

海馬 LTP 試験

1. MED プローブのコート処理

新品の MED プローブでは、電極表面が疎水性を帯びており、電場電位を効果的に記録する上で重要となる切片と電極との密着が良くありません。そのため、新品の MED プローブを使う際には、最初にポリエチレンイミン (PEI) 溶液によるコート処理を行って、電極表面を親水化しなければなりません。

- 1) 開封後の MED プローブに 0.1%PEI 溶液を 0.7 ml 注ぎます。
- 2) 0.1%PEI 溶液が蒸発しないように MED プローブを 90 mm ディッシュで管理し、一晩以上放置します。
- 3) 使用する直前に MED プローブを再蒸留水 (DDW) で 3 回濯ぎます。

Table1. 0.1%PEI 溶液の組成。

a. 25 mM ホウ酸塩緩衝液 (500 ml)

1. 4.768 g の Sodium tetraborate decahydrate (Sigma-Aldrich #S9640) を 450 ml の DDW で溶解します。
2. 1 規定の塩酸で pH を 8.4 に調製します。
3. DDW で 500 ml にメスアップして、冷蔵保管します。

b. 1%PEI ストック溶液

PEI 溶液は粘性が高いため、1%のストック溶液を調製し、冷蔵保管しておきます。

1. 1 ml の Poly(ethyleneimine) solution (Sigma-Aldrich #P3143) を 49 ml の 25 mM ホウ酸塩緩衝液で希釈し、冷蔵保管しておきます。
2. 1%PEI 溶液と 25 mM ホウ酸塩緩衝液を 1:9 の比率で混合して使用します。

2. 人工脳脊髄液 (artificial cerebro-spinal fluid; aCSF) の調製

急性脳組織切片を作成する当日に、aCSF (124.0 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 2.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 1.25 mM KH₂PO₄, 10.0 mM D-Glucose) を調製します。

- 1) 1000 ml のシリンダーに DDW を 800 ml 程度注ぎます。
- 2) 100 ml の Klebs x10 倍液を注ぎます。
- 3) 2.18 g の NaHCO₃ (Sigma-Aldrich #S5761) を加えます。
- 4) 10 ml の MgSO₄ x100 倍液を注ぎます。
- 5) 10 ml の CaCl₂ x100 倍液を注ぎます。
- 6) 10 ml の D-Glucose x100 倍液を注ぎます。
- 7) DDW で 1000 ml にメスアップし、スターラーでよく攪拌してから、すぐにカルボゲン (95% O₂ + 5% CO₂) で通気を続けます。

Table2. aCSF 調製用の各ストック溶液の組成。

a. Klebs x10 倍液 (1000 ml)

72.5 g の NaCl (Sigma-Aldrich #S5886)、2.2 g の KCl (Sigma-Aldrich #S5405)、1.7 g の KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich #P5655) を DDW で 1000 ml にメスアップして攪拌し、冷蔵保管する。

b. MgSO₄ x100 液

12.5 g の MgSO₄·7H₂O (Sigma-Aldrich #M7774) を DDW で 500 ml にメスアップして攪拌し、冷蔵保管する。

c. CaCl₂ x100 液

14.5 g の CaCl₂·2H₂O (Sigma-Aldrich #C7902) を DDW で 500 ml にメスアップして攪拌し、冷蔵保管する。

d. D-Glucose x100 液

90.0 g の D-Glucose (Sigma-Aldrich #G7021) を DDW で 500 ml にメスアップして攪拌し、冷蔵保管する。

3. 急性海馬切片の作成

3.1. 事前準備

1) 以下の実験器具を準備します。

100 ml ビーカー …… 2 個 500 ml ビーカー …… 1 個 リカバリー槽 …… 1 個 フレークアイス …… 適量
手術器具 (ピンセット、膝状剪刀、眼科剪刀等) カミソリ替刃 …… 2 枚 ガラス製ペトリ皿 (上蓋) …… 1 個
フィルターペーパー …… 1、2 枚 瞬間接着剤 …… 適量 5%程度の寒天 …… 適量 先端をカットしたスポイト …… 1 本 絵筆 …… 1 本

2) 15 分間以上通気した aCSF を 100 ml ビーカー 2 個に 20-50 ml 程度ずつ取り分け (片方は脳の氷冷に、もう片方は薄切時のスライサーステージに満たします)、カルボゲンで通気しながらフレークアイスで冷やして 4°C 以下にします。リカバリー槽にも aCSF を満たし、余った aCSF は 500 ml ビーカーに移して灌流用 aCSF として 32°C の恒温槽内に置きます。どちらの aCSF も実験が終わるまでカルボゲンで通気を続けます。

3.2. 脳の摘出とトリミング

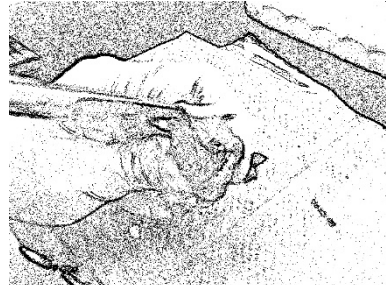
1) ハロタン (Sigma-Aldrich #B4388) を使って動物に麻酔をかけます。呼吸が停止してしまうと危険な状態ですので、胸郭の動きは注意深く観察してください。尾を強く摘んで反応しなくなれば、麻酔がかかったと判断してすばやく断頭します。

注: 状態の良い切片を得るため、作成した切片をリカバリー槽に浸漬するまでの以降の手続きは、できるだけすばやく行います。

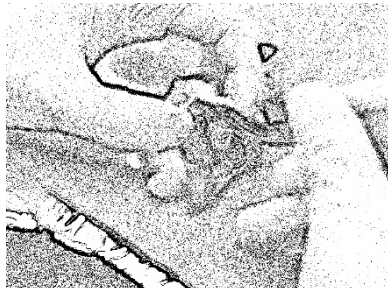
2) 正中線に沿って頭皮を切開して、頭蓋を露出させます。



3) 断頭によりできた頸椎断面から眼科剪刀を挿入し、正中線に沿って嗅球付近まで頭蓋を切開してから、正中線と交差するように、嗅球付近の頭蓋に切り込みを入れます。

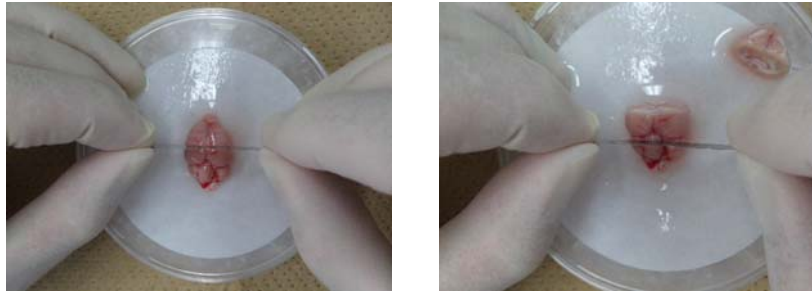


4) 先曲がりピンセットで頭蓋を左右に開き、視神経と三叉神経を切断しつつ脳を取りだし、氷冷の aCSF 内へ落とし入れて 2-3 分間冷やします。2-4 の手順はなるべくすばやく (1 分以内が推奨) 行ってください。



5) 脳を冷やす間に氷冷のガラス製ペトリ皿にフィルターペーパーを敷き、aCSF を数滴浸みこませます。また、この手順までに寒天ブロックをスライサーステージに接着させておきます。

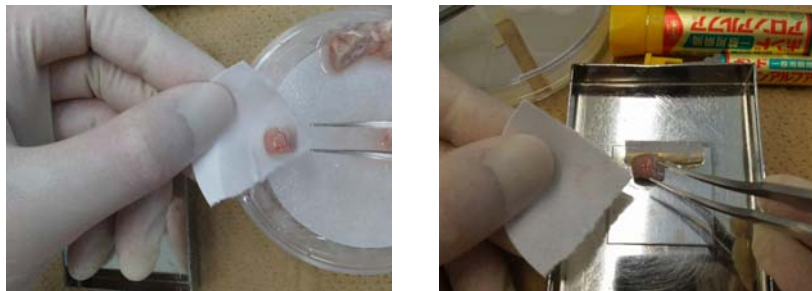
6) 冷やした脳をフィルターペーパーに移し、カミソリ替刃を使って大脳の吻側部 3 分の 1 及び小脳を切除します。



7) 吻側切断面が下になるように海馬を含む脳片を立たせて、大脳底部を 20°-30°の角度で切除してから左右に分離します。

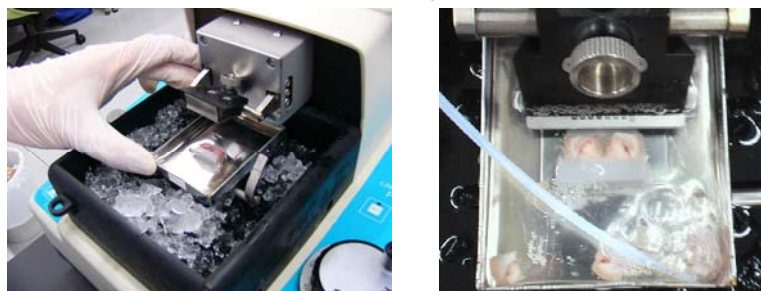


8) スライサーステージに瞬間接着剤を 2、3 滴落として広げた後、適度に aCSF をしみ込ませたフィルターペーパーに片側の脳片を載せてスライサーステージへとすばやく運び (注: 脳片を乾燥したフィルターペーパーに直接載せると、貼り付いて扱い難くなります)、尾側部側が寒天ブロックと密着するように置きます。同様に瞬間接着剤を 2、3 滴落として広げた後、もう片側の脳片も置きます。

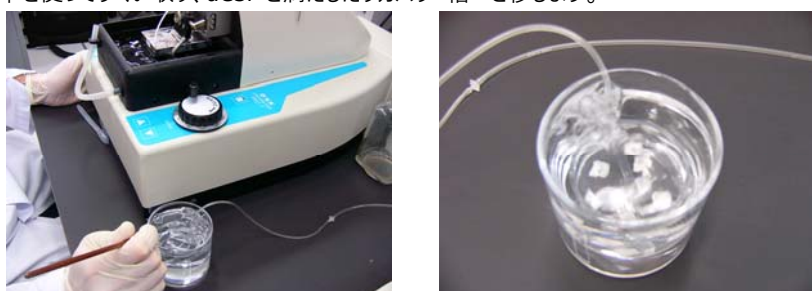


3.3. 脳の薄切

- 1) 瞬間接着剤を乾燥させるため数秒待つてから、スライサーステージをスライサー本体に固定し、氷冷の aCSF を注ぎます。スライサーステージは氷冷しながら、aCSF を通気し続けます。
- 2) スライサーの取り扱い説明書に従って薄切を行い、300 μm 厚の海馬切片を作成します。目安として、マウスの場合は表面から 1.0-1.5 mm、ラットの場合は 2.5-3.0 mm 程度切断すると、海馬を含む領域が現れます。



3) 作成した海馬切片は絵筆を使ってすくい取り、aCSF を満たしたリカバリー槽へと移します。



- 4) 海馬切片を含むリカバリー槽を 32°C の恒温槽で 45 分間程度温め、それ以降は恒温槽から出して室温管理します。リカバリー後の海馬切片は徐々に状態が悪くなっていくため、長くとも 8 時間以内に使用するのが推奨です。なお、室温でのリカバリーも可能ですが、夏場のエアコンが効きすぎた環境や、冬場の寒さが厳しい環境下では十分なリカバリーが行われず、神経活動が記録できないことがあります。また、リカバリーの条件は、場合によっては実験結果に大きな影響を与える可能性もあります (参考文献 1)。

3.4. ノイズチェック

- 1) 海馬切片をマウントする前に MED プローブに 0.7 ml 程度の aCSF を注ぎ、MED コネクターに装着します。
- 2) インレットパイプ及びアウトレットパイプをネジで固定しない状態で、灌流キャップを MED プローブに被せます。灌流キャップが不安定な場合は、テープや粘土等でチャンパーリングと固定します。

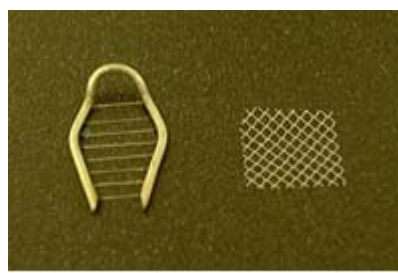


- 3) MED プローブ底面に白金線を密着させるようにしてネジで固定し、インレットパイプ及びアウトレットパイプの先端は MED プローブ底面からわずかに離れる程度に固定します。
- 4) 灌流ポンプを作動させてノイズチェックを行います。灌流ノイズが生じる場合はチップドロッパーを交換します。

4. 海馬切片の MED プローブへのマウント

- 1) 以下の実験器具を準備します。

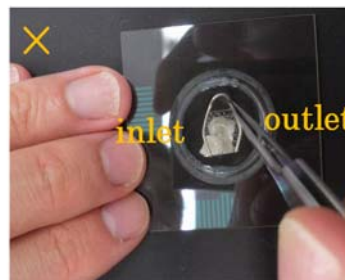
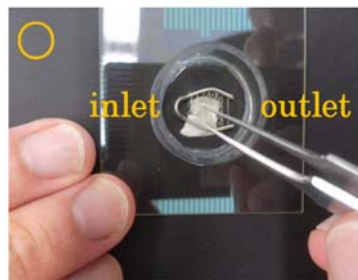
先端をカットしたスポイト …… 1 本 絵筆 …… 1 本 根元をカットした 200 μ l チップを装着した 5 ml シリンジ …… 1 本
スライスアンカー …… 1 個 メッシュ …… 1 枚



- 2) スポイトを使ってリカバリー槽から aCSF ごと切片を吸い取り、MED プローブに移します (注: 以降の 2-8 の手順はできるだけすばやく行います)。
- 3) 海馬切片の位置を微調整しやすくするため、5 ml シリンジでほとんど全ての aCSF を吸い取ります。



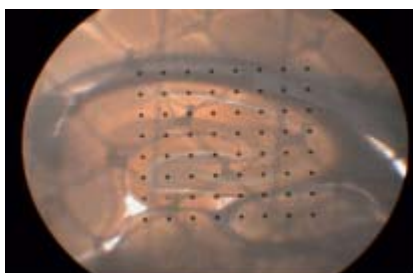
- 4) 絵筆を使って海馬切片を MED プローブ中央の電極部分に移動させ、その上にメッシュ、アンカーを順に載せます。この際、絵筆が記録電極や参照電極に触れないよう、十分にご注意ください。写真のように、いつも定まった方向に切片とアンカーを置くようにするのが理想的です。



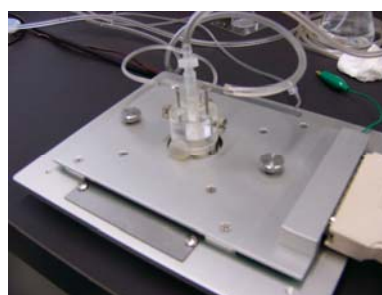
5) 倒立顕微鏡下で切片と記録電極の位置関係を確認します。位置が悪い場合は、絵筆を使ってアンカーごと切片の位置を微調整します。



6) 切片の位置を定めた後、顕微鏡写真を撮ります。64 電極全体を捉えるのに最適な倍率は 20-50 倍 (接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 2-5 倍) です。



7) MED プロブを MED コネクタに装着し、灌流キャップを被せます。インターフェース条件で実験する場合は、アウトレットパイプ先端を MED プロブ表面に密着するか、わずかに離れるようにネジで固定します。サブマージ条件で実験する場合は、アウトレットパイプ先端を MED プロブから少し離してネジで固定します。



8) インターフェース条件で実験する場合は 1.5-2.0 ml/min で aCSF の灌流を行い、切片が十分に電極と密着するよう 15 分間待ってから実験を開始します。サブマージ条件で実験する場合はさらに速い速度で灌流を行うことが、大きな応答を記録する上で重要となります (参考文献 2)。

5. MED64 システム専用ソフトウェアによる LTP の記録

詳しくは Mobius チュートリアルをご参照ください。

6. MED プロブの洗浄方法

電極の低インピーダンス (<math>< 50 \text{ k}\Omega</math>) 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) シリンジやスポイト等を使って MED プロブの縁から DDW を注ぎ、切片を浮かせて筆ですくい取ります。
- 2) DDW でチャンバー内を 3 回濯ぎます。
- 3) 洗浄後の MED プロブは DDW 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。

7. 参考文献

- 1) Capron B, Sindic C, Godaux E, Ris L. The characteristics of LTP induced in hippocampal slices are dependent on slice-recovery conditions. *Learn. Mem.*, 13, 271-7, 2006.
- 2) Hajos N, Ellender TJ, Zemankovics R, Mann EO, Exley R, Cragg SJ, Freund TF, Paulsen O. Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *Eur. J. Neurosci.*, 29, 319-27, 2009.
- 3) Oka H, Shimono K, Ogawa R, Sugihara H, Taketani M. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J. Neurosci. Methods*, 93, 61-7, 1999.
- 4) Shimono K, Brucher F, Granger R, Lynch G, Taketani M. Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices. *J. Neurosci.*, 20, 8462-73, 2000.
- 5) Shimono K, Kubota D, Brucher F, Taketani M, Lynch G. Asymmetrical distribution of the Schaffer projections within the apical dendrites of hippocampal field CA1. *Brain Res.*, 950, 279-87, 2002.