

# \*研究用臍帯血テクニカルシリーズ

## HES法にて調製した 凍結臍帯血有核細胞試料（HCB）からの CD4またはCD8陽性細胞の分離



### AMED NBRP

研究用ヒト臍帯血幹細胞バンク事業  
(代表機関 東京大学医科学研究所)



理化学研究所バイオリソースセンター  
<http://cell.brc.riken.jp/hcb>  
(Web ダウンロード準備中)



# (凍結) 臍帯血有核細胞試料の解凍・洗浄

(Dextran/FBS段階希釈法)

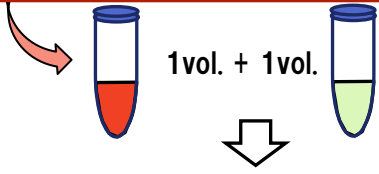
\*注意: HES法で調製・凍結した臍帯血は、好中球や赤血球も含んでおり、通常の培養液のみでの希釈では、凝集を生じます。Dextran/Fetal bovine serum (FBS(臨床用ではアルブミンを用いています)BS溶液の段階希釈法)を利用ください。なお、DEX/FBS 溶液とIsolation buffer はあらかじめ作成しておきましょう。

- ① HES法で調製した凍結臍帯血を、バッグごと37℃恒温槽で急速解凍する。
- ② Bagのポートから注射器で解凍した試料を抜き取り15mlチューブに入れる。容量が多い場合は50mlチューブへ。

Dextran/ FBS溶液 (DEX/FBS 溶液)作成

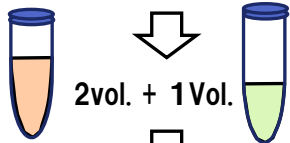
Dextran *	25ml
生理食塩水	20ml
FBS	5ml /50ml

\*大塚製薬低分子デキストラン糖液 を使用



- ②細胞浮遊液にDEX/FBS 溶液を血液風有益に対して等量 (1vol.) ゆっくり滴下して混和

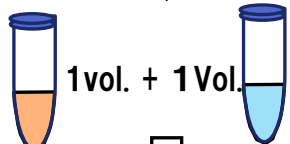
③氷上5分



- ④さらにDEX/FBS 溶液を1 Vol.加える。(添加は通常スピードでもよい)

⑤遠心 400G 10分 4℃ (プレーキオフ)

⑥上清 2vol.吸引→1 vol.になる。



Isolation Buffer 作成

PBS (-)	48.8ml
FBS	1ml
0.5M EDTA	200ul

⑦遠心 400G 10min 4℃ (プレーキオフ)

⑧上清 1vol.吸引→1 vol.になる。

⑨On ice

Cell Sortingへ続く

# CD4またはCD8陽性細胞分離

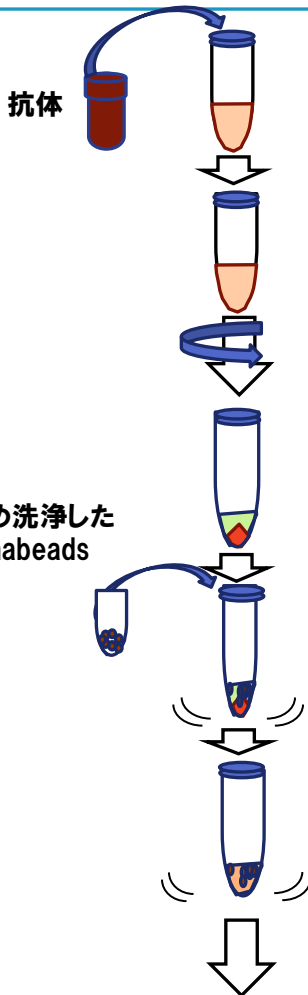
使用したKit

CD4:Invitrogen Dynabeads FlowComp Human CD4<sup>®</sup> cat no. 11361D

CD8:Invitrogen Dynabeads FlowComp Human CD8<sup>®</sup> cat no. 11362D

## 【Dynabeadsの準備】

- ①FlowComp Dynabeads のVialをよく振って均一にする。
- ②必要量のDynabeadsをエツペンチューブ等に入れる。
- ③同量のIsolation Bufferを加え、このエツペンチューブをマグネットにセットする。
- ④上清を吸引する。
- ⑤Isolation Bufferを同量加え、氷上に置いておく。



①解凍・洗浄した臍帯血浮遊液10ml (氷上)にFlowComp Human CD4 or CD8 Antibody 5  $\mu$ l/ $1 \times 10^7$ の割合で加えてよく混和する。

②氷上10分 (抗体反応)

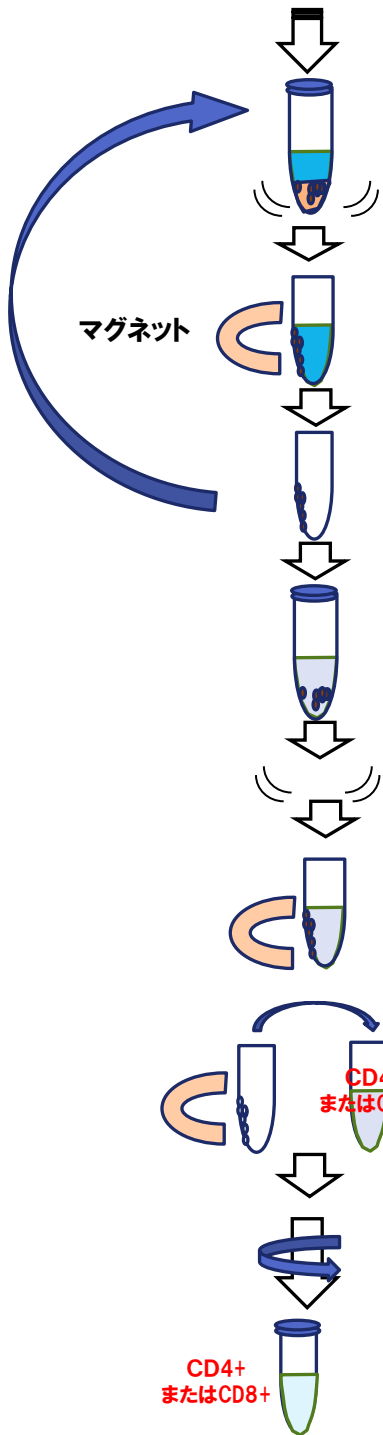
③Isolation Buffer 2vol..加えて、遠心350G (1270rpm) 15分(洗浄)。

④上清を除去する。  
\*白血球を吸引してしまわないようにペレットから約1cm上清を残すのがコツ。

⑤FlowComp Dynabeadsを加えて、Vortex 2-3秒。  
ビーズ量: 15ul/ $1 \times 10^7$ または75  $\mu$ l/2ml)

⑦サンプルが、蓋に付かない程度に揺らしながら室温で15分混ぜる。

(続く)



マグネット

⑧ Isolation Buffer 1vol.を加えて2~3秒Vortexする。

⑨ マグネットスタンドにセットして静置。3分以上

⑩ マグネットにセットしたままビーズに触れないように上清除去する。

⑪ FlowComp Release Buffer を 1/2vol. 入れて、ピペッティングする。

⑫ サンプルが蓋に付かない程度に揺らしながら 室温、10分混ぜる。

⑬ Pipetting 10回してマグネットにセット 1分以上静置

⑭ 上清(CD4またはCD8+細胞浮遊液)を新しいチューブに移して陽性細胞を回収する。  
\*間違っ、上清を捨てないように！！

⑮ Isolation Buffer 1vol.加えて、350G 8分 遠心する。

⑯ 上清除去後、mediumなどを加え、細胞カウント・解析、培養等へ

3 回洗浄を繰り返す

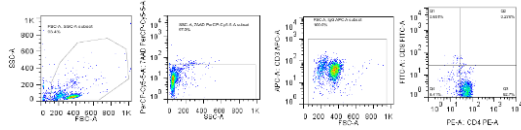
2 回繰り返し返して回収

CD4+  
またはCD8+

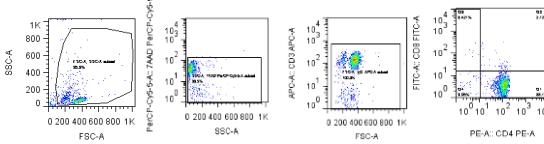
CD4+  
またはCD8+

# CD4 Sorting の実際例

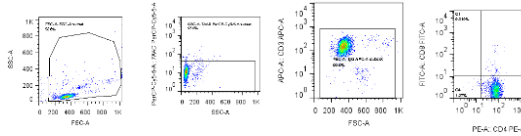
## CD4-1



## CD4-2



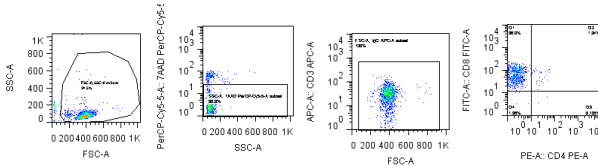
## CD4-3



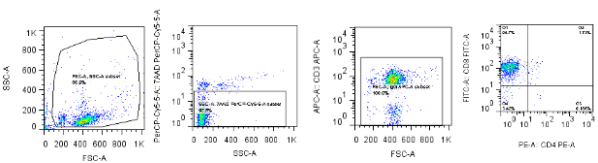
sample no.	WBC Pre ( $\times 10^7$ )	MNC Pre ( $\times 10^7$ )	CD4 Positive Fraction count ( $\times 10^7$ )	CD4 Positive Fraction/MNC (%)	Purity (%)	純細胞数 ( $\times 10^7$ )
CD4-1	30.57	17.14	2.38	13.89	98.3	2.34
CD4-2	60.42	22.84	1.09	4.78	92.4	1.01
CD4-3	23.35	14.14	3.61	25.53	97.7	3.53

# CD8 Sorting の実際例

## CD8-1

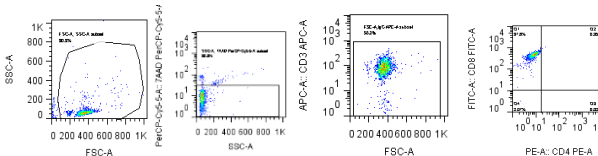


## CD8-2



sample no.	WBC Pre ( $\times 10^7$ )	MNC Pre ( $\times 10^7$ )	CD8 Positive Fraction count ( $\times 10^7$ )	CD8 Positive Fraction/MNC (%)	Purity (%)	純細胞数 ( $\times 10^7$ )
CD8-1	53.43	19.94	1.02	5.11	86.1	0.88
CD8-2	47.13	20.77	1.17	5.63	92.9	1.09
CD8-3	32.74	18.74	0.76	4.06	96.5	0.73

## CD8-3



CD8+細胞のソーティング時はCD4+に比較して死細胞の混入が多めです。

メモ

NBRP研究用ヒト臍帯血幹細胞バンクでは、下記の研究用凍結臍帯血試料を提供しています。

細胞の種類	処理方法	細胞数・品質等 提供手数料	提供形態	用途等
有核細胞 (HCB)	HES法	有核細胞 $>3 \times 10^8$ 個/bag以上 提供手数料:32,900円/個(非営利機関), 65,800円/個(営利機関)	細胞をいれたプラスチックバッグがキャニスターに入った状態です。 	臨床用臍帯血移植と同じ処理法で回収した細胞 ●造血幹細胞移植研究 ●様々な細胞分画の取得
単核細胞 (MNC)	フィコール法分離	凍結時好中球20%以下 小容量:MNC $1 \times 10^7$ /tube, 4本セット 提供手数料:13,400円/4本セット(非営利機関) 26,800円/4本セット(営利機関) 大容量:MNC $>1 \times 10^8$ /bag 提供手数料:32,900円/バッグ(非営利機関), 65,800円/バッグ(営利機関)	小容量:チューブ入り  大容量:プラスチックバッグ入りキャニスター 	●血液・免疫研究 ●再生医療研究 ●感染症研究 ●遺伝子治療研究 ●ヒト化マウスの作成を介した研究 ●ヒトゲノム・遺伝子解析研究
CD34 <sup>+</sup> 細胞	ビーズ法純化	CD34 <sup>+</sup> 細胞 $>1 \times 10^5$ /チューブ 凍結時CD34陽性率90%以上 提供手数料:43,200円/本(非営利機関)/86,400円/本(営利機関)	チューブ入り 	●造血幹細胞移植研究 ●血液分化の研究 ●再生医療研究 ●iPS細胞のソース





# AMED NBRP

**研究用ヒト臍帯血幹細胞バンク事業**

(代表機関 東京大学医科学研究所)

**理化学研究所バイオリソースセンター**

<http://cell.brc.riken.jp/hcb>

(Web ダウンロード準備中)

