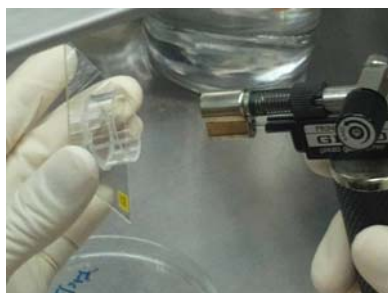


## 視交叉上核 (SCN) の器官培養

### 1. MED プローブの前処理

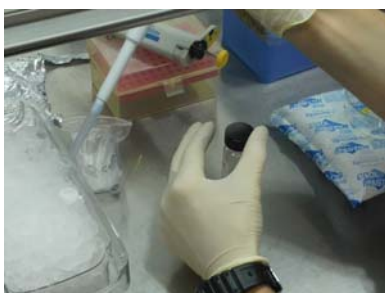
電極上で神経細胞を長期間（～2 カ月）培養する上で最重要のステップが MED プローブ表面の前処理です。初めて使用する場合、念入りの洗浄と殺菌、コート処理が必要になります。MED プローブの表面はやや疎水性を帯びているため、組織が密着しやすいように親水性を高めるコート処理が必要となります。長期間のコート処理により、MED プローブ表面が親水性を十分に帯びるようにしなければなりません。SCN の器官培養には、I 型コラーゲンでのコート処理が推奨です。I 型コラーゲンによるコート処理は以下の通りです。

- 1) MED プローブを滅菌済み蒸留水 (SDW) で 3 回濯いだ後、70%エタノールで 3 回濯ぎ、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) MED プローブ表面の親水性を高めるため、チャンバー底面（電極部分）をガスバーナー (Style Index #GB-2001) の青い炎に軽く曝します。表面が親水性を帯びるまで数回繰り返します。  
注: 長く曝すと絶縁層が破壊されます。1 回につき 1 秒以内で行い、繰り返す場合は表面を冷ましてから 6-7 回繰り返します。
- 4) MED プローブをディッシュに入れ、冷蔵庫で 10-15 分間冷却するか冷凍庫で急速冷却します (注: 冷やしすぎないように注意します)。



### コラーゲン溶液の作成（4-5 サンプル分）

1. 氷冷しながら 0.8 ml のコラーゲン液（Cellmatrix Type I-C, Nitta gelatin）に 10 倍濃度の DMEM/F-12 混合培地を 0.1 ml 加え、泡立てないようにピペティングしながら混合します。
2. 氷冷しながら 1 に 0.1 ml の緩衝液（0.05 M NaOH、2.2% NaHCO<sub>3</sub>、0.2 M HEPES）を加え、泡立てないようにピペティングしながら混合します。



- 5) 冷却した MED プローブに 1 ml のコラーゲン溶液を注ぎ、抜き取ります。

注: 抜き取った後のチャンバー内がコラーゲン溶液でまんべんなく濡れている状態（厚さ 50 μm 以下推奨）にします。



- 6) MED プローブを 37°C のインキュベーター内で 1.5-2 時間放置して、コラーゲンをゲル化させます。
- 7) MED プローブを SDW で 1 回濯いだ後、500  $\mu$ l の維持用培地を注ぎます。ディッシュ (MED プローブのリングチャンバー外) に SDW を少量満たし、37°C のインキュベーター内で少なくとも 1 時間もしくは 1 晩以上放置します。



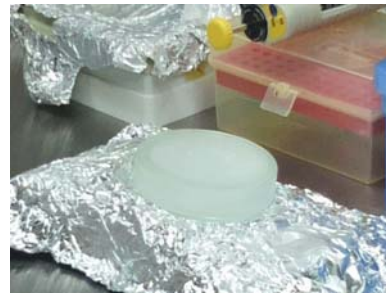
Table1. 添加物 x20 溶液の組成。維持用培地は FBS が 5%、添加物 x20 溶液が 5%となるように DMEM/F12 に混合する。

SDW に溶解し、濾過滅菌して使用する。

Apotransferrin	..... 2 mg/ml	Insulin (H <sub>2</sub> O soluble)	..... 100 $\mu$ g/ml	Putrescine	..... 2 mM
Progesterone (H <sub>2</sub> O soluble)	..... 0.4 $\mu$ M	Sodium selenite	..... 0.6 $\mu$ M		

## 2. 切片の作成

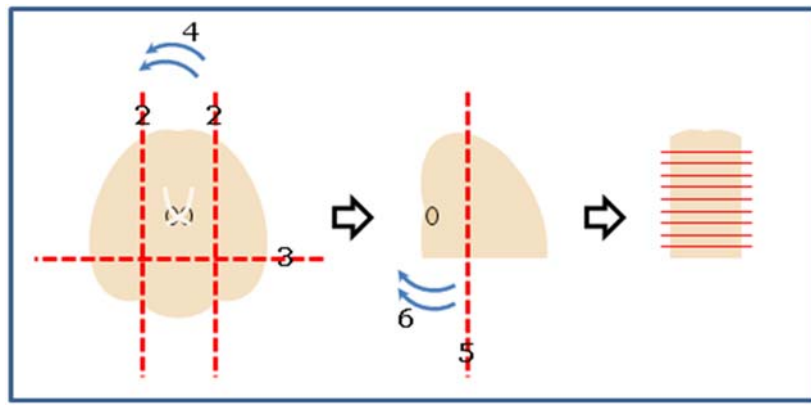
- 1) クリーンベンチ内での作業に先立って、事前準備を行います。ハンクス液 (Sigma-Aldrich #H8264) を 2 つのガラスシャーレに満たし、1 つは保冷剤で冷却します。フィルターペーパーの上に薬包紙を重ねたものをハンクス液にくぐらせて、トリミング用の下地とします。解剖顕微鏡のステージを保冷剤で冷却します。



- 2) 2-5 日齢のマウスもしくはラットを低温麻酔して断頭し、視神経を引っ張らないように注意しながら脳を取り出します。
- 3) 脳底を上にしてトリミング用の下地の上に置き、外科用メスを使って視床下部断片にします。



トリミングの手順



1. 脳底部が上になるように置く。
2. 左右の外側部を切断する。
3. 尾側部を切断する。
4. 脳断片を横に倒す。
5. 背側部を切断する。
6. 脳底部が下になるように倒す。
7. ティッシュ・チョッパーに移して薄切する。

4) McIlwain 型ティッシュ・チョッパーを用いて、冠状断で視床下部切片 (マウスの場合は 200-250  $\mu\text{m}$  厚、ラットの場合は 250-350  $\mu\text{m}$  厚) を作成し、薬包紙ごと冷却したハックス液に移します。



5) 顕微鏡下で視交叉上核を含む切片を単離し、外科用メスを使って SCN 以外の領域を切除します。先端をカットしたスポイトを使って、薄切した切片を 500  $\mu\text{l}$  の血清入り培地を含む MED プローブに滴下します。



6) シャーレをタッピングして、切片を電極上へ移動させます。切片と電極との密着を促すため、MED プローブから培地を全量抜き取りつつ、切片の位置を微調節します。ディッシュ (MED プローブのリングチャンバー外) に SDW を少量満たし、37°C で 100%湿度のインキュベーター内に 2 時間放置します。



7) 最初の 2 日間は維持用培地で培養します。切片が 5%CO<sub>2</sub> 環境下に曝されるよう、完全に浸漬することなく濡れる程度に培地の液面高を調節します (培地を注いでから適量抜き取ると、250  $\mu\text{m}$  程度になります)。3 日目以降はグリア細胞の過剰な増殖を抑えるため、5%添加物 x20 溶液・DMEM/F12 培地で維持培養します。培地は毎日半量交換して液面高を調節します (250  $\mu\text{m}$  の培地を注いで、適度な液面高となるように適

量抜き取ります)。

8) 2～3 日以内に切片の外縁付近から軸策が伸長し始めます。1 週間程度培養してから記録を行います。

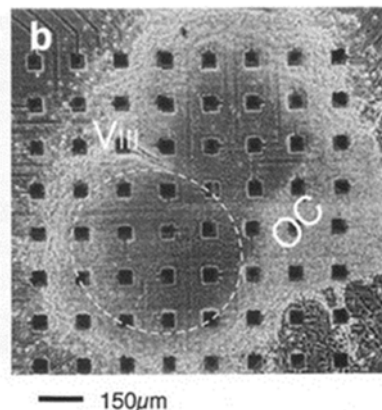


Fig.1. MED プロブ上のラット SCN 培養切片 (培養 14 日目)。OC: 視交叉、VIII: 第三脳室。破線は一側の SCN の境界を示す。

### 長期間記録のコツ

MED プロブ内を飽和湿度環境で維持するためには、チャンパーの縁にシリコングリスを塗り、酸素透過性のあるメンブレン (YSI #YSI 5794) で蓋をします。この状態で培地交換をすることなく、2-3 週間の連続測定が可能です。



### 3. MED プロブの設置

1) 培養切片を含む MED プロブを殺菌した MED コネクタに設置します。

注 1: MED コネクタとケーブルは、100%湿度の CO<sub>2</sub> 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、CO<sub>2</sub> 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。

### 4. 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。

### 5. MED プロブの洗浄方法

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。インピーダンスはプロブを繰り返し使用することで上昇します。これは取り扱いや、(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 プロブを繰り返し利用することができます (注: MED プロ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 でチャンパー内を 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パーに注ぎ、37°C 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。

### 5.1. 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  $\mu$ A) 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、MED 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.1 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。

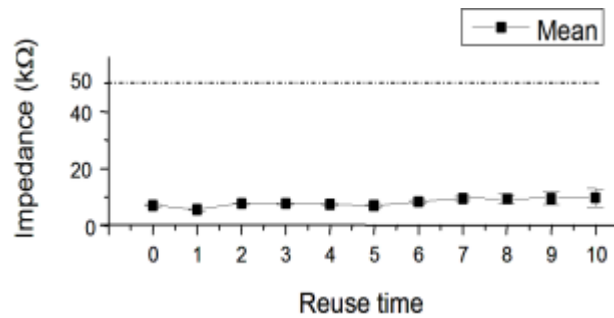


Fig.1. 再利用後のインピーダンス。

## 6. 指導・協力

小野 大輔 先生 (北海道大学 医学研究科連携研究センター光バイオイメージング部門 博士研究員)

本間 さと 先生 (北海道大学 時間医学講座 特任教授)

## 7. 参考文献

1) Nakamura W, Honma S, Shirakawa T, Honma K. Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.*, 14, 666-74, 2001.

2) Nakamura W, Honma S, Shirakawa T, Honma K. Clock mutation lengthens the circadian period without damping rhythms in individual SCN neurons. *Nat. Neurosci.*, 5, 399-400, 2002.