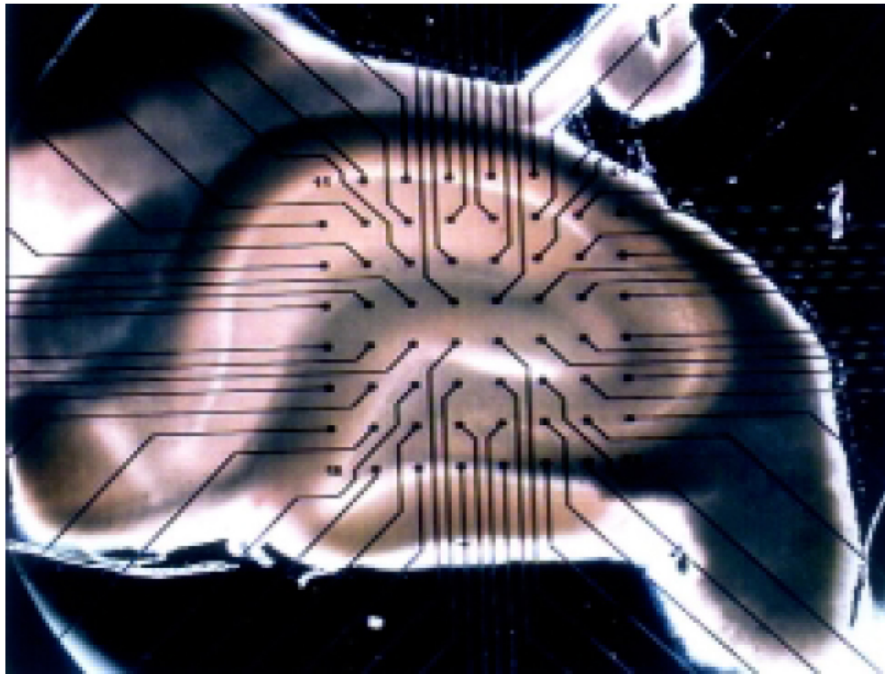


# MEA-cookbook

## 海馬スライス切片の急性マルチチャンネル レコーディングの手引き



バイオリサーチセンター株式会社 URL : <http://www.brck.co.jp> e-mail : [sales@brck.co.jp](mailto:sales@brck.co.jp)  
名古屋/〒461-0001 名古屋市東区泉二丁目 28-24 ヨコタビル 4F TEL(052)932-6421  
東京/〒101-0032 東京都千代田区岩本町二丁目 9-7 REC ビル TEL(03)3861-7021  
大阪/〒532-0011 大阪市淀川区西中島 6 丁目 8-8 花原第 8 ビル 203 TEL(06)6305-2130  
福岡/〒813-6591 福岡市東区多の津 1-14-1 FRC ビル 6F TEL(092)626-7211

## 始めに

シングル電極の記録から興奮性神経細胞のネットワーク特性を物理学的、病理学的に理解するには、かなり無理があります。

ここ 20 年ほどで、薄膜フィルム技術は飛躍的に進歩したことにより、in vitro での平面微小電極アレイが比較的容易に作成できるようになりました。

科学分野においては、この技術の本格的な広がりは主に PC 技術の改善に負っています。

マルチチャンネルレベルに於いて興奮性神経組織の性質を研究するためには、新しい装置やソフトウェアの拡充とともに、コンピューターの性能、メモリー保存の増設、ハードディスクの容量の拡張が必修条件となります。

この資料は MEA-60 データ収録システムと MEA-チップをそれぞれ使って、海馬スライス切片からマルチチャンネルデータを急性的に記録したい生物学者のためのものです。

ハードウェアとソフトウェアは、Multi Channel System MCS GmbH から提供されています。( [www.multichannelsystems.com](http://www.multichannelsystems.com) )

この資料はユーザーが直面する最も一般的な問題、例えば切片の準備、MEA のコーティング、切片のマウント、データの出力と保存、実験の手順、に基づいて編集されています。

ここにはシングル及びダブルパルス刺激 (PPF: 一対のパルス促進) 及び、シータバーストパラダイムによる海馬切片への長期増強誘導を含む典型的な記録が示してあります。

### 1. スライス切片の準備

頸部を脱臼させた若いオスのラット (PND21-49) の脳を素早く取り出し、酸素 (95%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>) を補給している冷却した "ショ糖" リンゲル溶液 (mM: NaCl 125; KCl 3.5; MgSO<sub>4</sub> 1.3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2.4; NaHCO<sub>3</sub> 26; ブドウ糖 10) に入れます。

始めの準備とスライス切片作成の間は、活動電位の発生を防ぐため、リンゲル溶液の全ての NaCl を等モルのショ糖に置き換えた "ショ糖" リンゲル溶液を使います。これはグルタミン酸塩の過剰な放出による電位変動による細胞のダメージを、最小限に押さえる為です。

400 μm の厚さにスライスした海馬切片を、室温で標準リンゲル液の入っているチャンバーに移しかえます。切片をネットの上に置き、2.5 ~ 6 時間連続的に酸素補給します。

MEA チップ上に切片を着床させるためには最低 2 時間の培養が必要です。

### 2. MEA のコーティング

細胞外の活動を説明、分析したりするためには、シグナルとノイズ (S/N) の比率は重要です。適切な S/N 比を得るには、標本組織と平面電極間が標本組織を穿刺しない程度に良好なシール抵抗を確保する必要があります。活動細胞と平面電極間の電荷転移は容量結合によって生じます。電荷容量は細胞と電極間の距離に反比例しますので、細胞の着床がしっかりしていることが細胞間で最適な電極結合を得るのに大変重要な条件となります。

MEA コーティングには次の二つの方法が、これまでの成功例として採用されています。

#### a) ニトロ・セルロース・コーティング

10ml のメタノールに 1・ニトロフィルターを溶かした保存溶液を準備します。MEA チップを使う前に、電極アレイにこの溶液を 3 ~ 5 μl たらし、乾燥させます (メタノールが気化するため、数秒でよい)。ニトロセルロース切片は MEA の表面に標本組織が着床する際の接着剤のような役目を担います (この方法はドイツ、Freiburg 大学の U.Egert 博士によって考案されたものです)。

## b) PEI (Polyethylenimine) コーティング

PEI は遊離細胞培養に採用されており、ポリリジンコートプレートに比べて培養での細胞の成熟を高めることが証明されています( 参照:Lelong, IH et al (1992) J.Neurosci Res. 32:562-568 )。蒸留水に溶かした 0.01% PEI の保存溶液を準備します。MEA をこの溶液に 2 時間つけた後、十分に蒸留水ですすぎ乾燥します。

急性試験の場合、基本的にコーティングは必要ありません。特に剣山タイプの 3D-MEA の場合、上からナイロンメッシュ製などのスライスアンカーを載せれば十分です。

## 3. スライス切片のマウント

全ての操作は顕微鏡を使った光学的実験に基づいて行われます。最低 2 時間インキュベーションした後、あらかじめコートした MEA にリングル溶液を数滴垂らして乾燥させた後、この MEA の上に海馬の切片をのせます。2 つのピペットチップを使って、電極部を覆うように切片をのせます。一方のピペットを使って溶液を吸引しながら、もう一方のピペットは切片の近くに充てて、切片標本の位置がズレないように調整します。数枚のフィルター小片を使って、残っている溶液を完全に吸引します。数秒間フィルター小片を表面に置いて切片を乾燥させます。その後すぐに、酸素補給しているリングル溶液を切片にそっとかけ、切片標本が付いている MEA チップを MEA-setup に移し、パフュージョンを開始します。

下の図は、MEA チップにのせた急性海馬スライス切片の典型的な例です。

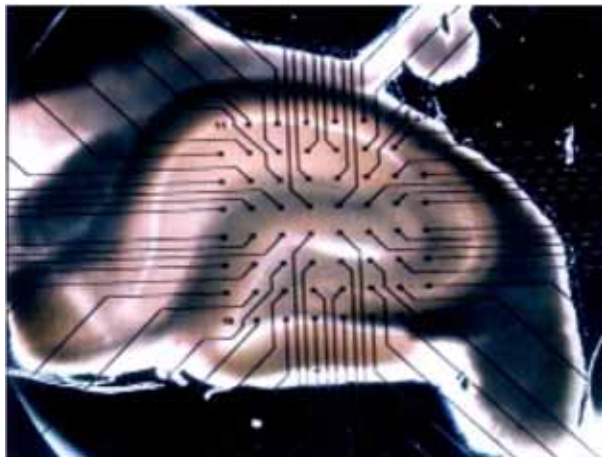


図 1: スライスした海馬切片を MEA チップにのせた図です。CA1、CA3、GD の顆粒細胞層がはっきり見えます。

## 4. ハードウェア

ここでのハードウェアの説明は、実験中のユーザーが抱く実際の問題や疑問、特に平面電極を組み込んだ MEA チップを使って刺激アンプをセットアップする方法に限定しました。

MEA-1060 や STG-1008 の技術的な仕様書や説明は、MCS ウェブサイトに載っています。

MEA-1060 を使って MEA チップの電極を刺激する場合、特定の電極を刺激するにはアンプをグランド側に切り替える必要があります。この為に各電極の後部にそれに対応する DIP スイッチを設け、33K $\Omega$  の抵抗を介してグランドに対して MEA アンプ内部でシャントできる様にしています。従って刺激する電極チャンネル以外は、全ての MEA アンプ内のチャンネルは刺激によるアーチファクトを受けることはありません。

図 4 はアース線をセットした MEA ハウジングの詳細図で、DIP スイッチ及び各電極を刺激する為の STG スティムレーターから各 MEA 電極までのケーブルをつなぐピンホールが示されています。

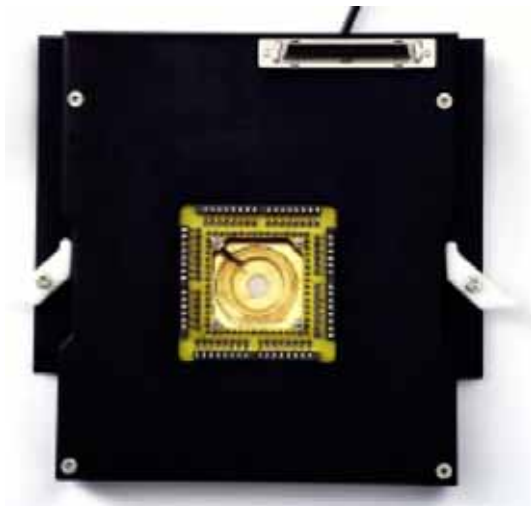


図 2 : MEA チップをセットした MEA-1060



図 3 : 外部の SIU を必要とせず、電圧と電流出力ができる MCS-STG1008 8ch スティムレーター

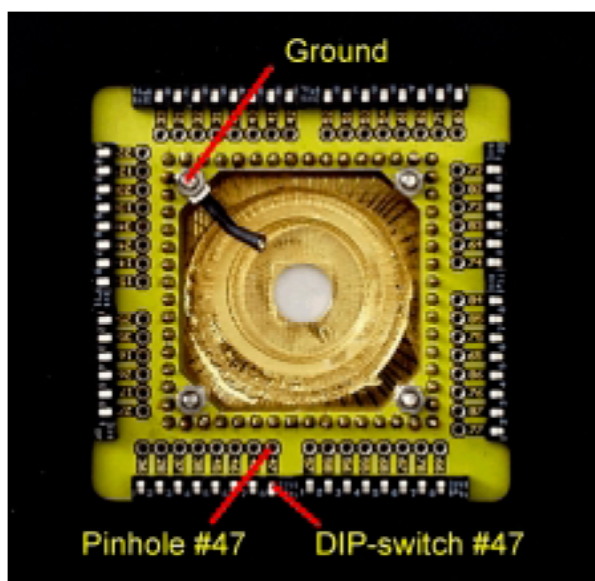


図 4 : MEAハウジングの拡大図。この実験では、MEA 電極 47 番へ単極刺激を行うために STG10008 スティムレーターからのリード線をピンホール 47 番につなぎ、グランドワイヤーにグランドリード線をつなぎます。さらに対応する DIP スイッチ 47 番を back の位置にします。これで MEA 電極 47 番のデータは記録できませんが、この電極チャンネルへの刺激はできます。すべての MEA 電極にはそれぞれのピンホールがあるので、複数の電極を同時に刺激することも可能です。

## 5.実験の準備

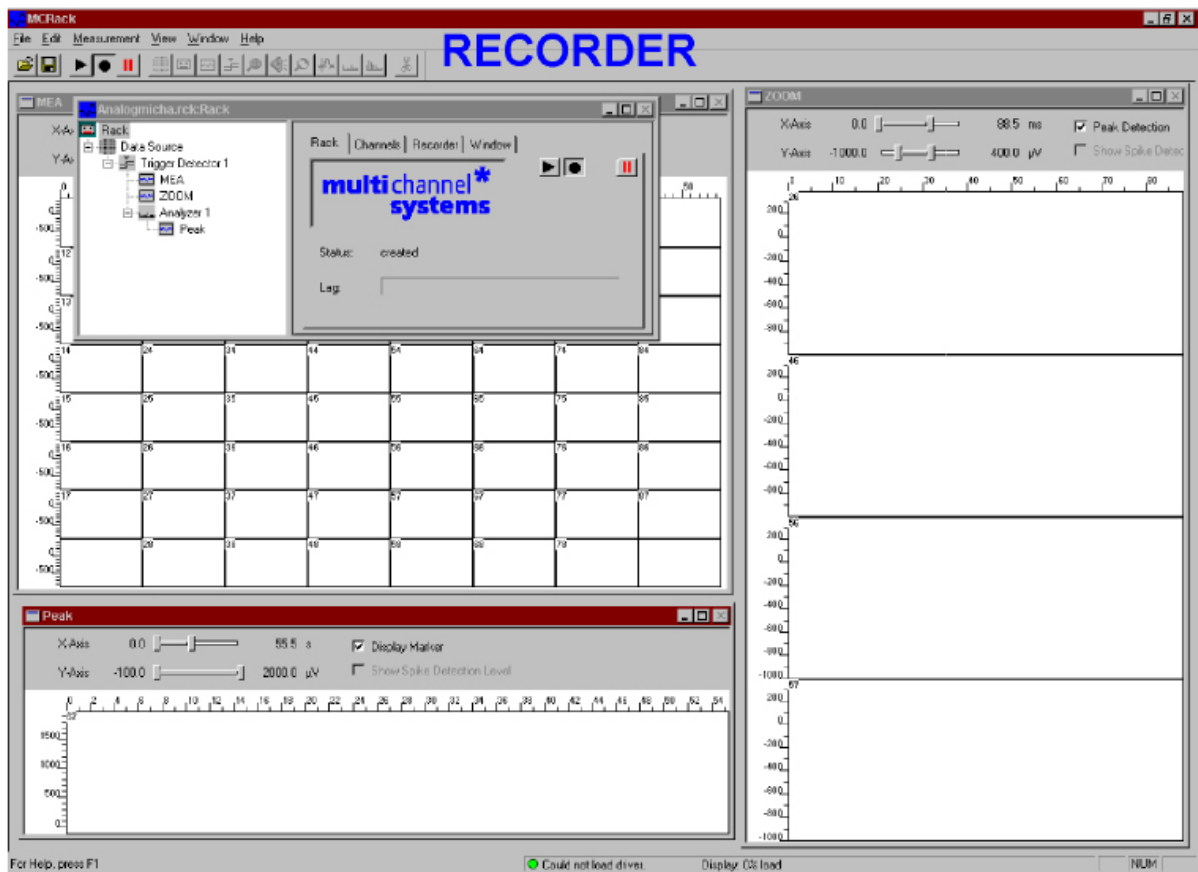
経験深い電気生理学者の方々にも是非、MCRack データ収録及び解析ソフトウェアの開発コンセプトをご理解頂きたいと思います。システムの特性は、マルチチャンネルデータをリアルタイムで記録、表示するためにいくつかの多用途な特性やモードがソフトウェア上で実行できます。ソフトウェア（ヘルプを含む）は Multi Channel System のウェブサイトから無償でダウンロードできます。通常、実験者は自発的活動、誘発的活動、またそれぞれの長時間サンプリング、短時間サンプリングに興味があります。MCRack のコンセプトはバーチャルラックそのものです（電気生理学者はアンプ、オシロスコープ、ポンプ、ポンプコントロールユニットなどの器械を収納できる 19 インチの標準的なラックをよく使用します。）標準的なラックと同じように、ユーザーはソフトウェアの中から異なったツールを選ぶことができ、後で使用するために保存しておいた個々のラックに差し込むことができます。もし同じ装置を使っているユーザが二人いて、それぞれの実験に異なった器具を必要とする場合、一方従来のメカニク的なラック構成ではモジュールを交換し一つの装置から別の装置に移動して装置全体を組み替える必要があります。MCRack を使えば実際の器具を移動する代わりに、ハードドライブに 2 つの異なったラックを保存しておくだけで済みます。これは使い易く便利な点で MCRack が他に例を見ない特徴です。

重要なチェック箇所が幾つかありますので、実際の記録を始める前に確認しておく必要があります。

1) 記録するデータに応じて必要なサンプリング速度を選びます。つまり、1ch 当たり 25kHz の高速度で遅いフィールド電位の変動 をサンプリングする必要はありません。一方、ユニット信号の活動を記録したいならば、適切なフィルター設定が重要になります（例えば、300 ~ 3kHz cut-off band）。1ch 当たり 25kHz のサンプリング速度で、同時に 60ch 記録するときにはハードディスクを 3MB/秒、つまり 10.8GB/時で使用できることを確認しておいて下さい。 そうすれば外部トリガーを使って、プレトリガー又は、ポストトリガーで切り出した時間帯にディテックとしたスパイクのトリガーデータがいつでも記録できます。

この手順では、発生時間をヘッダーとするデータを設定した回数だけ保存します。全てのチャンネルを必要ない場合、つまりシングルセルの記録ではそれに関与する幾つかの電極からの、実際に信号が採れるチャンネルのみを記録するだけで十分です。これにより記録するディスク容量が節約できます。

2) 実験の前にラックを組み立てます（ソフト上で）。実験者は実験で何を記録し視覚化し解析したいか、そしてハードディスク上でその特化したラックを保存します。図 1 が示すスライス切片からデータを記録する為の例として、以下に 2 種類のラックの構成を説明します（データを収録し保存するための Recorder-Rack、オフラインデータを視覚化し解析するための Replayer-Rack）。ラック上の Display 名はユーザーの必要に応じて名前を付け直すことができます（ファイル名として）。



レコーダラック Recorder-Rack :

ラック Rack :

- 実際の記録をするためのファイル名を設定する。
- 記録するデータの形式を設定する。つまり、アナログ又はデジタル生データ、電極の生データ（記録したい電極数が選択できる）、トリガー（常に記録されるべきデータ）、パラメータ（高さ、最小、最大、振幅）など。

Data Source :

- 希望サンプリング周波数と PCI-MC カードの A/D ボード（信号の大きさによる）の入力電圧幅を選択する。
- オフセット電位を補正し、控除する。

Trigger Detector :

- 適切なトリガーチャンネル、トリガーレベル、スロープ、終了時間を設定する。

MEA-display :

- 8×8 回路に配列された全てのチャンネルからの生データを表示する。時間軸スケール、振幅軸範囲、データの形式、トリガーデータの場合の window の幅など適切なセッティングを選びます。

Zoom-display :

- 時間軸と振幅軸を拡大表示させて、4 チャンネルの生データを表示します。

Analyzer 1 :

- 解析するパラメータ ( $t_{min,max}$ 、 $V_{min,max}$ 、高さ、振幅) を選択しそのレンジを設定します。ここでは 67 番目のチャンネルの高さ (Height) が設定されています。

Peak :

- Analyzer（解析）の結果をオンラインで表示。ここでは全実験を通じ 67 番目のチャンネルの高さを表示します。

ユーザーがどのように適切なラックをセットアップすればよいのか。以下に自発活動又は、トリガーされた活動（スパイクディテクション、トリガーディテクション）の記録を仮定し詳細に説明します。バーチャルツールはすべて太字で記載します。

#### a) 一般的なセッティング

始めに Data Source にプラグインし、適切な A/D レンジをソフトウェア上で設定します。実際の測定したい信号の大きさによります（シングルユニットでは 100  $\mu$ V 幅であるのに対して、フィールド電位では 1mV をしばしば越えます。最大  $\pm 4$ V まで選択できます）。次に、McRack でオシロスコープと同じ役割を果たす Display にプラグインします。Display は最も多用途なツールです。生データ、Analyzer で解析した（最小、最大、高さ、振幅等）パラメータなど、どのような形式のデータでも Display で表示できます。

・バーチャルラックはトップダウン構成で設計されています。当然、データが存在しなければデータの解析はできません。つまり明確な Data Source を持たずに、Analyzer や Display にプラグインしても意味がありません。あらかじめ Analyzer にプラグインしておかなければ、信号の最小・最大の値を表示させる Display は設定できません。どのツールにも、表示するチャンネル数、解析するチャンネル数といった共通する選択項目があります。従って、PC リソースを調節すると何を測定したいのかが確認できます。全チャンネルの最大値を解析する必要があるのでしょうか。海馬の切片で特別な回路を刺激するとき、電極の半分しか誘発反応を示しません。従って、実際の反応で平坦なラインしか示さないチャンネルは無視して、反応を示すチャンネルだけ Analyzer ツールで選びます。そうすることによって、PC リソースへの対応が楽になります。記録している間は、実際の負荷とシステムの実行状態を示す画面下のステータスラインに注意して下さい。

#### b) 自発的活動

細胞培養、又は急性的に調整した標本から、自発活動（シングルユニットやフィールド電位）が起こることを仮定します。McRack の Spike Detector ツールを使います。このバーチャルツールにはトリガーレベルの設定が必要です（各電極のノイズレベルの振幅頻度を計算し、Percentage ウィンドウでセッティングに従ってトリガーレベルを設定します）。もちろん自分で特定の電極や全電極のトリガーレベルの調整もできます。もし検知したスパイクのみを記録するのならば、適切な <pre-trigger>、<dead-time>、<post-event time period>を設定します。この設定は信号発生頻度にもよります。仮に 10Hz レンジでシングルユニットの発生を期待し、500ms の <trigger dead time>を選択すると、いくつかのスパイクは見逃してしまいます（スパイクが 100ms 間隔なら 4 コ ）。

・生データを注意深く観察し、2 つのディスプレイモード（時間軸が秒単位の遅い表示とミリ秒単位の速い表示）の内、適した方にプラグインします。これは Spike Detector の適切なセッティングを得る良いヒントになります。



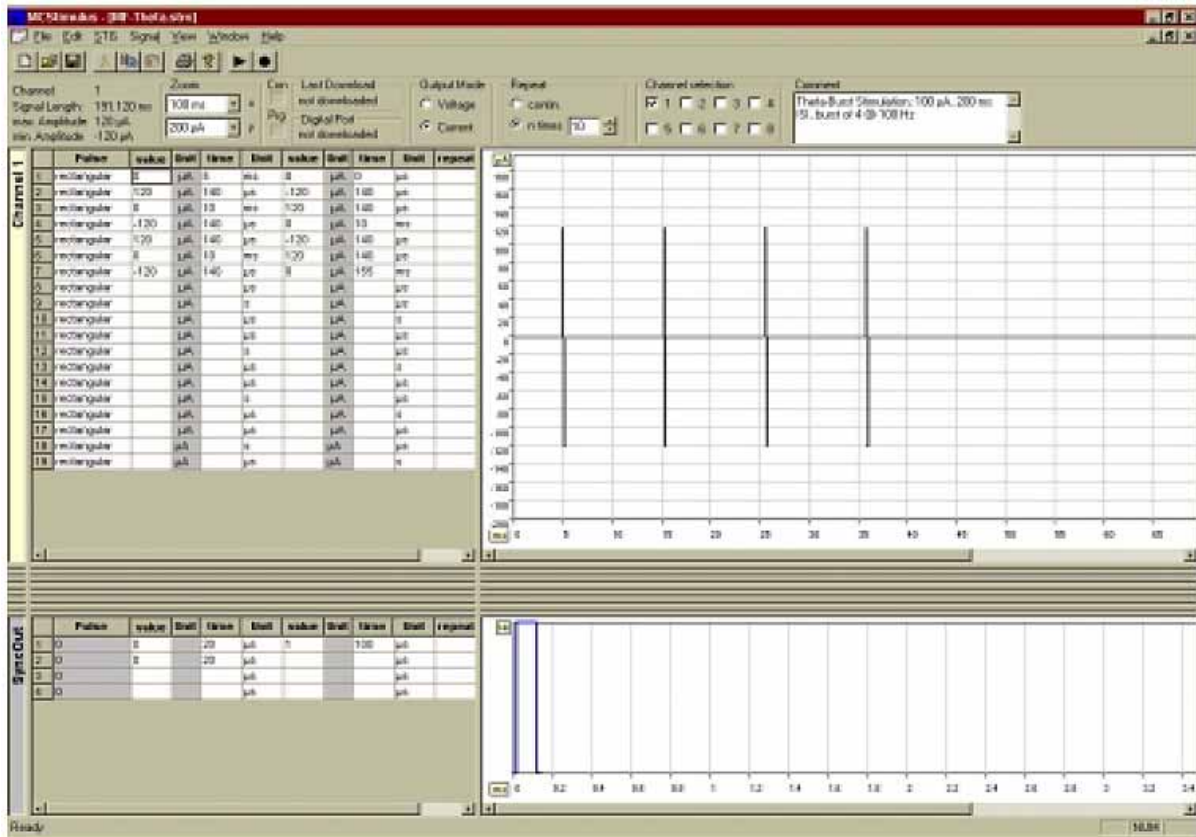


図 6 : チャンネル 1 の theata-burst の一例を示しています。4 つのシングルパルスのバースト（各パルス幅 140  $\mu$ s、 $\pm$ 100  $\mu$ A バイポーラカレントパルス。パルスのタイミングは 100Hz）が 200ms 間隔で出力されます。バーストの反復回数は 10 です。

一旦、MEA に付着している海馬切片を MCS-1060 にマウントしたら、組織切片を死滅させない為に直ぐにパフュージョンを開始します。理想的には、デジタルカメラを顕微鏡に備え付けておき、MEA 上のスライス切片の位置がビデオ画像で撮れるようにすると便利です。MCRack に Data Source をプラグインして、完全なアレイを映すため 8x8 の Display を使います。<single pulses paradigm> を使い、MEA 電極に通電して刺激します。8x8 の Display に誘発活動を示すチャンネルが現れますので、ディスプレイの設定条件が判ります。次に 2 番目の Display を使って、より速い時間ベースで振幅感度を上げて表示します。例えば、一番良いチャンネルと全ての欲しいチャンネルとを選び Analyzer ツールにプラグインすると、すぐに最小/最大値が解析されます。また、もう一つの Display には 1 番良いチャンネルだけをプラグインしてその最小/最大値のみを表示するようにも設定できます。従って全実験にわたり、少なくとも 1 チャンネルのオンライン振幅解析が実行できます。この機能は別々の薬品を投与したい時に、コントロールに用いる反応が安定しているかどうかを知りたい場合には必ず必要とされます。

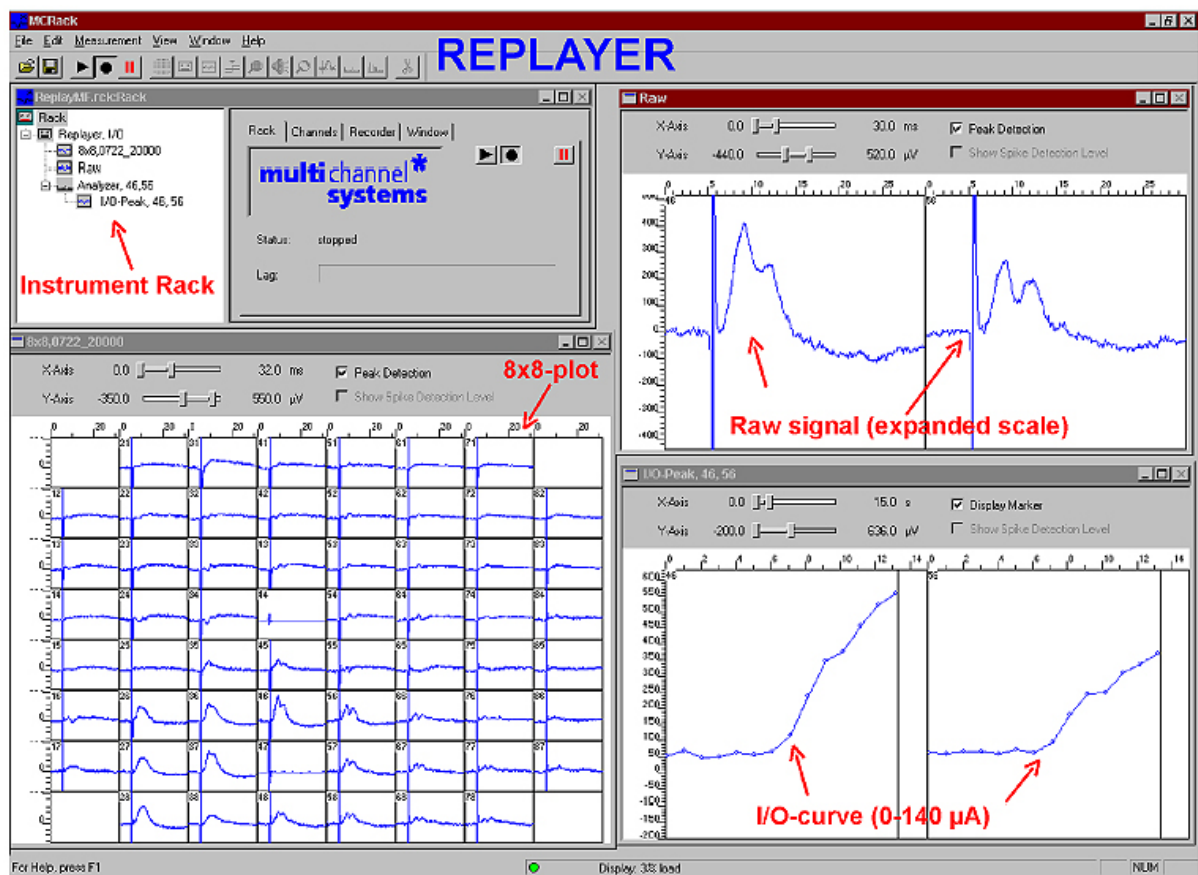
設定条件を整えたら、データを記録します。Rack から Recorder を選択し、ディレクトリーとファイル名を選びます。トリガーデータの場合はウインドウの大きさに適したセッティングを選択して下さい。

さもないと、生データを記録すると直ぐにハードドライブが一杯になってしまいます。

Replayer :

データを記録した後に、データを視覚化したり再生するためには Replayer を使います。理想的には2つの Rack、一つは記録用に、もう一つはデータの再生用にセッティングします。Replayer ウィンドウから再生したり解析したいファイルを選び、データ処理に必要なツールとディスプレイを選びます。いつでも Recorder にプラブインすればデータ集の重複を避けることができます。つまり、あるデータ集をパラメータを変えて別のファイルに保存できるわけです。従って、必要なデータ集のロード時間や解析時間を減らすことができます。Replayer の典型的な例を以下に示します。

I/O-curve は記録されたデータ集から抜粋され、全体の配列やチャンネルの一部、振幅分解能、解析結果(Peak-to-Peak など)を表示します。



Rack :

- データを<resample>化しディスクに抽出する特徴を記録します。このディスクはオリジナルのレコーディングから抜粋されたものではありません(この機能を使えば、大きなデータファイルからパラメータを変えて別のファイルに保存できます)。

Replayer. I/O :

- ロードするファイルとストリーム番号、プレトリガーのディレイ、window 幅、トリガーソース、記録に使った MCRack のバージョンを表示します。
- 再生速度を選択します。

8 x 8 .0722\_2000 :

- 指定したファイルの表示プロパティを規定します。ここでは8x8グリッドにアレイの全チャンネルを表示します。(チャンネル44は刺激電極用、チャンネル47は不関電極でグランド用です)。穿孔経路(電極44番)を刺激した後のスイープ波形(電極44番)やフィールド電位反応、歯状核領域のスパイク群を表示しています。

Raw :

- 46番と56番のチャンネルの生データを拡大表示します(Recorderパネルの<Zoom>と同じ)。穿孔経路(電極44番)をモノポーラ刺激した後のスイープ波形と電極46番と56番の反応を表示しています。

Analyzer 46.56 :

- 電極46番と56番の反応のpeak-to-peak振幅(高さ)を解析します。  
解析範囲は8msに(トリガーリレー5ms、刺激アーチファクトの通過に3ms)設定し、全信号をカバーするためにウインドウの幅は25ms(時間軸を拡大してデータを確認します)にセットしてあります。

I/O-Peak 46.56 :

- 刺激後に増加した振幅の解析結果を表示します(10 $\mu$ A刻みの0-140 $\mu$ Aで、合計14のスイープ波形を記録します)。

## 6. 結果

シナプスの可塑性は海馬で最もよく研究されている現象で、これはシナプス入力の変化が生理学的、病理学的に同等の条件を満たすためです。ここにMEA60システムへのペアパルス刺激(PPF)及び、長期増強誘発(LTP)の記録を示しておきます。

a) ペアパルス疎通 Paired-Pulse Facilitation(PPF):

PPF誘発のプロトコールは50ms間隔のダブルパルス刺激で行います。

b) 長期増強 Long-Term Potentiation(LTP):

長期増強は200ms間隔(5Hzのリズム)の10バースト波から成るバースト刺激(TBS)を使って誘発されます。各バーストは100Hzの4つのパルスから成っています。



図-7: 図はMEAアレー全体へのPPFを示します。刺激した電極は61番でPPFはパルス幅  $140\ \mu\text{s}$ 、 $\pm 100\ \mu\text{A}$  のダブルパルス(図-6 参照)で誘発されます。電極 47 番と 48 番はノイズの干渉を回避するためにグラウンドに対しシャントされます。

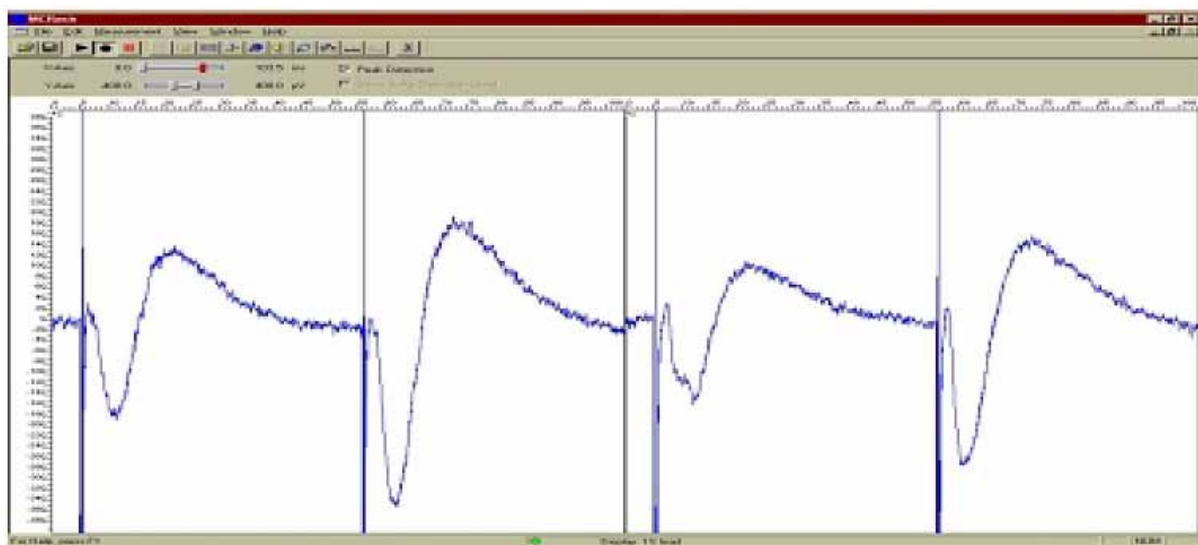


図-8: 図は二つの指定するMEA電極のPPFを示しています。この場合は42番と52番です。ノイズレベルは約  $10\ \mu\text{V}$  と極めて小さい点に注目して下さい。これはMEA1060アンプとMEAアレーとのコンフィギュレーションがいかに優れているかを示しています。

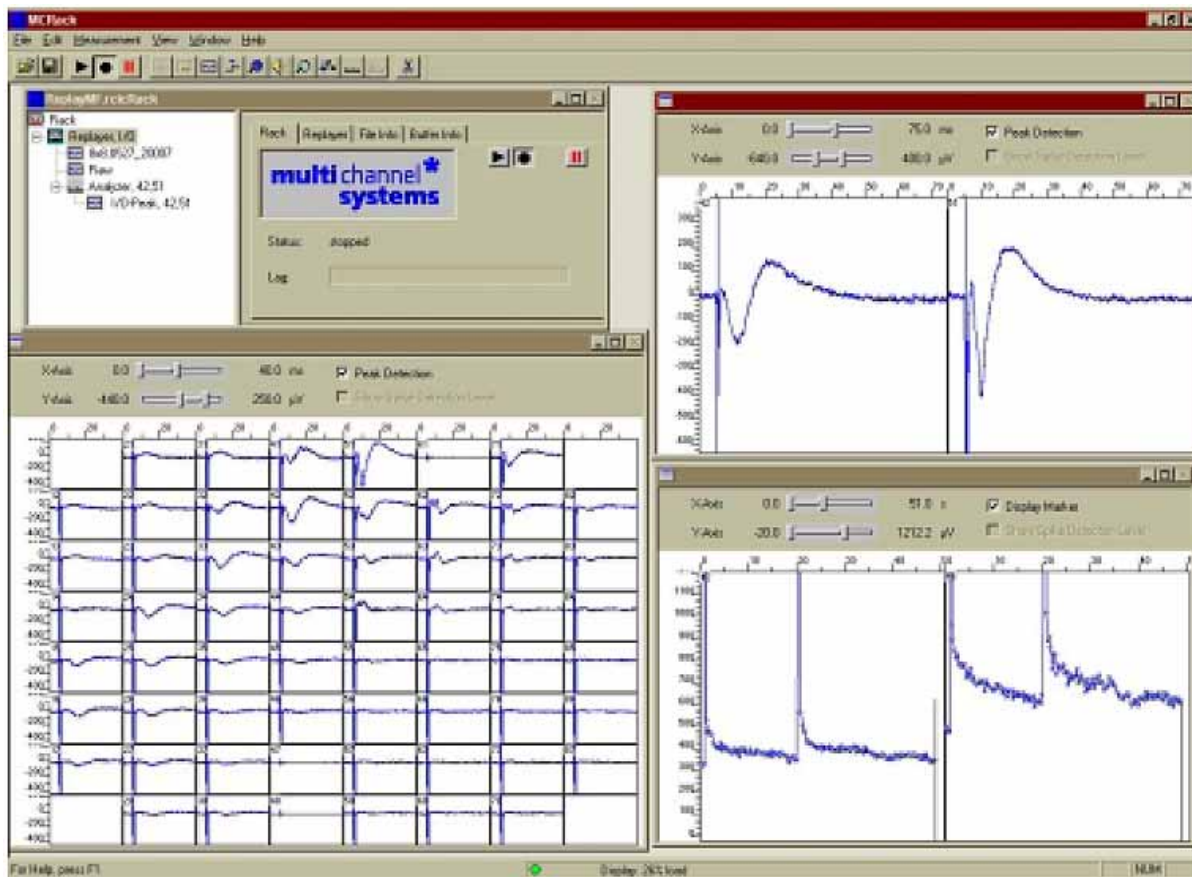


図-9: 図は二つの MEA 電極チャンネルからの LTP 誘発とモニターを示したもので、ここでは 42 番と 51 番のデータです。3 分おいて 2 回の TBS( パースト刺激)で LTP を誘発したものです。

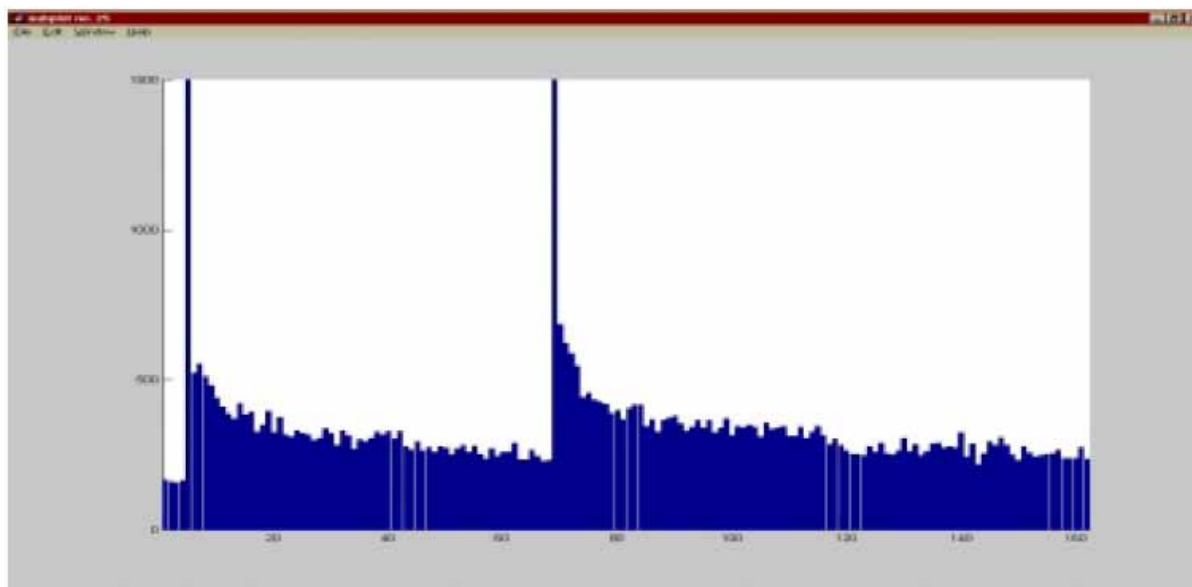


図-10: 図は MEA システムを使って 42 番の電極の LTP を記録した時間経緯を示しています。各バーは一つの刺激を表し、振幅は MEA ツールを使って抽出したものです。これは U.Egert, et al.(Univ. of Freiburg, Germany)によって開発された MATLAB ベースのスクリプトです。

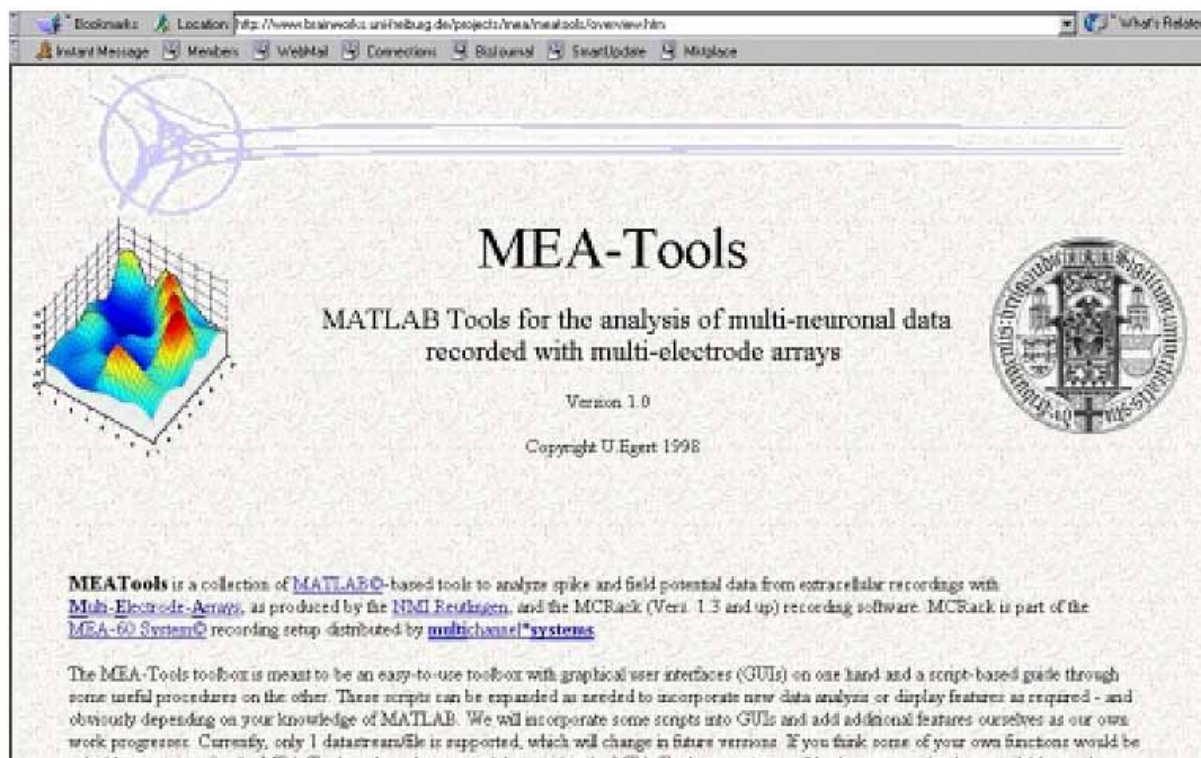


図-11: MEA ツールは下記の web より無料でダウンロードできます。

<http://www.brainworks.uni-freiburg.de/projects/nea/meatools/>

MEA-Tools 自体はフリーソフトですが、使用するには MatLab が必要です。