

第1章 EasySepによるTセル、Bセルの分離

使用する試薬

★株式会社ベリタス

■Tセル分離用 EasySep

コード ST-19951HLA

品名 EasySep HLA T cell Enrichment (全血 200 mL 用)

キット内容 HetaSep2 本、抗体カクテル 1 本、磁気ビーズ 3 本 凍結厳禁！！

■Bセル分離用 EasySep

コード ST-19954HLA

品名 EasySep HLA B cell Enrichment (全血 200 mL 用)

キット内容 HetaSep2 本、抗体カクテル 1 本、磁気ビーズ 4 本 凍結厳禁！！

■推奨メディウム

コード ST-20104

品名 RoboSep buffer

*自家調製する場合は、2% FBS、1mM EDTA 入り PBS (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺を含まないもの)。

組成の異なるバッファーを使うと、分離が上手くいかないことがありますのでご注意ください。

使用する器具

- EasySep 専用磁石 コード ST-18000 品名 EasySep Violet Magnet
- 15mL 遠心管
- ディスポピペットまたはパストールピペット
- 遠心機 (15mL 遠心管を 50×g、120×g で遠心できるもの)
- P-1000 ピペットとチップ
- P-200 ピペットとチップ
- P-20 ピペットとチップ
- 12×75 mm ポリスチレン丸底チューブ
指定: BD Bioscience 社 Cat # 352058 12×75 mm Falcon™ 5 mL ポリスチレン丸底チューブ
- ボルテックスミキサー
- アスピレーター

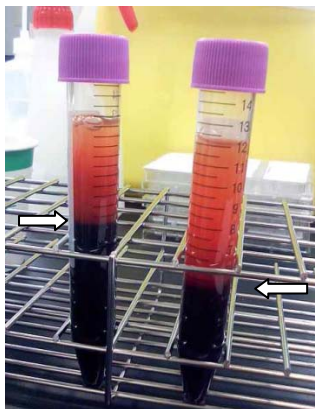
1) 血液サンプルの前処理

重要: 血液サンプルは、ヘパリンまたは ACD で採血したものを用意する (EDTA は使用不可！！)。

フローサイトメトリッククロスマッチのみを行う場合、検体差はあるものの、通常は血液サンプル 10mL (抗凝固剤込みの量で考えていただいて結構です) から十分な数の T セルと B セルが分離できることが多い。

1. 血液サンプルを 15mL 遠心管に入れる。血液 5 に対して、HetaSep を 1 の割合で加え、転倒混和でやさしく混ぜる (例: 血液 10mL - HetaSep 2mL)。

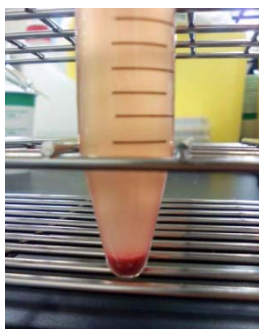
2. ブレーキをオフにし、 $90\times g$ 、5分間、室温で遠心する*。遠心機から取り出して10分間（または赤血球層が全体の40%程度になるまで）静置する（*新鮮血液10mL - HetaSep 2mLの場合）。



←赤血球層の量や沈殿スピードは、検体によってかなり差がありますが静置時間は一定のところまで判断して切ってください。

3. 赤血球層を乱さないよう注意しながら、パスツールピペットで上清を新しい15mL遠心管に採取する（できるだけギリギリまで採取したほうが、細胞の回収量は上がります）。

4. 推奨メディアムをたっぷり加え（およそ2倍量）、ブレーキオフ、 $120\times g$ 、10分間、室温で遠心する。



←細胞を遠沈したところ。赤血球が少し入ります。

5. アスピレーターで上清を除き、細胞ペレットを元のサンプル血液量の1/10量の推奨メディアムで再懸濁する（例：元の血液量が10mLなら、1mLで再懸濁する）。

推奨メディアムを加えたあと、ごく軽くボルテックスしてペレットをほぐすとよい。



←元の血液量の1/10量の推奨メディアムに、細胞を再懸濁したところ

2) Tセル、Bセル分離プロトコル (EasySep Violet Magnet 使用時)

重要：12×75 mm Falcon™ 5 mL ポリスチレン丸底チューブでは、細胞懸濁液を最高 2mL まで（全血で 20mL 相当まで）処理できます。

1. 上記 1) で調製した細胞懸濁液を、Tセル分離用と Bセル分離用に分けて 12×75 mm Falcon™ 5 mL ポリスチレン丸底チューブに入れる。

注)：このとき、細胞懸濁液を Tセル：Bセル=1：9 などの割合に分割し、細胞分離を行うと、目的細胞の数がバランスよく得られます。

例)、血液 10mL をスタートサンプルとした場合、上記 1) - 5 で細胞を 1mL の推奨メディアウムで懸濁したあと、Tセル分離用に 0.1mL、Bセル分離用に 0.9mL の割合に分けてチューブに入れる。

2. 細胞懸濁液に EasySep HLA T cell または B cell Enrichment cocktail を 50 μ L/mL cells の割合で加えて、ピペッティングでやさしく混ぜ、室温で 10 分間インキュベートする（試薬を取る際にもピペッティングを行ってください）。



例)、Tセル 100 μ L の場合、EasySep HLA T cell Enrichment cocktail を 5 μ L 入れる。Bセル 900 μ L の場合、EasySep HLA B cell Enrichment cocktail を 45 μ L 入れる。

→細胞懸濁液に抗体カクテルを加えたところ

3. EasySep Magnetic Microparticle を 30 秒間ボルテックスする。均一になっているか、チューブを逆さにして V 底部分に塊がないか目で見て確認する。

4. EasySep Magnetic Microparticle を T cell は 150 μ L/mL cells、B cell は 200 μ L/mL cells の割合で加えて、ピペッティングでやさしく混ぜ、室温で 5 分間インキュベートする（試薬を取る際にもピペッティングを行ってください）。



例)、Tセル 100 μ L の場合、EasySep Magnetic Microparticle を 15 μ L 入れる。Bセル 900 μ L の場合、EasySep Magnetic Microparticle を 180 μ L 入れる。

←EasySep Magnetic Microparticle を加えたところ

5. このチューブに推奨メディアムを加えてトータル液量を **2.5mL** にする（ピペッティングの必要はありません。**2.5mL** の液面より上に、液がつかないようにしてください）。そのままフタをせずにチューブをマグネットに差し込み、**5分間**静置する。

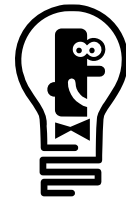


↑磁石の高さ（トータル液量 **2.5mL**）まで液量を増やしてから磁石に差し込みます。

6. チューブを差し込んだままの磁石を持ち上げ全体をゆっくりひっくり返し、新しい **12×75 mm** ポリスチレン丸底チューブにデカントで上清を移す。

<上清を移す際の注意> 重要！！

磁石をゆっくり傾け、逆さの状態のまま **2-3 秒**保持して上清を移す。
 この時チューブの口に残った液は無理に振り落としたり、壁を伝わらせて落としたりせず、そのままにしておく。
 無理に落とすと目的細胞の純度が落ちるので注意する。
 磁気ビーズの結合した細胞（不要な細胞）は **EasySep Magnet** の磁場によって、チューブ内に残る。



7. 得られた細胞を遠沈・再浮遊して、血球計算盤でセルカウントを行い、液量（細胞濃度）を **LCT** クロスマッチ、フローサイトメトリックロスマッチなどの用途に応じて調節する。

《参考》 一般的な分離効率

全血 **1mL** からは、およそ 1×10^6 個の単核球が得られるとされています。

単核球中の **CD3+ T cell** ポピュレーションは **60~70%**、**CD19+ B cell** はおよそ **10%**です。

健常人サンプルでの一般的な分離効率は下記のとおりです。

注：患者検体は、状況によってかなりの個人差があります。

	T cell (CD3+T cell として)	B Cell (CD19+B cell として)
純度	93.1~98.0%	81.5~99.7%
全血 5mL から回収可能な およその細胞数	$1.1 \sim 3.1 \times 10^6$ 個	$1.2 \sim 9.1 \times 10^5$ 個