

優れた初代神経細胞培養を実現する B-27 Plus Neuronal Culture System

生存率、成熟、および神経ネットワーク活性を向上

25年以上にわたり、従来からの Gibco™ B-27™ Supplement および Gibco™ Neurobasal™ Medium は、神経細胞培養試薬のスタンダードとなっています。新しい培養システム Gibco™ B-27™ Plus Neuronal Culture System は、Gibco™ B-27™ Plus Supplement (製品番号 A3582801) および Gibco™ Neurobasal™ Plus Medium (製品番号 A3582901) から構成され、原材料および製造の改良やマイナーな組成変更を通して従来の培養環境が改善されています。本製品は、いくつかの改善を通して、神経細胞の初代培養に大きな成果をもたらします。

神経細胞の健全性を改善

より優れた長期培養

げっ歯類由来初代神経細胞の健全な長期培養（3週間およびそれ以上）を維持することは困難とされています。これらの細胞は非常にセンシティブで、経時的に細胞死が進行する傾向があるためです。図1は、B-27 Plus システムでマウス皮質由来神経細胞を培養する利点を明確に示しています。B-27 Plus システムを使用した場合、細胞数とMAP2 染色の範囲がともに有意に改善されています。

神経突起伸長を改善

神経細胞培養初期の質を評価する指標の1つは、播種直後に見られる神経突起伸長です。神経細胞からの神経突起伸長（軸索および樹状突起の発達）のプロセスは、神経細胞の成熟中に生じます。図2は、B-27 Plus システムを用いた培養では、従来のB-27 培地よりも神経突起伸長の観察が1週間早く改善されたことを示しています。

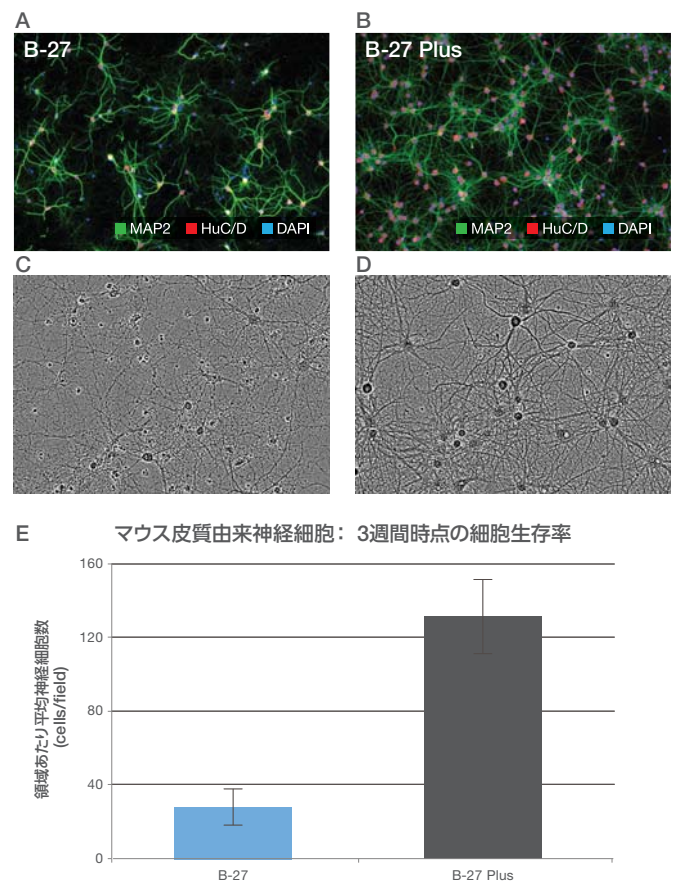


図1. B-27 Plus システムでマウス皮質由来神経細胞の生存率および成熟が改善 凍結保存した細胞を60,000 cells/cm²の密度で播種し、従来の B-27 サプリメント添加 Neurobasal 培地 (AおよびC) またはB-27 Plus 神経細胞培養システム (B-27 Plus サプリメント添加 Neurobasal Plus 培地; BおよびD) で培養しました。神経細胞数 (E, n = 4) は、Thermo Scientific™ CellInsight™ CX5 ハイコンテンツスクリーニングシステムでの自動画像取得および解析によって決定されました。神経細胞は、神経細胞樹状突起マーカー MAP2 (緑色) および神経細胞体マーカー HuC/D (赤色) で染色し、核はDAPI (青色) で対比染色しました。

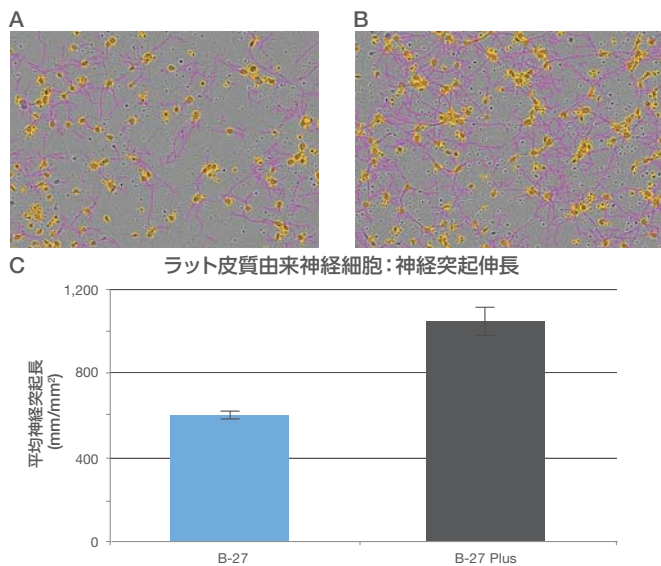


図2. ラット皮質由来神経細胞における神経突起伸長の形態解析 凍結保存した細胞を 5×10^4 cells/cm² の密度で播種し、**(A)** 従来の B-27 サプリメント添加 Neurobasal 培地 または **(B)** B-27 Plus 神経細胞培養システム (B-27 Plus サプリメント添加 Neurobasal Plus 培地) で培養しました。播種6日後の神経突起長は、生細胞イメージング用の Essen BioScience IncuCyte™ Zoom System を用いて定量化しました。**(C)** 神経突起長 (顕微鏡画像中の紫色のライン) は、細胞体 (黄色) に対して定量化しました。

シナプスの複雑さを増加

神経細胞の成熟過程には多くの変化が生じますが、そのうち軸索伸長とシナプス形成の2つは顕著な特徴です。これらは、神経突起ネットワークの密度と複雑さを増加させます。一般的なシナプス前部マーカーの1つは、シナプスにおける神経伝達物質の放出に関与するシナプシンファミリーのタンパク質です。シナプス後構造は、通常、シナプス後肥厚タンパク質 95 (PSD-95) を用いて、可視化されます。PSD-95は神経伝達物質受容体とカリウムチャンネルとの直接相互作用など、シナプス後機能を調節する多くの役割を果たす膜結合グアニル酸キナーゼです。シナプシンおよびPSD-95 の存在は、機能的に成熟したシナプス結合の形成を示唆します。図3に示されているように、B-27 Plus システムで培養したラット皮質由来神経細胞 (Gibco™ Primary Rat Cortex Neurons (RCNs), 製品番号 A10840) は、従来の B-27 添加 Neurobasal 培地の場合と比べて、シナプシンと PSD-95がともにより広範に発現しています。

神経細胞サブタイプに対する影響

げっ歯類脳由来神経細胞の調製物には、興奮性 (グルタミン酸作動性) および抑制性 (GABA作動性) ニューロン、ならびにパルブアルブミン (PV) 陽性のGABA作動性介在ニューロンのサ

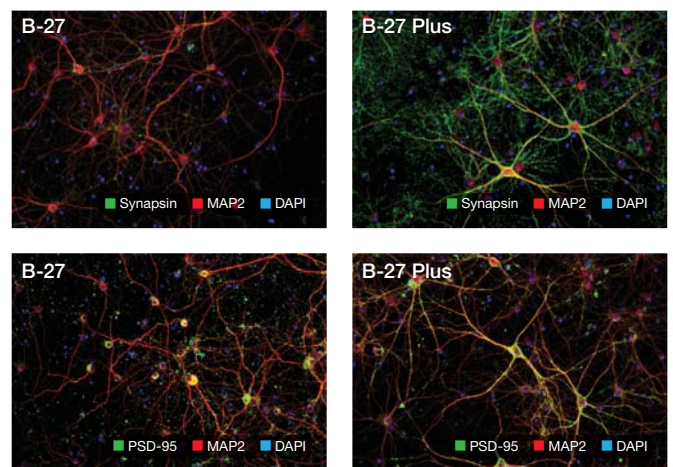


図3. B-27 Plus システムでは成熟したラット皮質由来神経細胞 (RCN) におけるシナプス前部および後部マーカーの発現が増強 RCNを記載のシステムで28日間培養した後、MAP2 (赤色)、シナプシン (緑色)、および PSD-95 (緑色) で免疫染色しました。核は、DAPI (青色) で染色しました。

ブセットなど、さまざまなタイプの細胞が含まれます。In vivoでは、多くの興奮性および抑制性ニューロンが厳密に調節されており、それらの相互作用が神経ネットワーク調節の基盤となっています。さらに、PV 介在ニューロンは、神経ネットワークにおける同期活動の制御に極めて重要な役割を果たしています。In vitroにおいて、神経細胞の生存とロバストな成熟は、皮質および海馬の初代培養における神経細胞亜集団の維持ならびにネットワーク形成および同期活動に不可欠です。

培養条件がRCNにおける興奮性および抑制性ニューロンの亜集団に与える影響について、従来のB-27 添加 Neurobasal 培地とB-27 Plus システムで28日間培養して比較した結果を図4に示します。神経細胞の総数は、HuC/D-陽性細胞により測定しました。これらの細胞は、さらにグルタミン酸作動性ニューロン (VGLUT2-陽性)、GABA作動性ニューロン (GABA-陽性)、およびPV-陽性介在ニューロンの神経細胞亜集団として定量化しました。定量的な画像解析において、B-27 Plus システムではHuC/D-陽性細胞が従来の培地より約50%多いことが示されました。VGLUT2で陽性に染色されたのは、従来のB-27 システムでは全神経細胞の90%であったのに対し、B-27 Plus 培養システムでは81%でした。GABA-陽性ニューロンは、従来の B-27 システムでの培養では12%であったのに対し、B-27 Plus システムでは14%でした。顕著であったのは、PV 介在ニューロンの割合で、B-27 システムの1%未満に対し、従来の B-27 Plus システムでは7%でした。

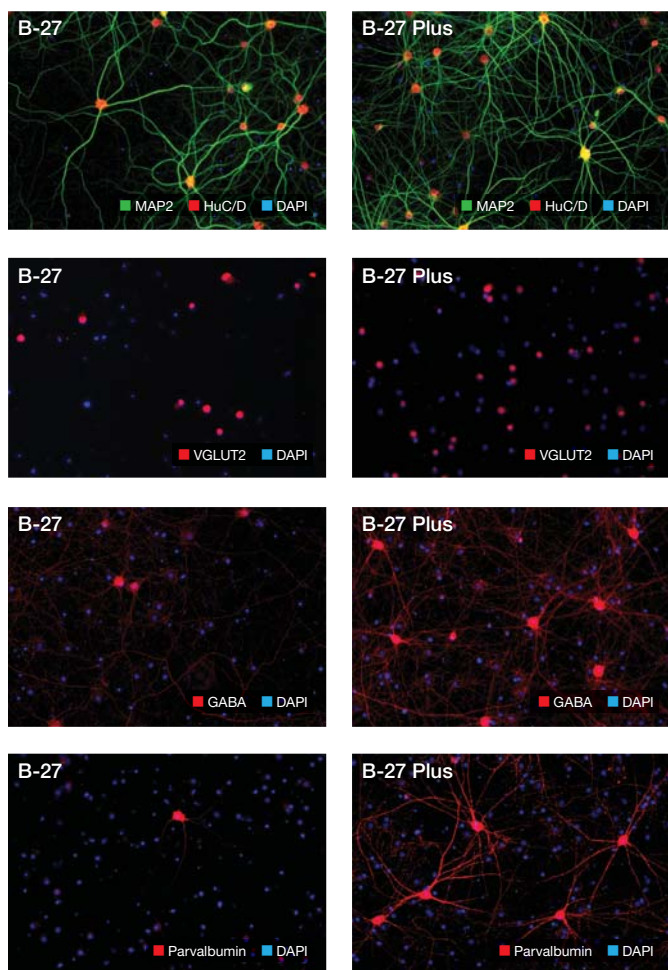


図4. ラット初代神経細胞の培養における神経細胞サブタイプの定義 RCNを従来のB-27 システム (左列) またはB-27 Plus システム (右列) で28日間培養後、MAP2 (緑色) およびHuC/D (赤色)、VGLUT2 (赤色)、GABA (赤色)、またはパルブアルブミン (赤色) のいずれかで免疫染色しました。核は、DAPI (青色) で染色しました。

これらの結果は、皮質由来神経細胞で見積もられているグルタミン酸作動性が80%、GABA作動性が20%の比率に一致します。MAP2、GABA、および PV 染色の定性分析では、B-27 Plus システムで神経突起の染色がより顕著に多く発色していることが示されており、これは神経細胞およびその亜集団の成熟が增强されていることを示唆します。まとめると、これらのデータは、B-27 Plus システムにおいて、神経細胞亜集団の維持および成熟が顕著に改善していることを示しています。

電気生理学的活性を改善

他の神経細胞成熟度の評価には、電位依存性イオンチャネルの発現および活性の測定があり、これは個々の神経細胞の活動電位の発生および神経細胞グループにわたる広範なネットワーク

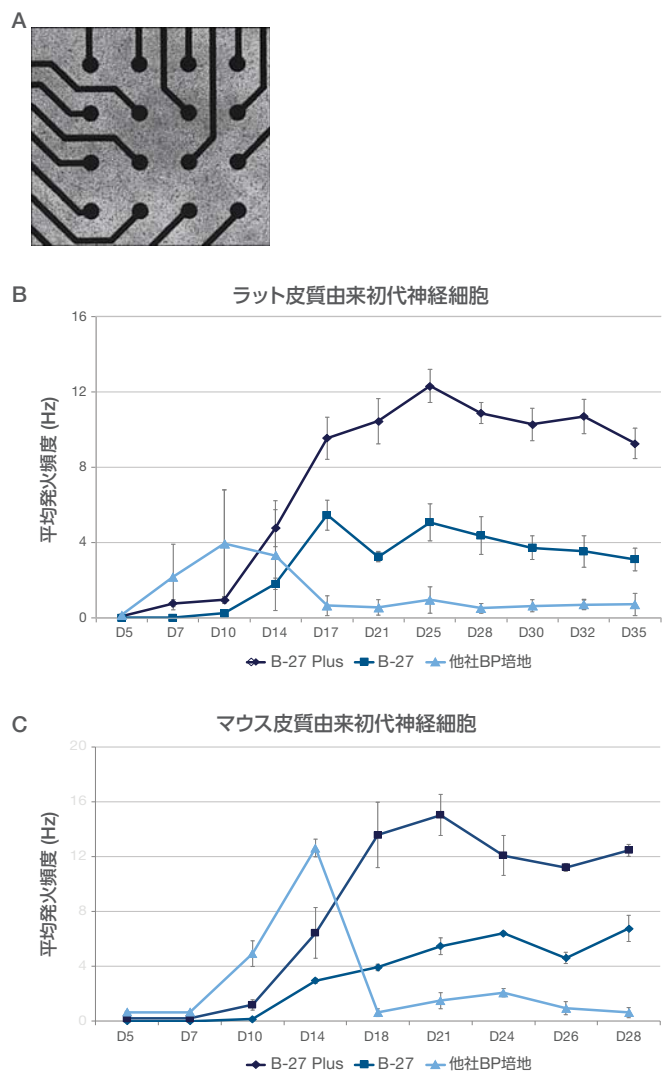


図5. B-27 Plus システムは、げっ歯類由来初代神経細胞の電気生理学的活性を改善 (A) MEA グリッド上の培養22日目のマウス由来初代神経細胞の顕微鏡写真。ラット (B) またはマウス (C) 皮質由来神経細胞を24ウェルの MEA プレートに高密度で播種し、従来のB-27、B-27 Plus、および 他社システム (BP培地+SMサプリメント) において35日間培養しました。自発的な電気生理学的活性は、Axion BioSystems Maestro Pro™ MEA プラットフォームを用いて一定間隔で測定し、平均発火頻度として記録しました。

形成活性に基づきます。マルチ電極アレイ (MEA) システムは、特殊な培養皿を使用し、刺激電極の極近傍で神経細胞を培養することにより、細胞グループの電気生理学的活性を非侵襲的に直接測定することを可能とします (図5A)。この方法を用いて、ラットおよびマウス皮質由来神経細胞の自発活動 (平均発火頻度により計測) を経時的に計測したところ、B-27 Plus システムで培養された細胞は、従来のB-27 システムや他社の培地の場合よりも高度に同期化された、持続的な電気生理学的活性を示しました (図5B、C)。

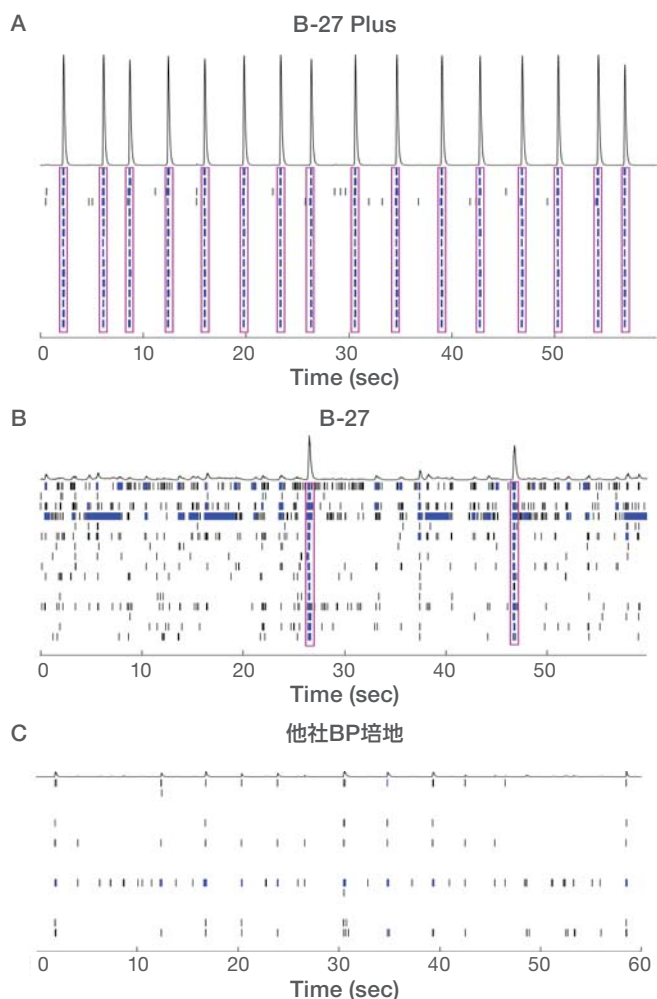


図6. MEAによるネットワーク活性の解析 (A) B-27 Plus システム、(B) 従来のB-27 システム、または (C) 他社システムでのRCN 培養28日目における同期バースト現象を示すラスタプロット。スパイク信号のトレースは、算出されたバースト活性を示しており、これは各刺激電極で計測された、同期化された電気生理学的活性によって定義されています (スパイク数の総和は、B-27 Plus 培養システムの16に対し、従来の B-27 培養システムは2、他社システムでは0。スパイクは紫枠でハイライト表示)。

ネットワーク活性や同期バーストの算出などの他のタイプのデータは、MEA 記録から取得することが可能で、ウェル内の個々の電極からのデータを同時に見ることができます。これにより、ネットワークの接続性や見積もりを可能とするだけでなく、ネットワーク自身の質に関する洞察を得ることも可能です。図6は、記載のシステムで28日間培養したRCNの1分間の記録から代表的なバースト発火データを示しています。

B-27 Plus システムで培養した RCN のバースト発火データは顕著な一貫性および同期性を示し、バースト間ノイズは極わずかでした。バーストは、興奮性および抑制性ニューロンの協調的な活動により発生します。B-27 Plus システムでは、ネットワーク同期性の安定的な「時間窓」が固有に形成され、研究者がこの複雑な神経細胞の相互作用を調べることが可能となります。

結論

従来のB-27 システムは、約30年にわたり神経生物学研究の主力製品でした。新しいB-27 Plus システムは、独自のサプリメントおよび基礎培地から構成され、従来のB-27や他社製品よりも初代神経細胞の健全性、成熟、および機能を顕著に向上します。この新組成の培地は、神経細胞培養の質とそこから得られるデータを改善します。ここで取り上げた例では、げっ歯類初代神経細胞の高品質な培養が全体を通して維持され、ネットワーク活性が最大4週間維持される根拠となる活動パターンを調べるのに安定的な時間窓の形成を可能とすることが明らかにされました。このネットワーク活性の改善には、B-27 Plus システムで可能となる、より密な神経突起ネットワークおよびより高いシナプス密度が少なくとも寄与しています。以上のデータはすべてB-27 Plus 添加 Neurobasal Plus 培養システムの主要な利点を明確に示しています。

Ordering information

製品名	サイズ	製品番号	価格
B-27 Plus Neuronal Culture System 構成成分: B-27 Plus Supplement (50x) 10 mL ・ Neurobasal Plus Medium 500 mL	1 kit	A3653401	¥39,000
B-27 Plus Supplement (50X)	10 mL	A3582801	¥29,800
Neurobasal Plus Medium	500 mL	A3582901	¥11,500

詳細はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/b27plus

研究用에만使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。

記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

For Research Use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

BrainPhys is a trademark of the Salk Institute for Biological Studies. IncuCyte is a trademark of Essen BioScience.

Maestro Pro is a trademark of Axion BioSystems.

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますので予めご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc

販売店

GIB084-A1809OB

**サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフテクノロジーズジャパン株式会社**

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584

営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

facebook.com/ThermoFisherJapan

[@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC