

EasySep の為のヒト細胞調製マニュアル

注：EasySep の製品ごとに推奨の細胞調製方法が異なります。各製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

全血は白血球（リンパ球、単球、顆粒球）、赤血球、血清を含んでいます。クエン酸デキストロース（ACD）、ヘパリン、EDTA のような抗凝固剤は、血液の凝固を防ぐために使用されます。溶血は、細胞死（特に顆粒球の細胞死）と同様に、採血して 24 時間後から始まります。古くなってしまったサンプルでは、ある細胞表面の抗原発現（例えばプラズマ細胞上の CD138 等。）が変わってしまう可能性があります。細胞分離を行う前に、古くなったサンプルは、細胞の生存率と、ターゲット細胞の割合を評価して下さい。

赤血球の除去

◇ 塩化アンモニウムによる溶血

- ・大きなチューブの中に、サンプル 1 に対して冷塩化アンモニウムを 5-10 加えます。
- ・転倒混和してよく混ぜ、室温で 5-10 分間インキュベーションします。（インキュベーション時間が長くなると、死細胞が増える原因になります。）
- ・5 倍量のバッファーを加え細胞を洗浄し、300×g、5 分間遠心します。
- ・上清をアスピレーターで除去し、細胞ペレットを必要な細胞濃度まで、推奨の培地で再懸濁します。

➤ ヒント

最適な溶血を行う為に、一週間以内に解凍したフレッシュな冷塩化アンモニウムをご使用ください。

もし最初の溶血後に、サンプルが非常に多くの赤血球を含んでいる場合には、もう一度、塩化アンモニウムによる溶血を行うことができます。

◇ HetaSep(コード No. : ST-07806 / ST-07906)

➤ 赤血球除去

全血 5 に対して、HetaSep 1 の割合で加えます。EasySep の種類によって異なりますので、製品資料を参照ください。

➤ ヒント

HetaSep での最適な細胞の回収のために、採血後 24 時間以内のサンプルは、遠心で分離し、24 時間以降のサンプルは重力沈降をする必要があります。

赤血球ペレット：HetaSep 後の古い血液は、血漿界面がぼんやりと見え

るかもしれません。回収を最大限にする為には、ぼんやりとした層と同様、はっきりと目に見える血漿層も回収してください。

◇ 低張性溶血

- ・冷滅菌水 27mL を、PMNC/RBC（多形核白血球細胞/赤血球）沈殿物の入った各 50mL チューブに加えます。
- ・25 秒間ピペティングで、混合します。ボルテックスは行わないでください。溶血ステップの時間を長引かせないでください。冷えた 3mL の 10×HBSS（Ca を含まない）を加え、よく混ぜます。
- ・チューブを 1×HBSS(Ca を含まない)で満たします。
- ・ブレーキをオフにし、1500rpm、10 分間遠心します。ペレットを崩さないように、慎重に上清を除去します。
- ・溶血をもう一度繰り返します。
- ・細胞を推奨バッファーに再懸濁します。

➤ ヒント

バイアビリティーの良い細胞を得る為に、インキュベーション時間を長引かせないようにして下さい。溶血後、ペレットは崩れやすくなります。デカンテーションではなく、アスピレーターで上清を除去すると、細胞の回収率が上がります。

✚ 単核細胞（MNC）の調整

◇ Ficoll

- ・サンプル、Ficoll、バッファーを室温にします。
- ・サンプルをバッファーで希釈します。（全血：バッファー=1：2、骨髄：バッファー=1：2～1：4、アフェレーシスサンプル=1：2～1：4）
- ・希釈したサンプルを Ficoll の上に静かに重層します。（サンプル:Ficoll=2:1）
- ・ブレーキオフで 300×g、30 分間または、ブレーキオフで 1200×g、20 分間で遠心します。
- ・遠心後、界面を回収する前に、慎重に血漿を回収してください。
- ・回収したサンプルは、5 倍量のバッファーで洗浄し、300×g、10 分間遠心します。

➤ ヒント

Ficoll で最適の細胞回収率を得る為に、界面を完全に回収するようにして下さい。また、Ficoll 処理後の細胞を洗浄する際は、Ficoll が残存しないように十分量のバッファーを用いて下さい。

古くなったサンプルでは通常、赤血球と脱顆粒した顆粒球が、界面に残

存します。塩化アンモニウムによる溶血を行うことで残存赤血球を除去できます。顆粒球のコンタミネーションを除去する為には、RosetteSep Granulocyte depletion kit (コード No. : ST-15624) の使用をお勧めします。

未処理の凍結細胞や培養細胞は、Ficoll による密度勾配遠心分離法はお薦めできません。これは、操作の間に細胞が凝集してしまい回収量が減少してしまうことがあるためです。

✚ 全末梢血からの多形核白血球細胞 (PMNC) 調整

注意：これは PBMNC とは異なります。(PBMNC は、Ficoll とバッファー界面に存在する細胞で、T 細胞や単球等を含みます。) PMNC は、顆粒球を含んでいます。

◇ Ficoll+塩化アンモニウムによる溶血

➤ 以下 2 つのステップを行います。

Step1 : Ficoll

- ・サンプル、Ficoll、バッファーを室温にします。
- ・サンプルをバッファーで希釈します。(全血：バッファー=1：2、骨髓：バッファー=1：2～1：4、アフェレーシスサンプル=1：2～1：4)
- ・希釈したサンプルを Ficoll の上に静かに重層します。(サンプル：Ficoll=2:1)
- ・ブレーキオフで 300×g、30 分間または、ブレーキオフで 1200×g、20 分間で遠心します。
- ・遠心後、慎重に血漿および Ficoll 層を全て除去します。
- ・赤血球ペレットに、2 倍量の推奨バッファーを加え、一度洗浄し、300×g、10 分間遠心します。ペレットが崩れやすいので、慎重に上清をアスピレーターで除去します。Step 2 の処理を行います。

Step2 : 塩化アンモニウムによる赤血球の溶血

- ・サンプル 1 に対して、冷塩化アンモニウムを 5-10 の割合で加えます。
- ・転倒混和してよく混ぜ、室温で 5-10 分間インキュベーションします。(インキュベーション時間が長くなると、死細胞が増える原因になります。)
- ・5 倍量のバッファーを加え細胞を洗浄し、300×g、5 分間遠心します。
- ・上清をアスピレーターで除去し、細胞ペレットを推奨バッファーで再懸濁します。

または、

◇ 低張性溶血

- ・冷滅菌水 27mL を、PMNC/RBC（多形核白血球細胞/赤血球）ペレットの入った各 50mL チューブに加えます。
- ・25 秒間ピペティングで、混合します。ボルテックスは行わないでください。溶血ステップの時間を長引かせないでください。冷えた 3mL の 10×HBSS（Ca を含まない）を加え、よく混ぜます。
- ・チューブを 1×HBSS(Ca を含まない)で満たします。
- ・1500rpm、10 分間遠心します。ペレットを崩さないように、慎重に上清を除去します。
- ・溶血をもう一度繰り返します。
- ・細胞を推奨バッファーに再懸濁します。

➤ ヒント

少量の PMNC が Ficoll 部分に含まれることがあります。PNMC の回収率を上げるために、Ficoll を少量残すようにして下さい。塩化アンモニウムは顆粒球を活性化することがあります。低張性溶血の際は、穏やかな操作を行って下さい。

株式会社ベリタス 〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル

TEL 03-3593-3211 FAX 03-3593-3216

技術的なお問い合わせは：TEL 03-3593-3385 E-mail techservice@veritastk.co.jp