

第19回神経組織培養研究会

神経幹細胞の培養

望月秀樹(順天堂大学医学部脳神経内科)

神経幹細胞培養法は, Reynoldsと Weiss により分離培養に成功した. 我々は, この細胞に遺伝子を改変レトロウイルスベクターにより導入し, その後の cell fate につき検討した.

胎生13~15日のマウスおよびラットより線状体を摘出後, F12 / DMEM中で細切する. 遠心後下記の培地にresuspend する.

培養液は F12/DMEM (Hepes Buffer (15mM), glucose (0.6%), sodium bicarbonate (3mM), and glutamine (2.5mM) を含む)を利用した. さらに insulin (25mg/ml), transferrin (100mg/ml), progesterone (20nM), putrescine (60mM), and sodium selenite (30nM) を加えた. 培養の際に EGF(Pepro Tech EC, 20ng/ml)と bFGF(Pepro Tech EC, 20ng/ml)を加えた.

ピペティングをパスツールピペットにて10回施行する. 細胞数を 2.0×10^6 / mlにて25 cm²のculture bottleに培養する. 培地交換は2-3日に一回行う.

培養後6~8日にて神経幹細胞のsphereを500rpm,4minの遠心にて採取する.

約 6×10^5 個の標的細胞を12wellのculture dishに播き、ウイルス上清と共にプロタミン非存在下にて500rpm,2hrで遠心した. 2日後、標的細胞はmediumと共に25 cm²のculture bottleに播き培養した.