実験技術

ランゲンドルフ灌流心実験法

中村 裕二¹⁾, 安東賢太郎^{1, 2)}, 杉山 篤¹⁾

要約：ランゲンドルフ灌流心実験法は19世紀末にドイツの生理学者 Oscar Langendorff によって開発された実験法である。摘出した心臓の大動脈にカニユーレを挿入して冠動脈から心臓を灌流する手法であり、実験操作の簡便さと心臓に対する薬物の直接作用を評価できることから薬理学的作用の評価法として長く用いられてきた。モルモットを具体例として我々の研究室で行っているランゲンドルフ灌流心の標本作製と測定手法について概説する。標本作製の手順であるが、まずモルモットをペントバルビタールナトリウムで麻酔し、ヘパリンを静注後、心臓を摘出する。摘出した心臓の大動脈にカニユーレを挿入して冠動脈から心臓を灌流し、ランゲンドルフ標本作製する。ランゲンドルフ灌流心では心電図、灌流圧、灌流量、左室圧、有効不応期、単相性活動電位の測定が可能である。左室圧は左室内に生理食塩液を満たしたバルーンを挿入して測定する。バルーンの容積を調節することにより収縮末期の左室容積を設定ができ、任意の前負荷状態における等容性収縮を評価することができる。さらに単相性活動電位を用いると、薬物の催不整脈作用をより詳細に評価することが可能である。ここでは一般的な測定項目に加えてより詳細な電気生理学的指標およびそれらの測定に際しての注意点を紹介する。

1. 歴史的背景

ランゲンドルフ灌流心実験法は19世紀末にドイツの生理学者 Oscar Langendorff によって開発された実験手法である。ランゲンドルフ灌流心が開発される以前は、冠血管を持たないカエルの摘出心を用いた実験が行われていた。1897年にLangendorffはネコ、イヌ、ウサギから摘出した心臓の大動脈にカニユーレを挿入

し、大動脈に逆行性に灌流液を流して冠動脈から心臓を灌流する手法で行った研究を報告した(1)。このLangendorffが行った手法に倣って摘出した心臓の大動脈にカニユーレを挿入して心臓を灌流する方法はランゲンドルフ灌流心と呼ばれている。最初の報告以降、ランゲンドルフ灌流心の実験はネコ、イヌ、ウサギの他にラット、モルモット、フェレットなど多くの動物で行われており、灌流法の改良や新しい実験装置の開発が行われるなど実験手法にも工夫や進歩が加えられて現在に至っている。ランゲンドルフ灌流心は古典的な実験法ではあるが、実験操作が簡便であり、神経反射やカテコラミンの影響を排除して心拍数や左室圧などの心機能および心電図に対する影響を直接評価できるという利点を有し、薬物のスクリーニングや薬理評価に長く用いられてきた。また、灌流液の流量や圧を自由にコントロールでき、虚血モデルとしても活用されてきた。さらに近年は単相性活動電位を測定して、電気生理学的なより詳細な解析研究にも応用されている(2)。本稿ではランゲンドルフ灌流心の標本作製法、一般的な各種パラメータの取得法、および近年行われているより詳細な電気生理学的指標の測定法について解説する。

2. 標本作製

ランゲンドルフ標本作製の手法をモルモットを具体例として紹介する。体重約300gのHartley系モルモットをペントバルビタールナトリウムで麻酔する(50 mg/kg, i.p.)。腹部を縦切開し、腸をよけながら腹部大静脈にヘパリンを静注する(1000 U/kg)。胸部の皮膚を切開し、剣状突起を鉗子でつまみ上げて横隔膜および肋骨を切開し、心臓を露出させる。心臓を肺ごと

キーワード：ランゲンドルフ、摘出心、灌流法、単相性活動電位、電気刺激

¹⁾ 東邦大学 医学部 薬理学 (〒143-8540 東京都大田区大森西 5-21-14)

²⁾ 東京大学大学院 食の安全研究センター 生体影響評価 (〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

E-mail: yuuji.nakamura@med.toho-u.ac.jp 原稿受領日：2012年7月23日、依頼原稿

Title: Langendorff perfusion heart model. Author: Yuji Nakamura, Kentaro Ando, Atsushi Sugiyama

切り取り Krebs-Henseleit 溶液に浸し、肺、気管等の周囲の組織を切除し心臓を単離する。周囲の組織を切除する際、カニューレ挿入のために十分な長さの大動脈を残すよう注意する。カニューレを大動脈に逆行性に挿入し1-0 絹糸で固定する(図1)。正しくカニューレが挿入できていればこの操作で灌流液によって血液が洗い流され、心臓の色が変わるのを確認できる。カニューレを深く挿入しすぎると、カニューレの先端が大動脈からの冠動脈分岐部を塞いでしまうことがあるので注意する。カニューレを挿入した際の灌流液の流量は15 mL/min 程度であることが望ましく、流量の変化で標本の状態が確認できる。

Oscar Langendorff は最初に実験を行った際に血液で標本を灌流した。初期の研究者たちも同様に血液を用いたが、酸素化にいくつかの課題があり次第に栄養液を用いる方法に移行した。現在は Krebs-Henseleit 溶液 (NaCl 118.5 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11 mM) がよく用いられている(3)。溶液を95% O₂, 5% CO₂ の混合ガスで飽和させ、pH7.4, 37℃ に加温して用いる。灌流圧の調整は、位置エネルギーを利用して灌流する方法や灌流液の酸素化に用いているガスを利用して加圧する方法がある。これらは従来から用いられてきたが、実験装置の巨大化・複雑化、回路内の灌流量の増加という欠点があった。近年、ペリスタポンプを用いたランゲンドルフ装置が用いられるようになり、装置全体の小型化・簡易化が進んでいる。このペリスタポンプを用いたランゲンドルフ装

置には灌流液のリーク回路を設けた装置があり、リーク回路の圧力を調整することによって定圧灌流、リーク回路を完全に閉鎖することによって定流量灌流を行うことができる(図2)。この方法は灌流圧を正確に規定でき、灌流方法の切り替えも簡便である。定流量灌流は心筋の酸素需要の評価や血管反応を除外して実験を行いたい場合に用いられる。

3. 測定項目

ランゲンドルフ灌流心で評価できる測定項目を解説する。下記の①～④が一般的な測定項目であり、⑤～⑦がより詳細な電気生理学的指標である。図3にランゲンドルフ灌流心を示す。

①心電図

心尖部を+極、大動脈を-極として電位差を測定すると、生体第Ⅱ誘導心電図類似の波形を得ることができる。大動脈に挿入したカニューレは金属製なので、カニューレに電極を装着して-極を取り、灌流液からアースを取る。灌流後の灌流液は心臓の外側をつたい心尖部から流れ落ちるので、電極がその灌流液に接触するように調整すれば心臓が拍動していても良好な心電図を記録できる(図3)。

②灌流量

灌流後に排出される灌流液の重量を測定して灌流量を評価する手法や、灌流液の回路中に電磁血流計を挿入して測定する方法がある。電磁血流計は灌流量の変化を経時的に観察でき、標本の状態の把握にも有用で

図1 ランゲンドルフ標本の作製

中央のプラスチックトレイ上で標本作製する。心臓を摘出する前に外径2.2 mmの金属製カニューレを洗濯ばさみでトレイに固定して灌流液を流す。流量の調整には輸液セットの点滴調整のクレンメを用いる。摘出した心臓をトレイに置き周囲の組織を切除する。大動脈にカニューレを挿入し仮固定クリップで固定した後1-0 絹糸で結紮する。

図2 ランゲンドルフ装置の灌流液回路模式図

リーク回路内の灌流圧調整装置でランゲンドルフ標本へ流れる灌流液の圧力を設定する。温水回路で灌流液を保温している。

図3 ランゲンドルフ灌流心写真および模式図

心尖部と金属カニューレから心電図を測定し、右室自由壁（写真左側）にペーシング電極を押し当て、左室自由壁（写真右側）に単相性活動電位測定電極を押し当てる。ECG: 心電図, MAP: 単相性活動電位。

あり、我々はこの方法で灌流量を測定している。また、ランゲンドルフ灌流心における虚血は定圧灌流モードを選択して灌流圧を低下させれば誘発できるが、定流量灌流モードを活用しても誘発可能である。

③灌流圧

装置で設定した圧力を灌流圧とする。灌流液のルートのカニューレの直前で分岐させて圧力トランスデューサーに接続し直接灌流圧を測定すればより正確に、経時的に灌流圧を測定できる。

④左室圧

生理食塩液を満たしたバルーンを左房から左室内に挿入し、カテーテルを介して圧力トランスデューサーに接続することによって左室圧を測定できる。バルーンは左室の大きさに対応したものを使用する。バルーンがカテーテルの先端を塞ぐと圧波形が正しく出ないので注意が必要である。バルーンがプルキンエ線維な

どの刺激伝導経路を圧迫すると不整脈が発生することがあるので、不整脈が頻発する場合はバルーンの深度と角度を微調整する。大動脈弁を逆行性に通過した灌流液が徐々に左室内に貯留し、時間の経過と共に拡張末期圧が上昇することがある。大動脈弁にドレーン用のカテーテルを留置しておくことでこれを回避できる。バルーン内の生理食塩液の量を調節すれば左室内容積を一定にでき、心室は等容性収縮する。バルーンの容積を変えることによって、前負荷を変化させた場合の心収縮力の変化を詳細に評価することができる。

⑤ペーシング

電極を縫い付けるか、押し当てることによって固定する。我々は4極の電極を右室自由壁に押し当て、その中から刺激閾値の低い2極を選んで電気刺激を行っている。この電極は湾曲したプレート上に4極が配置されており、平板なプレートよりも良好な接触を保つことができる。心室の電気刺激を行うことによって心拍数を一定にできるので、拍動数の変化による再分極持続時間への影響を除外できる。ただし心室の電気刺激を行った際の心電図波形は洞調律の時とは異なるので、再分極持続時間を測定する際には後述の単相性活動電位の測定が必要になる。また、電極を心房に接触させれば心房の電気刺激を行うこともできる。心房を電気刺激する場合は洞調律に近い形のQRS波形を得ることができるのでQT間隔の評価も可能である。心室の電気刺激は数心拍なら洞調律よりも遅い心拍数でペーシングできるが、心房の電気刺激は洞調律より遅い心拍数ではペーシングできない。それぞれの特徴に応じて使い分ける必要がある。

⑥有効不応期

プログラム刺激を行うことにより有効不応期の測定ができる。数拍の基本刺激の後に期外刺激を入れる。基本刺激と期外刺激の間隔を次第に短くしてゆき、心筋が応答できた最短の刺激間隔を有効不応期とする。心室刺激による心室の応答を指標にすれば心室の有効不応期が、心房刺激による心房の応答を指標にすれば心房の有効不応期が、心房刺激による心室の応答を指標にすれば房室伝導の有効不応期が測定できる。さらに基本刺激の間隔を変化させ、それに伴う有効不応期の変化を観察すれば、頻度依存性や逆頻度依存性の作用を評価できる。

⑦単相性活動電位

図3のような電極を用いて単相性活動電位を測定する。単相性活動電位の記録には電極を左室に押し当てる必要がある。刺激電極プレートと単相性活動電位記録電極で心臓をはさむように固定すると安定性がよい。

図4 心電図と単相性活動電位波形の典型例
ECG: 心電図, MAP: 単相性活動電位

先端電極で電位を固定し、側方の参照電極で電位を測定する。単相性活動電位は心室の電気刺激時においても活動電位様の波形が得られるので、その持続時間を測定することによって再分極時間を評価することができる。図4に実際に得られた心電図と単相性活動電位の波形を示す。図5にⅢ群の抗不整脈薬ニフェカラント投与前後での単相性活動電位を示す。基本刺激間隔が長い(=刺激頻度が遅い)ほど再分極持続時間が延長する、いわゆる逆頻度依存性が確認できる。海外の研究グループからはウサギのランゲンドルフ灌流心の単相性活動電位を測定し、活動電位の持続時間、活動電位の経時的な変動、および APD_{90} と APD_{30} の差の3種の情報から薬物の催不整脈性を評価する方法が報告されている(2)。

4. 実験上の注意点

①温度管理

心筋細胞は温度の影響を敏感に受ける。安定した実験を実施するためには、温度管理を厳密に行う必要がある。空のオルガンバス中で心臓を保温することが多いが、この手法では完全に外気を遮断できないので実験温度や気流に注意する必要がある。我々は、温水チャンバー内に心臓を懸垂して温度変化がほとんどない状態で実験を行っている。さらにチャンバー内の温度を常時モニターし、灌流液もカニューレに入る直前の温度を常時モニターしている。一方、温度を通常より下げた状態に保つことにより、低温状態での実験も可能である。

②気泡除去

灌流液に気泡が混入するといずれそれが冠動脈内に入るので心臓に障害を与える可能性が高い。灌流液は酸素化・加温されているため装置内の回路中での気泡の発生は回避できない。ランゲンドルフ灌流心におい

図5 ニフェカラント投与前後での単相性活動電位記録
(a) 洞調律。(b) 心室電気刺激時。図中の数字は基本刺激間隔。

て灌流液の空気抜きは標本の状態を良好に保つために必須である。我々はランゲンドルフ装置中のペリスタポンプとリーク回路への分岐の間と、カニューレの直前の2カ所にエアトラップを設置して冠動脈内に気泡が入らないようにしている。

おわりに

ランゲンドルフ灌流心は古典的な実験手法であるが、手技が比較的簡便で心機能を多方面から評価できる実験系である。測定に技術習得が必要な指標や安定した結果を得るための注意点はあるが、実験系としての有用性は高い。本稿がランゲンドルフ灌流心の理解の助けになれば幸いである。

文 献

- 1) Skrzypiec-Spring M, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2007; 55:113-126.
- 2) Valentin JP, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2004;49:171-181.
- 3) Sutherland FJ, et al. Pharmacol Res. 2000;41:613-627.