

スライスパッチクランプ法

井本 敬二、佐竹 伸一郎、加勢 大輔、杉山 大介

(生体情報研究系・神経シグナル研究部門)

川口 泰雄、大塚 岳、森島 美絵子

(大脳皮質機能研究系・大脳神経回路論研究部門)

目次

1. はじめに
2. スライスパッチクランプ法（ホールセル記録）の基本的手技
 - 2-1. 概要
 - 2-2. 脳スライス標本の作製
 - 2-3. 電極内液の選択とその作製法
 - 2-4. スライスパッチクランプ用実験セット
 - 2-5. パッチクランプアンプの使用法（ホールセル記録）
3. スライスパッチクランプ法の適用例
 - 3-1. Voltage-clamp 法：電気刺激によるシナプス後電流の記録
 - 3-2. Voltage-clamp 法：アゴニスト投与により誘発した電流の記録
 - 3-3. Current-clamp 法：細胞発火特性の解析
 - 3-4. Current-clamp 法：電気刺激により誘発したシナプス電位変化の記録
4. 細胞染色法
 - (補足 1) Modified Ringer 液について
 - (補足 2) 成熟動物の脳スライス作製
 - (補足 3) Ringer 液に Cd^{2+} を加える場合
 - (補足 4) IR-DIC システムの適用
 - (補足 5) Liquid junction potential による分極とその補正
 - (補足 6) 逆行性標識による神経細胞投射先同定法
 - (補足 7) データ解析法

実習生は、テキストを予習してきてください。

バイオサイチンを用いた細胞染色は、希望者にのみ実技指導します。

1. はじめに

1976年に Neher & Sakmann⁽¹⁾ によって開発されたパッチクランプ法は、細胞膜表面の単一チャネル記録に用いられ、イオンチャネルの存在を証明するという画期的成果を生み出した。さらに 1981 年の Hamill ら⁽²⁾ のホールセルパッチクランプ法の開発により、細胞膜表面全体に存在するチャネルを通る全電流の測定や小型細胞からの記録が可能になった。しかしパッチクランプ法は、記録用電極を細胞に接着させてギガオーム ($10^9 \Omega$) を超える密なシールを形成させる必要があるため、細胞膜を露出させた単離培養細胞に適用が制限されていた。その後、1989 年 Edwards ら⁽³⁾ によってスライスパッチクランプ法が開発されると、スライス標本で局所神経回路の構造を保った状態の神経細胞から記録することが可能になり、中枢神経系におけるシナプス伝達とその修飾機構、さらには局所神経回路での信号伝達様式までも解析できるようになった。通常のスライスパッチクランプ法は細胞直視下で行うため、幼若動物から作製した薄いスライスにおいて有効な手段であるが、ブラインドスライスパッチクランプ法が開発されるに至ると、成熟動物の厚いスライスでも記録を行うことが可能となった。

スライスパッチクランプ法は、樹状突起を広範に伸ばしている細胞から記録するため space clamp が十分にできないなど、培養細胞に比べて電気生理学的解析の厳密さにやや劣る面がある。しかし、シナプス電流を高い精度で記録できることのメリットは、そうした欠点を補って余りあるものがある。近年、シナプス前終末や樹状突起などからの記録が可能になったこと、また単一細胞 RT-PCR 法や各種イメージング技術との組み合わせ、caged 化合物の適用、穿孔パッチ法、細胞内灌流法など研究目的に応じた技術的革新も次々に行われていることから、スライスパッチクランプ法は今後も強力な脳機能解析手段であり続けるものと考えられる。この章では、正立顕微鏡直視下でのスライスパッチクランプ法の基本的手技について概説するとともに、実際の適用例を紹介する。

- (1) Neher E & Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799–802.
- (2) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85–100.
- (3) Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B & Takahashi T (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Arch* 414: 600–612.

2. スライスパッチクランプ法（ホールセル記録）の基本的な手技

2-1. 概要

パッチクランプ法の特徴として、電流固定法（current-clamp 記録）を用いた膜電位測定と電位固定法（voltage-clamp 記録）による電流測定との切り替えが比較的容易であることが挙げられる。Sharp electrode による細胞内記録とホールセル（全細胞）記録を比較したときの長所・短所を以下にまとめる。

	Sharp electrode による 細胞内記録	ホールセル（whole cell）記録 （patch clamp 用アンプ使用）
長所	○ 細胞が記録内液で灌流されない ○ 厚いスライスや whole animal での実験が比較的容易 ○ 時間解像度が高い	○ 細胞を記録内液で灌流できる ○ 細胞内染色が容易 ○ 膜電位固定が良好 ○ 記録が安定
短所	○ 細胞内液を灌流できない ○ 細胞内染色に手間がかかる ○ 膜電位固定が困難 ○ 記録が不安定	○ 細胞内が灌流されてしまう ○ 厚いスライスや成体（in vivo）での実験が困難（blind patch clamp 法を用いる必要がある） ○ 膜電位記録の時間解像度が不良

スライスパッチクランプ法を用いて解析可能な研究課題を以下に列挙する。

1. 細胞膜の電気生理学的性質（intrinsic membrane properties）

基本的な膜特性（膜抵抗、膜容量など）

電流通電に伴う活動電位発火（発火頻度など）

2. シナプス後電位（EPSP, IPSP）

電気刺激により誘発される PSP

3. 電位依存性チャネルの性質

活性化・不活性化機構

イオン透過性・イオン選択性

4. シナプス後電流（EPSC, IPSC）

アゴニスト投与により誘発される受容体電流（整流性、イオン透過性）

自発電流（spontaneous PSC）、微小電流（miniature PSC）

電気刺激により誘発されるシナプス後電流

5. 穿孔パッチクランプ法

細胞内機能分子を維持した条件でのシナプス伝達

GABA_A受容体を介するシナプス電流（グラミシジン穿孔パッチ）

6. シナプス前終末からの記録（ただし、Calyx of Held など特殊な標本に限られる）
シナプス前終末における電位依存性チャネル・各種受容体の性質
シナプス後細胞との同時記録
7. 樹状突起からの記録
樹状突起に発現する電位依存性チャネル・各種受容体の性質
樹状突起へのシナプス伝達
樹状突起スパイク
8. 複数細胞からの同時記録
単一シナプス電流（unitary PSC）、単一シナプス電位（unitary PSP）
局所神経回路におけるシナプス結合様式
9. バイオサイチンを用いた細胞染色（光学顕微鏡レベル～電子顕微鏡レベル）
記録した細胞の同定ならびに形態の観察（樹状突起、軸索、シナプス）
10. 免疫組織化学染色との併用
特異的発現分子との関連性
11. イメージング技術との併用
カルシウムイメージング法：細胞内カルシウム動態との同時記録
12. 分子生物学的手法との併用
単一細胞 RT-PCR：記録細胞における特異的機能分子との関連性
遺伝子改変動物の利用：標的分子の機能探索

2-2. 脳スライス標本の作製

スライスパッチクランプ記録の成否は、良質な脳スライス標本が作製できるか否かにかかっていると言っても過言ではない。ここでは、一般的なスライス作製手順を紹介するとともに、各過程での注意点を述べる。なお、以下の手順は幼若マウスを用いた場合について示してあるが、他の動物でも基本的に同じである。また、この章の最後で、成熟動物の脳スライス作製で問題となる点について述べる。

(1) 準備

- Normal extracellular Ringer 液：脳スライス標本の保存時と記録時に用いる人工脳脊髄液。本コースで使用する Ringer 液の組成を以下に示す（mM）。

125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 11 glucose
(95 % O₂、5 % CO₂ の混合ガスでバブリングしてから使用する)

(注) CaCl₂、MgCl₂ は NaHCO₃ と反応して沈殿が発生するので、NaHCO₃

を十分に溶かした後、最後に CaCl_2 、 MgCl_2 を加える。

(注) 溶液組成は、実験の目的に合わせて調節する。適宜、文献を参照のこと。

(注) スライス作製中に起こる細胞死を減らすには、組織を冷却して細胞の酸素需要を下げるのが有効である。スライス作製用チェンバーに入れる Ringer 液の温度上昇を防ぐため、氷ブロックもしくはシャーベット（混合ガスでバブルした Ringer 液で作製する）をあらかじめ準備しておく。より細胞死を防ぐため、modified Ringer 液を使う場合も多い（補足 1 を参照のこと）。

- スライス保存用チェンバーとして、小型ビーカーに normal Ringer 液を入れて、混合ガスでバブルしておく（図 2 参照）。
- 脳のトリミングと薄切にはフェザー製またはウィルキンソン製の両刃カミソリを用いる。これらの刃には油や接着剤が塗布してあり細胞に有害なので、使用前にアセトン：エタノール＝1：1 の混合液を綿棒につけて丁寧に拭き取っておく。
- シャーレ（直径 100 mm）に氷を入れ、蓋をして氷冷 Ringer 液で湿らせた濾紙を乗せる（この濾紙の上で脳をトリミングする）。

（2）断頭、脳の摘出

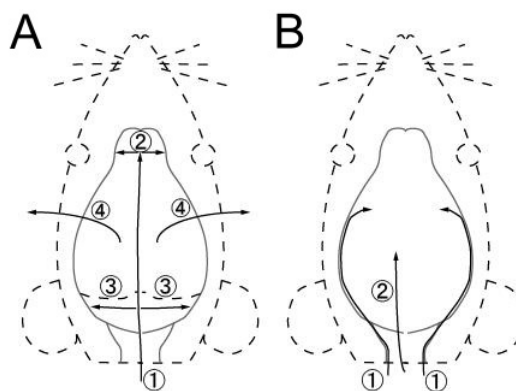
動物を深麻酔後、ハサミやギロチンで素早く断頭する。断頭面よりハサミを頭皮と頭蓋骨の間に入れ、頭皮を鼻側へ切り開く。ここでは摘出する脳領域ごとに手順を紹介する。いずれの方法でも実験に使う領域を傷つけずに、断頭から摘出までを迅速に行うことが重要である。

- 大脳の摘出手順（図 1 A）

断頭面の脊髄または延髄露出部からハサミを入れ、後頭骨 - 頭頂間骨を切り上げ、そのまま正中線に沿って嗅球のあたりまでハサミを進める（①）。次に頭蓋骨を前後で左右に切る（②、③）。ピンセットで頭蓋骨を観音開きにして（④）、スパーテルで脳を摘出する。

- 小脳の摘出手順（図 1 B）

断頭面の側面にハサミを入れ、そのまま後頭骨 - 頭頂骨の側面にハサミを進める（①）。これを左右両側で行い、ピンセットで断頭面付近背側の骨をつかんで持ち上げ（②）、スパーテルで脳を摘出する。



（図 1）マウスの頭蓋骨を切開する手順。A: 大脳の摘出例。B: 小脳の摘出例。

（３）トリミングとマイクロスライサーへの固定

摘出した脳を氷冷 Ringer 液に入れて十分に冷やす（１～３分）。脳をトリミング用シャーレの上に乗せ、カミソリ刃で不要な部分を除去して脳のブロックを作る。このとき、脳を押し潰さないよう、刃を引いて切るように心がける。ブロックを再び氷冷 Ringer 液に移し、さらに３分程度冷やす。その後、脳ブロックに付着している Ringer 液を軽くふき取り、瞬間接着剤（なるべく薄く均等に塗っておく）を用いて、脳ブロックをスライス作製用チェンバー（あらかじめ冷やしておく）に固定する。なお、スライス薄切の際にブロックが不安定にならないよう、底面積と高さのバランスに気をつける。また、脊髄のように小さい組織やブロック状にトリミングし難い組織を薄切するために、Ringer 液に溶かした寒天をスライサー台上の脳にかけたり、寒天に脳組織を包埋したりする場合もある⁽³⁾。

（４）脳スライスの作製

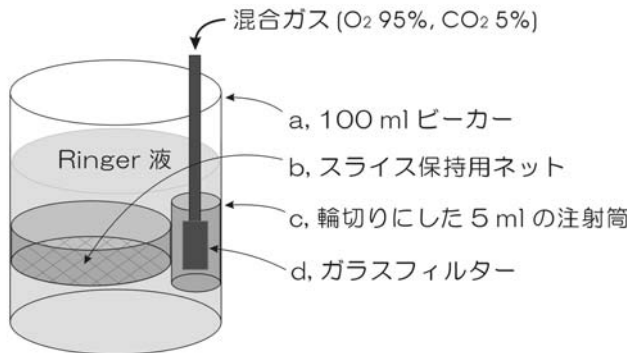
瞬間接着剤が固まるまで十分に待つ。脳ブロック固定が不十分な場合、薄切中にスライサーから外れたり、組織にひずみを生じたりする恐れがある。スライス作製用チェンバーを氷冷 Ringer 液で満たし、マイクロスライサーに固定する（常時 95 % O₂, 5 % CO₂ でバブルする）。実験に使う領域はゆっくり、それ以外の場所はブロックをひずませない程度にやや速く切るようにして全体の時間を短縮するように努める。

スライス薄切時、実体顕微鏡で観察しながら以下の点に注意する。①脳ブロックがカミソリ刃に押されてひずんでいないか。②刃がぶれて振動していないか（刃が浸かっている液面が深すぎるとぶれ易くなる）。③刃の周辺から脳の断片が粉状に舞い上がっていないか。こうした現象が起きていなければ、実験に適したスライスが得られる。作製したスライスはスポイトで回収して、normal extracellular Ringer 液が入った保存用チェンバーに静かに移す。

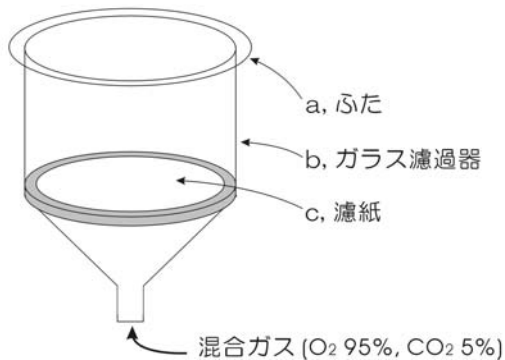
（５）脳スライスの保存

スライスは保存用チェンバーに１時間以上静置（室温または 30–32℃）した後、実験に供する。スライス保存用チェンバーは、各研究室で様々な様式のもの工夫されている。一般に幼若動物から作製したスライスの場合、Ringer 液中に保存する水浸式システム（図 2 A）を用いる。また、湿潤な混合ガスで飽和させたチェンバーの中にスライスを置く様式（インターフェイス式）が使われることもある（図 2 B：補足 2 参照）。

A, Submerged chamber



B, Interface chamber



(図 2) スライス保存チェンバーの例。A: 比較的簡単な水浸式チェンバー。スライス保持用ネットは、底をくり抜いた 35 mm プラスチック製ペトリ皿にガーゼを挟んで作る。このガーゼの上にスライスを静置する。B: インターフェイス式チェンバー。ガラスフィルター上に Ringer 液を濾紙が浸る程度入れる。濾紙の上に、半透膜セロハンにのせたスライスを置く。

(補足 1) Modified Ringer 液について

スライス標本作製時に、Ringer 液の Na⁺と Ca²⁺の濃度を低くした modified Ringer 液を使う場合がある。細胞活動（活動電位の発生など）を抑制することで、薄切時の組織障害を減らす利点がある。Na⁺は通常、スクロースもしくは塩化コリンと置換し、Ca²⁺は Mg²⁺と置換する。組成例を以下に示す。混合ガス（95 % O₂, 5 % CO₂ %）で十分にバブルした後、氷冷して（もしくはシャーベット状になるまで冷却して）用いる。

スクロース液 (mM) :

234 sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 glucose

塩化コリン液 :

120 Choline chloride, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 28 NaHCO₃, 8 MgCl₂, 25 glucose

(補足 2) 成熟動物の脳スライス作製

成熟動物での脳スライス作製における最大の問題点は、脳の摘出に時間を費やしてしまうことである。この問題を防ぐため、4℃に冷やした modified Ringer 液を心臓から灌流して脳を十分に冷却した後、断頭・脳摘出を行う方法がある。この工程により、脳の

摘出に少々時間を要しても細胞生存率が高くなる。また、一般に成熟動物の細胞は酸素需要が高い。インターフェイス式チェンバーを用いて酸素供給量を高く維持することにより、生存率が改善される場合がある。スライスや細胞の状態をよく観察して、最適な方法を選択してほしい。

(補足 3) Ringer 液に Cd^{2+} を加える場合

非選択的なカルシウムチャネル阻害薬として、 Cd^{2+} がよく使われる。しかし、Ringer 液に Cd^{2+} を加えると、炭酸イオンやリン酸イオンと反応して沈殿が生じることがある。こうした場合の対処法として、HEPES を緩衝液とした Ringer 液を用いる。その組成例を以下に示す。

HEPES Ringer (mM) :

140 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 5 HEPES, 10 glucose
(100 % O_2 でバブリングする)

2-3. 電極内液の選択とその作製法

電極内液組成の選択は非常に重要で、実験目的に即して調製する必要がある。後述の検討ポイントに基づき、適宜文献を参考にして適切な組成を選択してほしい。

本コースでは、以下に示す比較的単純な組成の電極内液 (mM) から実習を始める。

140 K-gluconate, 5 KCl, 0.2 EGTA, 2 MgCl_2 , 2 Na_2ATP , 10 HEPES
(KOH を用いて、pH を 7.3 に調節する)

(1) 主要陽イオンの選択 : K^+ にするか Cs^+ にするか?

細胞内の主な陽イオンは K^+ である。したがって、current-clamp mode で正常細胞に近い条件で活動電位などの膜電位変動を記録したいときには、 K^+ を 140–150 mM 含む電極内液を用いる。しかし、 K^+ チャネル以外のチャネル機能を調べるために、voltage-clamp mode で膜電位を delayed rectifier K^+ -channel の活性化閾値 (約 -20 mV) より脱分極側で保持したい場合にはしばしば問題が発生する。例えば、記録のベースに数百 pA から数 nA という巨大な K^+ 電流が交ざって、測定したい電流が記録レンジ外に飛び出してしまうケースなどである。たとえレンジ内に収まったとしても、その K^+ 電流 (記録が安定しない場合が多い) は調べたい現象のノイズと考えるにはあまりにも大き過ぎる。この場合、 K^+ チャネルは透過しないがグルタミン酸受容体チャネルなどに関しては K^+ とほぼ同等な透過性を示す Cs^+ を用いると良い。

（２）主要陰イオンの選択

最も一般的に使われる内液陰イオンは Cl^- である。この場合、liquid junction potential が小さく（ -4 mV 程度）、 KCl や CsCl を溶かすだけなので作製も簡単である。しかし一方で、 Cl^- 濃度が高くなるに従い、 Cl^- の反転電位が 0 mV 方向にシフトしてしまうという問題がある。また、長時間の記録にはあまり適していないようである。したがって、安定して長時間記録したい場合や、current-clamp mode で IPSP を静止膜電位付近で過分極反応として観察したい場合には、グルコン酸（gluconate）やメタンスルホン酸（methanesulfonate）を主要陰イオンとして用い、 Cl^- の濃度を $5\text{--}6 \text{ mM}$ 程度まで下げるようにすると良い。

（３）内液キレーター（EGTA, BAPTA）の選択

細胞内の 2 価イオン、特に Ca^{2+} を制御するため、目的に応じてキレーターを選択する。通常の voltage-clamp mode で細胞内 Ca^{2+} を変動させたくないときには 10 mM 程度の EGTA を電極内液に加えるが、細胞内に流入した Ca^{2+} が生理機能を発揮できるような条件の下で実験したいときには、濃度を 0.2 mM 程度まで下げた内液を用いる。例えば、定常電流通電に対する発火応答を調べる際、 10 mM の EGTA を用いると、活動電位に伴う流入 Ca^{2+} がキレートされるため、afterhyperpolarization に寄与するとされる Ca^{2+} -activated K^+ -channel がホールセル形成後 EGTA の細胞内拡散によって時間とともに阻害され、神経細胞の spike frequency adaptation が変化していく。細胞の発火特性を安定して記録するには、EGTA の濃度を 0.2 mM 程度にすると良い。また逆に細胞内の Ca^{2+} の上昇を素早くキレートしたい場合には、より速いキレーターである BAPTA を $10\text{--}20 \text{ mM}$ の濃度で用いる。

（４）内液の浸透圧

細胞外液に用いる Ringer 液の浸透圧（通常 $300\text{--}310 \text{ mOsm/L}$ ）に合わせて、細胞内液は $280\text{--}290 \text{ mOsm/L}$ の浸透圧となるよう調製する。記録の安定が悪い場合、しばしば細胞内外の浸透圧バランスが狂っていることがある（細胞が膨張しやすいなど）。したがって、内液を冷凍保存するときには、口にゴムの“O リング”が付いた気密性の高いプラスチックチューブを用いる。実験で異常を感じたら、細胞内液の浸透圧を確認してみるという習慣をつけておきたい。

（５）内液 polyamine（spermine など）の重要性

細胞内には spermine が豊富に存在している。細胞の静止膜電位の安定に重要な役割を果たす内向き整流性 K^+ チャンネルの内向き整流性の発現には、細胞内の polyamine が必須である。その他、 Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体や神経型ニコチン受容体チャンネルの内向き整流特性にも spermine が重要であることが明らかにされている。こうした理由から、より生理的な条件で長時間の安定したホールセル記録を行うため、電極内液に 0.1 mM 程度の spermine を添加しておくことを推奨する。

(6) 内液に加えることがあるチャンネル阻害薬 (QX314, TEA)

スライスでのホールセル記録の場合、space clamp は極端に悪いと考えておいた方がよい。特に問題が多いのは静止膜電位 (~ -60 mV) から活動電位の閾値付近での膜電位固定の場合で、シナプス入力やわずかな膜電位の変動に伴い、voltage-clamp が不十分な樹状突起で活動電位が発生してしまう。活動電位の発生を抑えたいが tetrodotoxin を使いたくない場合には、lidocaine アナログの QX-314 (lidocaine N-ethyl bromide) を 5 mM 程度細胞内液に加えると良い。また細胞内から delayed K^+ channel をブロックしたいときには TEA (tetraethylammonium) を 10 mM 程度用いる。

2-4. スライスパッチクランプ用実験セット

当研究所の多くの研究室では、特殊な測定系をマニアクに構築するのではなく、汎用性の高いシステムを使ってデータを出していこうとの発想に基づき、比較的スタンダードなセットを組むようにしている (図3)。

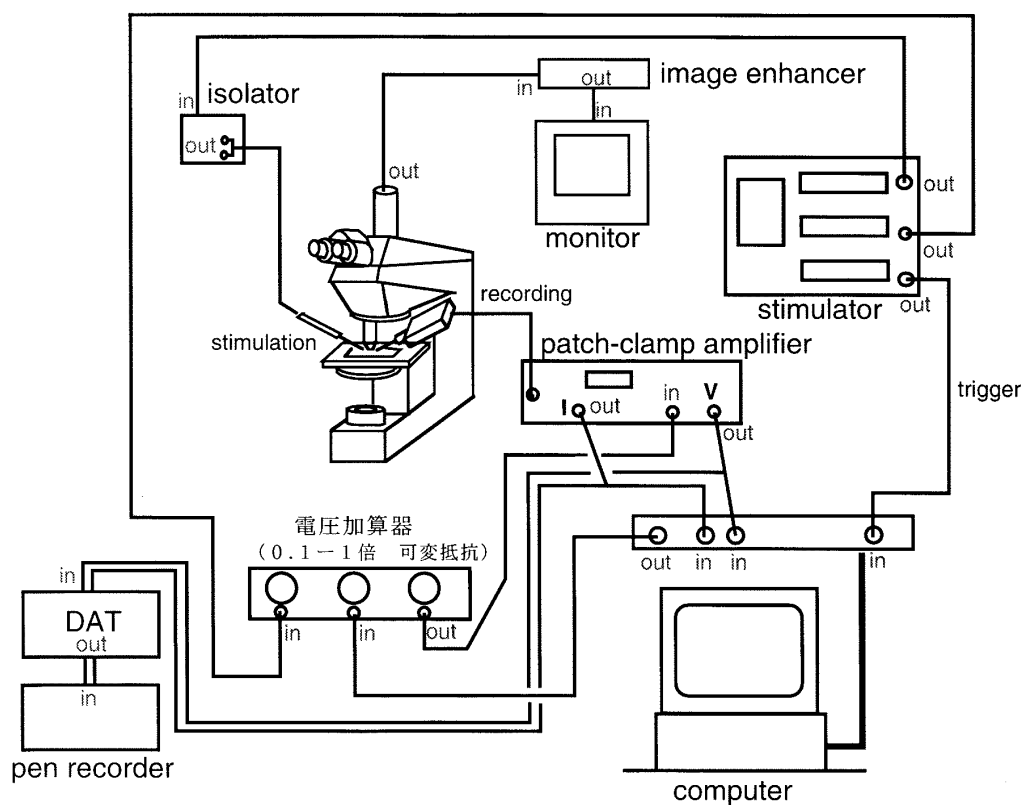
<基本セット例>

正立式微分干渉顕微鏡	: BX51WI (Olympus) 、FN1 (Nikon)
アイソレーションシステム	: ITS-O2 (成茂)
パッチクランプアンプ	: EPC-7,8,9,10 (HEKA) : Axopatch 200B (Molecular Devices)
CCD カメラ	: C2741-79 (浜松ホトニクス)
刺激制御装置	: Master-8 (AMPI)
アイソレータ	: ISO-FLEX (AMPI)
電動式マニピュレータ	: MP-225 (Sutter) 、PCS-5000 (Burleigh)
水圧式マニピュレータ	: MHW-3 (成茂)
データ取得システム	: pCLAMP + Digidata (Molecular Devices) : PULSE (HEKA) 、PATCHMASTER (HEKA) [EPC-7,8 の場合は ITC-16 (Instrutech) が必要]
送液ポンプ	: Miniplus3 (Gilson)
マイクロスライサー	: ZERO1 (堂阪イーエム) : VT1000S (Leica) 、VT1200S (Leica)
電極プラー	: P-97 (Sutter)

その他には、吸引装置 (ポンプ) 、除震台、テレビモニタ、オシロスコープ、シールドなどが必要である。

<その他オプション>

ピコポンプ : PV820 (WPI)
 落斜蛍光装置 : BX2N-FL-1 (Olympus)
 その他、データレコーダ、ペンレコーダ、電圧加算器など



(図3) スライスパッチクランプ記録のための実験セット例。

2-5. パッチクランプアンプの使用法（ホールセル記録）

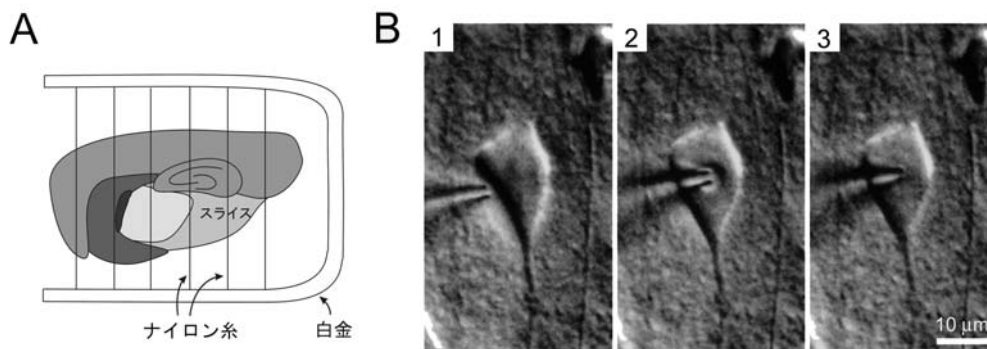
HEKA 社 EPC-7 (EPC-8) を例に、パッチクランプアンプの使い方を説明する。続いて EPC-9 (HEKA 社) および Axopatch 200B (Molecular Probe 社) についても概説する。

I. アンプ操作の前に

(1) 細胞の観察

脳スライスは、混合ガス (95 % O₂, 5 % CO₂) でバブルした normal Ringer 液中に室温で保存する。1 時間から 1 時間半後、スライスを記録用チェンバーに移して“グリッド (重し)”で固定する。グリッドは、U 字型に折り曲げた直径 1 ミリのプラチナ棒をハンマーで叩いて平らにして、細いナイロン糸 (ストッキングの最も細い糸がちょうど良い) をやや緩めに張って自作する (図 4 A)。

正立式微分干渉顕微鏡を用いて、ホールセル記録に適した細胞を選択する。その際、CCD カメラで取得したビデオ画像のコントラストを上げることで、細胞を鮮明に観察できる (図 4 B)。スライス深部の細胞や成熟動物から作製したスライスで記録するには、IR-DIC フィルターを用いることにより、細胞の同定が容易になる場合がある (補足 4 参照)。



(図 4) A: 脳スライス標本の固定法。B: ギガシールを形成する方法 (写真はマウス大脳皮質ニューロン)。1. 陽圧で細胞上の組織片を吹き飛ばしながら、細胞にアプローチ、2. 細胞に“くぼみ”を作る、3. 陽圧を解除すると細胞膜がパッチ電極に張り付いてくる。

(2) 電極内液の充填

初めに電極の先端を内液に浸すことで、毛細管現象を利用して先端側から内液を電極に少量充填する (この操作により、電極の先端に気泡が混入するのを防ぐことができる)。次に先を細長く伸ばしたピペットチップもしくは細い注射針 (またはマイクロフィル)

を用いて、反対側から内液約 25 μ l を電極に充填する。このとき、電極を指で軽く弾いて、混入した気泡を追い出しておく（小さな気泡が電極の先に残っていないかよく確認する）。充填量が多すぎると電極ホルダーまで電極内液が入ってしまうので注意する。

（補足 4）IR-DIC システムの適用

スライスパッチクランプ記録において、最近では IR-DIC（infra-red differential interference contrast：赤外線微分干渉）カメラを用いて細胞を同定するのが一般的である。赤外光は可視光よりも波長が長いため、スライス深部の細胞を鮮明に観察することが可能になる。赤外光は眼に見えないので、ビデオカメラを用いて観察する。詳しくは文献 4 を参照されたい。赤外線フィルターを顕微鏡ステージ下の光路に置き、ビデオエンハンサーを介して IR-DIC カメラで観察する。

(4) Stuart GJ, Dodt H-U & Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. Pflügers Archiv 423: 511–518.

II. アンプ操作

EPC-7 (or 8) の場合

< 初期設定 >

・ GAIN	10 mV/pA
・ MODE	VC
・ SLOW RANGE	off
・ %COMP	off
・ MONITOR	Vcomm
・ VHOLD	0 mV
・ FILTER	3 KHz (or 10 KHz)
・ STIM SCALING	0.01
・ C-SLOW	5 付近
・ G-series	5 付近
・ C-FAST	5 付近
・ τ -FAST	中央
・ Vp-offset	display 上で 0 に合わせる

（１）細胞へのアプローチ

陽圧をかけた記録用電極を灌流液に投入する。テストパルス設定で 1 mV, 10 ms のパルス波を与えながら電極抵抗を測定する（1 mV のステップパルスで 200 pA 流れたら 5 MΩ、500 pA 流れたら 2 MΩ になる）。細胞のサイズにもよるが、できれば電極抵抗 2–3 MΩ の電極を使用したい。パッチ電極に陽圧（~20 mHg）を付加した状態で記録したい細胞にアプローチし、細胞上を覆っている組織片を吹き飛ばす（図 4 B – 1）。

（２）ギガオームシールの形成

電極をさらに接近させると、細胞に“くぼみ”ができて、電極の先端が細胞膜に到達していることが分かる（図 4 B – 2）。スライス上の細胞は周辺組織に固定されているため、一般に単層の培養細胞よりもパッチ電極を強く押し当てることができる。むしろ若干強めに押し当ててをお勧めする。細胞表面のくぼみが限局してできているときは、パッチ電極の先端と細胞膜の間に障害物がないことを示している。しかし、くぼみが広いときには、細胞片などが間に挟まっている場合があるので注意する。次に陽圧を解除すると、細胞膜が電極の先端に張り付いてくる。この段階でシール抵抗が大きく上昇するはずである（そのままギガシールができることもある）。そこで引き続き電極に弱く陰圧をかけることにより、ギガシールを形成することができる（図 4 B – 3）。

電極抵抗が 1 GΩ を超えたら、静止膜電位付近に電位を固定する。

- ・ STIM SCALING 0.1
- ・ VHOLD -50 or -60 mV

引き続き、電極容量の補正を行う。

- ・ SLOW RANGE off のまま
- ・ C-FAST 容量電流の振幅を小さく
- ・ τ-FAST 二相性を単相性に

（電極容量の補正は極めて重要である。C-FAST は 10 で 10 pF、1 で 1 pF を表す）

（３）ホールセル記録

ギガシールが形成されたら、陰圧を付加して細胞膜を穿孔（破断）する（穿孔に伴い、大きな容量性電流が検出されるようになる）。穿孔後の過程は、voltage-clamp 記録の場合と current-clamp 記録の場合に分けて説明する。

<Voltage-clamp 記録の場合>

穿孔したら、膜容量とシリーズレジスタンス（series resistance：または、アクセス抵抗とも言う）の補正を行う。

- MODE VC のまま
- SLOW RANGE 100 pF
- G-series 容量性電流のピクを小さく
- C-SLOW 容量性電流の全体のサイズを小さく
- % COMP 70~90 %（発振しない程度に）

ホールセル記録時に正しく補正ができていれば G-series の値がシリーズレジスタンスを表し、C-SLOW が膜容量を表す。

	目盛値		シリーズレジスタンス
G-series:	10.0	→	1 MΩ
	5.0	→	2
	2.0	→	5
	1.0	→	10
	0.5	→	20
	0.2	→	50

（通常シリーズレジスタンスは電極抵抗の 3 倍程度になる）

	目盛値		膜容量
C-SLOW:	10.0	→	100 pF
	1.0	→	10 pF

<Current-clamp 記録の場合>

補正回路は働かないが、voltage-clamp mode におけるシリーズレジスタンス値に十分注意すること。

- MODE CC + COMM
- STIM SCALING 0.1 に維持

* 1 V の入力で 100 pA 通電される。

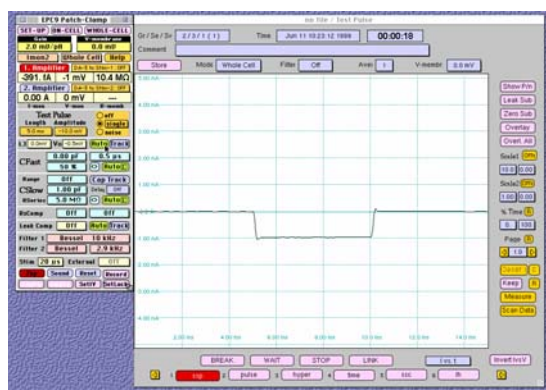
* Vp MONITOR は 10 倍で出力する。

ホールセル作製に失敗した場合、パッチ電極を交換して新しくやり直す。細胞に接した状態で一度陽圧を解除すると、電極の先端にゴミが付着してしまうので、再びギガセルを形成することはまず不可能である。

EPC-9 の場合

(1) 電極を細胞外液に浸ける

アンプ（増幅器）のゲイン（出力比）を 10 mV/pA 以下に設定し、電極の電位を 0 mV に固定する。EPC-9 のコントロールパネル中のテストパルス設定で、Length を 5 ms、Amplitude を -10 mV (+10 mV) にしてシングルパルスをオンにする。これにより過分極性（脱分極性）パルスが連続的に付加される。このテストパルスは、ホールセル状態を確立するまで与え続ける。内液を充填した電極を電極ホルダーに固定して、軽く陽圧を与えておく。EPC-9 のオシロスコープ画面では、電極が細胞外液に浸かると同時に、テストパルスを反映した電流が観察される（図 5）。このとき、電極内液と外液の間の界面電位（liquid junction potential）と塩化銀電極の電位の和である電極電位をゼロにしておく。電極の直流抵抗値は電流と電位から計算できるが、コントロールパネル中の R-membrane にも表示される。

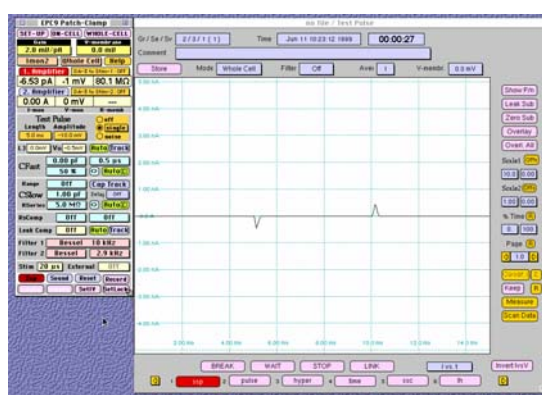


（図 5）電極を細胞外液に浸けた状態。過分極性のテストパルス電流が検出されている。このときの電流値を読み取ることによって、電極の直流抵抗値を計算することができる。

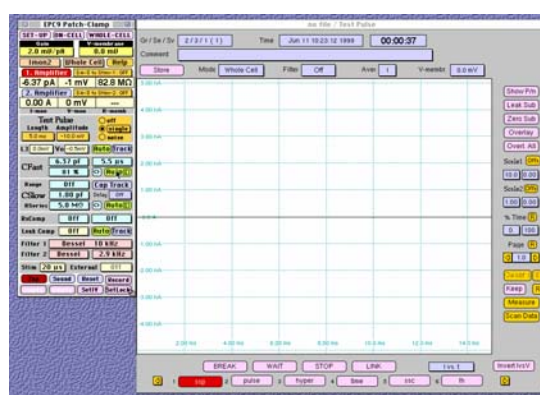
(2) ギガオームシールを作る

マニピュレータの粗動操作で、電極の先端を記録する細胞の真上に移動させる。コントロールパネルの V_o の値を手動で変えるか、その隣の Auto ボタンを押して、ここで再び電極電位をゼロに補正する（キーボードの“Z”キーを押すことでも可能）。次に電極に付加する陽圧を強くするとともにマニピュレータの微動操作により、電極をさらに細胞に接近させる。電極が細胞に接触し、その部分に少し“くぼみ”が現れたところで電極を動かすのを止める。電極が細胞に接触したか否かは電流量の変化（抵抗値の変化）からも知ることができる。細胞にくぼみを確認できたら陽圧を解除する。この操作だけでギガオームシールが形成されることもあるが、多くの場合、さらに陰圧をかけてシールの抵抗値が上昇するのを待つ。このときに陰圧をかけたり除いたりすることを繰り返したり、シールの形成が進むのに従って電極の電位を下げっていくことで、シールの形成が促進されることもある。シールの抵抗値は、コントロールパネルの R-membrane に表示されている値から確認できる。また、電極の電位はコントロールパネルの V-membrane の値をドラッグするか、右クリックして値を入力することで変更できる（キーボードの左右の矢印キーでも 10 mV 単位で変えることができる）。もしシールの形

成が進まなかったり止まったりした場合には、そこで中止し、新しい電極で別の細胞を狙う方が良い。シール形成が進むとテストパルスに応じて観察される定常的な電流が小さくなり、シールの抵抗値が $1\text{ G}\Omega$ 以上のギガオームシールが作られる。それに伴い一過性の電流が見えてくるが、これは電極の持つ浮遊容量をチャージするために流れる電極容量性の電流である（図6）。ガラスの浮遊容量を小さくするため、電極の細胞外液に浸かる部分にあらかじめワックスを塗っておく場合もあるが、それでも浮遊容量は若干残る。この容量性電流は、アンプ入力の飽和や速い時間経過の電流応答に歪みをもたらすなど記録に影響する。浮遊容量は、コントロールパネルの **CFast** を用いて容量値と時定数タウを手動で変化させて補正するか、**Auto** ボタンをクリックして自動補正する（キーボードの“A”キーを押すことでも可能）（図7）。



（図6）ギガオームシール形成時。テストパルスに応じた定常的な電流は小さくなる。その一方、電極ガラスによる一過性の容量性電流が残る。

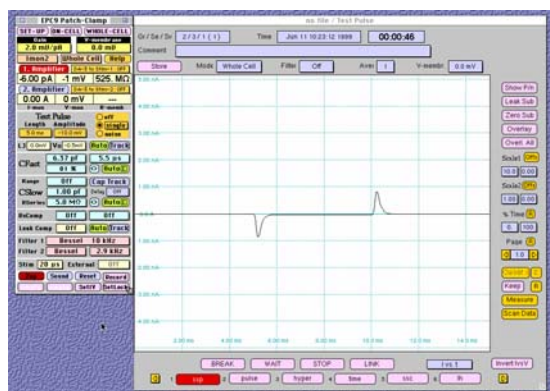


（図7）電極の浮遊容量の補正。コントロールパネルの **CFast** 中の **Auto** ボタンを押すか、手動で補正する。手動の場合の波形消去は、時定数と容量値（大きさ）を変化させて行う。

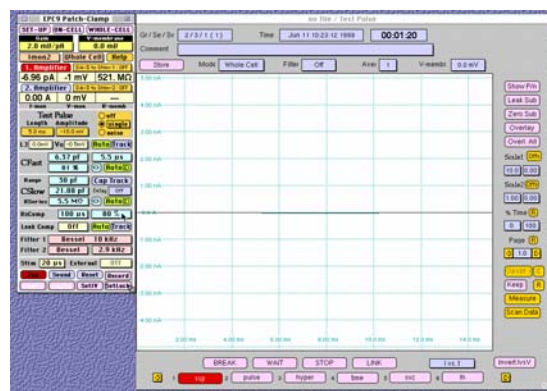
（3）ホールセル記録をする

ギガオームシールができて **CFast** の補正を行った後、電極電位を記録細胞の静止膜電位付近に移す。このとき、アンプのゲインを下げて 10 mV/pA 以下にしておく。短時間の強い陰圧を与えるか大きな電流を流して（**zapping**）、細胞膜を穿孔（破断）する。細胞内と電極内が開通する（ホールセル状態）と、テストパルスに応じて再び一過性の電流が観察されるようになる（図8）。これは電極と細胞間のシリーズレジスタンス（アクセス抵抗）を介して細胞の膜容量をチャージするときに流れる容量性電流で、電極の浮遊容量による容量性電流と比べて時間経過が遅い。**Voltage-clamp** 記録を行う場合、この成分は非定常電流記録に影響するので補正する必要がある。この補正は、コントロールパネルの **CSlow** を使って行う。まず、細胞体の大きさから細胞膜容量を推定してレンジを選択する（例えば、大脳皮質の錐体細胞なら 100 pF 、介在ニューロンなら 30

pF)。次に、容量値と **R-series** を変化させて、オシロスコープで観察される容量性電流をできる限り消去する（図9）。**R-series** の値が大きい場合には、細胞内へのシリーズレジスタンスによる電圧降下が無視できなくなるので、コントロールパネルの **RsComp** の補正率（%）を変えて補正電圧を設定し、誤差を少しでも減らすよう調整する。



(図8) 細胞膜破断時。ホールセルの状態になると、細胞の膜容量をチャージする一過性の容量性電流が観察される。電極の浮遊容量をチャージする容量性電流(図6参照)と比べて時間経過が遅いのが分かる。



(図 9) CSlow を用いた膜容量の補正。波形の時定数は Range と R-series で、大きさは容量値を変化させて補正している。

Axopatch 200B の場合

標的細胞への電極のアプローチ、ギガシールの形成、ホールセル穿孔までの手順ならびに電気生理学的基盤は EPC-7 (or 8) あるいは EPC-9 と共通なので、前項を参照されたい。

＜初期設定＞

- OUTPUT GAIN (α) $\times 1$
- LEAK SUBTRACTION off
- LOWPASS BESSEL FILTER 10 kHz
- CONFIG WHOLE CELL $\beta = 1$
- MODE V=CLAMP
- METER I
- HOLDING COMMAND off
- EXT. COMMAND off
- %COMPENSATION off

陽圧を与えながら記録電極を細胞外液に浸した後、EXT. COMMAND で 5 mV のパルスを加して電極抵抗を測定する。電極を目的の細胞付近まで近づけた時点で、陽圧を一旦解除する。PIPETTE OFFSET を使って、METER の I (holding current) の値をゼロにする。

ギガシールが形成されたら、

- オシロスコープの出力を 100 pA/division 程度 ($\alpha = 1$ なら 100 mV/div) に設定する。
- METER を $V_{\text{HOLD}}/I_{\text{HOLD}}$ にして、HOLDING COMMAND で固定電位 (holding potential) を静止膜電位付近 (~ -60 mV) に設定する。
- PIPETTE CAPACITANCE COMPENSATION:
FAST で fast component を補正する (容量電流の振幅を小さくする)
SLOW off

ホールセルの状態になったら、

- MODE V-CLAMP を維持する
- OUTPUT GAIN (α) $\times 5$ or 10
- WHOLE CELL CAPACITANCE および SERIES RESISTANCE を補正する
(補正の目安は EPC-7 or 9 の項を参照のこと)

補正された状態での各々の値が、WHOLE CELL CAPACITANCE (pF) および SERIES RESISTANCE (M Ω) となる。

- % COMPENSATION 80–90 %

<Current-clamp 記録の場合>

3 種類の MODE がある。

- I = 0: 電流コマンドなしに電位を記録する。細胞の自然な応答 (静止膜電位、自発性膜電位振動、自発性活動電位など) を測定することができる。
- I-CLAMP NORMAL: 電極抵抗が 1–10 M Ω の場合
- I-CLAMP FAST: 電極抵抗が 10 M Ω より大きい場合

Current-clamp 用アンプ (例えば、Axoclamp 2B など) と異なり、EPC-9 や Axopatch 200B のヘッドステージは、電極の電位をコントロールして電極の電流を測定するという仕様になっている。したがって、パッチクランプ用アンプは、本質的に current-clamp 記録には不向きである。この問題を解消して current-clamp 記録をできる限り正確に行うため、フィードバック回路により、電極の電流を一定に保つよう自動的に電極電位を調節している。したがって、V-CLAMP モードではアンプの V_m は command potential そのものであるのに対して、I-CLAMP モードでは、一定の電流が流れるのに

必要な電位になるよう V_m が自動的に調節される。

電極抵抗が低い場合、フィードバック回路の安定性が損なわれるという問題がある。この問題を補正するには、回路のスピード（時定数として反映される）を犠牲にしなければならない。安定性とスピードという相反する要求を両立させるために、Axopatch 200B では上記 2 種の I-CLAMP モードを備えている。

Voltage-clamp mode から Current-clamp mode への移行手順。

1. I = 0 mode を選択する
2. HOLDING POTENTIAL および他の commands を off にする
3. I-CLAMP (NORMAL or FAST) を選択する

Current-clamp mode から Voltage-clamp mode への移行手順。

1. I = 0 mode を選択する
2. HOLDING POTENTIAL を静止膜電位付近に設定する
3. V-CLAMP mode を選択する

3. スライスパッチクランプ法の適用例

3-1. Voltage-clamp 法：電気刺激によるシナプス後電流の記録

脳スライスでシナプス入力を記録する際、神経細胞を刺激する電極として金属電極やガラス電極が広く使われている。金属電極には、単極性（monopolar）電極と双極性（bipolar）電極がある。ガラス電極は、記録用パッチ電極よりも先端がやや太くなるよう引いて作製した電極に、細胞外液を充填して使用する。いずれの場合も電気刺激を与えながら、刺激場所（スライス表面に軽く触れる程度）や刺激強度を変えて、目的のシナプス電流が誘発される場所を探す。

電気刺激を定電流で行うか定電圧で行うかは、意見が分かれる。刺激電極として金属電極を用い、刺激強度が弱い場合は定電圧でも問題はない。しかし、ガラス電極の場合は、（電極にゴミがつまるなどの要因で、実験中に電極抵抗が変化する可能性がある）定電流刺激の方が望ましいと考えられる。

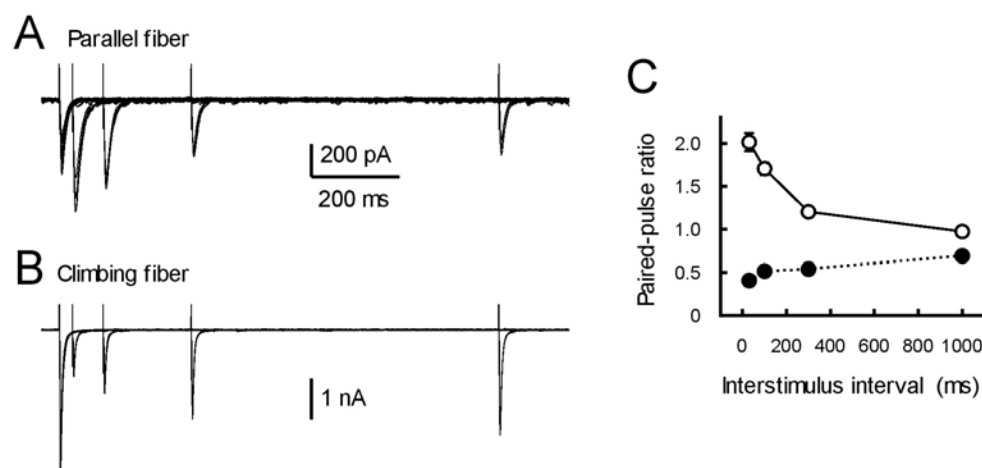
樹状突起の直接刺激や軸索刺激に伴う逆行性スパイクや、電位固定が不十分な場合に起こる活動電位が記録に影響しないよう、記録電極の内液に QX-314 を添加しておくことを推奨する。また、膜電位を変えて電流 - 電位曲線を記録したいときには、Cs-gluconate を主成分とするパッチ内液を用いる。

長時間に渡ってホールセル記録を行う場合、記録中のシリーズレジスタンスも同時に記録しておくことを習慣にしたい。シリーズレジスタンスは、しばしば実験中に大きく変化する。シリーズレジスタンスの変化は、シナプス電流の振幅や波形に大きな影響

を与える。シリーズレジスタンスは、刺激パルス後に 10~20 ms の過分極パルス（-1~-5 mV）を入れておくと、最初の素早い立ち上がりの容量成分として観察できる。ただし、この容量成分を正しく測るためには SLOW RANGE を off にしておく必要がある点に留意する。

図 10 に、小脳プルキンエ細胞で記録される 2 種類の興奮性シナプス入力の変化的変化を示す。ガラス電極による連続刺激に伴い、平行線維シナプス電流には増強が、登上線維シナプス電流には抑制が観察される。一発目刺激応答に対する二発目刺激応答の比率（ペアパルス比：paired pulse ratio; 2nd amplitude/1st amplitude）は、主にシナプス小胞放出機構の性質を反映すると考えられている⁽⁵⁾。

(5) Zucker RC & Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. Annu. Rev. Physiol. 64: 355-405.



(図 10) 小脳プルキンエ細胞で記録した平行線維 (parallel fiber) シナプス電流 (A: $V_h = -80$ mV) と登上線維 (climbing fiber) シナプス電流 (B: $V_h = -30$ mV)。GABA_A 受容体阻害剤 (5 μ M bicuculine) の存在下、30, 100, 300, 1000 ms の間隔で 2 発の電気刺激を与えた。C: 刺激間隔とペアパルス比の相関プロット (○: 平行線維、●: 登上線維)。

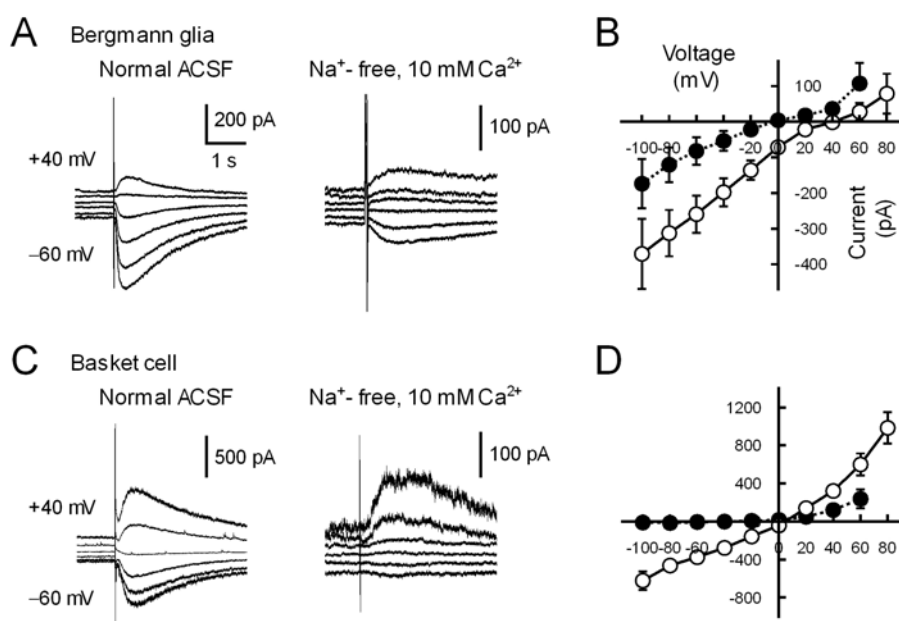
3-2. Voltage-clamp 法：アゴニスト投与により誘発した電流の記録

記録細胞の膜表面に発現している受容体チャネルの電流 - 電圧特性を検討するには、ホールセル記録下でアゴニスト投与に伴う電流応答を観察するとよい。しかし、アゴニストを灌流投与すると受容体の脱感作 (desensitization) が起きやすく、繰り返し投与に伴い安定した電流が記録できなくなるという問題がある。アゴニスト応答を繰り返し観察するには、こうした問題を避けるため、air puff による pressure application 法や

アゴニストの電荷を利用した電気泳動投与法 (iontophoresis) が使われる。

Air puff 法では、細胞外液に溶かしたアゴニストをガラス電極に充填し、電気刺激装置でコントロールした空気ポンプ (例えば、WPI 社製ピコポンプ PV820) を用いて陽圧を付加することにより投与する。アゴニストの濃度と陽圧パルスの時間は目的によって異なるが、カイニン酸や NMDA、アセチルコリンの場合、1~10 mM の濃度で 5~30 ms のパルスを与えている。さらに、実際に記録されたアゴニスト電流の波形を観察しながら、目的に即して刺激電極と細胞の距離や刺激パルス時間を調節する。

図 1 1 には、AMPA を電気泳動的に投与して、小脳皮質細胞に発現する AMPA 型グルタミン酸受容体の電流 - 電位特性ならびに Ca^{2+} 透過性を調べた例を示す。



(図 1 1) 小脳皮質に発現する AMPA 型グルタミン酸受容体の Ca^{2+} 透過性。 Ca^{2+} 透過型受容体 (A, B: バーグマングリア) と Ca^{2+} 非透過型受容体 (C, D: 介在神経) の電流 - 電位曲線 (GluR2 サブユニットを含まない AMPA 受容体は内向き整流性と Ca^{2+} 透過性を示す: B) 。 ○: normal Ringer 液、 ●: Na^+ -free, 10 mM Ca^{2+} Ringer 液。

<反転電位に基づく 2 価イオン透過性解析>

受容体の 2 価イオン (特に Ca^{2+}) 透過性を解析する実験手順について述べる。 Na^+ を含まず Ca^{2+} を高濃度 (10~100 mM) にした細胞外液で、アゴニストで誘発される電流の反転電位を計算する (図 1 1) 。

Na^+ -free, high Ca^{2+} 細胞外液 (mM) :

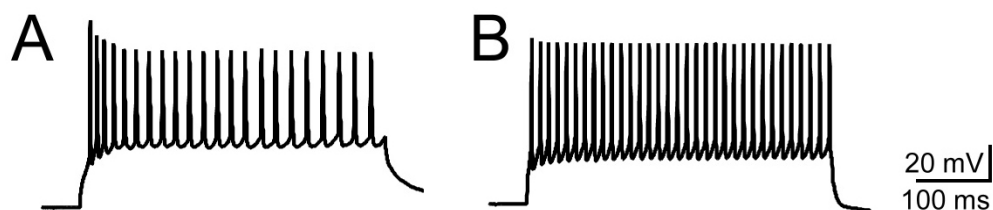
20 CaCl_2 , 10 Glucose, 5 HEPES, 144 *N*-methylglucamine (濃 HCl で pH7.4 にする)

細胞外液を重炭酸の緩衝液にすると、高濃度の Ca^{2+} イオンを含むことから CaCO_3 の沈殿を生じてしまう。こうした沈殿の発生を防ぐには、HEPES を緩衝液とした細胞外液を用いる（この場合、100 %酸素でバブリングする）。スライスでは、細胞外液を別の外液に置き換えるには長い灌流時間を要する。細胞外液の置換が十分か否かは、サブユニット構成として GluR2 を含む Ca^{2+} 非透過型 AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を調べることで確認できる（図 1 1）。なお、この場合、刺激電極に充填するアゴニストも、 Na^+ -free で高濃度の Ca^{2+} を含む細胞外液で調製する。

3-3. Current-clamp 法：細胞発火特性の解析

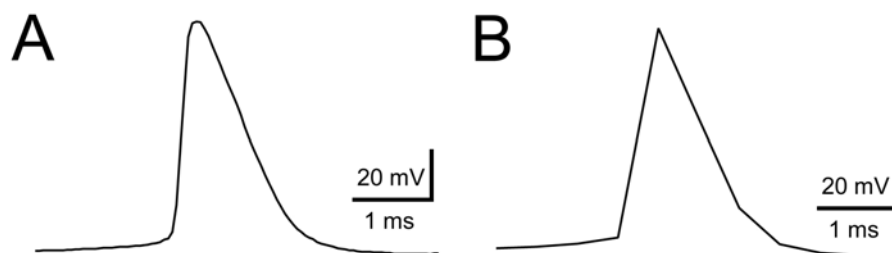
多種多様な神経細胞には、発現する分子や細胞形態のみならず、活動電位の発火特性にも著しい差異が認められる。発火特性の違いは、主としてその細胞に発現するチャネル分子の違いに由来する（例えば、大脳皮質 fast-spiking cell で観察される非常に狭い活動電位幅は、 Kv3 channel の存在が原因であると考えられている）。このような発火特性の違いを利用して、細胞の種類を同定することも可能である。

一般に神経細胞の発火特性は、数百 ms の定電流パルスを注入して細胞を脱分極させることで調べられる。パッチクランプアンプでは、電流通電による刺激も記録用ガラス電極を介して行うことが可能である。この場合、外部からのコマンド入力を受け付ける current-clamp モード（EPC の場合は current clamp + command mode）で記録と刺激を行う。図 1 2 には、大脳皮質における 2 種類の抑制性介在細胞の発火特性を示す。Regular-spiking non-pyramidal (RSNP) cell は繰り返し発火に伴い、活動電位の発生頻度が低下する（adaptation）。一方、fast-spiking (FS) cell は連続発火しても adaptation はほとんど観察されない。



（図 1 2）大脳皮質における 2 種類の抑制性介在細胞の発火様式。A: regular-spiking non-pyramidal (RSNP) cell。B: fast-spiking (FS) cell。共にトレーニングコース受講生が取得したデータ。

発火特性の解析において注意すべき点として、膜電位信号をコンピュータに取り込む際の、デジタル化サンプリング周波数がある。活動電位の時間経過は非常に速いため、発火様式を調べるには 10 kHz 以上の高いサンプリング周波数が必要となる（図 1 3）。

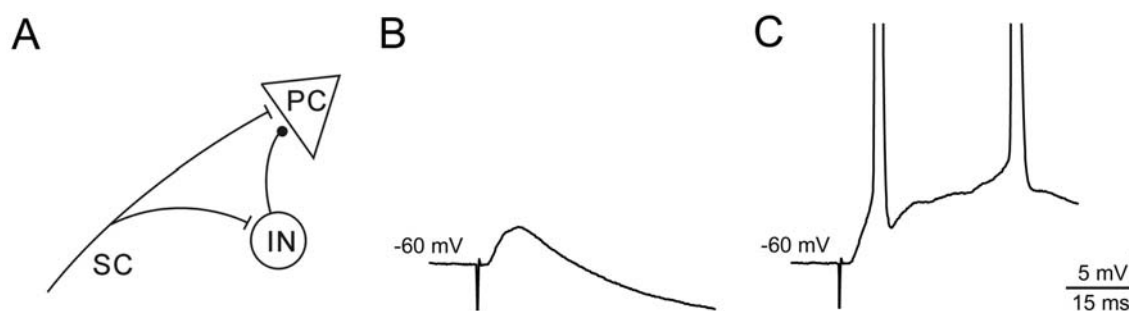


(図 1 3) サンプル周波数と活動電位トレース。大脳皮質錐体細胞から記録。A: 20 kHz。B: 2 kHz。

3-4. Current-clamp 法：電気刺激により誘発したシナプス電位変化の記録

Voltage-clamp 法を用いたシナプス電流記録と current-clamp 法を用いたシナプス電位記録にはそれぞれに利点があり、研究目的に応じて使い分ける。Voltage-clamp 法では、膜電位を固定して膜容量を補正することにより、目的のシナプス応答を正確に単離することができる。そのため、シナプス伝達の分子的基盤を解析するのに適している。一方、current-clamp 法は実際の神経細胞活動（膜電位変化や活動電位）を検出できるため、神経回路活動におけるシナプスの機能を調べるのに優れている（ただし、膜電位固定や膜容量補正機構が働かないため、シナプスの性質を調べるのには不向きとなる）。

図 1 4 には、Shaffer collateral 経路の電気刺激に伴い海馬 CA1 錐体細胞で記録されるシナプス電位応答を示す。Shaffer collateral からの単シナプス性（monosynaptic）興奮が入力しても、引き続き介在神経を介した 2 シナプス性（disynaptic）フィードフォワード抑制が入るため、錐体細胞は活動電位を発生しない（図 1 4 B）。しかし、2 シナプス性抑制入力を薬理的に阻害すると、活動電位が発生するようになる（図 1 4 C）。



(図 1 4) Shaffer collateral 経路 (SC) を刺激した際の海馬 CA1 錐体細胞 (PC) のシナプス電位応答。A: シナプス経路 (模式図)。単シナプス性興奮経路と介在神経細胞 (IN) を介した 2 シナプス性抑制経路が存在する。B: Normal Ringer 液中でのシナプス電位応答。C: GABA_A 受容体阻害薬 (10 μ M gabazine) 存在下でのシナプス電位応答。

電気刺激で誘発されるシナプス電位をホールセル記録で調べる際に注意すべき問題を2つ挙げる。第一は、**current-clamp** モードの電位出力は通常 10 倍しか増幅されていない点である。活動電位など振幅の大きい変化を観察する場合は問題ないが、シナプス電位のように数 mV 程度のわずかな変化を記録すると、コンピュータに取り込んだデータの解像度が悪くガタガタとした波形になってしまうことがある。こうした問題を解決するためにはパッチクランプアンプとコンピュータ（アナログ - デジタル変換ボード）の間に電位増幅器（プレアンプ）を置くか、より解像度の良いアナログ - デジタル変換ボード（16 bit 相当）を用いる必要がある。

第二に、パッチ電極内液の Cl^- 濃度に十分留意しておかないと、静止膜電位付近で抑制性シナプス後電位（IPSP）を脱分極応答として記録してしまうことがあるという問題がある。例えば 14 mM Cl^- の細胞内液で細胞外液の Cl^- 濃度が 128.5 mM の場合、その反転電位（ E_{Cl} ）は、

$$E_{\text{Cl}} = 58 \times \log_{10}(14/128.5) = -56 \text{ mV}$$

となる。したがって、静止電位を -70 mV として記録すると IPSP は脱分極応答となる。そこで細胞内液の Cl^- 濃度を 6 mM もしくは 4 mM に変えると、

$$E_{\text{Cl}} = 58 \times \log_{10}(6/128.5) = -77 \text{ mV}$$

$$E_{\text{Cl}} = 58 \times \log_{10}(4/128.5) = -87 \text{ mV}$$

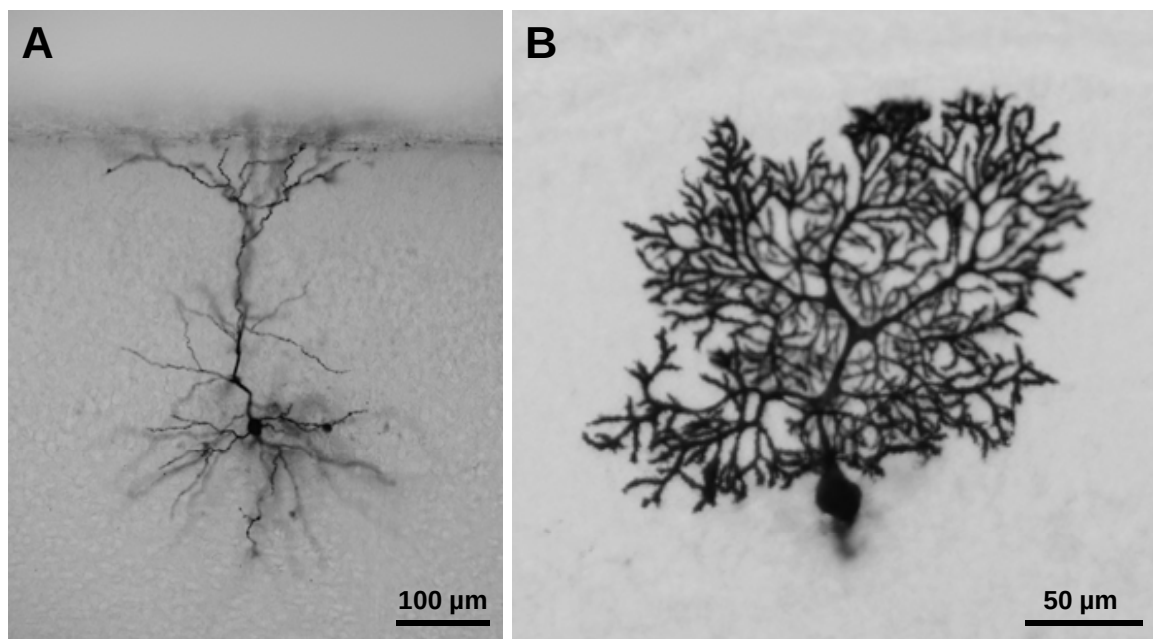
となり、静止電位付近でも IPSP を過分極応答として観察できるようになる。

4. 細胞染色法

ホールセル記録した細胞の形態を観察するには、記録の際に使用する電極内液に標識物質を添加して細胞をラベルする必要がある。ルシファーイエロー（Lucifer yellow）などの蛍光色素や、バイオサイチン（biocytin）を用いる方法がある。最近では、様々な利点からバイオサイチンを用いる場合が多い。利点として例えば、①蛍光色素に比べて軸索や樹状突起のように微細な細胞構造まで観察することが可能であること、②標本を長期間保存することができることなどが挙げられる。バイオサイチンを用いた細胞染色は、記録電極の内液にあらかじめバイオサイチン（5 mg/ml）を加えておくだけで良い。バイオサイチンは低分子量（MW 372.5）のため、細胞膜を破ってホールセルモードに移行した瞬間から素早く細胞内に拡散していく。従って、短時間のホールセル記録でも樹状突起の先端まで十分な染色像を得ることができる。ただし、記録した他の細胞と混同しないように、失敗した細胞も含めて1枚の脳スライスで染色する細胞は可能な限り1個に留めたい。それが困難な場合は十分に距離を離して、後から細胞の同定が可能な

ようにスライス上の位置をノートに記載しておく。ホールセル記録後、パッチ電極を細胞から丁寧に離すことが重要である（乱暴に扱うと、記録した細胞体が電極と一緒にスライスから離れてしまう）。細胞から無事に電極を離すことができたなら、スポイトなどを用いてスライスを 4 % paraformaldehyde を含む 0.1 M リン酸緩衝液に移し、一晚以上固定を行う（4℃）。

バイオサイチンで標識した細胞を可視化するには、アビジンとビオチンの選択的化学結合を利用した ABC (avidin-biotin complex) 法を用いる。バイオサイチンは、ビオチンの側鎖カルボキシル基とリジンの ϵ アミノ基がアミド結合した化合物 (N_ϵ -biotinyl-L-lysine) である。ストレプトアビジン (streptavidin: horseradish peroxidase で標識) は、4 分子のビオチンと結合する。ビオチン-ストレプトアビジン-HRP 複合体と反応させることにより巨大な複合体が形成され、標識シグナルを増幅することが可能となる。標識細胞は、HRP の基質である DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) を発色させて可視化する (図 1 5)。なお、蛍光物質を用いて、バイオサイチンを可視化することも可能である。この場合、蛍光標識したストレプトアビジンを用いる。また、免疫組織化学と組み合わせることで、記録した細胞に発現するケミカルマーカを調べることもできる (蛍光二重染色法)。さらに、蛍光ストレプトアビジンの濃度を下げることで、蛍光観察の後、通常の ABC 法を用いて細胞を可視化、長期保存用標本として残すことも可能である (蛍光ストレプトアビジンに結合しなかったバイオサイチンが残っているため)。



(図 1 5) バイオサイチン染色像。A: 大脳皮質錐体細胞。B: 小脳プルキンエ細胞。

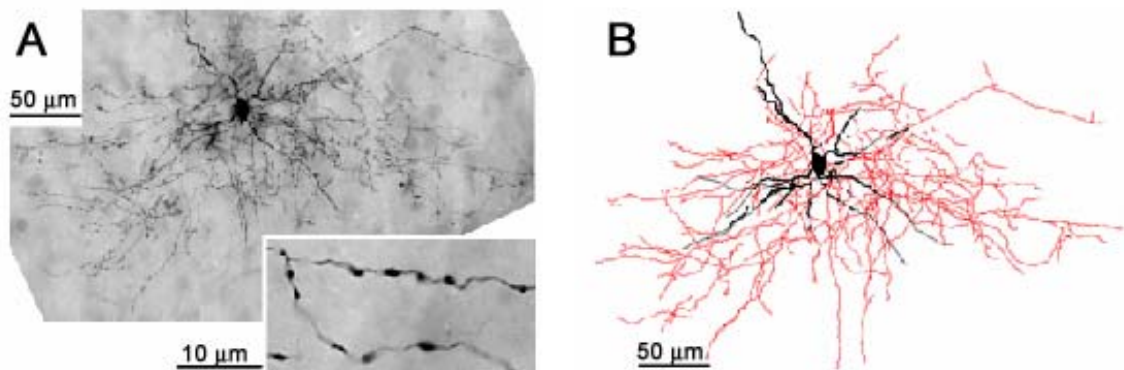
バイオサイチンの染色工程を以下に示す。なお、細胞の形態を詳細に解析するため、固

定したスライスの再薄切が必要となる場合がある（例えば、軸索や樹状突起の走行が複雑、高倍率の対物レンズの焦点距離が不十分な場合など）。こうした場合、ABC 液処理の前にスライサーを用いてスライスを 50 μm 程度に薄切しておく。再薄切後、ABC 法により可視化した大脳皮質非錐体細胞と、ニューロルシダを用いて再構築した画像を図 1 6 に示す。再薄切により、軸索の走行や軸索上の神経終末（ブトン：bouton）が明瞭に観察できる（図 1 6 A）。

【一般的なバイオサイチン染色工程】

1) Rinse in 0.05 M PBS (pH 7.4)	10 min $\times$ 2
2) Incubation in 0.6 % H_2O_2 in methanol	30 min
3) Rinse in PBS	10 min $\times$ 3
4) Incubation in ABC solution (1 %)	3 hrs
5) Rinse in PBS	10 min $\times$ 2
6) Rinse in 0.05 M TBS (pH 7.6)	10 min $\times$ 2
7) Incubation in 0.01 % DAB	
+ 1 % Nickel ammonium sulfate	
+ 0.0003 % H_2O_2 in TBS	30 min
8) Rinse in TBS, then in PBS	

全て反応は室温で行う。通常、培養プレートを用いて行っている。なお、標準的な処理（反応）時間を右側に示す（必要に応じて調整する）。

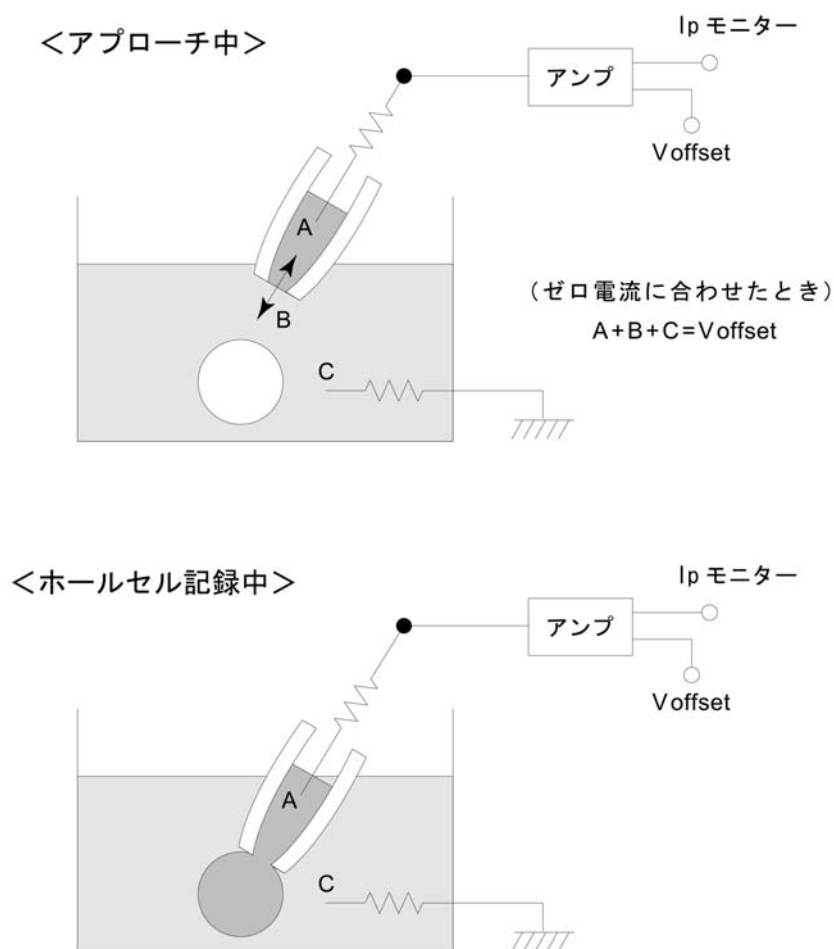


（図 1 6）大脳皮質非錐体細胞（fast spiking cell）のバイオサイチン染色像。A: スライスを 50 μm に薄切した後、ABC 法により可視化。軸索の bouton が $\times 100$ の油浸レンズで明瞭に観察できる。B: ニューロルシダによる再構築像。軸索を灰色、樹状突起を黒色で示す。

（補足 5）Liquid junction potential による分極とその補正

移動度の異なる複数のイオンが接する場所では、界面電位（junction potential）が生じる。通常のパッチクランプ実験システムでは、以下の 3 カ所（A, B, C）で界面電位が生じる（図 1 7 参照）。

- A 電極の銀線と電極内液の間
- B 電極内液と細胞外液の間
- C 細胞外液と不関電極の間



（図 1 7）Liquid junction potential が生じる原理。

このうち実際のホールセル記録の際に問題となるのは、B の電極内液と細胞外液の間に生じる liquid junction potential（液間での界面電位）である。なぜならば、細胞へのアプローチ中に、電極が細胞外液に浸っている状態で、電極を流れる電流量をオフセットのつまみを回しながらゼロにあわせるという操作を行っているからである。このとき、 $A + B + C$ の界面電位はオフセット電圧（ V_{offset} ）により一旦ゼロに補正されている

(図 1 7 : アプローチ中)。そして、そのオフセットの状態ではギガシールを形成し、穴を開けてホールセル状態に移行すると、もはや電極内液と細胞外液は直に接しなくなるため、B の liquid junction potential は存在しなくなる (図 1 7 : ホールセル記録中)。しかし、その分のオフセット電圧は残る。例えば、電極内液が細胞外液に対して -10 mV の liquid junction potential を持つとき、ホールセル記録中にオフセット電圧は $+10\text{ mV}$ 余計に付加されていることになる。この場合、パッチクランプアンプが -60 mV を示していたとしても、実際の細胞内の膜電位は -70 mV になってしまう。Liquid junction potential は内液の種類によって変動する。KCl が主要な内液組成では、その liquid junction potential は -4 mV 程度でほとんど無視できる。しかしより大きな陰イオンで構成される場合 (例えば K-gluconate など)、 -10 mV 以上になることがある。

<Liquid junction potential の測定法>

実験者は、使用している電極内液と細胞外液の間の liquid junction potential を知っておくことが望ましい。測定の手順を以下に示す。

1. 細胞外液は agar bridge と 3 M KCl を介して接地させる。まず電極内液と細胞外液をともに実験時の電極内液の組成にして、current-clamp モードで電位を 0 mV に合わせる。安定するまでに時間がかかることがあるので、安定するまで待つ。
2. 次に、細胞外液を実験時の外液組成に置換する。最終的に安定した電圧値が、liquid junction potential である。

(補足 6) 逆行性標識による神経細胞投射先同定法

スライスパッチクランプ記録においてバイオサイチンを充填した記録電極を用いると、局所回路内における神経細胞の軸索投射を追跡することができる。しかし、通常のスライス標本では、離れた脳領域への軸索投射を観察することは極めて困難である。目的とする脳領域に投射する神経細胞から選択的に記録を行うためには、あらかじめ投射先の脳領域に逆行性トレーサーを注入しておくが良い。トレーサーには、落斜蛍光顕微鏡で観察可能な蛍光物質が適している。我々は、dextran (MW 3,000) に結合させた Texas Red を用いている。ハミルトンシリンジで直接注入しても良いが、ガラス管を電極様に引いてポリエチレンチューブに繋げたものを用いると、局所的に注入できるとともに注入部位の機械的損傷を最小限に抑える効果がある。トレーサーが目的部位に到達するまでの期間は注入部位から細胞投射先までの距離に依存するため、予備実験をして動物の適切な生存期間を検討する必要がある。蛍光顕微鏡で蛍光標識された細胞を選び、写真撮影を行った後、ホールセル記録を行う。このとき、バイオサイチンを充填した記録電極を用いると、実験後のバイオサイチン可視化により記録細胞の同定ならびに形態の解析も可能となる。強く蛍光標識された細胞は、ホールセル記録には適さないことが多い (微分干渉顕微鏡では、細胞が膨張しているように観察される)。また逆行標識された

細胞に長時間に渡って励起光を照射することは、蛍光が退色するのみならず細胞自体にもダメージを与えるので避けるようにする。蛍光シグナルが明瞭で健康な細胞を短時間で選ぶことが重要である。

（補足 7）データ解析法

実験データの保存形式は、データ取得システムに依存する。例えば PULSE（HEKA 社）で取得したデータは、5 つのファイル形式（*.dat、*.pgf、*.pul、*.txt、*.amp）で保存できる。各データは、必要に応じて適切なファイル形式に変換した後、市販の解析ソフトで読み込む。一般的な解析ソフトへの適用例を下表に示す。

PULSE データの解析に適した市販ソフト

解析ソフト	適用	変換方法
Igor (WaveMetrics)	自由度の高いデータ解析、グラフ作成	機能拡張ファイル Patcher's Power Tools ^注 を介して、Igor から直接読み込む
Excel (Microsoft)	グラフ作成、統計処理	PULSE: Tree>Export (Full Sweeps) *.asc (ASCII ファイル) として保存
MiniAnalysis (Synaptosoft)	mEPSC/mIPSC の解析	PULSE: Tree>Export Full Sweeps ①Igor Binary (*.itx) として保存 ②ABF Utility を用いて*.abf に変換
PULSEFIT (HEKA)	トレースの kinetics 解析 (fitting)	
AxoGraph (AxoGraph Scientific)	自由度の比較的高いデータ解析、グラフ作成、トレースの kinetics 解析	PULSE: Tree>Export Full Sweeps データ取得ソフトが pClamp の場合変換不要
Origin (Origin Lab)	自由度の高いデータ解析、グラフ作成	PULSE: Tree>Export Full Sweeps pClamp の場合変換不要

注) インターネット上で無償配布されている (E. Neher's Laboratory)。