

# LECTURES

## 生理学学生実習： パッチクランプ法によるシングルチャネル記録

Howard Hughes Medical Institute/Massachusetts General Hospital  
小泉 周  
埼玉医科大学生理学教室 渡辺 修一  
星城大学リハビリテーション学部 金子 章道

### はじめに：この実習の到達目標

この実習の目標は、モルモット心室筋細胞の内向き整流性Kチャネルのシングルチャネル記録をパッチクランプ法（cell-attachedモード）で行い、以下の点を学生に理解させることにある。

- (1) 平衡電位（ネルンストの式）
- (2) 細胞の静止膜電位
- (3) チャネルのコンダクタンス
- (4) チャネルの開確率とその電位依存性
- (5) 電位依存性チャネルを通しての細胞全体での電流とその電位依存性

\*このチャネルは開閉が比較的ゆっくり起こるので、学生が記録紙上で電流値や開時間等を測定することができる。

実際に、慶應義塾大学医学部生理学教室で行った実習（1992-2002）では、4日間の日程で、10-15人の学生に対して指導者2名が担当し、実験およびレポート作成、ディスカッションまでを学生に行わせた。

なお、全細胞記録法、穿孔パッチクランプ法、電流固定法によるパッチクランプ実習の方法については、他の文献・教育講座に譲ることとしたい。

### 実習の日程

おおむね以下のような日程（4日間）を組んで実習を行った。

第1日目 午前：実習のガイダンス、イオンチ

ャネルについて概説

午後：溶液の作製、データ記録法と解析法について概説

第2日目 午前：標本作製（心室筋細胞単離）  
午後：実験

第3日目 午前：標本作製（心室筋細胞単離）  
午後：実験およびデータ整理

第4日目 午前：データ整理およびディスカッション  
午後：ディスカッションおよびレポート作成

### 実習の準備

- (1) モルモット、オス 350-400 g
- (2) ランゲンドルフ型灌流装置：心筋細胞単離用の灌流セットアップを指導者が自作した（図1を参照）
- (3) 心室筋細胞単離用の溶液
- (4) コラゲナーゼ溶液（Worthington type-II collagenase 100 mg/175 ml Ca-free Tyrode 溶液）
- (5) パッチクランプ記録用の溶液

### 心室筋細胞の単離

モルモット心臓からの心室筋細胞の単離は以下の方法で指導者が行った。なお、動物実験に際しては、学生に動物実験の意義と動物の尊厳を理解させた上で、全ての手技を日本生理学会の動物実

験指針に従って行った。

図1のようなランゲンドルフ型灌流装置を用意する。

(1) 以下の溶液を用意し、37℃の保温槽で保温しておく(100% O<sub>2</sub>で飽和)。

瓶 (A) 100 ml, Tyrode 溶液に, CaCl<sub>2</sub> 1.8

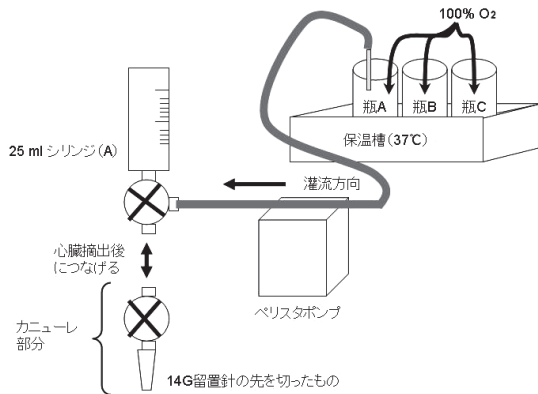


図1. ランゲンドルフ型灌流装置

mMを加えた溶液

瓶 (B) 100 ml, Ca-free Tyrode 溶液

瓶 (C) 175 ml, コラゲナーゼ溶液

(2) その他に, 20 ml, Ca-free Tyrode 溶液を灌流系のシリンジ (A) にいれておく. また, 100 ml 程度の Ca-free Tyrode 溶液を氷で冷やしておくといくとよい (手術用)。

(3) 灌流系に溶液を一度灌流させてみて, 空気がはいっていないことを確認する。

(4) モルモット心臓の摘出

モルモットの腹腔にネンブタール (50 mg/kg) を注射し麻酔する。

下腹部から喉に至るまでの正中の皮膚を切開する. 胸部は皮膚を完全にあげ, 胸郭が見えるようにしておく。

次に, 腹部の腹壁を切開し, 腹腔内に入ります. 右側腹部に切開をいれ, 臓器を展開し, 下大静脈を探す. 下大静脈からヘパリン (0.1 ml) を静脈注射する。

次に, 胸腔の左右の縁から肋骨を切っていく

表 1

Ca-free Tyrode 溶液	(mM)	K-B 溶液	(mM)
NaCl	143	K-Gluconate	70
KCl	4	KCl	30
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.33	Taurine	15
MgCl <sub>2</sub>	0.5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10
HEPES	5	MgCl <sub>2</sub>	0.5
Glucose	5.5	HEPES	5
pH 7.4 adjusted with NaOH		Glucose	60
		EGTA	0.5
		pH7.4 adjusted with KOH	

表 2

細胞外液	(mM)	電極内液	(mM)
NaCl	140	KCl	145
KCl	10.8	CaCl <sub>2</sub>	1.8
CaCl <sub>2</sub>	1.8	MgCl <sub>2</sub>	1
MgCl <sub>2</sub>	1	Glucose	10
Glucose	10	HEPES	5
HEPES	5	pH 7.4 adjusted with KOH	
pH 7.4 adjusted with NaOH			

(この際、正中からのアプローチは内胸動脈を切断する可能性があるのを避ける)。さらに、胸腔内が見えるように展開し、心臓の鼓動を確認する。

心臓の周囲の結合組織を剥がし、大動脈を露出させる。大動脈に縫合糸をかけ、緩く縛っておく。

縫合糸で縛った遠位側の大動脈の壁に横に切開をいれ、そこからカニューレ(図1を参照)を大動脈に刺入し、縛った箇所をくぐって近位側にむかって挿入する。

カニューレを大動脈に挿入した状態で、縫合糸を強く縛り、カニューレを固定する。

(5) カニューレごと、心臓を摘出し、灌流系に吊るす(図1を参照)。

(6) 灌流液を以下の順番で心臓に循環させる。この際、空気が灌流系に入らないように細心の注意を払う。

1. Tyrode 溶液 瓶 (A) 血液の色が抜けるまで

2. Ca-free Tyrode 溶液 瓶 (B) 心臓の拍動が止まるまで

3. コラゲナーゼ溶液 瓶 (C) 20分間(リサイクルして利用)

4. Ca-free Tyrode 溶液 瓶 (B) 2-3分間

(7) 心臓を房室間で切り、K-B溶液(50 ml)に入れる。K-B溶液内で心室の内腔を開き、心内膜に何箇所かカミソリで切れ目を入れる。

(8) 心臓をピンセットでつまみながらK-B溶液(50 ml)の入ったビーカーの中でゆっくりとゆらす。しばらくすると、だんだんに心室筋細胞がビーカーの底に溜まってくる。2時間程度放置したあと、収縮せずに生き残った心室筋細胞をパッチクランプ実験に利用する。

### cell-attached モードによるパッチクランプ記録

パッチクランプ法(cell-attachedモード)でのシングルチャンネル記録を行う。

実際の実験の様子は写真1を参照して欲しい。基本的には、普段のパッチクランプのセットアップと変わらないが、以下の2点を学生実習として特に注意し用意した。

(1) 顕微鏡の画像を観察できる外部モニターを

用意し、実験者のほかに、同時に何人かの学生と一緒にパッチクランプに参加出来るような環境を作った。

(2) 記録装置として、コンピューターでの記録以外に、デジタルレコーダーや、その場でプリントアウトできるチャートレコーダーを用意した。

Cell-attachedした状態で、ピペットの電位を電位固定法によってさまざまな電位に固定した(図2参照)。対象となるチャンネルは過分極によって活性化される内向き整流性の電流であるから、ピペットの電位として(+)側でも様々な電位に固定することが必要である。もちろん、Kの平衡電位(この実験条件では+2 mV)をはさんで電位をふっておくことが重要である。

今回の実験条件とモルモット心室筋細胞内のKおよびNaの組成(文献値)を図2に示した。細

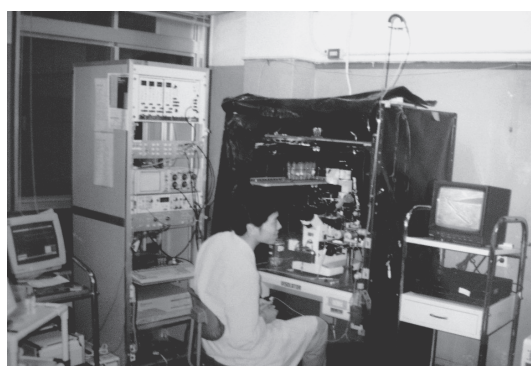


写真1. パッチクランプ学生実習の様子

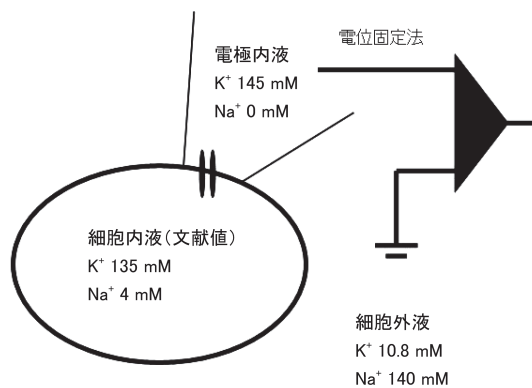


図2. 実験条件

胞の静止膜電位 (K の平衡電位,  $E_K$ ) については、ネルンストの式から学生に計算で求めさせた。

$$E_K = RT/F \times \ln ([K]_o/[K]_i) = 0.0257 \times \ln (10.8/135) = -64.9 \text{ mV}$$

R (気体定数) = 8.31 J/mol/K

F (ファラデー係数) =  $9.64 \times 10^4$  C/mol

T (絶対温度) = 298° (摂氏 25°C) として計算  
以下、細胞の静止膜電位を -65 mV であるとして話しを進める。

### データ解析

解析の目的は、(1) シングルチャネルのコンダクタンス (とその電位依存性) および (2) シングルチャネルの開確率 (とその電位依存性) を求めることにある。

実際に学生がとったデータの一部を図3に示す。

#### (1) シングルチャネルのコンダクタンスとその電位依存性

注意する点として、実際にはシングルチャネルとはいかず、パッチ膜には幾つかのチャネルが含まれており、様々な大きさの電流を見ることが多

かった。これが同じ種類のチャネルによるものなのか、違う種類のチャネルなのか、学生の考察ポイントとなる。コンダクタンスやその電位依存性を調べ、IV 曲線をプロットし逆転電位を調べることによって、同じチャネルか違うチャネルかを考察することが出来る。

具体的に実際の記録 (図3) をみてみることにしよう。たとえば、電極電位 -25 mV の記録をみると一段の電流 A と二段目になっている大きな電流 B が記録されている。これと同じように小さな電流 A と大きな電流 B は他の電位の記録でもみることが出来る。これらの記録から、電流 A と電流 B の大きさについて、横軸にパッチ膜の予想膜電位をとって IV 曲線を書かせる (表3および図4)。

この IV 曲線を見ると、大きな電流 B は、小さな電流 A と同じ逆転電位をもち、傾きがちょうど2倍の電流であることがわかる。すなわちこのことから、電流 B (コンダクタンス 56 pS) は、電流 A (コンダクタンス 30 pS) と同じチャネルが2つ同時に開いたときの電流であると考察できる。また、これらの電流の逆転電位 (-5 mV 程

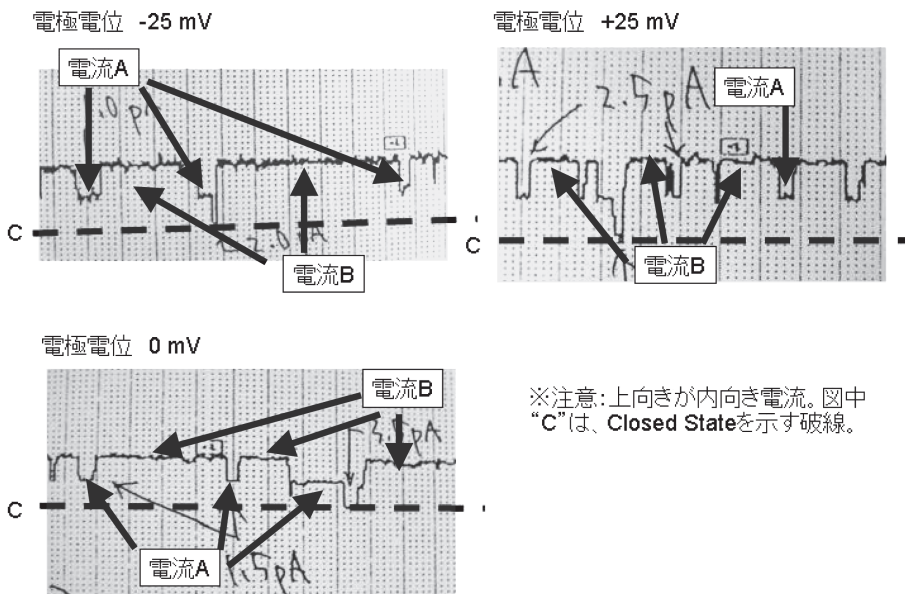


図3. 実際の記録より

表 3

電極電位 (mV)	パッチ膜の予想膜電位 (mV)	小さな電流 A (pA)	大きな電流 B (pA)
-100	35	0	0
-75	10	0	0
-50	-15	0	0
-25	-40	-1	-2
0	-65	-1.5	-3.5
25	-90	-2.5	-5
50	-115	-3.4	-6.5
75	-140	-4.2	

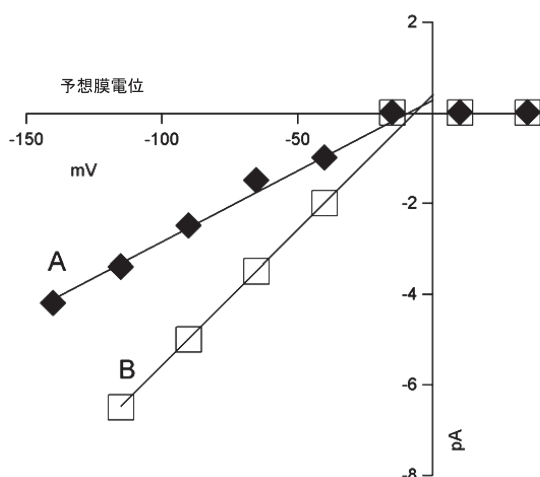


図4. 実際の記録から作ったIV曲線

度)は、実験条件から計算して予想することの出来るKの平衡電位 (+2 mV程度)に近いことが分かる。このことから、このチャンネルはKチャンネルであることも分かる。本実習では行わなかったが、別のK濃度の電極内液では逆転電位がシフトしていることを見れば、よりはっきりとKチャンネルであることが分かるはずである。

また、実際の記録では、異なったコンダクタンスや逆転電位をもった電流もしばしば記録された。これについても、IV曲線をかかせ、学生にどの種類のイオンによる電流で、どのようなコンダクタンスをもった電流であるかを考察させると良い。

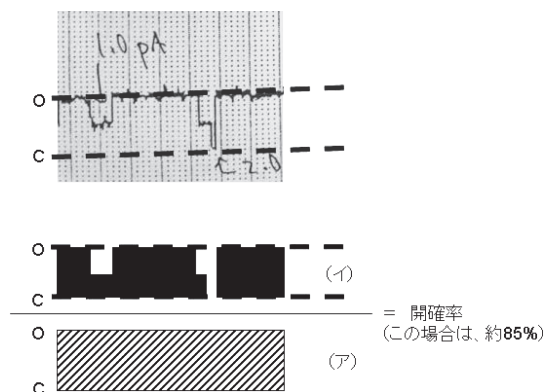


図5. 開確率の求め方

## (2) 開確率

上記の実際の記録では2個のチャンネルがこのパッチ膜に含まれていたことから、以下の式を用いてチャンネルの開確率を求める。

総電荷数/時間 =  $n \cdot p \cdot i$  ( $n$ =チャンネルの数,  $p$ =開確率,  $i$ =1個のチャンネルによる電流)

具体的な求め方は、図5に例を示す。得られた波形(図7)から、(ア)チャンネルが全て全時間開いていた場合の総電荷数、と、(イ)実際に流れた総電荷数を示す面積比を求めることで開確率を知ることが出来る。なお、当然ではあるが、実際に開確率をもとめる際には、出来るだけ長い記録(この場合は、30秒以上記録をとるようにした)を用いないと正確な値が得られない(しかしながら、実際の実習では長い記録を得ることがなかなか難しかった)。

以下に実際に記録したデータから求めた開確率を載せておく。

これによれば、このチャンネルの開確率は、脱分極よりはむしろ過分極側でほとんど開いている状態となっていることがわかる。

以上から、このチャンネルは、Kイオンを流す、内向き整流性電流である可能性が非常に高いことが分かる。本実習では行われなかったが、さらな

表 4

電極電位 (mV)	パッチ膜の予想膜電位 (mV)	開確率
-100	35	0 (* 2)
-75	10	0 (* 1)
-65	0	0 (* 1)
-50	-15	0 (* 1)
-25	-40	0.87
0	-65	0.96
25	-90	0.91
50	-115	0.95
75	-140	0.99

注意 \* 1: 電流の振幅が小さいため開確率が0であったとは言い切れない。

注意 \* 2: 電極電位が十分に大きいので、開確率は0であろうといえる。

る実験として、薬理的ブロッカーを用いたチャンネルの同定を行うとよりはっきりとするであろう。

#### さらなる考察：細胞全体の電流を予想する

ここから先の考察は、実験科学的ではない部分も多く含むが、あくまでも学生の好奇心と理解を助けるためのイメージネーションであると理解して欲しい。

今回はシングルチャンネルの電流を記録しその電位依存性などの特徴を解析したが、では細胞全体ではこのチャンネルによってどのような電流が流れるだろうか予想したい。

実際の細胞を考える上で、以下の点に留意（および仮定）しなければならない。

(1) 実際の細胞ではKの平衡電位は-60 mVくらいと推定する。

(2) Kの平衡電位が変わっても、チャンネルのコンダクタンスは変わらないはず。

(3) Kの平衡電位が変わっても、チャンネルの開確率の電位依存性は、変わらないはず。

以上から、シングルチャンネルの電流、および、電位依存性は図7（上）のようになっていると予想される。こうしたチャンネルが仮に1000個細胞

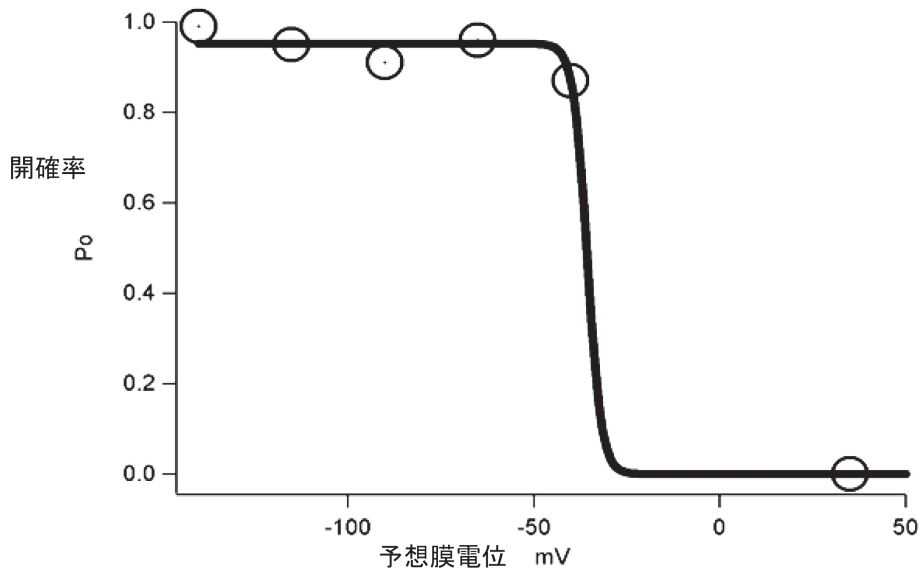


図6. 実際の記録から求めた開確率

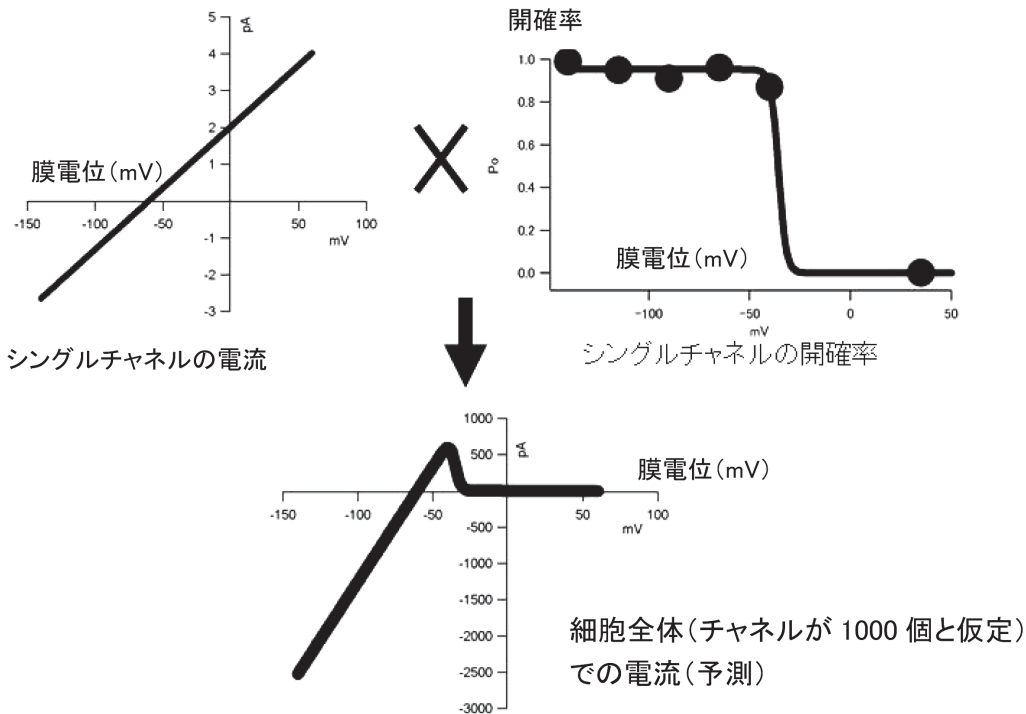


図7. 細胞全体での電流を予想する

に発現していたと考えよう。そうすると、細胞全体の電流（とその電位依存性）は以下のような掛け算で表されるはずである。

細胞全体の電流 = チャンネルの個数 1000 個 × シングルチャネルの電流 × シングルチャネルの開確率（各膜電位における）

実際に図を作ってみると図7（下）のようになる。この図は、過去の文献にみられる内向き整流性 K 電流のホールセル記録と見かけ上一致する (Imaizumi Y, J Physiol, **405**, 123, 1988などを参照)。「細胞全体ではこうやって電流が電位に依存して流れるのだよ」と説明すると学生にとってもシングルチャネルの記録と細胞全体での電流の流れへの理解が増す。

#### 参考文献など

以下の文献を事前に学生に予習させておいた。この実習を行うにあたっては、実験を行う前に、どのようなデータが予想され、どのような実験を

すべきか学生一人一人が理解していなければならない。予習は重要である。

1. 金子章道：神経情報の統合（第3章）。金子章道，川村光毅，植村慶一編，脳と神経—分子神経生物学入門，共立出版，pp. 225-244, 1999
2. 岡田泰伸，挾間章博，小原正裕：パッチクランプ法総論．岡田泰伸編，新パッチクランプ実験技術法，吉岡書店，2003
3. 曾我部正博：単一チャンネルデータの処理と解析法．岡田泰伸編，新パッチクランプ実験技術法，吉岡書店，2003
4. Sakmann B & Traube G : Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. J Physiol **347** : 641-657, 1984
5. Sakmann B. & Traube G : Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in the guinea-pig heart cell membrane. J Physiol **347** : 659-683, 1984

#### 最後に

4日間，しかも午前午後続けてというハードな

実習ではあったが、かなり多くのことを教えまた理解してもらえたと思う。学生にとっては顕微鏡を使って細かい作業をするのに慣れておらず、パッチクランプ自身が成功しギガシールを得るまでに相当な時間がかかった。ノイズのない綺麗なデータがとれることは希で、虎の子のデータを皆で一緒にディスカッションしながら解析した。ここに、学生の感想をそのまま載せたい。

「今回は、実習を通じて、今までのどんな実習よりも多くのことを学び、考え、吸収できたと思います。(中略)ともかく1週間本当にありがとうございました。特にわがままを言って夜遅くまでギガっていた我々に嫌な顔一つせず付き合ってくれた教室スタッフのみなさんに心から感謝いたします。」

このレクチャーを執筆するにあたって、1997

年に医学部3年生として生理学実習に参加した慶應義塾大学医学部学生(当時)の鳴海覚志君が提出したレポートと記録を参考にした(データ解析は筆者が新たに行った部分もある)。感謝したい。

最後に、この実習をすることによって、学生の多くが生理学実験というものに興味をもってくれたことを強調したい。リアルタイムで変化していく事象を記録するという生理学実験の醍醐味を面白いと感じてくれたのである。実際、実習後には、多くの学生が基礎配属(自主学習)という形で、生理学教室の門をたたき、実験を一緒に手伝ってくれた。かくゆう私自身(小泉)も、学生時代、この実習を通じて生理学教室(金子章道教授、当時)に通い詰める毎日となり、そのまま生理学研究者になってしまったのであった。