

海馬切片の器官培養

1. MED プローブのコート処理

MED プローブをエタノール殺菌し、紫外線 (UV) 殺菌して、PEI でコート処理します。コート処理後、MED プローブに血清を含む維持用培地を注ぎ、使用前まで CO₂ インキュベーター内で保管します。

1.1. I 型コラーゲンゲルコートの場合

- 1) MED プローブを滅菌済み蒸留水 (SDW) で 3 回濯いだ後、70%エタノールに 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。
- 3) MED プローブを滅菌済み 90 mm デイッシュに入れ、少なくとも 1 時間冷蔵保管します。
- 4) 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パ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。
- 5) MED プローブを 37°C のインキュベーター内で 30 分間放置して、コラーゲンをゲル化させます。
- 6) MED プローブを SDW で 3 回以上濯いだ後、使用するまで培地を注いで 37°C のインキュベーター内で保管します (滅菌状態により、1 週間-1 カ月保管できます)。

1.2. コラーゲン溶液の作成

- 1) 氷冷しながら 8 ml のコラーゲン液 (Cellmatrix Type I-A, Nitta gelatin) に 10 倍濃度の DMEM/F-12 混合培地を 1 ml 加え、泡立てないようにゆっくりと攪拌します。
- 2) 氷冷しながら 1 に 1 ml の緩衝液 (200 mM HEPES・0.08N NaOH 溶液) を加え、泡立てないようにゆっくりと攪拌します。その後、30 分間冷蔵保管して気泡を取り除きます (省略してもよい)。

2. 薄切用培地と維持用培地の作成

“薄切用培地”と“維持用培地”を作成し、滅菌します (「Table1」をご参照ください。)。どちらの培地も使用前まで (最長 1 カ月まで) 冷蔵保管します。維持用培地には血清 (MED プローブ上での直接培養は 5%HS、多孔質メンブレン上での培養は 20%HS) を加えます。

Table1. 培地の組成。

a. 薄切用培地 (1 L)	
pH 7.2 に調製し、再蒸留水 (DDW) で 1000 ml にメスアップします。	
Earle's MEM (Life Technologies #61100-061) ……	1 pack
HEPES ……	5.95 g
Tris-base ……	1.2 g
MgCl ₂ ・6H ₂ O (M.W. 203.31) ……	0.609 g
b. 維持用培地—MED プローブ上での直接培養用 (1.5 L)	
pH 7.3 に調製し、再蒸留水 (DDW) で 1500 ml にメスアップします。	
BME (Sigma-Aldrich #B9638) ……	9.2 g
10x EBSS (Sigma-Aldrich #E7510) ……	50 ml
NaCl (Sigma-Aldrich #S5866) ……	1.75 g
NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich #S5761) ……	0.63 g
CaCl ₂ ・2H ₂ O (Sigma-Aldrich #C7902) ……	44 mg
MgSO ₄ (Sigma-Aldrich #M2643) ……	0.305 g
D-glucose (Sigma-Aldrich #G7021) ……	12.97 g
Glutamine (Sigma-Aldrich #G7029) ……	0.585 g
Ascorbic acid (Sigma-Aldrich #A4544) ……	0.135 g
HEPES (Sigma-Aldrich #H3375) ……	9.54 g
Insulin (Sigma-Aldrich #I4011) ……	2 mg
100x Penicillin-Streptomycin ……	15 ml

3. 切片の作成

切片の作成はクリーンベンチ内で行います。薄切用培地、ラットの週齢、切片の厚み以外は、急性切片の作成と手順は同様です。切片の厚みは培養する部位により異なります。10 日齢のラット海馬の場合、MED プローブ上での直接培養には 200 μm、多孔質メンブレン上での直接培養には 300-400 μm が適当です。薄切用培地は薄切に先立って用意します (詳しくは MED64 システムアプリケーションノート「海馬 LTP 試験」をご参照ください)。

4. 切片の培養

5. MED プローブ上での直接培養

5.1. 切片の位置合わせと培養

1) MED プローブ上に切片を移し、記録したい領域が電極を覆うように切片の位置を調節します

注: この手順の間、切片には直接触れず、鋭いピペットで切片の端をやさしくつつきながら切片を動かします。

2) 位置合わせの後、切片を MED プローブ表面により密着させるため、培地を抜き取ります。

3) 切片の表面に 5%ウマ血清 (250 ml) を含む新鮮な培地を滴下しながら注ぎ、'インターフェース条件 (切片表面がかすかに浸る程度)'までゆっくりと水位をあげます。

4) 操作がしやすいように切片を含む MED プローブを 90 mm ディッシュで管理します。培地の蒸発を防ぐために、MED プローブ周囲に純水 (~5 ml) を注いで蓋をし、ディッシュごと加湿した CO₂ インキュベーター内で管理します。

注: 長期間の培養には低温 (34°C) での管理を推奨します。

5.2. MED プローブ上での培養切片の維持

チャンパー容量は非常に少ないため、維持用培地は毎日交換します。以下の方法で交換します。

1) 250 µl の新鮮な維持用培地をチャンパーに注ぎ、やさしく攪拌します。

2) チャンパーから 250 µl の培地を抜き取ります。

1 週間の培養後、MED プローブ上の切片はより薄く、透明になりますが、海馬の層構造は容易に同定できます (下の写真をご参照ください)。切片の状態が悪い場合は、移植片は暗く、不透明になり、層構造がはっきりしません。



Fig.1. MED プローブ上のラット海馬培養切片 (培養 10 日目)。

6. 多孔質メンブレン上での培養—MED プローブを測定のみを利用する

6.1. メンブレンディッシュの作成と培養

1) 多孔質メンブレン (ミリセル-CM インサート、Merck Millipore #PICM03050) を 35 mm ディッシュもしくは 6 ウェルプレートの単一ウェルに装着します。

2) 20%HS を含む培地 (1 ml) を膜の下に注ぎます。その後、使用するまで多孔質メンブレンを装着した培養ディッシュを CO₂ インキュベーター内で保管します。

3) 切片を作成します。

4) 何枚か (3-4 枚) の切片を培養ディッシュもしくはウェル内の各メンブレン上に置きます。

5) メンブレン表面上の全ての培地を抜き取ります。34°C もしくは 37°C の CO₂ インキュベーター内で培養切片を管理します。

注: 長期間培養には低温 (34°C) での管理が推奨です。

6) 培地は毎日全量交換します

注: 1 週間の培養後、MED プローブ上の切片はより薄く、透明になりますが、海馬の層構造は容易に同定できます。切片の状態が悪い場合は、移植片は暗く、不透明になり、層構造がはっきりしません。

6.2. MED64 システムによる記録の準備

- 1) 切片含むメンブレンを培養ディッシュもしくはウェルから取り外し、メスを使って切片の周囲の膜を切除します。
- 2) MED プローブ上の切片をうつ伏せに置き、切片表面が電極と向き合うようにします（膜側が上になる）。
- 3) 切片の位置を調節し、接着を良くするためにアンカーを置き、前節で述べたように浮遊するのを防ぎます。

注：良好な接着に不可欠なため、MED プローブは使用に先立って PEI コート処理をします。—MED64 システムアプリケーションノート「海馬 LTP 試験」p.1「1. MED プローブのコート処理」をご参照ください。

7. 応答の測定

培養 7-10 日目に、培養切片が安定した状態に近づきます。反応を測定するため、90 mm ディッシュから MED プローブを取りだし、MED コネクターに設置します。維持用培地で反応を測定することもできますが、維持用培地ではたんかん性の活動が起こる傾向があるため、安定した記録を行うには aCSF のほうが適切です。記録には灌流あり、なしの 2 条件があります。

注 1: MED コネクターとケーブルは、100%湿度の CO₂ インキュベーター内に放置できます。これは、MED コネクターが受動的回路のみで構成されるためです。従って、CO₂ 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 コネクターを 100%湿度のインキュベーターに放置する際には、MED コネクター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 プローブを MED コネクターに設置する前に、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プで毎回拭ってください。

7.1. 灌流なし

滅菌状態の維持がより重要となる長期間の記録には、灌流なしの記録条件が推奨です。10 mM HEPES を含む修正 aCSF (p.12「Table2」をご参照ください。) と酸素の直接的供給 (カルボゲン、95%O₂ + 5%CO₂) が記録中の応答を安定させるのに推奨です。

修正 aCSF を調製後、滅菌状態で酸素化した培地を維持します。MED プローブ内の維持用培地を全て抜き取り、400-500 μl の修正 aCSF を注ぎ、切片がサブマージ状態になるようにします。その後、MED プローブを MED コネクターに設置します。カルボゲンで組織に酸素供給し、記録中 34°C に維持します (注: 経験的には、灌流なしの記録ではインターフェース条件よりもサブマージ条件でより安定した応答が観察できます)。

Table2. 培養切片の修正 aCSF (100 ml) の組成—灌流なし条件。

以下の順に溶解します。pH 7.3 に調製し、再蒸留水 (DDW) で 100 ml にメスアップします。シリンジフィルターに通して滅菌後、室温で使用直前でカルボゲン (95%O ₂ + 5%CO ₂) で通気します。	
1. NaCl (M.W. 58.44) 0.725 g (124 mM)	5. MgSO ₄ ·7H ₂ O (M.W. 246.48) 0.025 g (1 mM)
2. KCl (M.W. 74.55) 0.022 g (3 mM)	6. Glucose (M.W. 180.20) 0.180 g (10 mM)
3. NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (M.W. 137.99) 0.017 g (1.25 mM)	7. CaCl ₂ ·2H ₂ O (M.W. 147.02) 0.025 g (2 mM)
4. NaHCO ₃ (M.W. 84.01) 0.218 g (26 mM)	8. HEPES (M.W. 238.3) 0.238 g (10 mM)

7.2. 灌流あり

灌流をしながら滅菌状態を維持するのは困難です。できるかぎり滅菌状態を維持するように、給液チューブと廃液チューブの間にフィルターを挟み、灌流キャップのカルボゲン吸入部にもフィルターを挟みます。aCSF を灌流させながら、培地を交換して記録を始めます。

上記いずれかの方法で記録に際して MED プローブを設置した後、培養切片の活動状態を確認します。詳しくは Mobius チュートリアルをご参照ください。

8. MED プローブの洗浄方法

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 プロー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ー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 プローブを繰り返し利用することができます (注: MED プロー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 プローブに 0.5 mM EDTA (Life Technologies #25300-054) を注ぎ、1 時間放置します。
- 2) PBS でチャンバー内を 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バーに注ぎ、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、プロー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。

8.1. 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 μ 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.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。

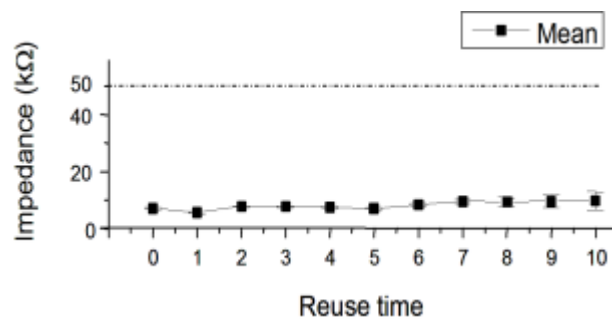


Fig.2. 再利用後のインピーダンス。

9. 参考文献

- 1) Gahwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods*, 4, 329-42, 1981.
- 2) Yamamoto N, Kurotani T, Toyama K. Neural connections between the lateral geniculate nucleus and visual cortex in vitro. *Science*, 245, 192-4, 1989.
- 3) Stoppini L, Buchs P-A, Muller D. A simple method of organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods*, 37, 173-82, 1991.
- 4) Shimono K, Baudry M, Panchenko V, Taketani M. Chronic multichannel recordings from organotypic hippocampal slice cultures: protection from excitotoxic effects of NMDA by noncompetitive NMDA antagonists. *J. Neurosci. Methods*, 120, 192-202, 2002.
- 5) Shimono K, Baudry M, Ho L, Taketania M, Lynch G. Long-term recording of LTP in cultured hippocampal slices. *Neural Plast.*, 9(4), 249-54, 2002.