

海馬スライス培養法（メンブレン法）

2001.12.19 藪中 厚生

器具・機器

断頭用はさみ（1）、曲型ピンセット（2）、脳摘出用スパチュラー（1）、血管除去用ピンセット（2）、眼科用ピンセット（1）、スカルペルナイフ（1）滅菌プラスチックシャーレ・濾紙入り*1（IWAKI 90mm）（1）、滅菌プラスチックシャーレ・ガーゼ入り*2（IWAKI 90mm）（1）、脳冷却用ステンレスシャーレ（1）、海馬冷却用滅菌シャーレ（Falcon 3001, 35mm）（1）、海馬スライス洗浄用滅菌シャーレ（Falcon 3001, 35mm）（3）、スライス分別用滅菌シャーレ（Falcon 3001, 35mm）（5）、改良滅菌パスツールピペット*3（3）、チョッパー（Mc Ilwain Tissue Chopper）、両刃カミソリ（1）、Millicell-CM*4（6）、濾紙（2）培養用滅菌シャーレ*5（Falcon 3001, 35mm）（6）、滅菌6穴シャーレ*6（1）、5%-CO₂, 34 インキュベーター（1）、ゴミ袋（1）、ピペッター（1）、消毒用アルコール噴霧器（1）、実体顕微鏡（1）、クリーンベンチ（1）、氷入れ（1）、ビーカー（1）、濾紙（ADVANTEC 90mm）（1）、メンブレン（Millipore GSWP04700）（2）、パスツールピペット（1）

（ ）内は数量

滅菌プラスチックシャーレ・濾紙入り*1：濾紙とメンブレンをシャーレのフタ側に入れ、底側を被せた状態でUV下に2時間以上置き滅菌する。滅菌後はアルミ薄で覆い保存。

滅菌プラスチックシャーレ・ガーゼ入り*2：JKワイパーを4つ折りにし70%アルコールを噴霧してシャーレに入れ、フタをしてUV下で2時間以上置き滅菌する。滅菌後はアルミ薄で覆い保存。

改良滅菌パスツール*3：パスツールピペットを先端径4mm程度になるようガラス切り用ヤスリで切断し、バーナーで切断面を炙ったパスツールを作成し、3本をまとめてアルミなどで包みオートクレーブにかけ滅菌する。

Millicell-CM* 4 : 培養スライス組織を光学測定や染色など培養後の目的に応じて使いやすいものを使用する。通常はMillicell-CM PICM 030 50 (0.4um)を用い、滅菌6穴シャーレ* 6 と組み合わせて使用。水浸レンズなどを用いて組織を観察する場合はMillicell-CM PICM ORG 50 (0.4um)と培養用滅菌シャーレ* 5 を組み合わせて用いるとよい。

試薬・培地

< 海馬摘出用試薬 >

・ Krebs-Ringer液

10 × ACSF (NaCl:162g, KCl:5g, NaHCO₃:35.2g, NaH₂PO₄ 2H₂O:1.8g / 2L) : 200ml、1M-CaCl₂ : 4ml、1M-MgSO₄ : 2.6ml、Glucose : 3.6g を2Lのメスフラスコで攪拌しながら作成しメスアップする。濾過滅菌して4 で保存。

< 培養用培地 >

Minimum Essential Medium(MEM;GIBCO 11095-080) : 50%、Hanks Balanced Salt Solution(HBSS;GIBCO 24020-117) : 25%、Glucose : 5g / L、Penicillin-Streptomycin Solution (GIBCO 15140-122) : 培地に対して1/100

以上を混合し濾過滅菌した後、Heat inactivated Horse Serum : 25%を加え4 で保存。

スライス作成方法

< 下準備 >

1 . ビーカー内に70%エタノールを入れ、ここに手術に必要な断頭用はさみ、曲型ピンセット、脳摘出用スパチュラー、血管除去用ピンセット、眼科用ピンセット、スカルペルナイフを浸け、クリーンベンチ内に用意する。

2 . 同じくクリーンベンチ内に滅菌プラスチックシャーレ(ガーゼ入り)とゴミ袋をセットし、滅菌プラスチックシャーレのフタ側に1の器具を取り出しておく。

3 . 滅菌プラスチックシャーレ(濾紙入り)、海馬冷却用滅菌

シャーレにKrebs-Ringer液をそれぞれ数ml、脳冷却用ステンレスシャーレに15ml程度加え、スライス分別用滅菌シャーレ(5)にはNeurobasal Medium (GIBCO 21103-049)をそれぞれ数ml加えたものを氷上に静置する。

4. 培養用シャーレ (Falcon 35mm or 6穴シャーレ) に培地を1mlずつ加え、Millicell-CMをピンセットで膜の下に空気が入らないように静かに置きインキュベーターで加温しておく。

5. 海馬スライス洗浄用滅菌シャーレ(3)に培地を数ml加えインキュベーターに入れ加温しておく。

< 海馬の摘出 >

1. ラット (P7 ~ P10) に70%エタノールを噴霧し、断頭後直ちに全脳を取り出し脳冷却用ステンレスシャーレに入れる。

2. 眼科用ピンセットで滅菌プラスチックシャーレ(濾紙入り)の濾紙上に脳を移し、脳摘出用スパチュラーとピンセットを用い、顕微鏡下で海馬を単離する。

3. ピンセットで血管等を取り除いた海馬をスパチュラーですくい取り、海馬冷却用滅菌シャーレに入れる。

4. チョッパーをアルコールを噴霧して滅菌した両刃カミソリ(フェザー)をセットし、シリコン台にNeurobasal Mediumに浸したメンブレンを乗せ、その上に海馬を並べ350umの厚さでスライスしていく。(= 120程度がよい)

5. できたスライスは改良滅菌パスツールを使って海馬の位置に目安を付けながら、5等分になるようNeurobasal Mediumを軽く吹き付け吸い取り、予め番号を付けたスライス分別用滅菌シャーレに移し入れる。

6. 海馬の両端から作成されたスライス(1番と5番のシャーレのスライス)は使用せずその他の部位からのスライスをピペッティングによって1枚ずつにする。

< 培養の開始 >

1. 海馬スライス洗浄用滅菌シャーレ(3)をインキュベーターから取り出し、スライスを改良滅菌パ

スツールで各々の番号のシャーレに移す。（この際、Neurobasal Mediumがなるべく入らないようにする）

2. 10分間インキュベーターに入れ、プレインキュベートする。

3. 培養用シャーレの膜上に改良滅菌パスツールを用い、スライスを切り出した部位が均等に配分されるよう、1つのシャーレに4～6枚程度の海馬スライスを乗せる。（洗浄用シャーレに入っていた培地はなるべく入らないようにする）

4. スライスが重ならない様に注意しながら、パスツールピペットで膜上の不要な培地を取り除き、培養の開始時刻を確認して日付等を記入しインキュベーター内に静置する。

5. 培地交換は3日に1度行い、古い培地を500ul取り出して新しい培地を500ul入れる要領で行う。（全量交換ではなく、過剰な培地量としないこと）

（その他）

ラットが動き回り断頭が困難な場合はハロセンで麻酔するとよい。

また、ゴミ袋の内側をアルコールで滅菌し、アルコールを噴霧したJKワイパーを数枚かさねたものを袋に入れ、その上で断頭し滅菌プラスチックシャーレ（濾紙入り）上で脳の摘出を行う方法もある。

チョッパーの使用はクリーンベンチ内で行うことが望ましいがそうしなくてもコンタミは発生しない。

スライスされた海馬をピペッティングによって1枚ずつにするのが困難な時はピンセットで海馬以外の不要な部分を摘んで1枚ずつにする。その際傷んだ部分はナイフで切り落とすこと。

氷上で行うものは十分冷却し、断頭から培養開始まで1時間程度を目安とする。