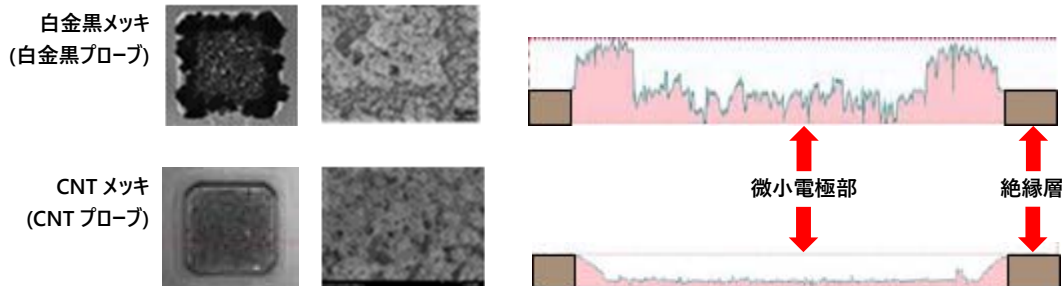


MED プローブ 取扱説明書



1. はじめに

MED プローブは神経細胞等の電氣的活動を「多数の点から、同時に、長期間にわたって」測定できる電気生理実験測定用プローブで、急性脳スライスや分散培養系、器官培養系等の in vitro 標本に適用できます。基板中央部には 64 個の記録電極が 8×8 配列でパターンニングされており、その外側 4 個所には参照電極がパターンニングされています。MED64 システムではこの 4 個所の参照電極と 64 個の各記録電極間にかかる電位を検出しますが、任意の記録電極への電流印可も可能です。電極部は ITO のリードパターン上に白金黒、またはカーボンナノチューブ（以下 CNT）をメッキして電極表面倍率を有効倍率 100-200 倍にしてあり、その結果、信号ノイズ比が向上し、大電流の印加も可能となっています。さらに CNT メッキ電極の MED プローブ（以下 CNT プローブ）では、その電極性能を保ったまま、「物理的耐久性の向上」や「フラットな電極表面構造」を実現しています。



2. 使用方法

2.1. 開封

MED プローブは非滅菌、洗浄済みの状態で包装されております。もし、表面に付着した埃等がある場合には、洗浄瓶等を用いて蒸留水で流し取ります。 **注：洗浄の際、MED プローブの電極表面には触れないでください。電極や絶縁層を傷つける恐れがあります。**

2.1.1. 未使用状態での保管期限の目安

新品の MED プローブであっても、未使用のまま年月が経過すると電極性能が経年劣化します。未使用で長期保管する場合は 3 ヶ月以内に開封し、使用時までチャンパー内に超純水（以下 DDW）または滅菌水（以下 SDW）を満たした状態で保管します。特に CNT プローブの T タイプについては、製造後、長期間乾燥状態に曝すことによるインピーダンスの上昇を防ぐため、購入後はなるべくすぐに DDW 処理します。

2.1.2. 使用期限と使用回数

製造から 1 年間以上経過した MED プローブについては、保管の状態に関わらず、性能保証はいたしかねます。また MED プローブは適切に取り扱うことで再利用も可能ですが、基本的に 1 回使い捨てを想定して設計されていますので、再利用時の性能保証もいたしかねます。

2.2. 殺菌処理

MED プローブ上で培養を行う場合には、開封後、必要に応じて以下の殺菌処理を行います。

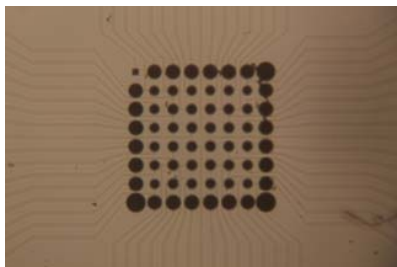
- (1) MED プローブを 70%エタノール中に 15 分間浸漬します。 **注：絶縁層等への影響を防ぐため、30 分以上の放置は避けてください。**
- (2) クリーンベンチ内で自然乾燥後、紫外線ランプを 15 分間照射します。 **注：オートクレーブは使用しないでください。電極を破壊する恐れがあります。**

2.3. MED プローブの親水化処理

未使用の MED プローブの電極表面は比較的疎水性であるため、使用に際し事前の親水化処理が必要です。この際、所定の時間処理するだけでなく、濯ぎの際に電極表面を目視で観察し、水を弾かずしっとりと濡れた状態に変化したかを確認して、不十分な場合は繰り返し十分な処理を行います。なお、MED プローブは繰り返し使用し、適切に保管することで徐々に親水化が進むため、再利用の際にはこの工程は必ずしも必要ありません。以下に代表的な処理例を示します。

2.3.1. ポリエチレンイミン処理

- (1) 25 mM ホウ酸塩緩衝液に溶解した 0.1%ポリエチレンイミン（PEI）溶液を MED プローブに満たし、室温で 12 時間処理します。0.1%PEI 溶液を満たした際に、電極部を気泡が覆う場合がありますので、その場合はピペティングして気泡を除去します。



(2) 使用前に DDW または SDW で 3 回濯ぎます。

0.1%ポリエチレンイミン溶液の作り方

(1) ホウ酸塩緩衝液の調製。

① 9.525 g の四ホウ酸ナトリウム十水和物 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) を 950 ml の純水で溶解、攪拌します。② 1N-HCl で pH8.4 に調製します。③ DDW で 1000 ml にメスアップします。④ 4°C 下で保存します。

(2) 1%ポリエチレンイミン溶液の調製。

① ポリエチレンイミン (Polyethylenimine) は本来 50%溶液のため、重量で量りつつ (ピペッターに 1 ml チップの先端を切って装着、使用する) 遠心チューブに入れ、ホウ酸塩緩衝液でまず 5 倍希釈します。② その後さらに 10 倍希釈して 1%溶液を調製し、③ 1%溶液を冷蔵保管します。

(3) 使用時にさらにホウ酸塩緩衝液で希釈して 0.1%溶液にして使用します。

2.3.2. 血清処理

新しい MED プローブに血清 (細胞培養に使用した血清入り培地でも良い) を満たして 1~2 分後に除去し、SDW で 3 回濯ぎます。

2.4. MED プローブの細胞外基質コーティング

MED プローブ上で培養をする場合は、対象標本の播種やマウント前に細胞外基質をコーティングします。標本の種類や細胞種により細胞外基質との相性があるため、適した細胞外基質を用います。以下に代表的なコーティング例を示します。

2.4.1. ポリ-D-リジン [対象: 初代培養神経細胞]

- (1) ポリ-D-リジン (Sigma P6407) を濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう SDW で調製します。
- (2) 殺菌処理した MED プローブに、調製済みのポリ-D-リジン 1 ml を MED プローブ底面が全て覆われるように滴下し、1 時間以上インキュベーター内に静置します。
- (3) ピペットを用いてポリ-D-リジンをできるだけ除去し、SDW で 3 回濯ぎます。この時除去したポリ-D-リジンは、他の MED プローブのコーティングにも再利用できます。

2.4.2. ファイブロネクチン [対象: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞]

- (1) 2 μl の 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ファイブロネクチン溶液を殺菌処理した MED プローブの記録電極部分にのみ滴下し、1 時間インキュベーター内に静置します。この際、ファイブロネクチン溶液が乾燥しないように、MED プローブをシャーレに入れ、周囲に 3 ml 程度の SDW を満たした状態でインキュベーションします。
- (2) 細胞の播種直前に、ファイブロネクチン溶液がわずかに電極部に残るようにしてアスピレーターで吸い取り、速やかに細胞懸濁液を播種します。

2.4.3. マトリゲル [対象: ヒト iPS 細胞由来心筋細胞]

- (1) 2 μl のマトリゲル (BD Biosciences #354277) 溶液を殺菌処理した MED プローブの記録電極部分にのみ滴下します。マトリゲル溶液はメーカーの取扱説明書に従って調製し、-20°C で分注保存して使用直前に溶解します。
- (2) マトリゲル溶液を滴下した MED プローブを少なくとも 30 分間インキュベーター内に静置します。

2.4.4. コラーゲン [対象: 種々の培養標本]

全ての操作は無菌状態で行います。コーティングした MED プローブにコンタミがないことを確認するため、本プロトコルは培養開始 8 時間以上前に行います。

- (1) 70%エタノールを用いて MED プローブを殺菌します。

- (2) クリーンベンチ内で MED プローブを風乾し、さらに 15 分間紫外線照射により殺菌します。
- (3) MED プローブを少なくとも 1 時間冷蔵庫内に静置し、十分に冷やします。
- (4) MED プローブを冷蔵庫から取り出し、コラーゲン溶液が MED プローブ表面を完全に覆うようにチャンバー内へ注ぎます。その後直ちにピペットを用いてコラーゲン溶液をできるだけ除去し、その際に MED プローブ表面がまんべんなくコラーゲン溶液で濡れていることを確認します。除去したコラーゲン溶液は他の MED プローブのコティングにも再利用できます。
- (5) コラーゲンがゲル化するよう、MED プローブを CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 30 分間インキュベーションします。
- (6) MED プローブ表面を滅菌蒸留水で 3 回濯ぎます。
- (7) MED プローブに培地を注ぎ、使用直前まで CO₂ インキュベーター内で保存します (最大 1 週間まで保存可能)。

コラーゲン溶液 (新田ゼラチン; Cellmatrix Type I-A) の調製法

調製は無菌状態、4°C の環境下で行います。

- (1) コラーゲングル溶液 (0.01N 塩酸中、pH3.0) に、10 倍濃度の DMEM/F-12 混合培地 1 ml を加え、静かに攪拌します。
- (2) 上の混合液に、再構成バッファー (0.08N 水酸化ナトリウム、200 mM HEPES) を加え、静かに攪拌します。
- (3) 最終混合液を冷蔵庫内に 30 分間放置し、気泡を除きます (このステップは省略可能です)。

2.5. 使用後の洗浄方法

2.5.1. 急性脳スライス標本の場合

- (1) 電極部に直接触れないようピンセットで注意しながらアンカーを取り除いた後、MED プローブに水や電解液等を入れて軽く左右に振って急性標本を浮かし、絵筆等ですくい取ります。
- (2) DDW で 2~3 回程度濯ぎます。

2.5.2. 培養標本の場合

- (1) 培養液を捨て、直後にトリプシン EDTA でプローブ底面を満たし、1 時間程度 37°C インキュベーター内で放置します。
- (2) 数回ピペッティング操作を行い、細胞を剥離します。
- (3) トリプシン EDTA をアスピレーターで吸引除去した後、滅菌水 (以下 SDW) で 2~3 回洗浄します。

2.5.3. 漂白剤による洗浄

- (1) 培養切片や培養細胞が存在した状態でチャンバー内を約 1 ml の漂白剤 (Clorox 等) で 3 回濯ぎます。
- (2) 漂白剤を MED プローブに注いだまま 15-30 秒間放置します

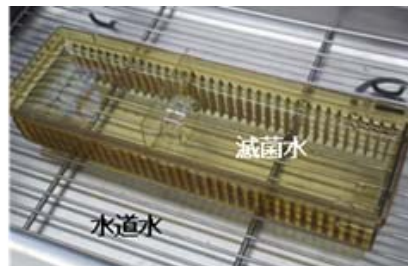
注: この処理後も洗浄しきれない場合は、さらに 2 回濯いでから、MED プローブを長時間漂白剤に曝します。通常は 1-2 分間で十分ですが、15 分間までは可能です。20 分間以上は曝さないでください。また細胞が死んで時間が経過し、電極に貼り付いた状態で洗浄すると、細胞が電極メッキごと剥がれる場合がありますので、実験終了後なるべくすぐに実施します。

- (3) 漂白剤を廃棄し、MED プローブを DDW で少なくとも 5 回は濯ぎます。

注: 白金黒プローブとは異なり、CNT プローブでは塩素系漂白剤による細胞残存物の除去は電極の破損が生じるため行えません。

2.5.4. 超音波洗浄

CNT プローブでは上述のトリプシン処理後も汚れが目立つ場合、必要に応じて超音波洗浄が可能です。白金黒プローブでは電極の破損が生じるため実施しないでください。実施する場合、MED プローブを DDW または SDW を満たしたプラスチック容器に必ず入れて、間接的に洗浄するようにします。洗浄槽での直接的な洗浄や、ガラス容器での間接的な洗浄では、電極部が破損するおそれがあります。また、洗浄時間は 1 回につき、3 分間以内に抑えるようにしてください。細胞が貼り付いた状態では実施しないでください。



2.6. 使用後の保管方法

MED プローブは電極が乾燥するとインピーダンスが上昇し、本来の低インピーダンスを維持できなくなります。必ず下記 A または B の方法で適切に保管します。

(A) DDW (できれば SDW) を入れたビーカーなどの容器の中に MED プローブを入れ、冷蔵保管します。

(B) MED プローブのチャンパー内に DDW (できれば SDW) を入れ、パラフィルムなどで密閉し、冷蔵保管します。

注: どちらの場合でも長期にわたって保管する場合は、少なくとも 1 ヶ月に 1 度 DDW または SDW を交換します。

2.7. その他の注意事項

2.7.1. 絶縁層について

MED プローブのチャンパー内は電極部以外絶縁膜で覆われています。電極部と同様に非常にデリケートな素材であるため、ピンセットやマイクロペットの先端等で触れないように十分ご注意ください。

2.7.2. 電極に印加する刺激電流について

下の刺激電流と印加時間のグラフの赤色部内の設定でご使用ください。この範囲外の設定で使用されると、微小電極や測定試料にダメージを与える可能性があります (図 1)。

2.8.3. 培養液を満した CNT プローブの取扱い

CNT プローブは培養液を満した状態で大気中 (5%CO₂ 環境外) に放置すると、およそ 2-3 時間でインピーダンスが著しく上昇し、電極性能が大幅に低下します (図 2)。これを避けるため、使用後は速やかにインキュベーターへ戻すか、あるいは MED プローブの洗浄を行ってください。万が一大気中で放置して性能が低下してしまった場合、3 分間超音波洗浄の後、DDW 中で 12 時間以上保管することで本来の性能に戻ります。超音波洗浄については p.4「2.5.4. 超音波洗浄」をご参照ください。

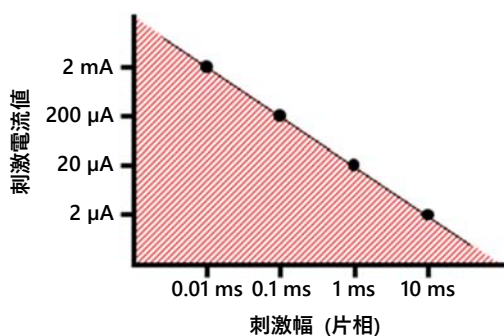


図 1

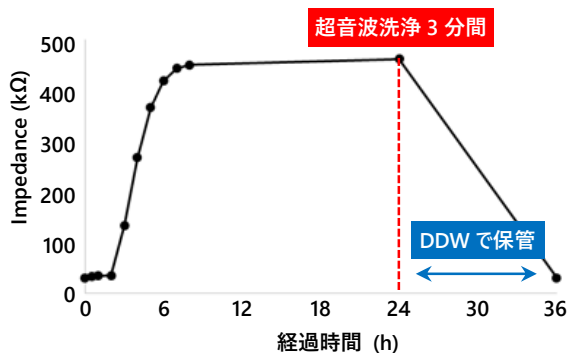


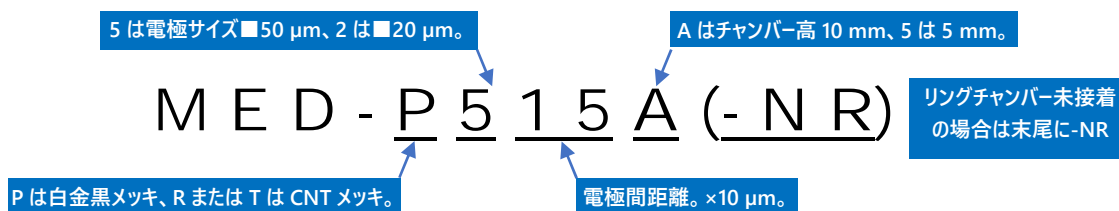
図 2

2.8.4. 煮沸消毒

MED プローブは煮沸消毒が可能です。電極部を下に向けて煮沸すると、煮沸消毒器の底面 (または鍋底) からの気泡により電極が破損しかねないため、上に向けて置くようにします。水の状態から煮沸を始め、沸騰して最大 20 分間煮沸します。煮沸後はガラス基板が割れないように水に曝すのは避け、自然に冷まします。

2.8.5. MED プローブの型番について

一部の特殊な型番を除き、MED プローブの型番は以下の規則により定められています。



3. 定格・仕様

3.1. 一般

ガラス基板部	
材質	ガラス
寸法: MED プローブ	縦 50×横 50×高さ 0.7 mm
MED ミニ・プローブ	縦 40×横 30×高さ 0.7 mm
MED マルチウェル・プローブ	縦 35×横 100×高さ 0.7 mm
導電層材質	酸化インジウムスズ (Indium Tin Oxide; ITO) [0.15 μm 厚]
絶縁層材質 ※	ポリイミド [1.5 μm 厚]、またはアクリル系樹脂 [1.5 μm 厚]
チャンバー	
材質: MED プローブ	ガラス、またはアクリル樹脂
MED ミニ・プローブ	ガラス
MED マルチウェル・プローブ	アクリル樹脂
寸法: MED プローブ	外径 25 mm、内径 22 mm、高さ 10 mm (MED-P###A) 外径 25 mm、内径 22 mm、高さ 5 mm (MED-P###5)
MED ミニ・プローブ	外径 25 mm、内径 22 mm、高さ 10 mm
MED マルチウェル・プローブ	ウェル孔径Φ16 mm、ウェル間隔 18 mm、高さ 10 mm (MED-#5NF30) ウェル孔径 7.5×16 mm、ウェル間隔 9 mm、高さ 10 mm (MED-#5N811)
記録電極部	
材質	白金黒、またはカーボンナノチューブ (CNT)
電極数	64
寸法	50×50 μm (MED-#5###) / 20×20 μm (MED-#210#) / Φ50 μm (MED-#5001#、MED-#5002#、MED-#5003#) / Φ20 μm (MED-#2H08#)
インピーダンス (1 kHz、50 mV 正弦波印加時)	< 22 kΩ (MED-#5###) / < 30 kΩ (MED-#210#)
許容電流値	±200 μA (0.1 ms 幅)
許容電圧値	±1 V (0.1 ms 幅)
参照電極部	
材質	白金黒、またはカーボンナノチューブ (CNT)
電極数	64
寸法	50×50 μm (MED-#5###) / 20×20 μm (MED-#210#)
インピーダンス (1 kHz、50 mV 正弦波印加時)	< 2.2 kΩ

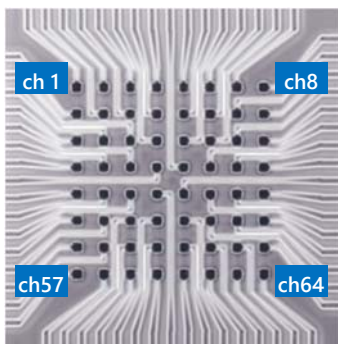
※絶縁層素材の変更について

2017年3月より、アクリル系樹脂製のガラス基板在庫がなくなり次第、随時ポリイミド製のガラス基板への切り替えを行っています。2019年7月末時点での切り替え済の型番は以下の通りです。

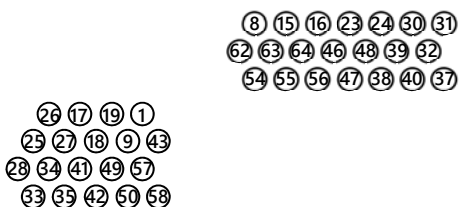
MED-#515#、MED-#530#、MED-#545#、MED-#G515#

3.2. 電極配置

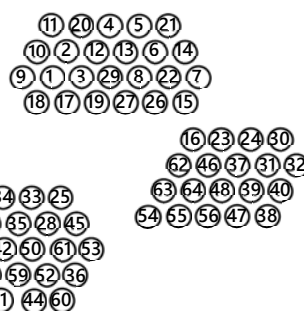
3.2.1. 標準 8×8 配列 (MED コネクターの出力端子が右側に位置する状態での電極番号)



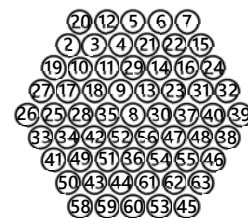
3.2.2. 特殊配列 (MED コネクターの出力端子が右側に位置する状態での電極番号)



ラット海馬スライス用アレイ (MED-#5001#)



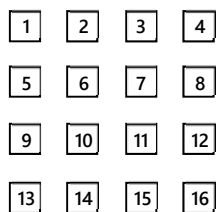
マウス海馬スライス用アレイ (MED-#5002#)



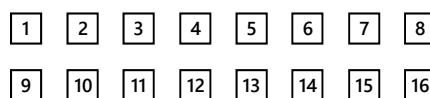
ヘキサゴナルアレイ (MED-#2H07#)

注: ヘキサゴナルアレイにおいて、電極が配置されていない ch1、ch57、ch64 は、信号の収録できません。データファイルのサイズ縮小の観点から、Mobius の Acquire MED64R2 data モジュールの Channel 設定欄で ch1、ch57、ch64 をオフにして信号収録するようお願いいたします。

3.2.3. MED ミニ・プローブ (端子部が上側に位置する状態での電極番号)

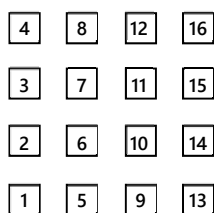


MED-#G515A

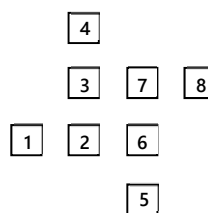


MED-#G501A

3.2.4. MED マルチウェル・プローブ (端子部が上側に位置する状態での電極番号)



MED-#5NF30



MED-#5N811

本書は予告なく変更される場合があります。本書の一部または全てを著作権者であるアルファメッドサイエンティフィック株式会社の許可なしに複製、転載することを禁止します。本書の作成にあたっては細心の注意を払っておりますが、本書の記述にいかなる誤りや欠落があろうとも、またそれらの誤記や本書内で紹介するプログラムやソースコードによりいかなる損害が生じようとも、執筆者はいかなる責任も負わないものとします。いかなる場合でも、本書により直接的または間接的に生じた損害に対して、発行者および執筆者は責任を負いません。

© 2019 アルファメッドサイエンティフィック株式会社 ★不許複製・禁無断転載

Version: 1.00; 2019 年 7月30日

■ 企画・製造

アルファメッドサイエンティフィック株式会社

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 7-15 彩都バイオインキュベータ 209 号

TEL: 072-648-7973 FAX: 072-648-7974

E-mail: info@amedsci.com Web: <https://alphamedsci.com>

■ 販売

株式会社 SCREEN ホールディングス ライフサイエンス事業室 細胞関連機材営業課

〒612-8486 京都市伏見区羽束師古川町 322

TEL : 075-931-7824 FAX : 075-931-7826