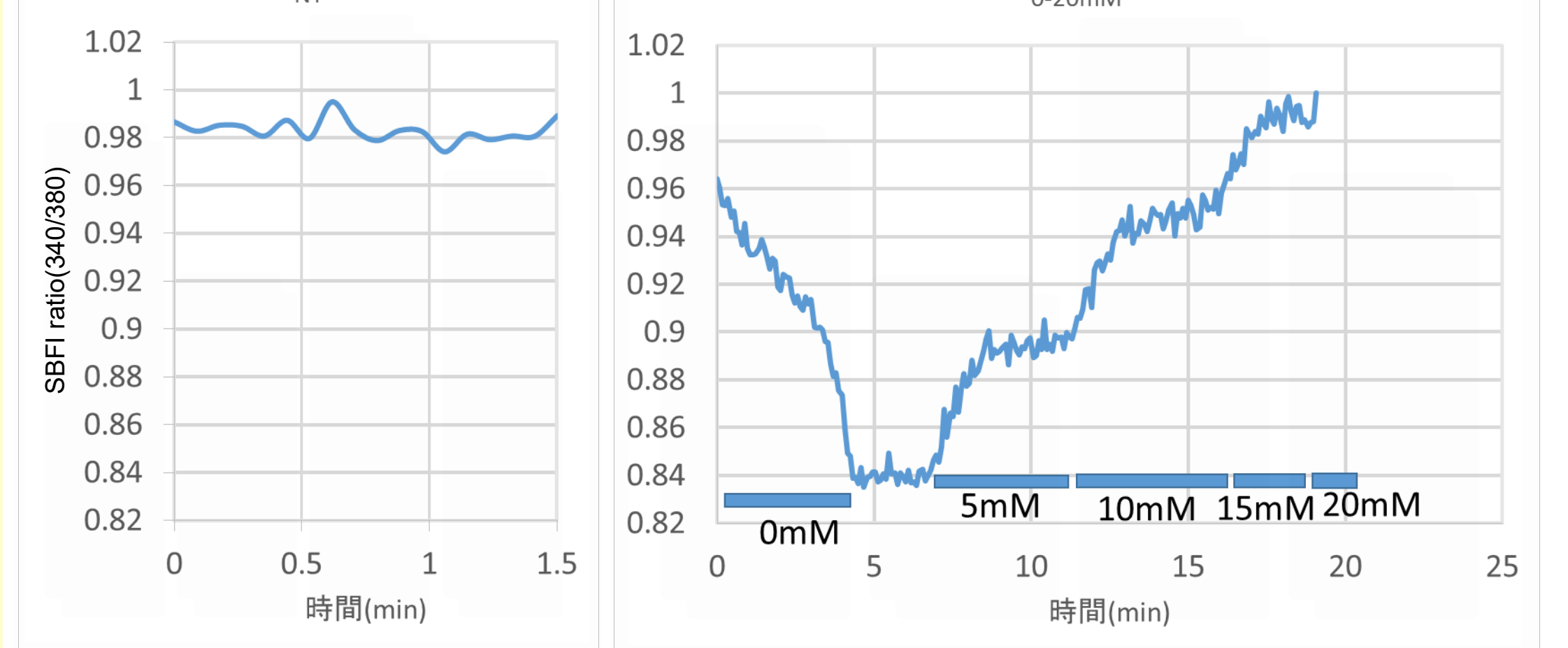


結果②: モルモットよりもマウスの方がNa⁺濃度が高い

モルモット: 6.4±0.70 mM

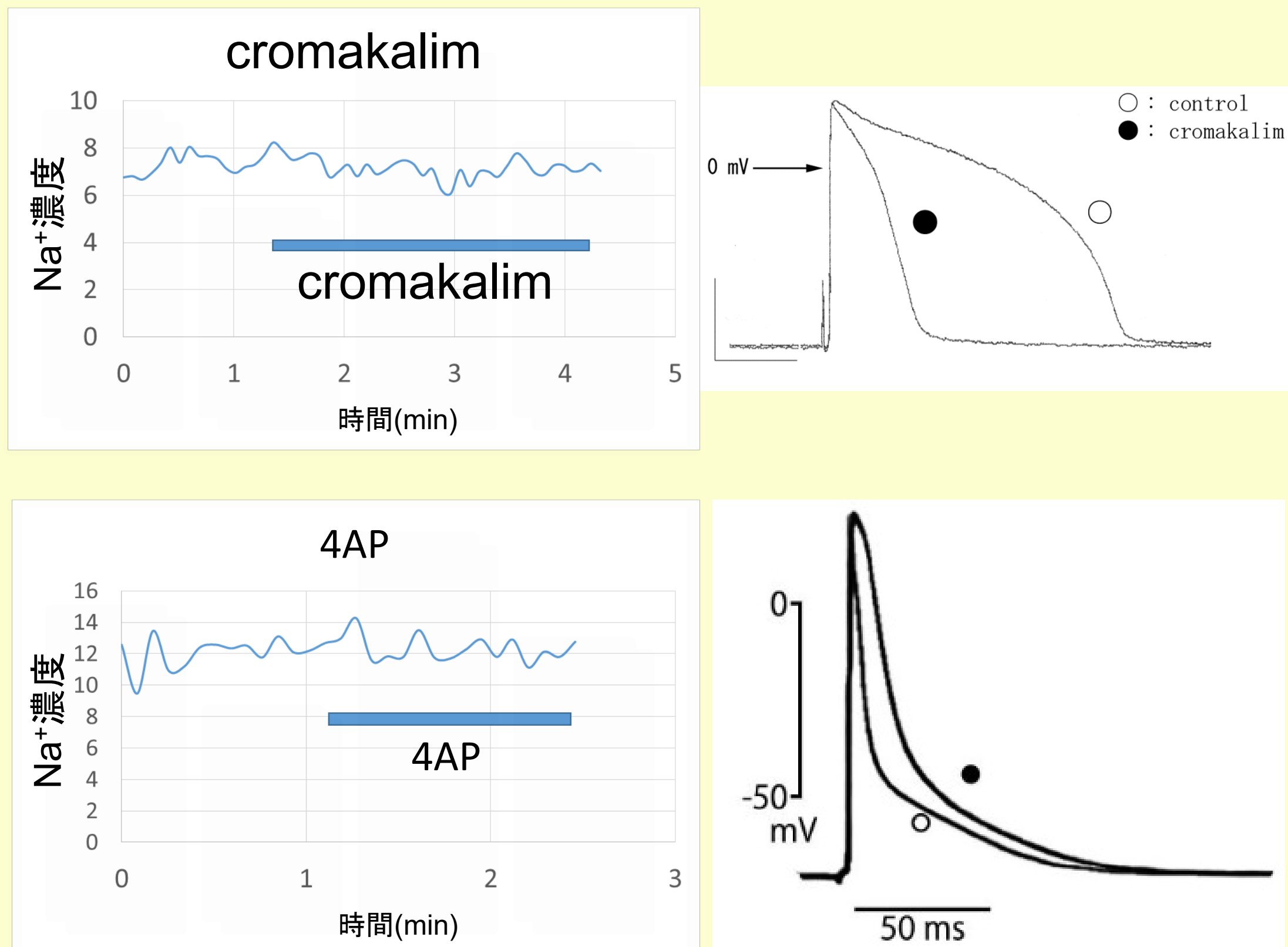


マウス: 15.7±1.73 mM



結果③:活動電位を変化させてもNa⁺濃度に変化は見られない

成体期モルモットの活動電位を短縮させた場合(上段)、成体期マウスの活動電位を延長させた場合(下段)ともにNa⁺濃度に変化は見られなかった。



実験方法③

モルモットのNa⁺濃度測定には正常Tyrodeに活動電位を短縮させるK⁺ATPチャネル開口薬である cromakalim(30 μM)を加えた溶液、マウスのNa⁺濃度測定には正常Tyrodeに活動電位を延長させるK⁺チャネル遮断薬である4-Aminopyridine(3 mM)を加えた溶液を用いて測定し、キャリアブレーションを行った。