

## 海馬由来神経細胞の初代培養

### 1. MED プローブの前処理

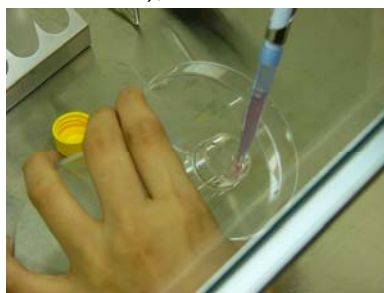
電極上で神経細胞を培養する上で最重要のステップが MED プローブ表面の前処理です。MED プローブの表面はやや疎水性を帯びているため、組織が密着しやすいように親水性を高めるコート処理が必要となります。どのようなコート剤で処理をするかにより、神経細胞の活動状態、生存率、軸索の伸長、移動の程度等が影響を受けます。たとえそれ以外の事前準備が完全であっても、大規模な凝集や、早期の細胞死が起こる可能性があります。その場合、MED プローブのコート処理に問題があることが多いようです。コート処理の手順は以下の通りです。

- 1) MED プローブを滅菌済み蒸留水 (SDW) で 3 回濯いだ後、70%エタノールで数回濯ぎ (もしくは 15 分間浸し)、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 ディッシュ内で管理します。

注: 上記 1、2 の手順は必ずしも必要ありません。また、MED プローブの 2 回目以降の再使用时も必要ありません。

#### 1.1. ポリ D リジンコートの場合

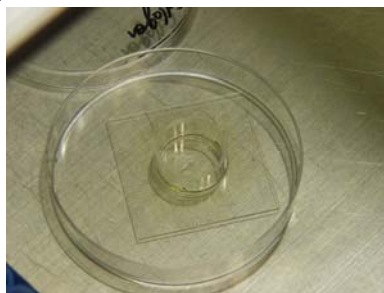
- 3) 細胞の播種日に、MED プローブ表面の親水性を高めるため DMEM 等の血清入り培地を注ぎ、1-2 分後に廃棄します (注: プラズマ照射装置が利用できる場合は、プラズマ処理による親水化をお奨めします)。



- 4) MED プローブのチャンパー内を 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ポリ D リジン溶液 (M.W. 70000 以上推奨) で 1 回濯ぎ、再度新鮮なポリ D リジン溶液を 1 ml 注いでインキュベーター内に放置します (~1 時間程度)。



- 5) MED プローブをクリーンベンチに移し、ポリ D リジン溶液を抜き取って、蒸発乾燥するまで放置します (注: この際、電極表面が撥水性を失い、しっかりと濡れた状態になっていなければなりません)。



- 6) SDW で 3 回濯いだ後、維持用培地を入れてできるだけ時間を空けずに細胞を播種します (後述)。

## 1.2. I型コラーゲン・ポリDリジンコートの場合

- 3) コラーゲン液 (Cellmatrix Type I-C, Nitta gelatin) と希塩酸 (pH 3) を 1: 9 で混合します。
- 4) MED プローブに上述のコラーゲン溶液を 1 ml 注いでインキュベーター内に放置します (~1 時間程度)。
- 5) MED プローブをクリーンベンチに移し、コラーゲン溶液を抜き取って、蒸発乾燥するまで放置します (注: この際、電極表面が撥水性を失い、しっとりと濡れた状態になっていなければなりません)。
- 6) PBS で MED プローブを 2 回濯いだ後、50 µg/ml ポリ D リジン溶液を注いでインキュベーター内に放置します (~1 時間程度)。
- 7) MED プローブをクリーンベンチに移し、ポリ D リジン溶液を抜き取って、蒸発乾燥するまで放置します。
- 8) SDW で 3 回濯いだ後、維持用培地を入れてできるだけ時間を空けずに細胞を播種します (後述)。

## 2. ラット海馬由来神経細胞の調製

### 2.1. 事前準備

- 1) 4 枚の 90 mm ディッシュ (1-4) に解剖用培地を 20 ml ずつ分注します。

Table1. 解剖用培地 (2 L) の組成。

NaOH 溶液で pH 7.2 に調節する。  
 HBSS ..... 2 L Sodium pyruvate ..... 1 mM HEPES ..... 10 mM

- 2) 6 本の遠沈管に以下の溶液を満たし、遠沈管 2 のみ 37°C の恒温槽で加温し、それ以外の遠沈管は氷冷しておきます。

遠沈管 1: 解剖用培地 ..... 15 ml  
 遠沈管 2: 0.1 mg/ml DNase (100 µl) ・0.5 mg/ml トリプシン (100 µl) ・HBSS ..... 5 ml  
 遠沈管 3: 0.1 mg/ml DNase (50 µl) ・10%FBS (500 µl) ・解剖用培地 ..... 5 ml  
 遠沈管 4: 0.1 mg/ml DNase (35 µl) ・解剖用培地 ..... 5 ml  
 遠沈管 5: 0.1 mg/ml DNase (20 µl) ・解剖用培地 ..... 5 ml  
 遠沈管 6: 修正 Neurobasal 培地 ..... 5 ml

Table2. 修正 Neurobasal 培地 (513 ml) の組成。

Neurobasal Medium (Life Technologies #21103-049) ..... 500 ml  
 B27 supplement (Life Technologies #17504044) ..... 10 ml  
 L-glutamine ..... 0.074 mg/ml (40.7 mg を 22 ml の Neurobasal Medium で溶解し、フィルター濾過して 20 ml を戻します。)  
 Penicillin-Streptomycin (Life Technologies #15140-148) ..... 5 ml

### 2.2. 解剖手順

注: さらに詳細を知りたい方は参考文献 1 をご参照ください。

- 1) 妊娠ラットをエーテル麻酔し、頸動脈を切断してから腹部を切開します。
- 2) 胎児ラットを子宮ごと採取し、滅菌済みディッシュに移します。
- 3) 子宮内膜を剥離して胎児ラットを採取し、ディッシュ 1 に移して体表を洗った後、ディッシュ 2 に移します。
- 4) ディッシュ 2 の胎児ラットをキムワイブ上に移し、小脳を含む脳組織を摘出してディッシュ 3 に移します。
- 5) ディッシュ 3 で摘出した脳組織から左右の大脳片を分離してディッシュ 4 に移します。
- 6) ディッシュ 4 を氷冷しながら、顕微鏡下で大脳片から海馬を単離し、氷冷の遠沈管 1 に移します。



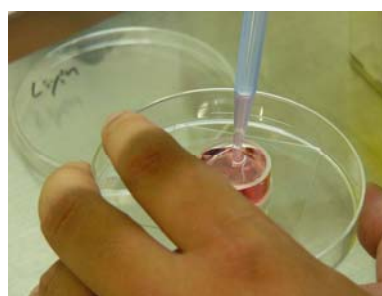
- 7) 一腹の胎児ラット海馬片が沈殿した遠沈管 1 の上清を抜き取り、遠沈管 2 の溶液を加えてから、インキュベーター内で 15 分間反応させます。遠沈管は 5 分ごとに取出し、やさしく振とうしてから戻します (注: 後のピペッティング操作で細胞を傷害させることのないよう、しっかりと反応させます)。



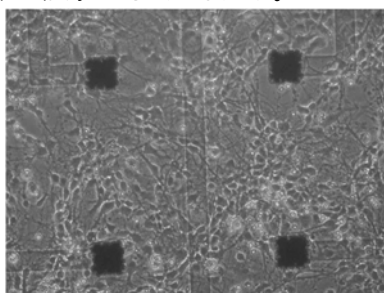
- 8) 4°C、1000 rpm で 5 分間遠心分離します。  
 9) 上清を抜き取り、遠沈管 3 の溶液を加えてからやさしく 10 回ピペッティングし、4°C、1000 rpm で 5 分間遠心分離します。  
 10) 上清を抜き取り、遠沈管 4 の溶液を加えてからやさしく 10 回ピペッティングし、4°C、1000 rpm で 5 分間遠心分離します。  
 11) 上清を抜き取り、遠沈管 5 の溶液を加えてからやさしく 10 回ピペッティングし、4°C、1000 rpm で 5 分間遠心分離します。  
 12) 上清を抜き取り、遠沈管 6 の溶液を加えてからやさしく 20 回ピペッティングし、細胞を完全に懸濁させます。  
 13) 細胞懸濁液を 40 μm のセルストレーナーで濾過します。



- 14) 条件培地と修正 Neurobasal 培地を 1: 9 で混合し、0.22 μm フィルターで濾過して、コート処理した MED プローブに注ぎます。  
 15) 混合培地を入れてできるだけ時間を空けずに細胞懸濁液を  $5 \times 10^5$  cells (細胞懸濁液が  $5 \times 10^6$  cells/ml だった場合は 100 μl) の密度で滴下します。電極部分に気泡が生じた場合は、やさしくピペッティングをして取り除きます。混合培地 (10%条件培地・90%修正 Neurobasal 培地) は 10 日目に新鮮な混合培地と半量交換し、以降は 1-2 週間に 1 回半量交換します (注: 交換後数時間は神経活動が影響を受けます)。



- 16) 細胞播種から約 7-10 日後に自発的活動電位が記録できるようになります。



### 2.3. 条件培地の作成

条件培地を使用して培養を行うと、神経細胞の成長と維持、および電気信号の取得率、S/N 比が向上します。維持用培地中の最終的なウシ胎児血清 (FBS) 濃度を 1% にすることが、グリア細胞を適度な濃度に増殖させる上で重要となります。

- 1) 6 穴プレートで 10% 非働化 FBS・修正 Neurobasal 培地によりグリア細胞と神経細胞をコンフルエントになるまで 1-2 週間培養します。
- 2) およそ 2 週間でグリア細胞と神経細胞はコンフルエントな状態にまで増殖し、培地が黄色くなります (オレンジ色くらいでの使用を推奨します)。これを 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過し、回収日ごとにストックとして  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存します (使用時に  $37^{\circ}\text{C}$  の恒温槽で溶解します)。



- 3) これ以降、培地は週に 1 回全量交換します (同一プレートは ~3 カ月まで使用可能です)。

### 3. MED プロブの設置

- 1) 培養細胞を含む MED プロブを、殺菌した MED コネクタに設置し、35 mm ディッシュの上蓋をかぶせます。

注 1: MED コネクタとケーブルは、100%湿度の  $\text{CO}_2$  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、 $\text{CO}_2$  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 k $\Omega$ ) 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 MED プロブを繰り返し使用することで上昇します。これは MED プロブ自体の取り扱いや、(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 0.25% トリプシン・EDTA (Life Technologies #25200-056) を注ぎ、 $37^{\circ}\text{C}$  のインキュベーター内で 1 時間放置します。
- 2) PBS で MED プロブを 3 回濯ぎます。
- 3) SDW で MED プロブを少なくとも 3 回は濯ぎます。
- 4) 洗浄後の MED プロブは 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 プロブに置き、EPSPs (刺激強度は 10-20  $\mu\text{A}$ ) 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.2 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。



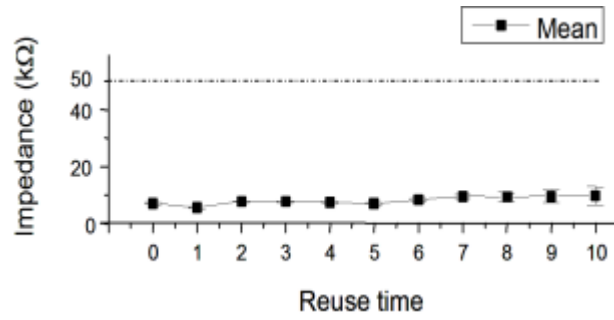


Fig.2. 再利用後のインピーダンス。

## 6. 指導・協力

鈴木 郁郎 先生 (東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 大学院 バイオニクス専攻 助教)

## 7. 参考文献

1) Fath T, Ke YD, Gunning P, Götz J, Ittner LM. Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. Nat. Protoc., 4, 78-85, 2009.

2) Suzuki I, Yasuda K. Detection of tetanus-induced effects in linearly lined-up micropatterned neuronal networks: application of a multi-electrode array chip combined with agarose microstructures. Biochem. Biophys. Res. Commun., 356, 470-5, 2007.