

スライス・パッチクランプ法

高橋智幸・真鍋俊也

(東京大学医学部・脳研究施設・脳生理)

1. はじめに

シナプス伝達機構の研究は従来、末梢神経系、無脊椎動物、培養細胞を主な対象として発展したため、中枢シナプスに特有の伝達機構や可塑性機構の研究は充分に行われなかった。数年前にスライスパッチ法が完成し、中枢シナプスの研究に伴う技術的制約が打ち破られ、新たな研究の可能性が開かれた。この方法は、細胞を顕微鏡下に直視しながらパッチクランプ記録を行う薄切スライス法と、細胞を直視せずにパッチクランプ記録を行うブラインドパッチ法とに大別される。この総説では、それぞれの方法について概説する。

2. 薄切スライス・パッチクランプ記録法

脳組織の薄切スライスでは細胞体が無染色で観察されることが山本により明らかにされた¹³⁾。高橋は脊髄の薄切スライスを作製して、顕微鏡直視下に運動ニューロンから細胞内記録を行った¹¹⁾(図1)。

その後、約10年を経て、この標本にパッチクランプ法を適用する試みが成功した⁴⁾。この方法は、細胞表面を覆う組織を除去して、パッチ電極、細胞膜間にギガオームシールを形成せしめるもので、クリーニング後は、パッチクランプのすべてのモードが適用出来る(図2)。

(1) 薄切スライス法に必要な実験装置

(i) 正立鏡筒上下型ノマルスキー微分干涉顕微鏡(例, Karl Zeiss, Axioskop)

倒立型では細胞と電極先端を同時に観察することが難しい。ステージ上下型顕微鏡の場合はマニピュレーターをすべてステージに取り付け

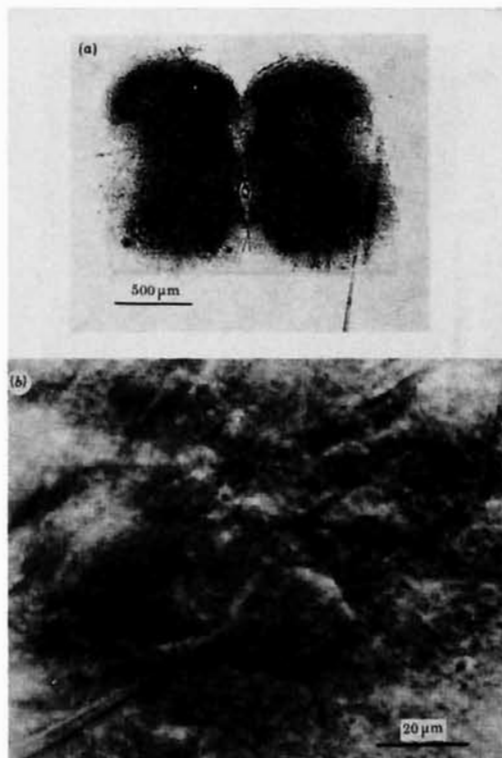


図1. 脊髄薄切スライス¹¹⁾。(a)生後1日齢ラット腰髄130 μ mスライス。右下前角に微小電極。(b)運動ニューロン。左下から微小電極が刺入されている。ノマルスキー顕微鏡, $\times 400$ 。

て遠隔操作することが必要である。したがって正立鏡筒上下型顕微鏡が最も使用しやすい。水浸対物レンズ($\times 40$)を用いる。水浸対物レンズと本体は必ず電氣的に隔絶することが必要で、絶縁性素材(例, エポナイト)を両者間に取り付けて使用する。

(ii) マニピュレーター

ステージ取り付け型(例, 成茂)が最も振動を伝え難い。鏡筒上下型の場合はマニピュレーターを必ずしもステージに取り付ける必要はな

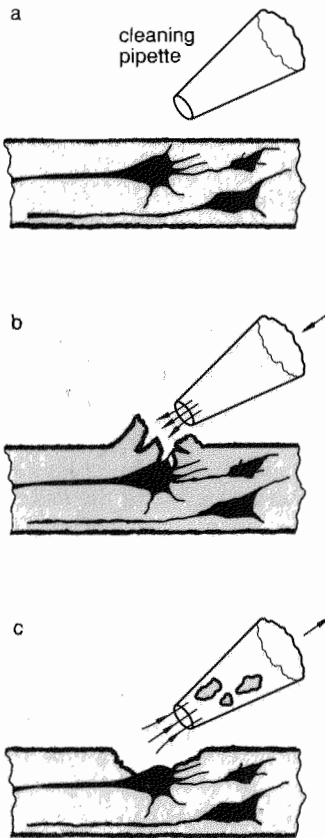


図2. スライスニューロンのクリーニング法⁴⁾

い。ドリフトの少ないピエゾ型、モーター駆動型（例、成茂、Eppendorf）が目的に合っているが、ピエゾ型は可動距離が短いため粗動マニピュレーターに取り付ける必要がある。作動距離1/10短縮型水圧マニピュレーター（成茂）も使用可能である。シナプス応答記録の場合は刺激電極、記録電極の順に支持マニピュレーターの精密度が要求されるであろう。クリーニングピペット用には、遠隔操作、作動距離の点で水圧、油圧三次元マニピュレーターが便利である。

(iii) 灌流液チェンバー

微分干渉効果を得るためには光路の部分ガラスにする必要がある。カバーガラスは対物レンズをぶつけると簡単に壊れる上、液温変化に伴う膨張収縮による動きが生じやすいので、薄めのスライドガラスが適当である。不関電極は

CI濃度、液温を変化させない場合は銀-塩化銀電極を直接使用出来る。それ以外の場合は3MKCl寒天ブリッジを用いる。流入は、自然落下、流出はポンプ吸引が簡単であるが、波動が少なければ灌流ポンプも使用可能である。流出液を介するノイズの進入は、アウトレットを点滴用チューブで断続させて防ぐことが出来る。また、灌流液があふれる場合を想定して、チェンバーに外溝を作るなどしてコンデンサーを保護する必要がある。

(iv) スライサー（例、堂阪 DTK1000）

ベアリングが摩耗して縦揺れが生じると、細胞が破損するので振動雑音には常に注意が必要である。チョッパーや回転方式のスライサーは薄切スライス法には不適当であった。

(v) スライス固定用グリッド（図3）

直径0.7~0.8mmのプラチナ線をコの字型に曲げ、万力でつぶして平坦な枠を作る。ナイロンストッキングを伝線させて単一線維に分け、実体顕微鏡下、ピンセットで幅約200~400 μ mに並べ、十分に伸展後、瞬間接着剤で枠に接着させる。このグリッドをスライスの上に載せると自重でスライスは安定し、灌流液によって動くことはない。

(vi) その他、パッチクランプ記録に必要な電気生理学実験装置。

(2) 手順の概略

(i) 組織の摘出—スライサーへの固定

動物断頭後、組織を手早く摘出し、95%-5%酸素-炭酸ガス飽和氷冷-リンゲル液の中に入れる。冷凍してシャーベット状になったリンゲル液を加えて低温を保つ。約10分間、組織が完全に冷却するのを待って次の操作へ移る。軟膜が強固に付着している脊髄組織では、スライス作製前に軟膜をピンセットで完全に除去することが必要である。摘出した組織は瞬間接着剤でスライサーの皿に固定する。大脳、小脳など比較的大きな組織の場合は、そのまま、あるいは寒天ブロックと共に皿に固定し、後方より組織を支える。脊髄など比較的小さく切れにくい組

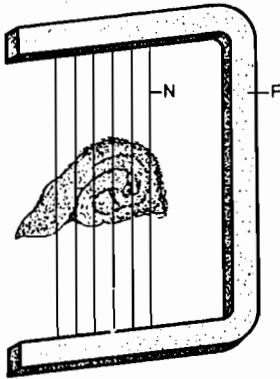


図 3

織は、寒天(2.0~2.5%)を-リングル液中で一旦沸騰させてから40℃以下に冷却した中に包埋し、速やかに氷冷-リングルを与えて寒天を固化させた後、脊髓包埋寒天ブロックを切り取ってスライサーの皿に固定する¹¹⁾。

(ii) スライスの作製

実験の成否は、スライスの状態に依存する。良いスライスを作るためには、酸素を十分に供給し、かつ酸素需要を下げるために組織を低温に保持する必要がある。幼若動物は酸素需要性が低いため、比較的良いスライスが得られ易い。スライサーの刃による組織の圧迫を避けるため7.0~7.5ヘルツで水平振動する刃を進めて厚さ120~200 μm スライスを作製する。刃の進行速度を実体顕微鏡($\times 20\sim 40$)でモニターしながら、肝心の箇所では、出来る限りゆっくり進めて、圧迫による障害を最小とする。それ以外の箇所では速やかに進めてスライス作製操作の所要時間が短くなるようにする。刃があたかも水中をすべるように組織中を進んで行く時は良いスライスが得られる。組織が少しでも動いたり、波動が激しい場合は良いスライスが得られない。スライサーの刃は、両刃カミソリを切って用いる(例, Wilkinson)が、刃に油や接着剤が残存しているとスライスを傷めるので、予めアルコール、アセトンで完全に除去することが必要である。良いスライスでは、最表層に膨らみのある健康な細胞が高密度に存在している。悪いスライスでは、破壊された細胞の残骸が多く

認められる。

(iii) クリーニング

リングル液を先端約10 μm のピペットから局所投与して結合織を除去する(図2)。ピペットの最適サイズは、細胞体の直径が一つの目安である。グリアや破壊された細胞の断片はこの操作によって飛ばされるが、健康な細胞は、樹状突起により支えられているために、簡単に吹き飛ばされることはない。リングルの陽圧を止めると、結合織は、もとに戻ってくるが、細胞膜からは一旦離れているため、周辺から軽く吸引してやることにより簡単に除去される。この際、吸引が強すぎたり、ピペットの位置が細胞に近付きすぎると、しばしば樹状突起がピペット内に引き込まれて細胞が障害される。次節ブラインドパッチ法で解説するように、パッチピペット先端に与えた陽圧だけで結合織が除去出来ることもある。ギガシールの成否は、細胞の状態に強く依存する。良い状態の細胞は、輝きがあり、表面が平滑に見える。ピペットに陽圧を加えて細胞表面に軽く押し当てると膜にえくぼが生じるようであればギガオームシールは、ほぼ確実である。あばた状の顆粒が認められる細胞や、萎縮、膨張した細胞は良く見分けて避ける必要がある。細胞直視によって状態の悪い細胞を除外出来ることは薄切スライス法の利点の一つである。

3. ブラインド・パッチクランプ記録法

前節では薄切スライス標本を用いたスライスパッチ法について解説したが、本節では従来より細胞内記録法や細胞外電位記録法が用いられているより厚い(500ミクロン程度)スライスにも適用できるブラインド・パッチクランプ記録法(以下ブラインド法と略す)の概説を行う。その名が示すとおり、目的とする細胞が見えない状態でホールセルおよびシングルチャネル記録を行えるのがブラインド法の最大の特徴である。この方法は、2つのグループ²⁾³⁾により独立に開発され、その後多くの研究室で中枢神経系の研究に盛んに応用されている¹⁾⁷⁾⁸⁾。

スライス標本においてパッチクランプ法を適用する利点は、薄切標本の場合と共通であるが、ブラインド法特有の利点について以下に述べる。

- 1) より厚い標本を使用できるため、標本作成の際の障害がより少なくシナプス構築がより保たれた細胞での記録が可能となる。
- 2) スライス表面に近い細胞だけでなく表面から100ミクロン程度のスライスのかかなり深い部分に位置する細胞からも記録できる。
- 3) 記録する細胞の周囲の結合組織をクリーニングする必要がないため、クリーニングの際に起こりうる樹状突起切断などの細胞への障害を避けることができる。
- 4) ギガオームシールを得る際に目的の細胞を直視する必要がないため高性能の顕微鏡は必要なく、通常の実体顕微鏡があれば十分であり、そのためより少ない費用で実験が可能となる。
- 5) より広い視野と操作領域が確保できるため、実験操作が比較的容易である。

ブラインド法の欠点はホールセル記録法で一般的に見られる細胞内成分の“washout”現象などのほかに、ブラインド法に特有の欠点として、細胞を直視下で同定できないことから、複数の種類の細胞が混在する組織では特定の種類の細胞からの記録が確実には行えないことがある。また、パッチ電極が細胞膜に接触したかどうかを電極抵抗の変化だけでモニターしているため、適当なギガオームシールを得られるようになるまでに多少の熟練を要する。この点に関しては、従来の細胞内記録と類似の手技であるため、細胞内記録法の経験がある場合にはほとんど問題にはならない。

(1) ブラインド法の実際

(i) 組織：ブラインド法では細胞が直視下で同定できないことから、同じ種類の細胞が密集した組織が適している。ブラインド法が適用されている中枢神経系組織の主なものとして、海

馬、大脳皮質、小脳などがあり、主にスライス標本が用いられているが、*in vivo* の標本にも適用されている⁵⁾。さらに、心臓、腎臓あるいは脾臓などの神経系以外の組織にも応用可能である（私信）。

(ii) 標本作製：基本的には薄切スライス標本の場合とほぼ同様である。通常、厚さ400~500ミクロンのスライスを実験に用いる。この程度の厚さのスライスの場合、チョッパーを用いて作製することもできるが、ホールセル記録ではスライサーを用いて作製したもののほうがより高い確率でシールを得ることができるようである。

(iii) 実験設備：パッチピペット作製および電流記録に要する機器は他のパッチクランプ法と同様である。実体顕微鏡に関しては、標本内の細胞層あるいは細胞集団を同定でき、記録電極をその近傍に誘導できる程度の性能を有するもので十分である。記録用チェンバーも特殊なものは不要で、それぞれの実験目的に適するものでよいが、標本を十分観察するためにはできればチェンバーの下方より照明できるものがよい。シナプス電流を記録する場合、操作領域が広いと、複数の刺激電極で入力線維を電気刺激することも容易である。パッチピペットの位置調節および細胞の検索には遠隔操作のできるマニピュレーターが必要であり、一定距離をステップで前進させることのできるモータードライブのマニピュレーターが望ましい。

(iv) 手技：パッチクランプ法の手技自体は他の章で詳しく述べられているものと同様であるためここでは省略する。通常、ピペットはシルガードコーティングしないが、必要な場合は、ピペットが組織のかかなり深い部分まで進む場合もあるので、ピペットを進める際にシルガードが組織を圧迫しないようコーティングは必要最小限にとどめるようにする。

ブラインド法では細胞の検索とギガオームシールを得る過程のみが薄切スライス法と異なるため、ここではその点についてのみ詳述することにする。

- 1) パッチ電極の抵抗をオシロスコープでモニターすることにより、電極の先端が細胞膜に接触したかどうかを判断する。そのために、細胞内液を充填したパッチピペットをバスに入れ、パッチクランプ増幅器をボルテージクランプモードとし、振幅1ミリボルト、持続時間数十ミリ秒程度の矩形波を1秒に数回程度の頻度で与え、それに対応する電流をオシロスコープ上でモニターする。オームの法則よりパッチ電極の電気抵抗を計算できる。標準的な細胞内液を用いた場合、4~8M Ω 程度の抵抗を持つ電極が本法には適している。カレントクランプモードでも同様に行えるが、以下ではボルテージクランプの場合についてのみ説明する。
- 2) ギガオームシールを得るまでピペット内の圧力調整はすべて10ml程度の大きさのシリンジを用いて行う。シリンジを使用することで、微妙な圧力の調整が可能となる。通常のパッチクランプ法では細胞を得るまではピペットに比較的低い陽圧をかけるが、ブラインド法ではかなり強い陽圧をかける点の特徴である。標準的なセットアップでは1~2ml程度空気を押し出し陽圧をかけるが、それぞれのセットアップで適当な圧力を経験的に決定する。次に、ピペットを細胞層のごく近傍まで移動させ、マニピュレーターを用いて、電極抵抗をオシロスコープでモニターしながら、数ミクロンずつ前進させる。この際、細胞層に平行に、あるいは、なるべく多くの細胞に接触するように記録電極の進行方向を調節しておくことが、より高い確率でギガオームシールを得るために必要である。
- 3) このようにパッチピペットを進行させると、ピペットがスライス表面に触れた瞬間、電流の大きなシフトが見られる。陽圧を維持しながら、さらにそのままピペットを進行させ、矩形波のモニター電流が瞬間的に減少する（つまり、ピペットの先端が細胞

膜に接し電気抵抗が上昇する)まで続ける。通常、スライスの表層近くに位置する細胞では持続して安定な記録を得ることが困難なため、最初の細胞はピペットにさらに強い陽圧をかけ破壊することもある。このようにモニター電流が減少した瞬間に、シリンジに急激に適度の陰圧をかけると、数秒から10秒以内にギガオームシールが得られる。スライスの状態が正常であれば、非常に高い確率で適当なシールを得ることができる。陰圧をかけるタイミングが遅れるとモニター電流がもとの大きさに戻ってしまい、それから陰圧をかけてもあまりよいシールが得られないことが多い。陰圧をかけてもギガオームシールが得られなかった場合にはピペットを交換し、少し部位を変え同じ操作を繰り返す。陰圧をかけなかった場合には繰り返し同じピペットを使うことができる。

- 4) ホールセル記録をする場合にはピペットに瞬間的に強い陰圧をかけてパッチを破るが、この際には口で圧力をかけるほうがうまくホールセルになるようである。ブラインド法で得たパッチでもシングルチャンネル記録を行うことが可能である。

(2) ブラインド法に必要なセットアップ シールド用ケージ

防振台：空気バネ式の性能の優れたものが望ましい。

実体顕微鏡：細胞層が十分観察できる程度のものでよい。細胞層がよく見えない場合にはシールを得る確率がかなり低くなる。

照明装置：パッチピペットの先端が十分見えるような照明が望ましい。

パッチクランプ用増幅器

電気刺激装置

アイソレーター

オシロスコープ

データ記録解析用パーソナルコンピューター
インターフェース

マニピュレーター：粗動マニピュレーターの先端に、ピペットの進行方向に動く電動マニピュレーターが必要で、ステップ状に電極を進められるものが望ましい（例、成茂MO-81）。マニピュレーターにドリフトがあると、安定に長時間記録することができない。

4. おわりに

薄切スライスパッチ法、ブラインドパッチ法について概説した。これらの方法はそれぞれ一長一短があり、目的により使い分けるべきものである。蛍光色素で逆行性標識した細胞からの記録¹²⁾、二重パッチ法、細胞内色素注入などの場合には薄切法が適しているが、層構造をなす細胞で、樹状突起へのシナプス入力が必要な場合には、ブラインド法が適している。最近、この両方法の長所を備えた赤外線パッチ法が開発された¹⁰⁾。これは厚いスライスに赤外線を透過させ顕微鏡カメラで細胞を直視するもので300~400 μ mのスライスで表面から50 μ m下の細胞が表面の細胞と同様に明確に観察される。必要な装置は薄切スライスパッチ法の装置に加えて赤外線用のCCDカメラ（Hamamatsu, C2400-07）とモニターである。この方法の別の利点は、樹状突起がよく見えることで、この方法を用いて、大脳皮質錐体細胞の樹状突起先端と細胞体から同時パッチ記録を行い、シナプス電位の伝播の様子が調べられている⁹⁾。赤外線パッチ法と並んで注目すべき方法は培養スライス・パッチクランプ法であろう⁶⁾。スライスパッチ法の普及により培養細胞におけるパッチクランプ研究の重要性が減少しつつある一方、培養でなければ行えない研究が進行している。受容体サブユニットのスイッチングファクターの研究などがその一例であろう。共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いたパッチクランプ記録も、既にいくつかの研究室で行われており、今後は重要な技術となるであろう。

文 献

- 1) Bekkers, J. M. & Stevens, C. F. (1990) Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **346**, 724-729
- 2) Blanton, M. G., Lo Turco, J. J. & Kriegstein, A. R. (1989) Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Meth.*, **30**, 203-210
- 3) Coleman, P. A. & Miller, R. F. (1989) Measurement of passive membrane parameters with whole-cell recording from neurons in the intact amphibian retina. *J. Neurophysiol.*, **61**, 218-230
- 4) Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B. & Takahashi, T. (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurons of the mammalian central nervous system. *Pflügers Arch.*, **414**, 600-612
- 5) Ferster, D. & Jagadeesh, B. (1992) EPSP-IPSP interactions in cat visual cortex studied with *in vivo* whole-cell patch recording. *J. Neurosci.*, **12**, 1262-1274
- 6) Gähwiler, B. H. (1981) Organotypic monolayer cultures of nervous tissues. *J. Neurosci. Meth.*, **4**, 329-342
- 7) Malinow, R. & Tsien, R. W. (1990) Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature*, **346**, 177-180
- 8) Manabe, T., Renner, P. & Nicoll, R. A. (1992) Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature*, **355**, 50-55
- 9) Stuart, G. J. & Sakmann, B. (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature*, **367**, 69-72
- 10) Stuart, G. J., Dodt, H.-V. & Sakmann, B. (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared microscopy. *Pflügers Arch.*, **423**, 511-518
- 11) Takahashi, T. (1978) Intracellular recording from visually identified motoneurons in rat spinal cord slices. *Proc. Roy. Soc. London B.*, **202**, 417-421
- 12) Takahashi, T. (1990) Membrane currents in visually identified motoneurons of neonatal rat spinal cord. *J. Physiol.*, **423**, 27-46
- 13) Yamamoto, C. (1975) Recording of electrical activity from microscopically identified neurons of the mammalian brain. *Experientia*, **31**, 309-310