凍結株化細胞製品

株化ミクログリア 6-3 細胞

【 6-3 Microglia Cell Clone, Code No.COS-NMG-6-3C 】

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2022 年 8 月 8 日改訂

I. 製品概要

これまで知られているミクログリア株化細胞は、マクロファージ様性質が強く、ガン遺伝子や遺伝子変異をもっているために細胞の増殖の調節が難しいなど生体内でのミクログリアの性質とは大きく異なっていました。

名古屋大学 環境医学研究所　澤田　誠　教授が樹立した株化ミクログリア 1）は、これまで知られている株化細胞とは異なり、増殖因子依存的に細胞増殖し、増殖因子非存在下では増殖能を失い分岐したミクログリア（ramified form）へと誘導するなど、生体内の脳内で見られるミクログリアを in vitro でも再現できる新規な株化細胞です。

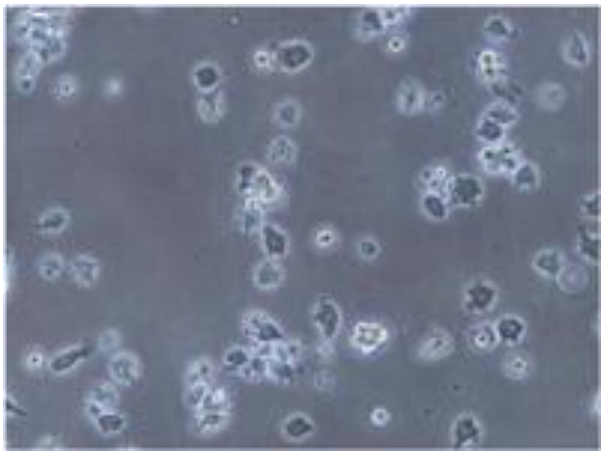

図 1　株化ミクログリア（6-3）

II. 使用前注意事項

品番：COS-NMG-6-3C は非営利機関のお客様向け、品番：COS-NMG-6-3CP は営利機関のお客様向けの販売となります。
本製品は取扱い上の注意点が多くあるため、本マニュアルを使用前に必ずご確認ください。
本製品はすべて【無菌操作】で実施して下さい。バイオセーフティーレベルは【レベル 1】です。
本製品の培養には別売の専用メディウム・専用スクレーパーをご使用下さい。
下記 URL に取扱説明動画を用意しております、是非ご参照ください。
URL: http://www.primarycell.com/hanbai/microglia_clone.html
お困りの際には、本マニュアルのトラブルシューティングや下記 URL の FAQ をご確認ください。
URL：http://www.primarycell.com/faq.html#microglia_cell

III. 製品の保証について

細胞を液体窒素にて正しく保存し、専用メディウム及び試薬を用いてマニュアル通りに培養された場合のみ、培養開始後の増殖不良に関して保証致します。
当社、製品サポート（メール：primarycell@cosmobio.co.jp）までご連絡下さい。
保証期限は【製品お受け取りから 6 ヶ月以内】です。
メディウムや使用方法に変更を加えられた場合や、再凍結した細胞を使用された場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

IV. 製品構成

構成	容量	本数	保存方法	有効期限
6-3 細胞（凍結細胞）	1×10^6cells/vial	1 本	液体窒素保存	6 ヶ月

※受け取り後、直ちにご使用にならない場合は凍結細胞を液体窒素にて保存してください
※細胞はマイコプラズマ陰性確認済

V. 細胞の由来

マウスの primary ミクログリアからクローニング（C57BL マウス）

VI. 専用メディウム＆専用セルスクレーパー（別売）

品名	品番	容量	保存方法	有効期限
株化ミクログリア用メディウム	COS-NMGM	250 mL	－20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ボトル記載(－20℃保存) 解凍後 3 ヶ月(4℃保存)
株化ミクログリア専用セルスクレーパー	COS-NMGS	3 本	－	－

培地の主成分：EMEM、血清、抗生剤、その他

VII. 培養サービス紹介

株化ミクログリアは新規なクローン細胞で、非常に取扱いが難しい細胞です。
高度な培養技術を必要とするため、当社では "培養サービス"も承っております。

株化ミクログリアは、
解凍時にダメージを受けやすい。
マイコプラズマ感染などコンタミを起こしやすい。
播種数や GM-CSF 濃度を適切に調節しないと細胞が接着せずに死んでしまう。
適切な条件でないと増殖しない。
など多くの注意点があります。

再度解凍からのやり直す場合の大幅な時間・コストのロスを懸念されるお客様や、細胞培養の経験が少ないお客様には、培養サービスをお勧めいたします。お気軽にお問い合わせください。

VIII. 操作方法

※本製品は【継代可能】です。

細胞解凍・播種

※下記は、100 mm dish で培養する場合のプロトコールになります。
※取扱の注意点に関しては、動画【株化ミクログリア手引 1-取扱の注意-】も参考にしてください。
URL: http://www.primarycell.com/hanbai/img/microglia_Cell_Clone_1.wmv
※作業の内容は動画【株化ミクログリア手引 2-細胞の解凍-】も参考にしてください。
URL: http://www.primarycell.com/hanbai/img/microglia_Cell_Clone_2.wmv
なお、動画内容は頻繁に更新できないため、取説の方法が最新のプロトコルとなります。

【準備するもの】

・ 株化ミクログリア用メディウム
※細胞の解凍前に予め、冷蔵で溶解しておいて下さい。加温での溶解は添加成分の劣化を招くためお勧め出来ません。

・ GM-CSF（推奨品：R&D 社製、Cat No.415-ML-010/CF、10μg）
※細胞の解凍前に予め、試薬のプロトコールに従い溶解しておいて下さい。

・ 殺菌・消毒用試薬
例：塩素系消毒剤、消毒用エタノール、マイコプラズマ殺菌剤（関連製品：BIOLOGICAL INDUSTRIES 社製、Pharmacidal (spray bottle) for disinfecting surfaces、Cat No. IC-110100、1L、コスモ・バイオ㈱）

【作業前準備】

・ クリーンベンチ内を消毒用エタノール・マイコプラズマ殺菌剤で消毒しておいてください。
※マイコプラズマに感染しやすい為、作業時はマスク・手袋を必ず着用してください。

・ 使用したピペットを浸漬するための薄めた塩素系消毒剤をバケツ等にいれてクリーンベンチの側に置いておいてください（飛沫感染予防のため）。

・ 使用したチップを捨てるためのフタ付きのゴミ箱等をクリーンベンチ内に入れておいてください（飛沫感染予防のため）。

・ クリーンベンチ内にメディウム・シャーレ・プラスチックピペット・マイクロピペット・氷冷するための氷等を予め準備しておいてください。
※クリーンベンチ内に入れる物は全て消毒用エタノール・マイコプラズマ殺菌剤等で消毒してから入れるようにしてください。

1. 凍結細胞のバイアルを、37℃温水にて 2 分加温して解凍してください。

2. 解凍した細胞液は、予め室温に戻した株化ミクログリア用メディウム 10 mL が入っている 50 mL 遠沈管に移し混和した後、遠沈管内の株化ミクログリア用メディウムを 1 mL 分取し、バイアルを共洗いして細胞液を回収してください。

3. 細胞懸濁液を全量、細胞培養用 100mm dish（播種密度：約 9×10^4 cells/cm^2）に播種し、5%CO_2 存在下の 37℃インキュベーターで 2～3 時間培養してください。

4. 培養後、細胞が底面に接着したのを確認したら（接着の状態は【図 2】を参照してください。）、GM-CSF をマイクロピペットで添加し再度インキュベーターで培養してください。GM-CSF 濃度は推奨品（100 μg/mL）の場合、3000～5000 倍希釈で添加してください。

   ※GM-CSF は播種後、細胞が容器に接着してから、添加してください（通常 2～3 時間後）。未接着の状態で添加すると、浮き細胞が増えやすくなります。

5. 細胞の状態は 2～3 日毎に確認してください。播種翌日に 1 回、その後は 3～4 日毎に以下のプロトコール【培地交換】に従って培地交換を行って下さい。

   ※細胞の状態や増殖スピードは GM-CSF の濃度に左右されます。細胞の状態が良好で、かつ 7~10 日で約 10 倍程度に増殖するように濃度は適宜調整してください。解凍直後は細胞の状態が不安定なため、GM-CSF の濃度は 3000 倍希釈から開始し、3～4 日でコンフルエントになってしまう場合には継代後、徐々に濃度を下げていくことを推奨しております。

※株化ミクログリアは貪食能を持っているため、死細胞（黒く変色した浮き細胞等）を貪食することで形質が変わることがあります。解凍後、死細胞が多く観察される場合はプロトコール【培地交換】に従い、速やかに培地交換を行ってください。

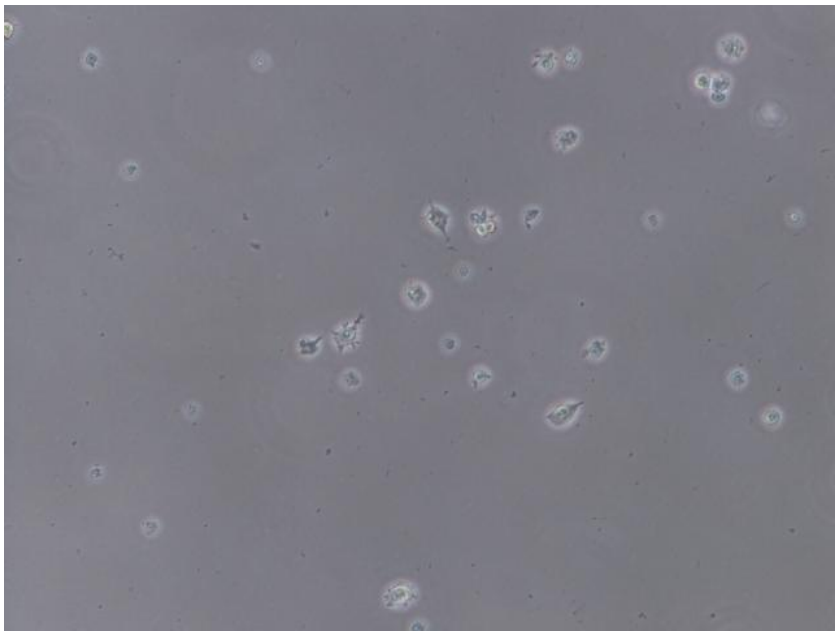

図 1 播種 2～3 時間後（6-3）

培地交換

※作業の内容は動画【株化ミクログリア手引 3-培地の交換-】も参考にしてください。
URL: http://www.primarycell.com/hanbai/img/microglia_Cell_Clone_3.wmv
なお、動画内容は頻繁に更新できないため、取説の方法が最新のプロトコルとなります。

【準備するもの】
・ 株化ミクログリア用メディウム

【作業前準備】
・ クリーンベンチ内を消毒用エタノール・マイコプラズマ殺菌剤で消毒しておいてください。
※マイコプラズマに感染しやすい為、作業時はマスク・手袋を必ず着用してください。
・ 使用したピペットを浸漬するための薄めた塩素系消毒剤をバケツ等にいれてクリーンベンチの側に置いておいてください（飛沫感染予防のため）。
・ 使用したチップを捨てるためのフタ付きのゴミ箱等をクリーンベンチ内に入れておいてください（飛沫感染予防のため）。
※クリーンベンチ内に入れる物は全て消毒用エタノール・マイコプラズマ殺菌剤等で消毒してから入れるようにしてください。

1. 株化ミクログリア用メディウムをクリーンベンチ内でメディウム交換に必要な分だけ遠沈管等に分取し、37℃のウォーターバスで加温してください。

※メディウムは繰り返しの加温や保存温度が適正でないなどの原因により劣化する場合があります。

2. 株化ミクログリアの状態を位相差顕微鏡で確認してください。

   ※株化ミクログリアは、通常の細胞のように底面に面で接着するのではなく、突起を出して軽く接着した状態で増殖します。また、増殖の際に接着力が低くなる細胞の為、若干の浮き細胞が観察されますが、接着している細胞が多い分には問題ありません。浮き細胞が増えすぎる場合は、GM-CSF の濃度を低くしてください。

3. 加温したメディウムをクリーンベンチ内に入れた後、ディッシュの上清を除去し、加温した株化ミクログリア用メディウムを 10 mL 加えてください。

   ※株化ミクログリアは、接着力が弱い為、メディウムはディッシュの壁に沿うようにゆっくり添加してください。

4. GM-CSF をマイクロピペットで添加し 5%CO2 存在下の 37℃インキュベーターで培養してください。GM-CSF 濃度は推奨品（100 μg/mL）の場合、3000～10000 倍希釈で添加してください。

<u>細胞継代</u>

※作業の内容は動画【株化ミクログリア手引 4-細胞の継代-】も参考にしてください。
URL: http://www.primarycell.com/hanbai/img/microglia_Cell_Clone_4.wmv
なお、動画内容は頻繁に更新できないため、取説の方法が最新のプロトコルとなります。

【準備するもの】
- 70～90%コンフルエントになった細胞
- 株化ミクログリア用メディウム
- 株化ミクログリア専用セルスクレーパー
- Trypan Blue

【作業前準備】
- クリーンベンチ内を消毒用エタノール・マイコプラズマ殺菌剤で消毒しておいてください。
  ※マイコプラズマに感染しやすい為、作業時はマスク・手袋を必ず着用してください。
- 使用したピペットを浸漬するための薄めた塩素系消毒剤をバケツ等にいれてクリーンベンチの側に置いておいてください（飛沫感染予防のため）。
- 使用したチップを捨てるためのフタ付きのゴミ箱等をクリーンベンチ内に入れておいてください（飛沫感染予防のため）。
- クリーンベンチ内にメディウム・シャーレ・プラスチックピペット・マイクロピペット・氷冷するための氷等を予め準備しておいてください。
  ※クリーンベンチ内に入れる物は全て消毒用エタノール・マイコプラズマ殺菌剤等で消毒してから入れるようにしてください。

1. 株化ミクログリアの状態を位相差顕微鏡で確認してください。細胞の状態は【図 3】を参照してください。

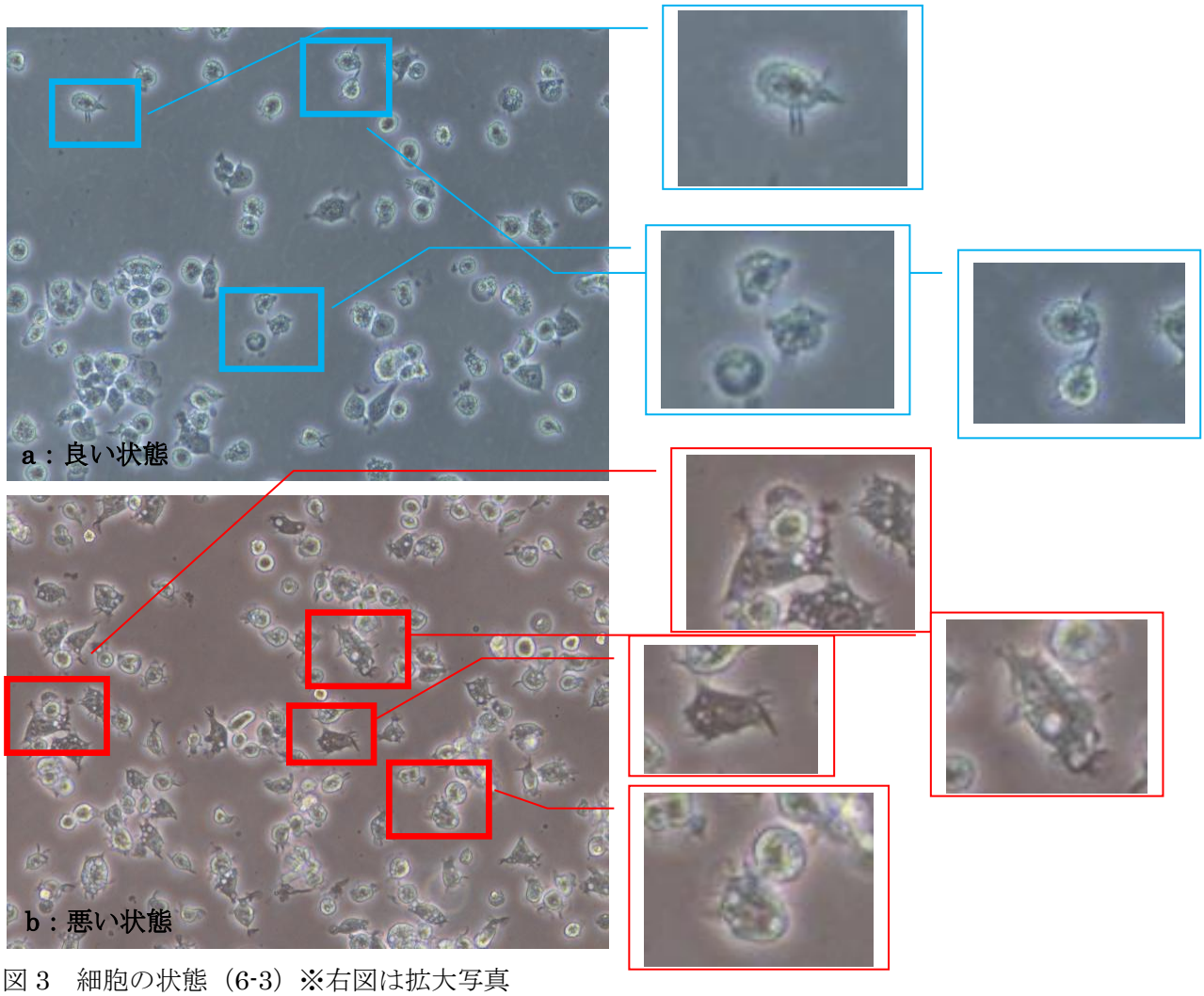

図 3　細胞の状態（6-3）※右図は拡大写真

※他の株化細胞とは異なり、非常に細胞間の隙間が大きい状態で増殖します。上図の a の状態でサブコンフルエントとなるため、継代を行ってください。□で示したように球形の細胞が数本の突起を出してゆるやかに接着している状態が状態の良い細胞です。b のように over culture となると□で示したような巨大なアメーバ状の形質の異なる細胞が散見されるようになります。継代を行うことで除外されることも有りますが、継代を行っても除外されない場合、凍結ストックからの再培養を行ってください。

2. 50 mL 遠沈管に 10 mL の株化ミクログリア用メディウムを入れ、氷冷しておいてください。

3. 70～90%コンフルエントになった細胞を用意し、培養容器から培養上清を除いてください。

4. 50 mL 遠沈管に入ったメディウムを 1～2 mL 添加し、専用セルスクレーパーで迅速かつ優しく細胞を剥離してください。

   ※継代時のダメージにより、細胞の状態が悪くなることがあります。特にセルスクレーパーで剥離してから、培養容器に播種するまでの時間が長いとダメージを受けやすくなります。作業は速やかに行ってください。

   ※セルスクレーパーは細胞にダメージを与えないよう、先端が柔らかくなっています。先端が折り曲がらない程度に優しく剥離してください。セルスクレーパーの使い方は動画【株化ミクログリアの手引】も是非ご参照ください。使用したセルスクレーパーは、洗浄後、オートクレーブ滅菌により、再度使用することができます。

5. 剥離した細胞をメディウムが入った 50 mL 遠沈管に戻し、ピペッティングして攪拌し、細胞懸濁液とします。

6. 細胞懸濁液の一部を Trypan Blue 等で染色した後、カウントしてください。

   ※細胞の生存率は、細胞の状態を判断する上で重要な指標となります。継代時のダメージにより、株化ミクログリアの状態が【図 3：b】のように悪い状態に傾くこともあります。同様に、剥離した細胞を凍結保存する際にも、剥離後の生存率が低いと解凍後の状態が【図 3：b】のように悪い状態になることがあります。

7. 細胞を 0.5～1×10^4 cells/cm2 の濃度で播種し、5%CO2 存在下の 37℃インキュベーターで 2～3 時間培養してください。

8. GM-CSF をマイクロピペットで添加し 5%CO2 存在下の 37℃インキュベーターで培養してください。GM-CSF 濃度は推奨品（100 μg/mL）の場合、3000～10000 倍希釈で添加してください。

9. 3~4 日毎にメディウム交換を行ってください。交換の際、GM-CSF を添加してください。

<u>凍結ストックの調製</u>

※株化ミクログリアは培養・維持が難しい細胞の為、継代数が早い段階での凍結ストックの作成をお勧めしております。

1. 細胞継代方法の 1～6 を行います。

2. 4℃、200 ×g、5 分間遠心後、上清を除去し、COS banker(KOJ 製品コード COS-CFM01）を 1×10^6 cells/mL になる様に加えて懸濁します。

3. 凍結保存用チューブに 1mL/チューブで分注し、細胞凍結用コンテナ(BM 機器 製品コード BCS-136 または 同等品)を用いて-80℃で凍結保存します。

4. １日以上-80℃にて静置後、液体窒素中に移してください。

IX. トラブルシューティング

細胞を解凍後、播種したが細胞の接着が悪い

株化ミクログリアは、通常の細胞のように底面に面で接着するのではなく、突起を出して軽く接着した状態で増殖します。また、増殖の際に接着力が低くなる細胞の為、若干の浮き細胞が観察されますが、接着している細胞が多い分には問題ありません。ほとんどの細胞が浮いてしまうような場合は、GM-CSF の濃度が高すぎる可能性があります。株化ミクログリアは解凍時にダメージを受けやすいため、状況が改善しない場合は、再度スペアからの解凍をお試しください。お急ぎのお客様や本細胞の培養に懸念をお持ちのお客様は「株化ミクログリア培養サービス」URL :http://www.primarycell.com/hanbai/microglia_clone.html をご利用ください。

細胞を解凍後、播種したが細胞が増えない

株化ミクログリアは、他の株化細胞とは異なり、非常に細胞間の隙間が大きい状態で増殖します、細胞の増殖度合いは図 3 を参照してください。図 3 と比較しても、細胞の増殖が観察出来ない場合、細胞の増殖度合いは GM-CSF の影響を強く受けるため、GM-CSF の濃度を上げてみてください。GM-CSF の濃度を上げても、増殖が認められない場合は、解凍時にダメージを受けすぎている可能性があります。【図 3：b】で示したような悪い状態の細胞が 1 視野に多く認められる場合は、再度スペアからの解凍をお試しください。または「株化ミクログリア培養サービス」URL :http://www.primarycell.com/hanbai/microglia_clone.html をご利用ください。

細胞が増殖しなくなった・細胞の状態が変化した

- 継代時にダメージを受けすぎている
  ※継代作業は迅速に行なってください。ディッシュの数が多い場合は数回に分けて作業を行ってください。
- 継代の頻度が不適切である
  ※Over confluent は細胞の状態を悪化させる原因となります。早めの継代を心がけてください。
- GM-CSF の濃度が不適切である
  ※GM-CSF の濃度は、お客様の培養状況によって適宜調整してください。増殖が良すぎたり、浮き細胞が多すぎる場合は濃度を下げ、逆に増殖が低かったり、接着が強すぎたりする場合は濃度を上げてください。
- マイコプラズマに感染した
  ※貪食能があるため、通常の細胞に比べてマイコプラズマに感染する可能性が高いです。培養作業や培養環境は、十分に注意してください。

上記の原因により、細胞の状態が悪化してしまった場合、継代によって状況が改善する可能性もありますが、凍結ストックからの再培養をお勧めしております。弊社製品の解凍後は、できるだけ早い段階で凍結ストックを調製することをお勧め致します。また、お客様のお手元で凍結された株化ミクログリアに関しては、リプレイス等の保証の対象外となりますので、予めご了承くださいますようお願い申し上げます。

セルスクレーパーは市販品も使用できるか

株化ミクログリア剥離の際のダメージを最小限に抑えられるよう、専用に作られたスクレーパーとなっています。剥離の際のダメージが大きいと増殖や細胞の状態に影響が出るため、専用のスクレーパーをご使用ください。専用スクレーパーは滅菌バッグ等で滅菌しての再利用が可能です。先端のシリコンゴムの劣化や硬化が認められれば交換時期です。新しい専用スクレーパーをご購入ください。

手持ちの培地を使用できるか

株化ミクログリアは血清のロットの影響を受け易い為、弊社専用の培地をご使用ください。培地に関しては、抗生剤なしや容量の可変等のご希望があれば、特注にて対応しております。お手持ちの培地を使用した場合、全ての保証の対象外となりますのでご注意ください。なお、培地組成の詳細に関しては非開示とさせて頂いております。何卒ご了承ください。

X. 技術情報

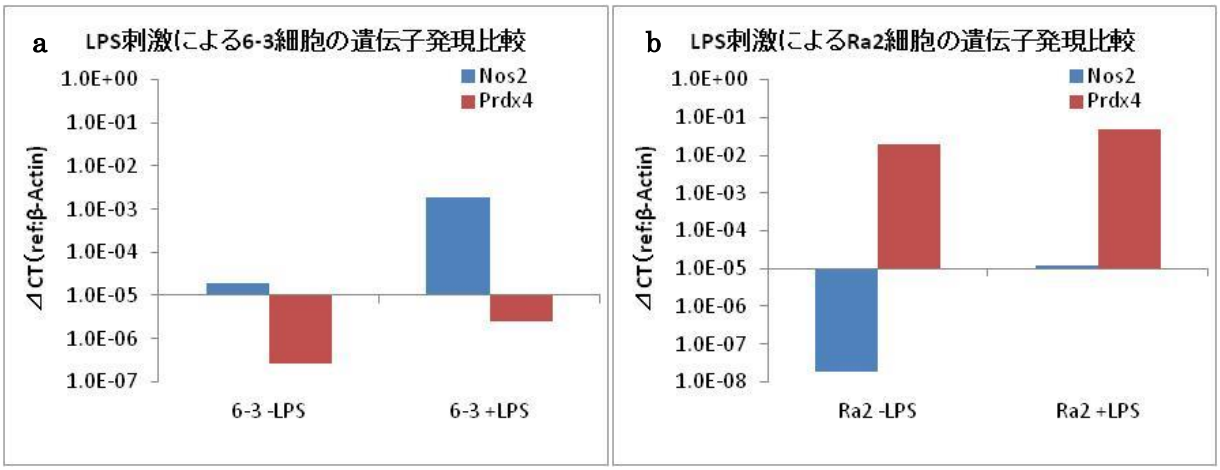

図 4　6-3 細胞と Ra2 細胞の違いについて
a：6-3 細胞は、マクロファージ様の傾向が強く、Nos-2 の発現が高く、逆に Prdx4 の発現が低い特徴を持っています。
b：Ra2 細胞は、神経保護に働く傾向が強く、Prdx4 の発現が高く、逆に Nos-2 の発現が低い特徴を持っています。
どちらの細胞も LPS（1 μg/mL）刺激により、両遺伝子の発現が増強されます。

XI. 参考文献

1) Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Hayakawa, M., Kanno, T. and Nagatsu, T. (1998) Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain. FEBS Lett. 433, 37–40.

《本製品をご利用になられた文献、発表データ 》

本製品をご利用いただいて投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付先：〒047-0261　北海道小樽市銭函 3 丁目 513 番 2
コスモ・バイオ株式会社　札幌事業部　あて郵送
または　primarycell@cosmobio.co.jp　あて PDF ファイル送信

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : http://www.cosmobio.co.jp/

● 営業部（お問い合わせ）
TEL : (03) 5632-9610　FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部（技術的なお問い合わせ）
TEL : (0134) 61-2301　FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp
URL : http://www.primarycell.com/