

視交叉上核 (SCN) の初代培養

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。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。ポリ L オルチニン (Sigma-Aldrich) は、神経培養に関しては、その効果と信頼性が高いコート剤です。ポリ L オルチニンによるコート処理は以下の通りです。

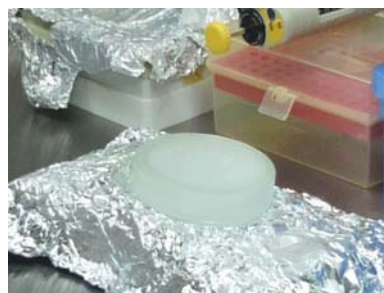
- 1) MED プローブ表面を滅菌済み蒸留水 (SDW) で 3 回濯いだ後、MED プローブ全体をガラス用中性洗剤 (7X Laboratory Detergent 等) で振とう洗浄します (37°C で ~30 分間)。
- 2) MED プローブを SDW で 5 回濯いだ後、0.1N HCl を 1-6 時間満たすことで、電極インピーダンスはかすかに下がります。
- 3) MED プローブを SDW で 3 回濯いだ後、70%エタノールで数回濯ぎ (もしくは 15 分間浸し)、クリーンベンチ内で乾燥させます。乾燥時に MED プローブ上に有機溶質が残らないよう、なるべく等級の高いエタノールをご使用ください。
- 4) 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。
- 5) 細胞の播種前日に、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)。

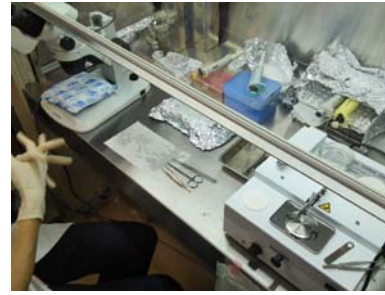


6. MED プローブにおよそ 1 ml の 0.02%ポリ L オルチニンを注ぎ、コンタミネーションを防ぐため蓋をし、少なくとも 1 週間冷蔵保管 (4°C) します (注: 多くのユーザーが数分から一晩程度のポリ L オルチニンコートにより良好な結果を得ておりますが、より長期間のコート処理が推奨です)。
7. SDW で濯いだ後、MED プローブにラミニン (もしくは 2-5%血清を含む培地やファイブロネクチン等) を滴下し、37°C の CO₂ インキュベーター内で 2 時間以上放置します (注: スポイト等を使って、できるだけ電極部分にのみ滴下するようにします)。

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。緩衝液 (p.3「Table1.a」をご参照ください。) 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緩衝液にくぐらせて、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。

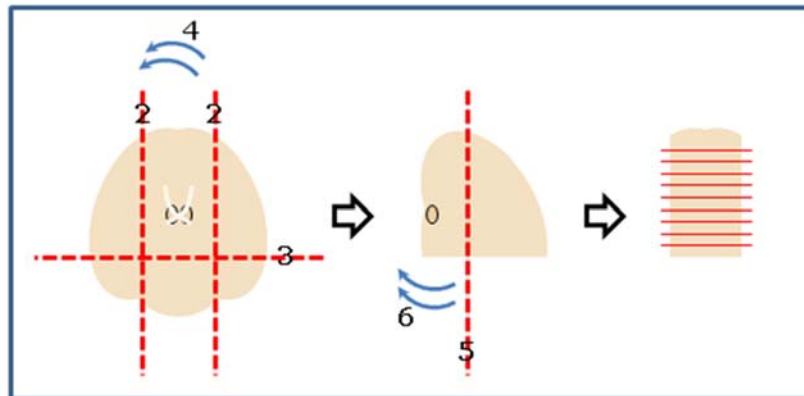




- 2) 2-5 日齢のマウスもしくはラットを低温麻酔して断頭し、視神経を引っ張らないように注意しながら脳を取り出します。
- 3) 脳底を上にしてトリミング用の下地の上に置き、外科用メスを使って視床下部断片にします (p.3「Fig.1」をご参照ください)。



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 400 μm 厚、ラットの場合は 600-700 μm 厚) を作成し、薬包紙ごと冷却した緩衝液に移します。



- 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。
- 6) 解剖顕微鏡下で、メスを用いて氷冷の緩衝液中で両側 SCN のみにトリミングします。複数の新生仔から得られた SCN 断片を 0.8 ml の 5%FBS・DMEM 培地 (p.32「Table1b」をご参照ください。) を満たした 1.5 ml 遠沈管に移します (マウスの場合は 3-5 匹、ラットの場合は 10-30 匹)。
- 7) SCN を 0.03%トリプシン緩衝液により 37°C で 15 分間処理します (注: トリプシンはかなり強力な酵素ですが、トリプシン緩衝液中で分散させなければ細胞生存率には影響せず、作用時間を短縮できます)。
- 8) 0.022%トリプシン阻害剤および 0.01%Dnase を含む緩衝液で SCN を濯ぎます。SCN を先端熱加工したパスツールピペットを用いて 10-20 回やさ

しくフラッシング、ピペッティングして分離させます (注: 20 回以上の激しいフラッシング、ピペッティングは細胞生存率を低下させます。細胞生存率に影響する重要なステップですのでご注意ください)。

- 9) 細胞懸濁液をポアサイズ 60 μm 、直径 25 mm のナイロンフィルター (Merck Millipore #NY6002500) でフィルター濾過します。
- 10) 細胞懸濁液を 5 分間、1500 rpm で遠心分離し、上清を抜き取り、5%FBS・DMEM 培地に再懸濁させます。
- 11) 細胞数をカウントします (注: 95%以上の高い細胞生存率は長期間記録に不可欠な条件です)。
- 12) MED プローブを軽く乾燥させ、内径 5 mm のクローニングリングの縁にシリコングリスを塗り、電極を囲うようにチャンパーリング中央に立てます。64 電極を含む中央領域に細胞懸濁液を 0.5-1.0 $\times 10^5$ cells/20-30 μl となるように播種し、ディッシュ (MED プローブのリングチャンパー外) に SDW を少量満たして、37°C の CO₂ インキュベーター内に 6 時間放置します。
- 13) 播種から 6 時間後に 1 ml の 2.5%FBS・5%添加物 x20 溶液・DMEM 培地を注ぎ、ゆっくりとクローニングリングを外します。記録を始めるまで 2 日に 1 回培地交換しますが、以降の血清濃度は 1-2%に抑えます。播種から 4-10 日目に神経活動が起こり、その後 2-6 週間記録を得ることができます。

Table1. 各種溶液の組成。

a. 緩衝液 (pH 7.3 / 0°C)

SDW に溶解し、濾過滅菌して使用する。

NaCl 8.6 g/L KCl 0.3 g/L NaHCO₃ 3.0 g/L HEPES 4.7 g/L Kanamycin 20 mg/L

b. DMEM 培地

DMEM, Powder, High Glucose (Life Technologies #12100-046) を添付プロトコルに従って調製する。血清濃度は適宜変更する。

c. 添加物 x20 溶液

SDW に溶解し、濾過滅菌して使用する。

Apotransferrin 2 mg/ml Insulin (H₂O soluble) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Putrescine hydrochloride 2 mM
 Progesterone (H₂O soluble) 0.4 μM Sodium selenite 0.6 μM

長期間記録のコツ

MED プローブ内を飽和湿度環境で維持するためには、チャンパーリング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。



100%空気で培養細胞を維持するためには、培地中の NaHCO₃ 濃度を低くして pH を ~ 7.4 に保ちます。問題は MED プローブ上の神経細胞の移動です。電極サイズの大きな MED プローブ (50 x 50 μm) の使用は有効であり、また血清濃度を 0.5-2.5%に抑えることで細胞移動をある程度減少できますが、血清により誘発されるグリア細胞の増殖を、播種から 3-7 日目に分裂阻止剤 (1 μM シトシンアラビノシド、1 μM フルオデキシウリジン: 1 mM 液を 1/100 量滴下します。) により阻害しなければなりません。

3. MED プローブの設置

- 1) 培養切片を含む MED プローブを殺菌した MED コネクターに設置します。

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。

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 プローブの洗浄方法

電極の低インピーダンス (<50 k Ω) 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 0.25% トリプシン・EDTA (Life Technologies #25200-056) を注ぎ、37°C のインキュベーター内で 1 時間放置します。
- 2) PBS で MED プローブを 3 回濯ぎます。
- 3) SDW で MED プローブを少なくとも 3 回は濯ぎます。
- 4) 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 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.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。

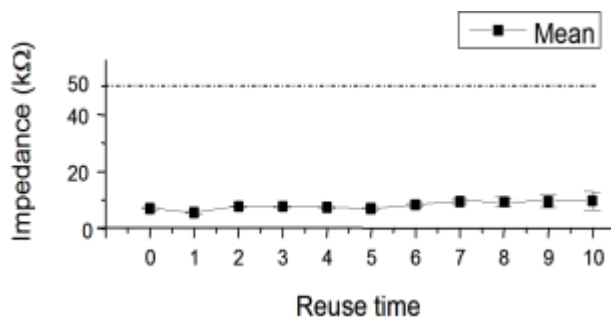


Fig.1. 再利用後のインピーダンス。

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) Honma S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namihira M, Honma K. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci. Lett.*, 250, 157-60, 1998.
- 2) Honma S, Shirakawa T, Nakamura W, Honma K. Synaptic communication of cellular oscillations in the rat suprachiasmatic neurons. *Neurosci. Lett.*, 294, 113-6, 2000.
- 3) Honma S, Nakamura W, Shirakawa T, Honma K. Application of a multielectrode array dish to chronobiology: monitoring the circadian firing rhythm of single SCN neurons. In: "Biological Rhythms" Proceedings of the Tenth Sapporo Symposium on Biological Rhythm, Ed. by Honma K., and Honma S., Hokkaido University Press, Sapporo, 2005.

4) Kononenko NI, Honma S, Dudek FE, Honma K. On the role of calcium and potassium currents in circadian modulation of firing rate in rat suprachiasmatic nucleus neurons: Multielectrode dish analysis. *Neurosci. Res.*, 62, 51-7, 2008.