



初代細胞製品（培養細胞）

初代ミクログリア培養キット（C57BL/6 マウス）

【Primary Microglia Culture Kit (C57BL/6 mouse), 品番：MGC57】

2024年7月1日改訂

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

I. 製品概要

ミクログリア（microglia 小膠細胞）は、脳脊髄中に存在する神経膠細胞の1つであるが、他の神経膠細胞は外胚葉由来に対しミクログリアは中胚葉由来と起源が異なっていると考えられています。

正常個体でのミクログリアは、胎生後期から出生直後までは球状の ameboid microglia として存在し、死細胞の除去などの活発な貪食能を示すが、生後2週間以降から分岐した形態 (ramified form) の resting microglia が増加し、成熟個体の脳実質に豊富に存在するようになります。炎症や変性などの障害を受けた神経組織では reactive microglia が出現し、病変の修復に関与します。また、Fc レセプター、補体レセプター、MHC の発現、インターロイキン1の分泌を行い、中枢神経系の免疫担当細胞としての役割を有する可能性が示唆されています。

本培養キットは、出生直後の脳から分離したミクログリア (ameboid microglia) で、形態・機能の維持に最適な条件下である混合培養系（ミクログリア、アストロサイト・神経細胞・線維芽細胞などが含まれた状態）で培養したフラスコと培地をセットにしております。混合培養系のため、同じフラスコから数回ミクログリアを回収することが可能です。

ミクログリアの機能解明、アルツハイマー治療薬の開発、免疫反応実験などにご利用ください。

II. 使用前注意事項

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。

本製品の培養には付属の専用メディアウムをご使用下さい。

III. 製品の保証について

製品は培養された状態で納品されます。到着後すぐに CO₂ インキュベーターに入れて培養を開始してください。

製品は保存できません。到着後速やかに実験にご使用ください。

製品は到着時又は翌日に細胞の状態を確認して下さい。

専用メディア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、製品到着後の生育不良に関して保証いたします。

保証期限は【製品お受け取りから翌日まで】です。

また、増殖不良や分化不良に関しては、製品サポートまでお問い合わせ下さい。

メディアウムや使用方法に変更を加えられた場合は、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
マイクログリア (混合培養系)	75cm ² フラスコ	2 枚
マイクログリア培養用メディウム	250 mL	1 本

※専用メディウムは単品販売もごさいます。

使用動物組織 : C57BL/6 マウス・0 日～1 日齢の脳
細胞採取日 : XXXX 年 XX 月 XX 日
発送日 : XXXX 年 XX 月 XX 日
Lot No. : XXX-C-XXX

V. 培養用メディウムの主成分

品名	主成分
マイクログリア培養用メディウム	D-MEM (high glucose)、血清、その他

VI. 操作方法

※本製品は【継代不可】です。

細胞培養－混合培養系での培養方法

本培養キットのフラスコは、細胞をシート状に培養した状態でお送りいたしております。製品がお手元に届きましたら、細胞シートが剥がれていないかを位相差顕微鏡等で確認してください。

納品後 1～2 週間は、混合培養系のフラスコからマイクログリアが増殖および浮遊しますので、マイクログリアを数回収することが可能です。回収できる細胞数は、2 ないし 3 回目までは 1 フラスコあたり 4～6×10⁵cells 程度、それ以降回収できる細胞数は徐々に少なくなります。

1. 輸送時にフラスコ内を培養用メディウムで充填していますので、無菌的にフラスコから培養用メディウムの残量を 10～12mL になるまで抜き取ってください。
2. 5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで 2～4 日間培地交換をせずに培養してください。通常、この培養日数でマイクログリアが浮遊してきます (図 1 参照)。
3. 細胞培養－マイクログリアの回収 に続く。

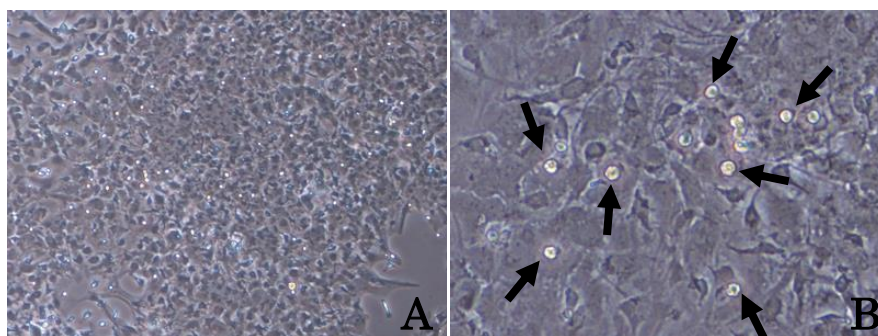


図 1. 細胞形態

A. 混合培養系での細胞形態

B. 混合培養系の強拡大像。

矢印は浮遊しているマイクログリアを示す。

細胞培養—マイクログリアの回収

【準備するもの】

- ・回転式シェイカー

※：マイクログリアはプラスチックに接着しやすい為、使用するチップ、ピペットおよび遠沈管などは、一度培地で内面を濡らしてから使用することをお勧めいたします。マクロファージ接着防止コーティング剤（品番：MAA-50）の使用も効果的です。

1. マイクログリアが浮遊してきた状態のフラスコを用意してください。
2. キャップをきちんと閉めた後、室温で30分～1時間シェーカー（50～150rpm^{※1}）で振盪してください。
※¹：回転数は使用機器によって異なりますが、回転数の目安として回転直径が25mmでは50rpm前後、回転直径が大きいものは回転速度を遅くしてください。フラスコ内の培地が跳ねない程度を目安にゆっくりと振盪させてください。
※ 振盪による回収率の上昇は10%程度のため、マイクログリアにできるだけダメージを与えない等の目的がある場合は、振盪の工程は不要です。
3. 振盪させたフラスコ内の上清を回収してください。さらにマイクログリアの純度を高める場合は、マイクログリアの精製をご覧ください。
※ 上清を回収したフラスコは、再度数日間培養することでマイクログリアを回収することが可能となりますので、37℃に加温した培養用メディウムを新たに10～12mL加えて数日間培養してください。
4. 4℃、200×gで5分間遠心してください。
5. 上清を除去後、培養用メディウム1～2mLを加えて沈殿した細胞を浮遊し、血球計算盤で細胞数をカウントしてください。
※血球計算盤やチップ等に細胞が付着するため、正確な細胞数は算出できません。あくまで血球計算盤の結果は参考値としてください。
6. 適切な細胞密度になるように播種して任意の実験系に供してください。

マイクログリアの精製

※精製はマイクログリアの純度を上げますが、接着させる工程を含むため、マイクログリアにとってはダメージになります。ダメージを受けるとマイクログリアは炎症性の傾向を強めるため、マイクログリアの非炎症性の実験を行う場合には、精製の作業は不要です。

【準備するもの】

- ・浮遊細胞用90mmディッシュ（イナ・オプティカ社製、品番：I-90または同等品）
- ・滅菌済みPBS（-）
- ・回転式シェイカー
- ・セルスクレイパー、もしくは1mM EDTA/PBS（-）溶液

細胞培養－ミクログリアの回収の1～3まで共通。

1. 回収した上清を浮遊細胞用ディッシュ 1～2 枚に播種し、5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで 30 分～2 時間培養してください。この培養時間は球状のミクログリアのみを培養面に接着させるように調整してください。長時間の培養では他の細胞も接着し始めますのでご注意ください。
2. 培養したディッシュから培地を除去後、PBS (-) で 2～3 回洗浄し、未接着細胞を除去してください。
3. 付着したミクログリアをセルスクレイパー又は 1mL の 1mM EDTA 溶液で剥離してください。
4. 培養用メディウムを 10mL 添加し、剥離したミクログリアを遠沈管に回収後、4°C、200×g で 5 分間遠心してください。
5. 上清を除去後、培養用メディウム 1～2mL を加えて沈殿した細胞を浮遊し、血球計算盤で細胞数をカウントしてください。
6. 適切な細胞密度になるように播種して任意の実験系に供してください。

VII. 参考文献

- 1) Takenouchi T, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto M, Fujita M, Sekigawa A, Sekiyama K, Sato M, Kojima S, Conti B, Hashimoto M, Kitani H., The activation of P2X7 receptor induces cathepsin D-dependent production of a 20-kDa form of IL-1β under acidic extracellular pH in LPS-primed microglial cells.