

## 「マウスおよびラット脊髄後角細胞からの in vivo パッチクランプ記録法」

九州大学大学院 医学研究院 統合生理学

古江 秀昌 園畑 素樹 吉村 恵

### はじめに

脊髄における感覚情報伝達機序の解析は in vivo 標本からの細胞外記録法による発火頻度の解析および細胞内記録法による活動電位やシナプス応答の解析によって、多くの事が明らかにされてきた [1, 2]. しかしながら、これらの方法では記録が大きな細胞に限られることやシナプス応答の詳細な解析が困難であるなどの問題があった。これに対して、いわゆるギガ・シールを形成し、小細胞からでも安定してイオンチャネル電流の解析を可能にしたパッチクランプ法 [3, 4] が、培養細胞や単離細胞、さらにはスライス標本に適用され、脊髄後角細胞におけるシナプス応答の詳細な解析が行われてきた [5, 6]. しかし、これら in vitro の実験系では、観察されたシナプス応答が如何なる感覚情報を運んでいるのか知ることは出来ず、得られた結果を in vivo 標本から得られた結果と関連づけて説明することは困難であった。そこで、著者らは in vivo 標本の脊髄後角細胞からのパッチクランプ法を開発した [7, 8]. この方法では細胞の状態が良いためか、慣れるとパッチクランプ記録は比較的容易で、かつ予想に反し S/N 比も良好で、興奮性シナプス後電流 (EPSC) や抑制性シナプス後電流 (IPSC) などシナプス応答の詳細な解析ができる。また、脊髄表面から直接薬物を投与してその作用を調べることができるなど、スライス標本を用いたパッチクランプ法と遜色はない。なによりも生理的な感覚刺激ができるため、vitro の系で観察されてきたシナプス

応答が如何なる感覚情報を運んでいるのかを知ることができる。

本稿では我々が用いているマウスおよびラット脊髄後角細胞からの in vivo パッチクランプ記録法について概説し、要点と思われるところを詳しく述べる。特に、マウスからの in vivo パッチクランプ法は遺伝子操作動物を対象にできるため、本方法は行動薬理学的手法を用いた研究と in vitro の実験の中間に位置し、vitro の結果を in vivo の結果と合わせて検討し、遺伝子操作によって生じた行動の変化をある程度説明できるものと期待される。

### 1 In vivo 標本の作製とパッチクランプ記録

ラット in vivo 標本の作製とパッチクランプ記録の実際については、他にも詳細を記したものがあるので参照して頂きたい [9]. ここではマウスを対象として in vivo 標本の作製法を述べて行きたい。基本的な標本の作製法やパッチクランプ記録自体はどちらの動物でも同様と考えて良いが、周知のとおりマウスはラットに比べ相当小さい (図 1A). そのため、鑷子や定位固定装置 (図 1B, 3A ~ D) など小型のものを用いる必要がある。

#### 1. In vivo 標本の作製

マウスの麻酔開始から、標本を作製し脊髄脳定位固定装置にセットするまで、約1時間を目安にして標本の作製を簡素化している。作製した標本からは10時間以上にわたって記録が可能で、また単一細胞から最長2時間にわたって安定した記

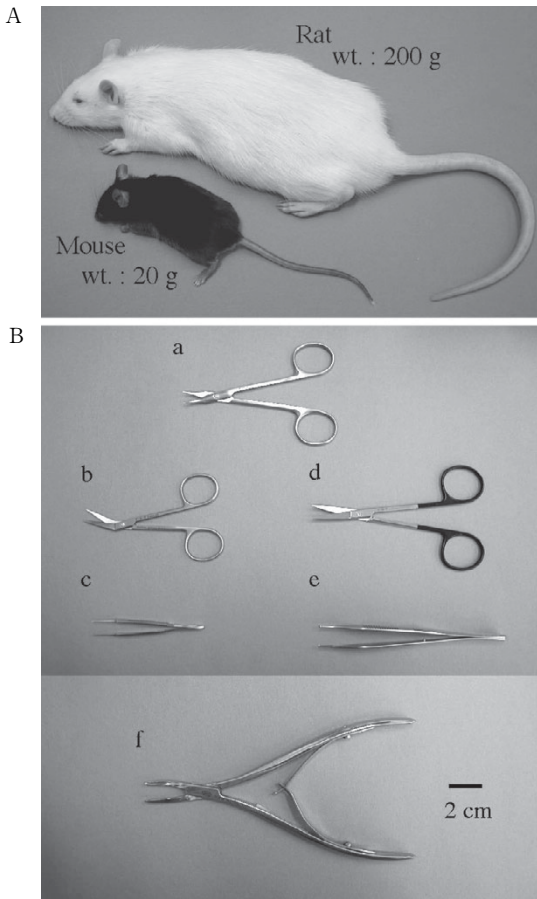


図1. A. マウスとラット. B. 手術器具  
 a. 骨剪刀反型 (FST 14077-10), b. 小膝状剪刀 (FST 14063-09), c. 小型有鉤鑷子 (FST 11066-07), d. 反剪刀 (FST 14059-11), e. 有鉤鑷子 (FST 11027-12), f. 骨鉗子 (FST 16021-14)

録が可能であった。4週～15週齢のマウスあるいはラット腹腔内にウレタンを投与して麻酔する(1.2～1.5 g/kg)。「ラットの手術法」[10]に詳細が記してある様にマウスにおいても麻酔の失敗は極力さける。ウレタンが腹腔内にうまく入らず皮下や筋肉に注射してしまい麻酔が効かない場合には、追加投与せずに新たに別のマウス・ラットを用いた方がよい。過剰な投与を行うと、次第に呼吸などが抑制され実験中に動物が死に至ることが多い。麻酔下に一侧の頸動脈にカニューレを挿入して血圧をモニターする。実験初期においては血圧モニターは必須にしていたが、実験に慣れて

くると後肢の足底や眼球の色および脊髄後正中静脈の色や小静脈の血球の流れが状態判断の目安となる。現在は動脈圧のモニターは必要なときのみ行っている。ただし、直腸温のモニターは行う。また、背側頸部皮下に生食を注射して補液とする。

呼吸などに伴う脊髄の振動を如何に抑制するかは、従来の細胞内記録法に用いられてきた *in vivo* 標本の作製法が参考となる [1]。ただし、細胞内記録法では、胸郭の振動を抑えるために人工呼吸下に気胸して換気量の調節を行う事が多いが、微小電極を刺入する細胞内記録法に比して、細胞膜を吸引して記録を行うパッチクランプ法は振動に強いので、気胸・人工呼吸を行う必要はない。人工呼吸・気胸なしでも1時間以上にわたる安定した記録が可能である。我々も当初は人工呼吸・気胸を行っていたが、気胸を行うとそれに伴う出血や肺の損傷でかえって状態を悪くすることが多かった。ただし、動物を良い状態に保てない場合や、神経線維や神経核を電気刺激する際に運動ニューロンの発火を伴って体動が生じる場合には、人工呼吸を行い筋弛緩薬等を投与する必要がある。この場合、マウスは200～400  $\mu$ l・150～250/minの換気量・頻度で、ラットは2～3ml・100～130/minで換気を行う。呼気終末CO<sub>2</sub>をモニターして換気が適当であるか判断する。マウス用人工呼吸器にはHugo Sachs Elektronik社製Mini Ventベンチレーター、ラット用にはHARVARD社製小動物ベンチレーターModel 683を用いた。

## 2. 椎弓切除

この過程が一番注意を要する。椎弓切除時に脊髄を損傷してしまうと、細胞の状態が悪くなりパッチクランプの成功率が低下する。通常6～7髄節にわたって脊椎を露出する。これは、脊椎を3～4点固定するために必要なスペースを確保するためである。まず、出血を最小にするために、皮膚を切開後、エピネフリン添加0.5%キシロカイン液を棘突起の両側に局注し(図2A)、図1Bに示している鋏b、有鉤鑷子c(ラットの場合はd、e)を用いて傍脊柱筋などを切除し脊椎を露出する(図2B)。脊髄を圧迫しないようにできるだけ

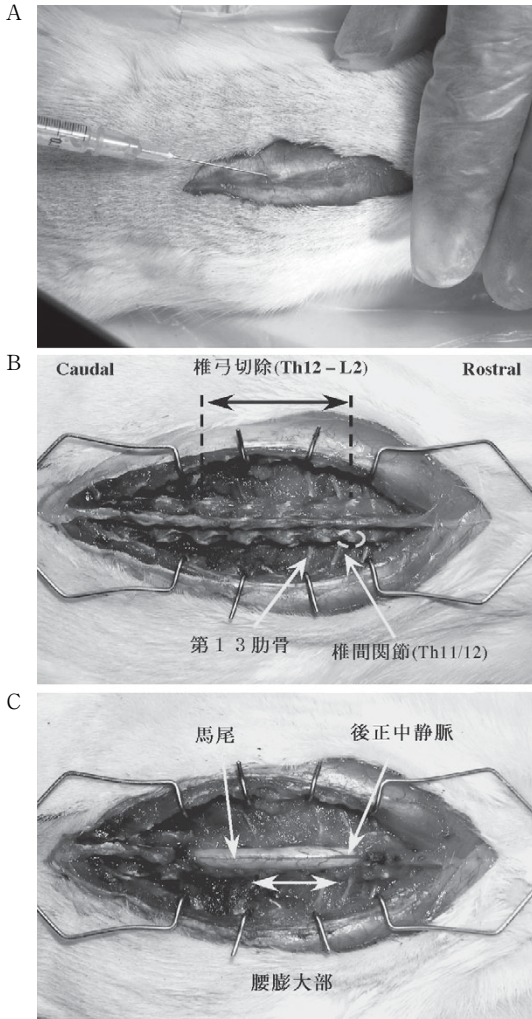


図2. 椎弓切除

A. 皮膚切開後のエピネフリン添加キシロカイン液の局注. B. 腰部脊椎の露出. C. 椎弓切除によって露出した腰膨大部.

刃先の細い骨剪刀 (図2B, a) を用いて椎弓切除を行う. Th11-Th12の下関節突起と上関節突起 (図2B) を両側離断し, Th12棘突起を把持して棘間靭帯を取り除くと脊髓の一部が見えてくる. ここから髄腔内へ刃先を入れ, 両側の椎弓根を順に切断していく. この場合必ず頭側から尾側に向かって切除していく. 逆に尾側から頭側に向かって切除を行うと, 椎弓根の切断が困難となり, 棘突起を持ち上げた時に上関節突起が髄腔内へ落ち

込み脊髓を損傷してしまうことがある. 刃先で脊髓を損傷しないために手元を低い位置に置き, 刃先を脊髓と平行に保って切除していくことが重要である. 余分な椎弓の一部が残った場合には骨鉗子 (図1B, f) で取り除く. 電動ドリルを用いて椎弓切除することも可能だが, かなりの時間を要する. Th12-L2の椎弓を切除すると, 腰膨大部が現れる (図2C). この状態で動物を固定装置にセットする.

### 3. In vivo 標本の固定およびクモ膜と軟膜の処理

イヤーパーを用いて頭部を固定した後, 椎骨を両側から挟んで計3カ所で固定する (図3B). 椎弓を切除した部分を頭側と尾側からそれぞれ1カ所ずつ, 椎弓を切除していないL3を1カ所固定する. 上下のみの2点固定では胸郭などの振動を抑制することは困難である. ラットは十分なスペースが確保できるため, 頭側のTh11をもう1カ所固定する (図3D). 実体顕微鏡下に硬膜を切開すると, 後正中静脈の両側に後根が観察される. 必要に応じて後根の一部をガラス棒で軽く圧排し記録電極の刺入のスペースを確保する. 図3Eに示すようにこの位置から記録電極を刺入して後角細胞にアクセスする. クモ膜と軟膜に微細欠みを用いて約0.2mmのパッチ電極刺入用の窓を開ける. 脊髓表面は38℃の酸素負荷したKrebs液で灌流し, 同じラインから必要に応じて薬物を投与する. 記録電極を刺入する深さからある程度記録細胞の同定は可能であるが, より詳しい同定は記録電極よりneurobiotinなどを注入し, 実験終了後に記録細胞を染色して細胞の同定を行う.

### 4. パッチクランプ記録

パッチクランプ記録は脊髓後角の表層から深層まで, どの層の細胞からでも記録が可能である. ただし, 第II層, いわゆる膠様質などの細胞密度の高い層からの記録の方が容易である. Borosilicate ガラスピペット (WPI, MTW150F-4) から, プラー (Sutter, P-97) を用いて一段引きでテーパーの長めの電極を作製する. これは刺入時に表層の細胞の損傷を少なくするためである. 電極抵抗は通常のK-gluconateやCs内液を充填して~10 MΩのものを用いる. 5 MΩ程度の電極

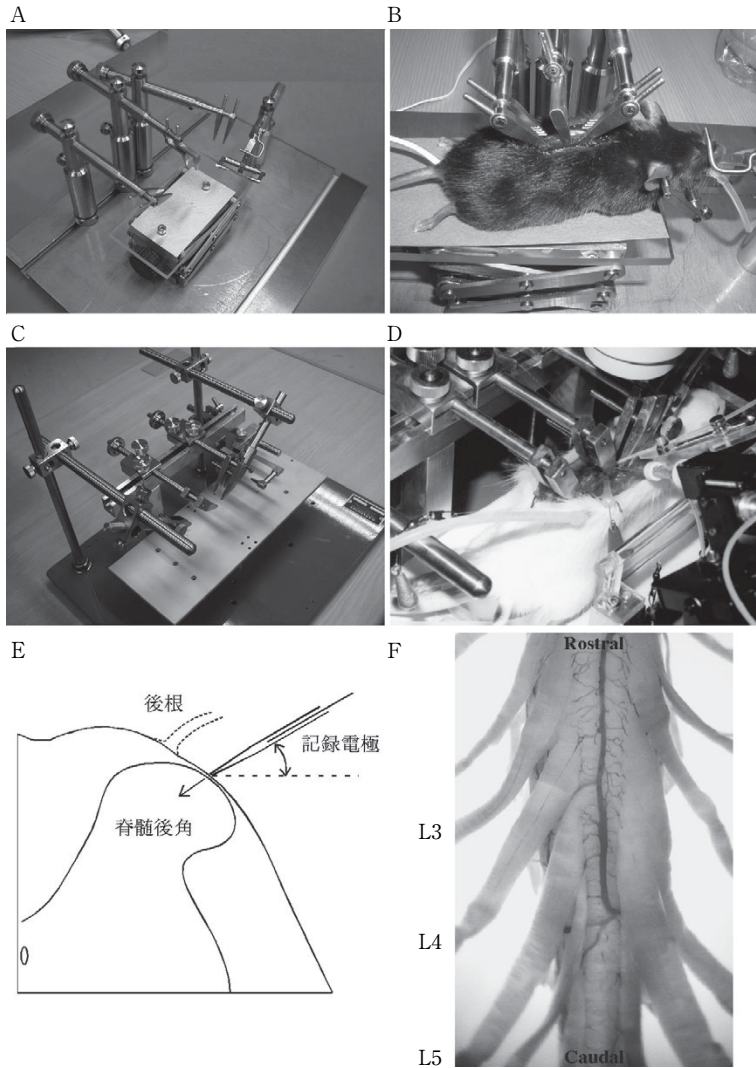


図3. Vivo標本の固定と後角細胞からの記録

A, B. マウス用脊髄定位固定装置と椎骨の固定. C, D. ラット用脊髄定位固定装置と椎骨の固定. マウス用脊髄定位固定装置 (STS-7) はナリシゲ科学機器研究所と著者らの共同研究によって開発したもの. ラット用脊髄定位固定装置: ナリシゲ社製ST-7. E. 脊髄後角横断面の模式図と記録電極のアクセス. F. 脊髄後根の同定.

でも記録は可能であるが、膠様質細胞などのサイズの小さな細胞は長時間キープすることが困難である。マイクロマニピレーターでパッチ電極を脊髄内へと刺入し、5mVステップに対する応答電流の変化を指標にギガ・シールを形成する、いわゆるブラインドパッチクランプ法によって記録を行う。記録電極が脊髄表面に達すると、基線の

揺れが確認される。この時のマニピレーターの目盛りを覚えておき、記録細胞の表面からの深さを求める。矩形波に対する電流が～10%ほど減少した時、陽圧を解除する。状態の良い標本では、50%以上の確率でギガ・シールが形成できる。この状態で1～2分待つと、シール抵抗値が次第に上がり5～20GΩの一定値に達する。陰圧を加

えてパッチ膜を破り、細胞をホールセルクランプする。通常のパッチクランプ記録と同様に、電流固定下で興奮性シナプス後電位 (EPSP) や活動電位、電位固定下で EPSC や IPSC が記録できる。同一細胞から最長2時間以上におよぶ記録が可能で、通常、1日に4~7細胞から記録を得ることができるなどスライス標本を用いたブラインドパッチクランプ法と遜色ない。

## 5. 皮膚への感覚刺激法

デルマトームに従って記録している細胞の脊髄レベルから受容野を決める。例えば、後肢に刺激を加える場合はL3~L5レベルの細胞から記録を行う。特にL4とL5の後根は幅が広い (図3F)、実体顕微鏡下でこれを指標にする。熱刺激装置にはペルチェ素子やレーザー光を用いたものがあるが、我々はハロゲン光を集光させて刺激を行っている (ダイヤモンド社製 DSP-705)。付属の温度センサーを用いて刺激と同時に皮膚温を計測する。触刺激はブラッシングで与えることができるが、一般に順応が早い安定したシナプス応答を記録することが出来ない。電磁弁を用いて定圧の空気を吹き付けて触刺激を加えると繰り返し安定した応答が記録できる。機械的痛みは有鉤鑷子を用いる。この場合も安定した応答を記録するには、毎回同じ強さで刺激を加える必要がある。著者らは、有鉤鑷子をマグネチックスタンドに固定し、重りをのせて機械的痛み刺激を加えている (図4A)。後肢以外の部位の刺激の反応を見る場合には、デルマトームに従って記録する髄節レベルを変える。必要に応じて椎弓切除を行うレベルも変える。

## II 感覚刺激によって誘起されたシナプス応答

### 1. 膠様質細胞の機械的痛みと触応答

最後にラット膠様質細胞および深層の細胞から記録した感覚刺激誘起のシナプス応答を紹介する。スライス標本を用いた研究から膠様質細胞は痛みを伝えるA $\delta$ 線維やC線維からの単シナプス性入力を密に受け [6]、痛みの伝達・調節に重要な役割を果たすと考えられている。膠様質細胞を-70 mVの電位固定下に置くと自発性のEPSC

が観察された。皮膚にpinch刺激を加えると、EPSCの振幅と発生頻度が著明に増大した。意外にも膠様質細胞は触刺激でも同様にEPSCの振幅と発生頻度が著明に増大した (図4B)。これらの応答はCNQXによって抑制され、どちらの刺激によっても緩徐なシナプス応答は観察されなかった。また、現在まで30以上の細胞で解析を行ったが、膠様質細胞は熱刺激には全く応答を示さなかった。このことから、膠様質細胞は熱覚を受容せず、機械的痛みと触覚を受容することが示された [7]。一方、IPSCを解析すると、膠様質細胞の多くは触刺激によってIPSCの振幅と発生頻度が著明に増大し、pinch刺激では刺激のはじめと終わりにのみIPSCの振幅が増大した (図4C)。pinch刺激では触刺激も同時に加わるため、刺激の始めと終わりに見られた一過性の応答は触刺激によって誘起されたと考えられた。これらの刺激によって誘起されたIPSCはGABAやglycineの拮抗薬で抑制された [11]。また、通常のパッチクランプ法と同様に、電流固定下でEPSPや活動電位の発生を記録することができる (図4D)。

### 2. 後角深層細胞の熱覚応答

熱覚はC線維によって脊髄へ伝えられ、C線維は膠様質などの表層に投射している。しかし、C線維が密に投射している膠様質から記録を行うと、上述のように熱刺激による応答は全く観察されなかった。そこで、記録電極を深層まで刺入してIV/V層の細胞から記録を行い熱刺激を加えた。その結果、約20%の細胞では熱刺激によってEPSCの発生頻度と振幅が著明に増大した。このことやスライス標本を用いた実験および免疫組織化学的研究から、熱覚は深層の細胞が表層へ延ばした樹状突起においてグルタミン酸を介して伝えられると考えられた。また、深層の細胞においても、機械的痛み刺激や触刺激によってEPSCの発生頻度と振幅が著明に増大した。

### 3. 脊髄後角における感覚情報の伝達機序

以上より、膠様質細胞においては機械的痛みと触刺激によって、深層の細胞においては機械的痛みと触刺激に加え熱刺激によってグルタミン酸を介したEPSCが誘起される。また、膠様質細胞に

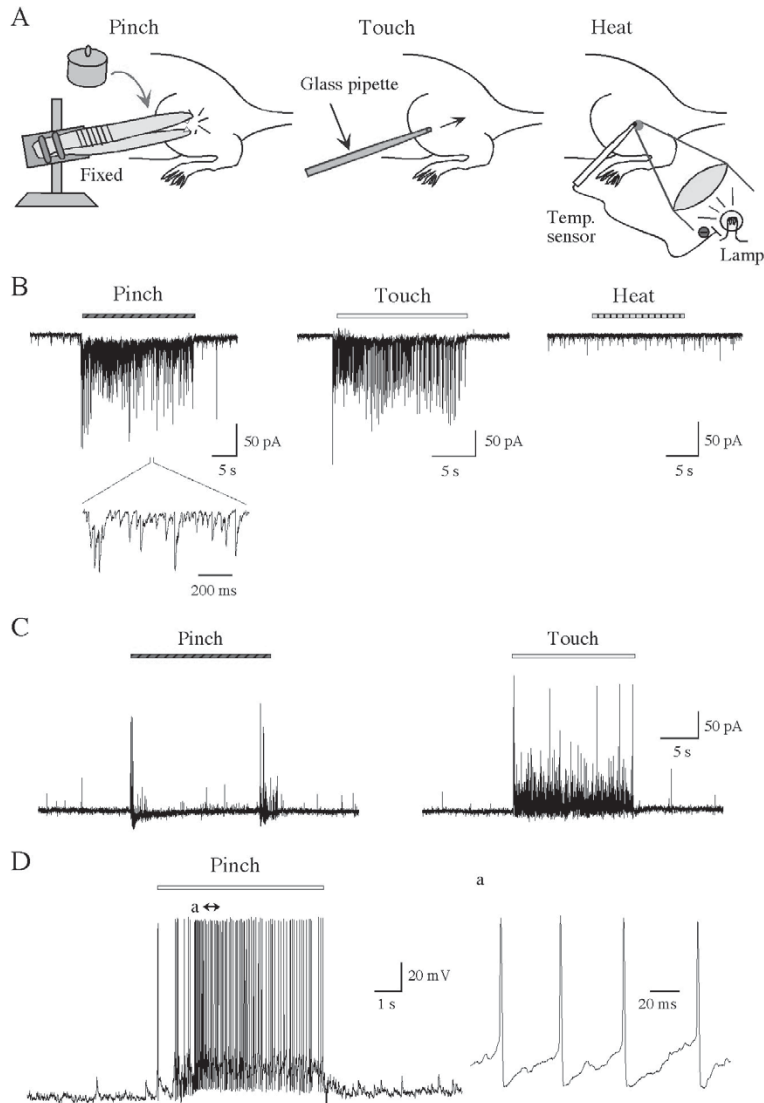


図4. 皮膚刺激によって誘起された膠様質細胞のシナプス応答  
 A. 皮膚への機械的痛み刺激（左），触刺激（中），熱刺激（右）. B.  $-70$  mVの電位固定下で記録した皮膚刺激誘起のEPSC. Pinch刺激と触刺激によってEPSCの振幅と発生頻度が著明に増大した（左・中）. 熱刺激には応答しない（右）. C.  $0$  mVの保持電位で記録したIPSC. Pinch刺激をくわえると，刺激のはじめと終わりにのみIPSCの振幅と発生頻度が増大した（左）. 触刺激では，持続してIPSCの振幅と発生頻度の著明な増大がみられた（右）. D. 電流固定下で記録した膜電位変化. 後肢皮膚へpinch刺激を加えると活動電位が発生した. 右のトレースはaで示す活動電位を速い時間軸で見たもの.

においてIPSCは痛みではなく，おもに触刺激によって誘起されることが明らかになった. このことは，痛み刺激ではおもにEPSCだけが誘起される

が，触刺激ではEPSCと同時にIPSCも誘起されることになる. 従って，痛み刺激と同時に触刺激が加わると痛みの伝達が抑制されることが示唆さ

れる。この膠様質における触刺激による痛み伝達の抑制は、我々が日常よく体験する痛みが生じた患部を撫でる、息を吹きかけるなどして痛みを和らげることの説明となるかもしれない。

## おわりに

近年、分子生物学的手法を用いた多くの研究がなされている。特に遺伝子操作動物を作製し、行動薬理的解析にスライス標本を用いた電気生理学的解析を併せて行い、多くの分子の機能が明らかにされてきた。しかし、*in vitro*のスライスの結果をそのまま行動変化と関連付けるには飛躍しすぎるとの感は否めなかった。本法は生理的感覚刺激によって誘起されるシナプス応答の詳細な解析ができるため、スライス標本を用いた*in vitro*の研究と行動薬理的研究の間に位置し、今まで困難であった*in vitro*の結果から行動学的な変化の説明をある程度可能にすることができ、分子機能の解明に大いに寄与することが期待される。さらに、LTPやLTDなど*in vitro*の系で観察されてきた可塑性が、実際に如何なる生理的刺激によって誘起されるかを明らかにできると思われる。

## 謝辞

マウス *in vivo* パッチクランプ法を開発するにあたり、脳脊髄定位固定装置の開発に多大なご協力を賜りました(株)成茂科学器械研究所の米山氏、関係者の皆様に心よりお礼申し上げます。また、椎弓切除の図を作成した大学院 加藤 剛君に感謝します。

## 文 献

1. Kumazawa T & Perl E R: Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. *J Comp Neurol* 177: 417-434, 1978.
2. Willis Jr. W D & Coggeshall E E: *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. 2nd edn. Plenum Publ Co, New York, 1991.
3. Sakmann B & Neher, E: *Single-Channel Recording*. Plenum Publ Co, New York, 1983.
4. 岡田泰伸, 挟間章博, 小原正裕: パッチクランプ法総論. 新パッチクランプ法, 岡田泰伸編, 吉岡書店, 京都, pp14-30, 2001.
5. Yoshimura M & Nishi S: Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents. *Neurosci* 53 (2): 519-526, 1993.
6. Yoshimura M: Slow synaptic transmission in the spinal dorsal horn. In: *Progress in Brain Research*, Ed. Kumazawa T, Kruger L & Mizumura K, Elsevier Publ Co, Amsterdam, Vol 113 pp 443-462, 1996.
7. Furue H, Narikawa K, Kumamoto E & Yoshimura M: Responsiveness of rat substantia gelatinosa neurons to mechanical but not thermal stimuli revealed by *in vivo* patch-clamp recording. *J Physiol (Lond)* 521: 529-535, 1999.
8. Light AR & Willcockson HH: Spinal laminae I-II neurons in rat recorded *in vivo* in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. *J Neurophysiol* 82: 3316-3326, 1999.
9. 吉村 恵, 古江秀昌: *In vivo* パッチクランプ法. 新パッチクランプ法, 岡田泰伸編, 吉岡書店, 京都, pp 140-146, 2001.
10. 片瀬俊彦: ラットの実験法, *日本生理学雑誌* 63 (10) : 261-270, 2001.
11. Narikawa K, Furue H, Kumamoto E, Yoshimura M: *In vivo* patch-clamp analysis of IPSCs evoked in rat substantia gelatinosa neurons by cutaneous mechanical stimulation. *J Neurophysiol* 84: 2171-2174, 2000.