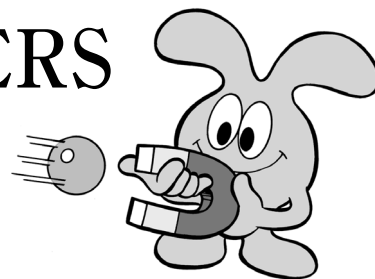


DYNABEADS LETTERS



Dynabeads®を用いた CD34⁺細胞の分離 --- PBSC harvest、臍帯血からの分離例 ---

I. PBSC harvest からの分離

九州大学 医学部 第一内科学教室
血液研究室
長藤宏司、竹中克斗

1. はじめに

近年、化学療法後に一過性に末梢血に動員される造血幹細胞 (Peripheral Blood Stem Cell : PBSC)を用いた自家末梢血幹細胞移植 (Autologous Blood Stem Cell Transplantation : ABSCT) が、急速に普及しつつある。PBSC は、今後、1) in vitro amplification、2) gene therapy、などに利用されることが予想される。これらにはまず PBSC Harvest より造血幹細胞を分離する必要がある。ここでは PBSC Harvest からの Dynabeads M - 450 CD34 を用いた CD34⁺細胞の分離法を紹介する。

2. PBSC の採取

AraC (Arabinosylcytosine) や VP-16 (Etoposide) など比較的急峻な骨髄抑制がかかる化学療法の回復期に continuous blood cell separator (主に Cobe 社製 Spectra を使用) を用いて Leukapheresis して採取した PBSC Harvest を使用している。事前に Flow Cytometry を用いて、CD34⁺細胞の多い検体 (1% 以上) を用いることが望ましい。

3. 非貧食細胞の調製

PBSC Harvest を 10% Fetal calf serum (FCS) 添加 RPMI - 1640 培地に浮遊し、細胞数を $2 \sim 5 \times 10^7 / \text{ml}$ に調製する。この細胞浮遊液に 10% Vol の Silica Suspension (KAC - 2 : 日本抗体研究所、高崎市) を添加し、混和する。その後 37 °C で incubate し 15 分毎にさらに混和を繰り返す。

1 時間後 Lymphocyte Separation Medium : LSM, Organon Teknika, SG. 1077 を用い、比重遠心法により 1800 rpm で 20 分間遠心を行ない、単核球を分離する。

分離した非貧食単核球を RPMI - 1640 で 2 回洗浄後、10% FCS 添加 RPMI - 1640 に浮遊し $5 \sim 20 \times 10^7 / \text{ml}$ の細胞浮遊液 1 ml を調製する。

この際用いる試験管は、次の操作において細胞と Dynabeads M - 450 CD34 が充分混和するように丸底が望ましい。この時点で細胞の収率は 50% 程度となる。

4. CD34 陽性細胞の分離

1) Dynabeads M - 450 CD34 の調製

Dynabeads M - 450 CD34 は、非貧食細胞 1×10^8 個に対し 500 μl の割合で用いる。

Dynabeads M - 450 CD34 に 10% FCS 添加 RPMI - 1640 5 ml を加え、Dyna MPC (Magnetic Particle Concentrator) 上に 2 分間静置し、その後上清を除去する。この洗浄操作を計 3 回行い、以下の操作に用いる。(この操作は、Dynabeads に防腐剤として添加されている Sodium Azide を除去するために行う。)

2) Dynabeads M - 450 CD34 による CD34⁺ 細胞の分離

上記 3. で調製した 1ml の細胞浮遊液を 3 分間氷上に置き冷却する。

洗浄した Dynabeads M - 450 CD34 に氷冷した細胞浮遊液を加え、20 回程度 pipetting する。その後 4 分で 1 時間緩徐に混和する。10% FCS 添加 RPMI - 1640 およそ 5 ml を加え静かに数回 pipetting した後、MPC 上に 2 分間静置した後上清を除去する。この操作を計 4 回行い、感作細胞を分離する。この細胞を 10% FCS 添加 RPMI - 1640 の 100 μ l に浮遊する。

5. 分離細胞からの Dynabeads の離脱

この細胞浮遊液に DETACHaBEAD 100 μ l を加え、50 回程度 pipetting した後、室温で 90 分間緩徐に混和し、10% FCS 添加 RPMI - 1640 2 ml を加え、強いに 10 回程度 pipetting した後、MPC 上に 2 分間静置する。その後 CD34⁺ 細胞の浮遊した上清を分離する。

この操作を 2 回繰り返す。DETACHaBEAD を洗い落とすため、10% FCS 添加 RPMI - 1640 2 ml を用いて 3 回洗浄後、その後の実験に使用する。細胞浮遊液の細胞数を測定し、Flow Cytometry を用いて CD34 の陽性率を測定する (図 1)。

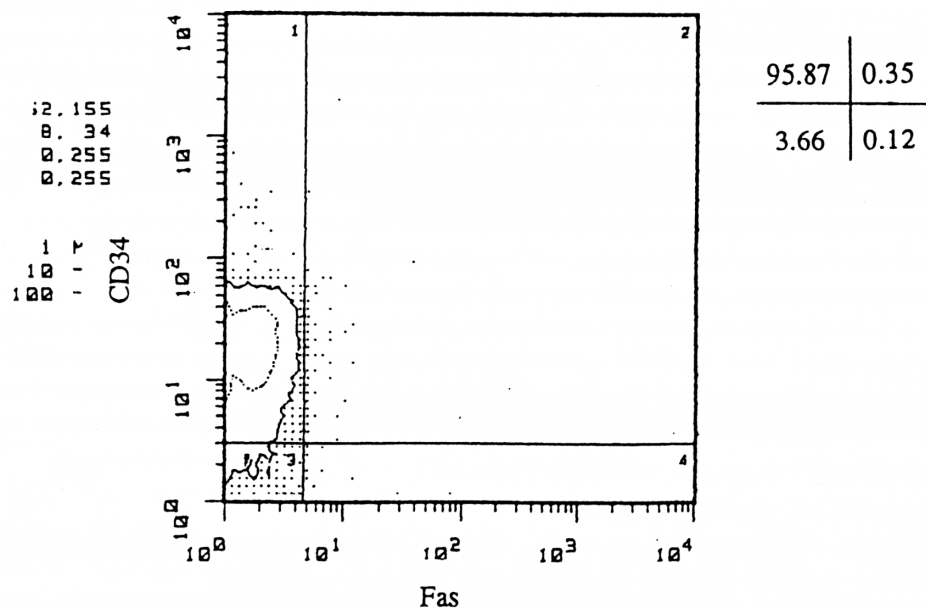


図 1) PBSC Harvest から Dynabeads M - 450 CD34 と DETACHaBEAD を用いることにより、CD34⁺ 細胞を 90 % 以上の純度で分離することが可能である。[FACSCAN]

6. 考 察

CD34⁺ 細胞を分離する場合、収率を上げ、CD34 陽性率を上げるためには、貧食細胞を除去して非特異的結合を少なくすることが重要である。骨髓に比して PBSC Harvest は特に単球が多いのでその処理には種々の工夫がなされている。-Globulin 添加、Dynabeads M - 450 Uncoated を用いた pre-depletion、薬物を用いた単球の除去、などが報告されている。ここに紹介した、Dynabeads M - 450 CD34 と DETACHaBEAD による PBSC Harvest より造血幹細胞を分離する際の pre-depletion に "Silica Suspension" を用いた方法は、比較的安価に貧食細胞を除去でき、かつ CD34⁺ 細胞を濃縮できる方法と考えられる。

7. 文 献

- 1) Hematopoietic Stem Cells : The Mulhouse Manual. 1994 edited by Eckert Wunder et al. Alpha Med. Press.
- 2) Koji Nagafuji et al. Blood 1993 ; 82, 2823 - 2828

II. 臍帯血からの分離

東京大学医科学研究所
輸血部
伊藤善啓

1. 臍帯血の採取

胎盤娩出後、可及的速やかに臍帯静脈より臍帯血を採取する。通常、約 40 ~ 60 ml の血液採取が可能である。

2. 非貧食細胞の調製

採取した臍帯血に10 % 容量のSilica Suspension (シリカ:免疫生物研究所、藤岡市)を添加し、混和する。その後37 °C で incubateし、15 分毎にさらに混和を繰り返す。

1時間後 Lymphocyte Separation Medium : Lymphoprep, NYCOMED, Oslo, SG. 1077 を用い、比重遠心法により、400 G, 20 分間遠心を行い、中間の単核球層を分離する。

分離した 非貧食単核球を、5 % ACD-A, 5 % Fetal Calf Serum (FCS) 添加 PBS で、1回目 400 G 10分間、2 回目100 G 20 分間遠心洗浄後 (これにより Platelet rich plasma を除去)、10 % Fetal Calf Serum (FCS) 添加 - mediumに浮遊し $2.5 \sim 5.0 \times 10^7 / \text{ml}$ の細胞浮遊液を調製する(直ちに以下の行程に移れる場合は、Buffer Aに浮遊)。

3. Positive selection of CD34 positive cells

Buffer A: 2 % HSA (Human Serum Albumin) 添加PBS および Buffer B : 0.2 % HSA 添加 PBS を調製する。

2. の細胞浮遊液を、Buffer B で 2 回洗浄した後、Buffer A に浮遊し $2.5 \sim 5.0 \times 10^7 / \text{ml}$ の細胞浮遊液を調製する。

ここでビーズの洗浄を完了しておく。すなわち得られた単核球と同数のDynabeads M-450 CD34 を丸底の試験管にとり、Buffer A 1 ml を加え混和した後、DynaL MPC にセットし1 分間静置して上清を吸う。この操作を4 ~ 5 回繰り返す。細胞浮遊液を洗浄したビーズと混合し、よく混和する。この際、試験管中の浮遊液は1 ml とし、これを超える場合は、試験管を複数本用意する。

45 分間、4 °C で浮遊状態を保つようincubation (数分毎に手で振るなど) の後、Buffer B を4 ml 加え混和し、DynaL MPC に2 分間セットし、壁面に触れないように上清を吸う。

この操作を、4 回繰り返した後、Buffer A 100 μl に浮遊する。

4. Detachment of Dynabeads

先に加えたDynabeads と等量のDETACHaBEAD CD34 を加え、よく混和した後 60 分間室温にて、浮遊状態を保つように incubation する。

Buffer 1 ml を加え、よく混和した後 Dynal MPC に2 分間セットし、上清を回収する。この操作を4回繰り返した後、集めた上清をDynaL MPC に2 分間セットし、上清を回収する。Buffer B 10 ml で洗浄(400 G、10 分間) した後、Buffer A 1 ml に再浮遊させ、CD34 陽性細胞とし、細胞数を算定する。

お問合せは 日本総代理店

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 [代] FAX(03) 3593-3216