

## MED64急性スライス実験解説

アルファメッドサイエンティフィック(株)

### はじめに

MED64システムは、従来電気生理実験を経験したことの無い研究者でも、簡単に電気生理学的手法を用いたデータ解析を可能にしたシステムです。とは言うものの、例えば急性スライスの実験をしようとするれば、スライスを調製しなければなりません。これは従来の電気生理実験と全く同様の技術を必要とします。又、そのスライスをMEDプローブに配置する際にも若干のノウハウを必要とします。

本解説書は、MED64システムを使って、電気生理実験に初めてトライする研究者のために、ラット海馬の急性スライス実験の方法について、解説しています。

### ステップ1. MEDプローブコーティング

MEDプローブ表面は比較的疎水性です。新しいプローブを初めて使う際は、ポリエチレンイミン0.1%溶液で表面をコーティングする必要があります。尚、1度使用したプローブではこの工程は必要ありません。

→**ポリエチレンイミン0.1%溶液の作り方詳細 EXHIBIT A 参照**

新しいプローブにホウ酸バッファー(25mM)に溶解した0.1%ポリエチレンイミン(PEI)を満たし、室温で12時間放置してください。使用前に蒸留水で3回すすいでください。

### ステップ2. MED64周辺システムのセットアップ

ウォーターバス、インキュベーター、加湿O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>等の調整により、プローブ周囲温度が約31°C~32°Cを維持できるようにしてください。

(EPSPの記録は、常温下でも可能です。)

### ステップ3. ACSF (Artificial CSF: 人工脳脊髄液)

ACSFを1リットル準備し、連続して混合ガス(O<sub>2</sub> 95%、CO<sub>2</sub> 5%、以下全て同じ)通気を行います。

ACSFの構成は、(mM) :

NaCl 124、KCl 3、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25、D-Glucose 10、MgSO<sub>4</sub> 1、NaHCO<sub>3</sub> 26、CaCl<sub>2</sub> 2[pH=~7.4]。

→**ACSFの作り方詳細 EXHIBIT B 参照**

少なくとも10分間混合ガスで通気したACSFを、150ml(凍結速度を速める為、2つのビーカーに各75ml)を取り出し、フリーザーに入れます。ステップ4のチェックリストによるチェックを完了した後、ACSFの1/3程度が氷になった時点で取り出してください。部分的に凍ったACSFを砕いてシャーベット状にして、使用するまで混合ガス通気をしてください。大脳取り出しと解剖に75mlを使用し、もう75mlは、ビブラトーム槽に入れてください。

## ステップ4. 海馬切片

海馬取り出し前に完了すべき手順とツールのチェックリストを以下に記します。

### 脳摘出ツール：

- ◆ メス刃
- ◆ 小さいはさみ
- ◆ ピンセット
- ◆ スパチュラ
- ◆ ギロチン
- ◆ 廃棄袋
- ◆ ペーパータオル



### 海馬解剖ツール：

- ◆ メス刃
- ◆ プラスティック・スプーン
- ◆ 先曲がりピンセット
- ◆ フィルターペーパー付きペトリ皿
- ◆ 脱脂したビブラトーム刃
- ◆ 予備フィルターペーパー（余分な接着剤やACSFを吸い取るため）
- ◆ 吸引ピペット（切片をビブラトーム槽からリカバリ槽に移すため）
- ◆ シアノアクリレート接着剤(瞬間接着剤、アロンアルファ)
- ◆ フリーザーから、ビーカーに入れ凍結したACSFを取り出し、砕いて混合ガス通気したもの
- ◆ 砕いた氷で満たした発泡スチロールの容器に、上記ビーカーを入れる
- ◆ ビブラトーム槽に凍結ACSFを半分量（常温ACSFと混合）連続的に混合ガス通気が必要。
- ◆ ビブラトームのベースプレート部の周囲を砕いた氷で満たす。
- ◆ ブロック状の寒天をビブラトームベースプレートに接着固定したもの
- ◆ 底がメッシュナイロン加工されたシャーレを入れた、混合ガス通気されたりカバー槽。



### 脳摘出

脳を摘出し、氷で冷やされた75mlのACSFの中に手早く入れてください。このステップはダメージを最小限に留めるよう手早く処理しなければなりません。25秒から45秒が目安です。90秒以上かかると、再度摘出が必要となります。脳全体を十分冷やして（2～3分）から、次のステップに進みます。

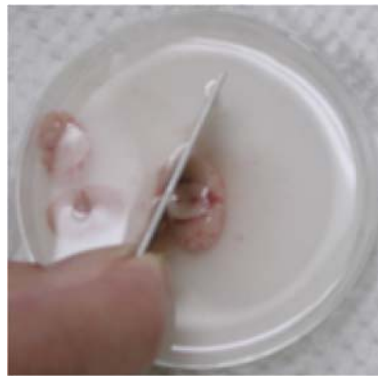
- ⇒
  - 手早く脳を摘出すること。＜要練習＞
  - 十分冷やすこと。（次ステップでのダメージを最小限にします）

## 解剖

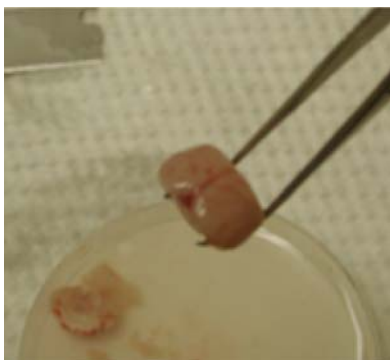
- ◆ プラスティック・スプーンを使用して、大脳底部がフィルターペーパーに接触するようにペトリ皿に入れます。(シャーベット状のACSFを満たしてください。)
- ◆ 小脳 (coronal section) を取り除いてください。
- ◆ 大脳の約1/3を占める前頭葉 (coronal section) を取り除いてください。



- ◆ 前頭葉切断面が下になるように立ててください。
- ◆ 大脳底部の角を水平から20° ~30° の角度で両方取り除いてください。



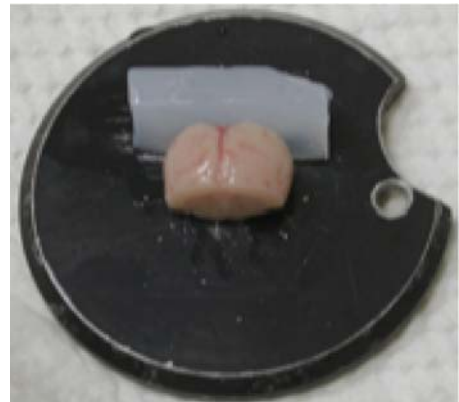
- ◆ 大脳をペトリ皿から乾いたフィルターペーパーに移してください。ここでも大脳底部は下に向けます。



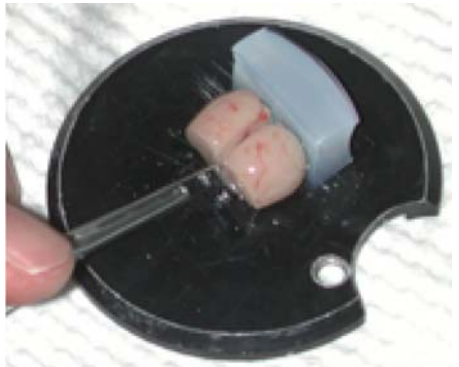
- ◆ ビブラトームベースプレート上のブロック状の寒天付近に接着剤を2~3滴のせてください。
- ◆ 接着剤を広げる事により、数平方cmの薄い層が形成されます。



- ◆ フィルターペーパーにより余分な水分を吸い取った大脳をベースプレートに接着固定します。このとき大脳の向きは底部が接着面、尾部(小脳切除面)が寒天側に接するようにします。



- ◆ 正中線のカット。そうすると、最終的に、脳底部から角度をつけて切断した面が、プレートと接着することになります。



- ◆ 大脳の手前側と両側の底面に接着剤を流し、更に十分な固定を行います。その後余分な接着剤や水分をフィルターペーパーで吸い取ってください。
- ⇒ 接着剤は、脳の底面のみに付け、上部に付かないように注意。



- ◆ 接着剤が乾くまで更に10秒待ち、0°Cのビブラトーム槽に入れてください。

⇒ ➤ ビブラトーム槽は、十分冷やすこと。

- ◆ 最初は4mmから5mmの厚さ（ラットの場合）にカットしてください。そうすれば海馬を目視にて確認できます。海馬切片は通常300～350ミクロンの厚さでカットしてください。切片は海馬と周囲皮質部を含みます。

⇒ ➤ スライサーの刃は、4回くらいのカットが限界。6枚のスライスが取ればよい。  
➤ 1回目、4-5mm厚でカットする時、如何に適切な位置までカットできるかが重要。

- ◆ カットされた切片は速やかにリカバリー槽に入れ、少なくとも50分間リカバリーを行ってください。



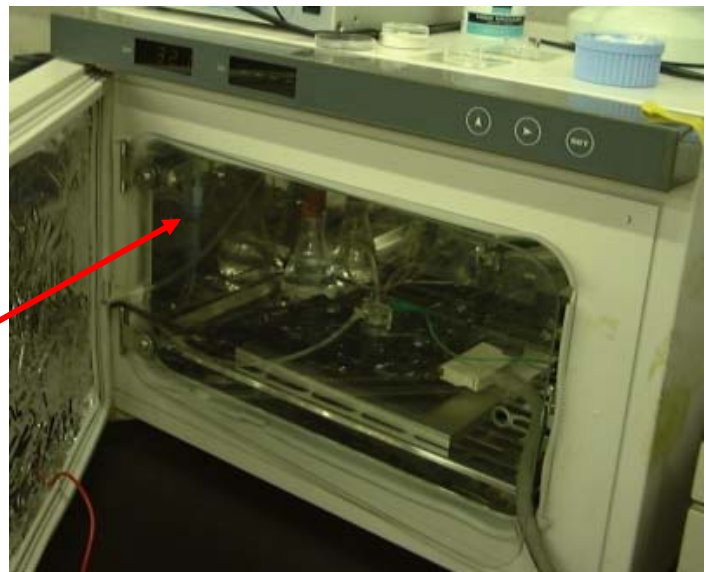
## ステップ5. 環流・混合ガス及び温度設定

環流キャップにはインレット・アウトレット・混合ガス供給用の3つのポートがあります。インレット・アウトレットのポートは液面高さを調整することができます。

混合ガス通気されたACSFをプローブに循環する為に環流システムを使用します。ACSF溶液とプローブ槽に供給する混合ガスは32℃に設定します。



IVドリッパー



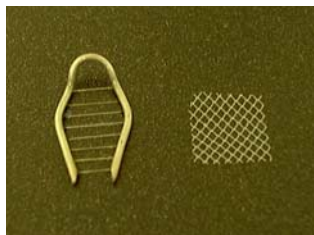
ポンプ出力から環流キャップのインレットポートの任意の位置にIVドリッパー設ける必要があります。流量は最高2 ml/分とし、通常0.5 ml/分～ 1.0 ml/分が使用されます。

加湿混合ガスは、0.1リッター/分以上、0.3リッター/分未満の流量に設定して下さい。

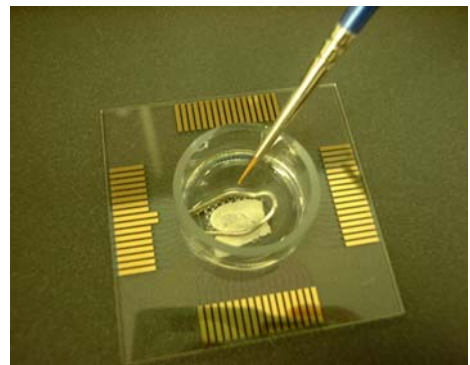
## ステップ6. MEDプローブへの切片の配置

プローブと切片の接触を確保するため、重りで押さえる方法を用います。スライスの上にメッシュシートを被せ、その上に錘を載せます。このような切片を固定させる重りは市販されていますので、それを使っていただくのが良いでしょう。

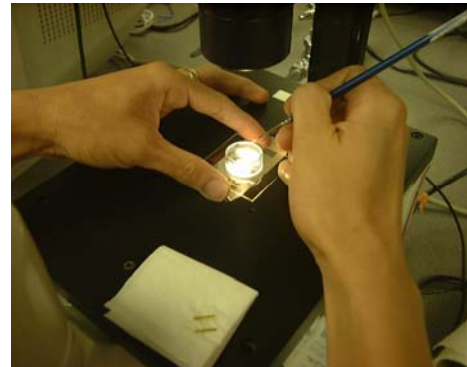
- ◆ 重りが準備できたらリカバリー槽から切片を一つ取りだし、プローブに配置してください。
- ◆ プローブ中のACSFを200ul程度残し、それ以外は吸い取ってください。
- ◆ スライスにメッシュシートを被せ、記録に影響のない範囲に重りを載せてください。
  - ⇒ ➤ メッシュシート、重りは撥水するため、そのまま載せようとするとうき上がってしまう。予め、ACSFに漬けて、馴染ませておくこと。
  - メッシュシートは、大きくしすぎないこと。浮き上がる原因になる。



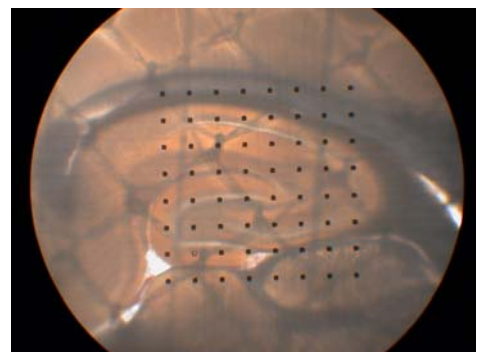
重りの例  
(Warner製、SHD-22CKIT)



- ◆ 顕微鏡で切片を希望する位置に配置してください。
  - ⇒ ➤ 動かす場合、重りごとゆっくりと動かす。



- ◆ 写真を撮ります。

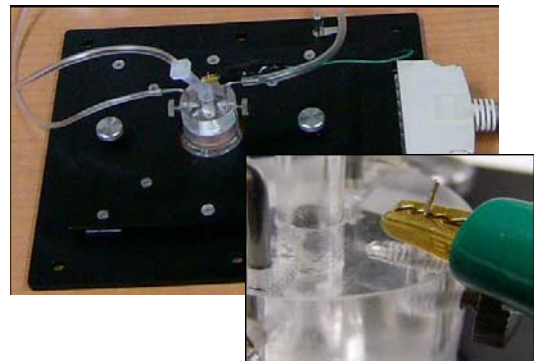


## ステップ7. 記録する

実験開始前にプローブ上の切片位置の顕微鏡写真を撮ります。顕微鏡写真をソフト(MED64 conductor)に取り込み、電極と切片の相対位置を確認します。



プローブをMEDコネクタ装着し、プローブに還流キャップを取り付けます。還流キャップの白金線をアース接地してください。



20-30分還流して、スライスが安定したら、実験をスタートしてください。

顕微鏡写真を参照しながら刺激チャンネルを選択し、アンプで刺激レベルを設定してください。刺激信号がMED Conductorから送信され全64チャンネルの誘発レスポンスを記録・保存できます。

**EXHIBIT A****ポリエチレンイミン0.1%溶液の作り方****(1) Borate Buffer の調整**

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 9.525g 計り、  
950ml の純水で溶解、攪拌

↓

1N-HCl で pH8.4 に調整

↓

純水で 1000ml にメスアップ

↓

4°C 保存

**(2) ポリエチレンイミン 1% 溶液を作る**

(注) ポリエチレンイミン (Polyethylenimine) はもともと50%溶液。

重量で量りとって (ピペットマン、1ml 用チップの先を切り使用する) 遠心  
チューブに入れ、まず5倍に薄めて溶かす

↓

更に10倍にして、1%溶液完成

↓

1%溶液を冷蔵庫で保存する

**(3) ポリエチレンイミン 0.1% 溶液を作る**

使用時にさらに Borate Buffer で薄めて 0.1%溶液にして使用する

## EXHIBIT B

### ACSFの作り方

#### < 組成 >

		M. W.	/L	
NaCl	124.00m M	58.44	7.25 g	SIGMA S-5886
KCl	3.00m M	74.55	0.22 g	SIGMA P-5405
NaHCO <sub>3</sub>	26.00m M	84.01	2.18 g	SIGMA S-5761
CaCl <sub>2</sub> /2H <sub>2</sub> O	2.00m M	147.02	0.29 g	SIGMA C-7902
MgSO <sub>4</sub> /7H <sub>2</sub> O	1.00m M	246.48	0.25 g	SIGMA M-7774
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25m M	136.09	0.17 g	SIGMA P-5655
D-Glucose	10.00m M	180.20	1.80 g	SIGMA G-7021

#### < 準備 >

- (1) CaCl<sub>2</sub> の 100 倍液を作る。 CaCl<sub>2</sub> 14.5g に純水を加え、500ml 作る。
- (2) MgSO<sub>4</sub> の 100 倍液を作る。 MgSO<sub>4</sub> 12.5g " "
- (3) D-Glucose の 100 倍液を作る。 D-Glucose 36.0g に純水を加え、200ml 作る。
- (4) NaCl、KCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を混合し、Klebs10 倍液を作る。

NaCl 72.5g、KCl 2.2g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7g に純水を加え、1000ml 作る  
それぞれを、冷蔵庫で保存する。

#### < ACSF を 1000ml 作る >

1000ml のシリンダーに純水を 800ml 程入れ、下記の順番でそれぞれを混合し、最後に純水を追加し、1000ml に合わせる。

- (1) X 10 Klebs 100ml
- (2) NaHCO<sub>3</sub> 2.18 g
- (3) X 100 MgSO<sub>4</sub> 10m l
- (4) X 100 CaCl<sub>2</sub> 10m l
- (5) X 100 D-Glucose 10m l

(注) 混合した後は、すぐに酸素 (5% CO<sub>2</sub> 混合) 通気すること。

実験・MED64システムに関するお問い合わせ・ご相談は



**アルファメッドサイエンティフィック株式会社**

〒587-0085

大阪府茨木市彩都あさぎ7-7-15

彩都インキュベータ209号

電話:072-648-7973

FAX:072-648-7974

[Support@amedsci.com](mailto:Support@amedsci.com)

[www.med64.com](http://www.med64.com)