

1 磁気ビーズ法

原理 T細胞またはB細胞に選択的に発現している表面分子に対する特異抗体を、磁気ビーズに吸着させた試薬とリンパ球を反応させたのち、マグネットを用いて磁気ビーズに結合した細胞を非結合細胞から分離する方法である。分離法には**ポジティブセレクション法**と**ネガティブセレクション法**がある(図9-17)。

▶**Dynabeads法**(Technical Handbook Second edition DYNAL®: Cell Separation and Protein Purification. 参照): 磁気を帯びた微小粒子(サイズは4.5 μ m)であるDynabeads(Dynal Biotech)は種々の抗体を吸着し、目的とする細胞に特異的に結合する。B細胞(T細胞)の分離には、抗ヒトマウス抗CD19抗体(抗ヒトマウス抗CD3抗体)が標識されているDynabeads®M-450 CD19(Dynabeads®M-450 CD3)が用いられ、抗体を介して磁気ビーズを結合した細胞は磁石に吸着される性質を利用して、目的とする細胞集団を純化することができる。抗Fabフラグメントポリクローナル抗体(DETACHaBEAD®)を用いて、得られた細胞集団

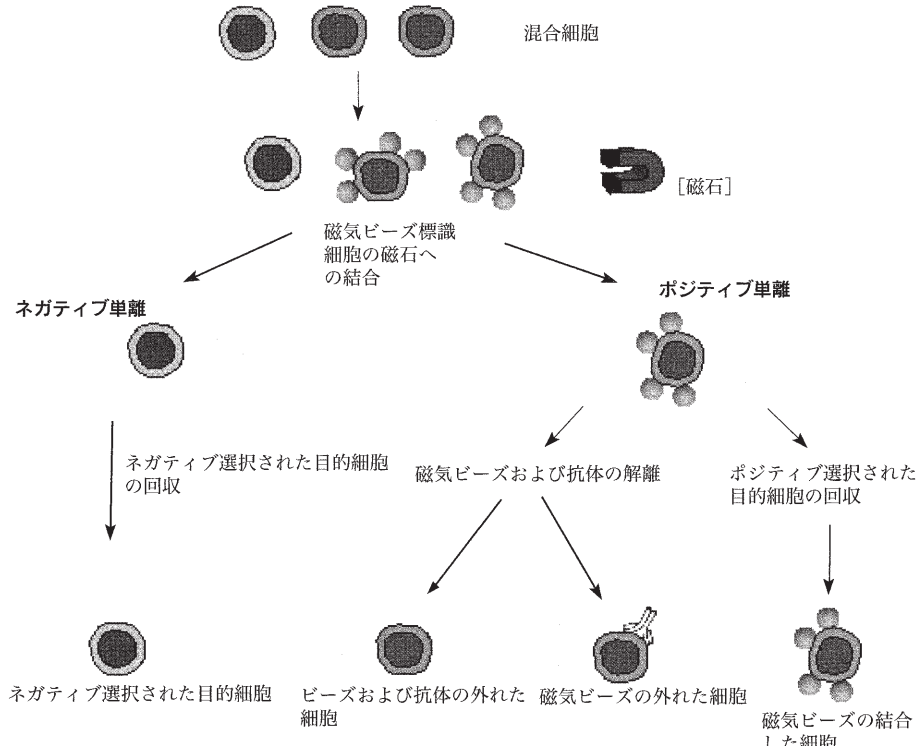


図9-17 磁気細胞分離システム(ポジティブおよびネガティブセレクション法)

から磁気ビーズを除去し、目的の細胞を分離する。全血に直接磁気ビーズを添加して分離する方法もあるが、以下に比重遠心法で得られた末梢血単核球細胞からのB細胞分離法について記した。10ml血液から比重遠心法により得られた末梢血単核球細胞浮遊液5ml(2%FCSを含むRPMI-1640)について記述する。

試薬 PBS, pH 7.4: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.57g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 19.80g, NaCl 81.0g, クエン酸Na 60gを蒸留水(精製水)10lに溶解する。

機器 ① 強力磁石: Dynal MPC(Dynal Biotech社), ② ローテーター: Dynal Sample Mixer(Dynal Biotech社)

実施 (B細胞分離法)

① Dynabeadsは0.02% NaN_3 溶液で調製されているので、使用前に2%FCSを含む滅菌PBS(PBS/FCS)で4~5回洗浄する。

② よく混和したDynabeads®M-450 CD19 37.5 μ lを10mlの滅菌試験管に採取する。

③ 強力磁石に試験管をセットし、1分間静置後、磁気ビーズが吸着した状態でPBSを除去する。

④ 強力磁石から試験管を外し、1~2mlのPBS/FCSを加える。

⑤ ②および③の行程を繰り返し、初期の容量にもどす。

⑥ 滅菌試験管を準備し、比重遠心法で分離した末梢血単核球浮遊液5mlおよび0.01M EDTAを含むRPMI-1640を2.5ml加える(サンプルおよび試薬は冷却しておく)。

⑦ 洗浄した磁気ビーズ37.5 μ lをリンパ球の入った試験管に加え、ゆるやかに混和する。

⑧ 2~4°Cで30分間、ローテーターで緩く傾けた状態でゆるやかにインキュベートする。

⑨ 洗浄緩衝液PBS/FCS 5mlを加え、ゆるやかにピペティングした後、ビーズ結合細胞(B細胞)の入った試験管を強力磁石にセットし2~3分間磁石に吸着させたのち、上清を除去する。

⑩ ⑨の操作を4~6回繰り返す。

⑪ 2%FCSを含むRPMI-1640を適量(100 μ l)加え、細胞を浮遊させる。

⑫ DETACHaBEADを10 μ l加え、室温で45~60分間インキュベートする(傾けた状態でゆるやかに)。

⑬ 試験管を強力磁石に再びセットし、PBS/FCS 5mlを加え、ゆるやかにピペティングした後、2~3分間磁石に吸着させ、剥がれてきたB細胞を50mlの滅菌試験管に回収する。

⑭ ⑬の操作を4~5回繰り返す(5ml \times 5回で25mlになる)。

⑮ 回収したB細胞は十分洗浄後、すばやく培養液に浮遊させ、目的の検査に供する。

注意 ① Dynabeadsと標的細胞の比は4~10:1の範囲で行う。また、細胞と混合した場合Dynabeadsの濃度が 1×10^7 /ml以上が望ましい。

② マクロファージの磁気ビーズへの非特異的吸着を防ぐため、⑥~⑧の操作は2~4°C付近で行うのが好ましい。

③ DETACHaBEADを加えインキュベートする場合、20°C以下あるいは37°C以上ではB細胞の回収率が低下する。

④ DETACHaBEADの使用量は回収されるB細胞数が $1 \sim 10 \times 10^6$ 個の範囲であれば2%FCS/RPMI-1640培地を100 μ lに対し10 μ lでよい。これを超える場合は比例して量を増加させる。上記の場合は約 1.85×10^6 個のB細胞が回収されるので、100 μ lに対し10 μ lとする。

⑤ 細胞数が少ない場合⑩の操作で、細胞が試験管の底に残ってしまうので注意する。

⑥ DETACHaBEADはanti-mouse Fab抗体なので、フローサイトメトリーに使用する場合は採取したB細胞を十分に洗浄する。

⑦ CD3に対するDETACHaBEADはつくられていない。T細胞の単離にはDynal T Cell Neagative Isolation Kitが発売されている。

⑧ Dynabeads M-450 Pan-B(CD19)は 4×10^8 /mlに調整されている。

2 autoMACS(Magnetic Cell Sorting)

原理 分離過程が自動化されている機器であり、ポジティブセレクションでは目的とする細胞を5~10分で単離することができる。超常磁性マイクロビーズは極めて微細(直径は約50nm程度)で、抗体やハプテン/抗ハプテン抗体を介して細胞に結合する。

機器 磁気細胞分離システム autoMACS(第一化学)

試薬 PBS, pH 7.4: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を1.57g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を19.80g, NaCl 81.0gを留水10lに溶解する。オートクレーブにて滅菌後、0.5%BSA・2mM EDTA・PBSとする(BSAは5g/dl程度とし滅菌ろ過したのち滅菌PBSに添加するとよい)。

▶ポジティブセレクション法

CD19 MicroBeadsおよびCD3 MicroBeadsを用いて、CD19陽性B細胞およびCD3陽性T細胞を純化する方法である。

① 15ml用滅菌試験管を用いて、末梢血単核球細胞液(1×10^7)をPBS 80 μ lに浮遊させ、20 μ lのCD19標識磁気ビーズを添加し、4°C 15分間インキュベートする。

② PBS 10mlを加え、4°C 1,100rpm(300g)で10分間遠心し、上清を除く。

③ PBS 1.5mlを加え、ピペティングする。次に、静かに0.5mlのPBSを重層する(回収率がよくなる)。

④ autoMACSをあらかじめ消毒用エタノールでリンスし、各試薬をセットしておく。滅菌試験管(15ml)をポジティブ(Pos)およびネガティブ(Neg)の位置にセットする。

⑤ 分離プログラムPOSSELを選択する。ポジティブセレクションが開始され、ポジティブフラクション2mlにはB細胞(T細胞)が、ネガティブフラクション4mlには、その他の細胞が回収される。

⑥ 遠心後、PBS 2mlで洗浄する。

⑦ 培養液で洗浄後、浮遊液を作製し、目的の検査に供する。

注意 ① BSAはビオチンを含まない純度の高いものを使用すること。

② B細胞亜集団を単離したい場合は、磁気ビーズを剥がした後、異なるマーカを用いて亜集団を純化できるマルチソートキットCD19を使用する。

③ autoMACSを用いると 4×10^8 の末梢血単核球からおおよそ 2×10^8 のB細胞を純化できる(回収率はおおよそ5%)。

▶ネガティブセレクション法

細胞集団から目的とする細胞以外の細胞を除去して、純化する方法である。ヒト末梢血単核球細胞から、T細胞/NK細胞/単球/樹状細胞/顆粒球/血小板/赤血球系細胞に対するビオチン標識特異抗体カクテルおよび**抗ビオチン抗体マイクロビーズ**を用いた間接法により、B細胞を純化する。T細胞を分離する場合は**ビオチン標識抗体カクテル**(B細胞/NK細胞/単球/樹状細胞/顆粒球/血小板/赤血球系細胞)を用いる。本法では目的とするリンパ球亜集団を、もとのままの状態に取り出すことができる利点がある。

実施 ① ここではB細胞分離について述べる。滅菌試験管(15ml)を用いて、末梢血単核球浮遊液(1×10^7 /試薬60 μ l)を作製する。

② **Fc受容体ブロッキング試薬**(ヒト免疫グロブリン)20 μ lおよびハプテン結合抗体カクテル20 μ lを添加し、4°Cで15分間インキュベートする。

③ 試薬10mlを加え、4°C 1,100rpm(300g)で10分間遠心する。

④ 上清除去後、抗ハプテン抗体吸着磁気ビーズ20 μ lを添加し、4°C 15分間インキュベートする。

⑤ 試薬10mlを加え、4°C 1,100rpmで10分間遠心し、上清を除去する。

⑥ 試薬1.5mlを加え、ピペティングする。試薬0.5mlを丁寧に重層する。

⑦ autoMACSをあらかじめ消毒用エタノールでリンスし、各試薬をセットしておく。滅菌試験管(15ml)をポジティブ(Pos)およびネガティブ(Neg)の位置にセットする。

⑧ 分離プログラムのDEPLETEを選択する。ネガティブセレクションが開始され、ネガティブフラクション4mlに目的とする細胞、ポジティブフラクション2mlにその他の細胞集団が回収される。

⑨ 遠心後、試薬2mlで洗浄する。

⑩ 培養液で洗浄後、浮遊液を作製し、目的の検査に供する。

注意 ① BSAは、ビオチンを含まない純度の高いものを使用する。

② 細胞集団と抗体結合磁気ビーズとの反応が不十分であると、目的とする細胞以外の細胞が混入し、純度が低下する恐れがあるので、流速がゆるやかなDEPLETES分離プログラムを選択する。

③ 死細胞は磁気ビーズと非特異的に結合することがあるので、あらかじめFicoll-Hyperqueで除去しておく。

④ T細胞、B細胞以外の細胞系列についても、特異的モノクローナル抗体を用いたキット(第一化学薬品)が発売されている。