

【補足資料】MethoCult™ 培地を使用したCFUアッセイ（細胞サンプルの調製）

注：この説明書は英文添付文書の簡易訳です。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。

塩化アンモニウム溶液によるヒト骨髄の溶血処理

ヒト骨髄サンプルから以下の手順で赤血球細胞を除去することで、有核細胞の懸濁液を調製します。

- (1) ヒト骨髄サンプルをよく混合し、少量（100 μ L）を分取します。校正済みの自動セルカウンターまたはノイバウエル血球計算盤で有核細胞数をカウントし、元のサンプル中の有核細胞数と濃度を算出します。
詳細は「MethoCult™ 培地を使用したCFUアッセイ」（日本語簡易版）4.1章をご参照ください。
- (2) 骨髄サンプル全量を14 mLチューブに分注します。14 mLチューブ1本あたり骨髄サンプルを2 mLより多く入れないでください。1本あたりの骨髄サンプルが2 mLを超えるときは、50 mLチューブに移します。
- (3) 骨髄サンプルに対して4倍量以上の塩化アンモニウム溶液を加えます。
（例：1 mLの骨髄サンプルに対して、4 mL以上の塩化アンモニウム溶液を添加）
- (4) ボルテックスミキサーで(3)の混合物を穏やかに攪拌し、氷上で10分間静置します。途中で1~2回穏やかに攪拌または反転させます。すべての赤血球は通常10分以内に溶血します。
- (5) 完全に溶血したことを確認します（混合物は半透明の赤色に見えます）。溶血が不完全であればボルテックスミキサーで穏やかに攪拌し、さらに氷上で5~10分間静置しながら時々穏やかに攪拌またはチューブを反転させます。
- (6) IMDM + 2% FBS（無血清条件ではIMDM + 25 mM HEPES）を加えて各チューブの液量を12 mLにし、300 x gで10分間、室温（15~25°C）で遠心分離します（ブレーキはオン）。
- (7) 細胞ペレットを崩さないように、すばやくかつ注意深く上清を除去します。
- (8) ボルテックスミキサーで穏やかに攪拌して細胞ペレットをほぐしたら、10 mLのIMDM + 2% FBS（無血清条件ではIMDM + 25 mM HEPES）を加えます。ボルテックスミキサーで攪拌することで細胞ペレットを再懸濁します。
- (9) (8)の細胞懸濁液を300 x gで10分間、室温（15~25°C）で遠心分離します（ブレーキはオン）。上清を捨て、細胞を再度洗浄します。
注：複数のチューブでも同一サンプルの由来であれば、最終洗浄の前に細胞をプールすることもできます。
- (10) 最終洗浄後の上清を捨て、1~2 mLのIMDM + 2% FBS（無血清条件ではIMDM + 25 mM HEPES）を加えて細胞を穏やかに再懸濁します。開始時の有核細胞数が多ければより多くの容量を加えます。
- (11) (10)の細胞懸濁液の容量を記録し、初期細胞数と同じ方法で有核細胞数をカウントします。
詳細は「MethoCult™ 培地を使用したCFUアッセイ」（日本語簡易版）4.1章をご参照ください。

密度勾配遠心によるヒト単核細胞の分離

造血コロニー形成細胞は骨髄、臍帯血、末梢血の単核細胞（MNC）画分に存在します。Lymphoprep™を使用した密度勾配遠心分離によりMNCを濃縮する一方で、成熟赤血球、有核赤血球前駆体、好中球、および高密度の非生細胞を除去します。

- (1) サンプルをよく混合し、少量（100 μ L）を分取します。校正済みの自動セルカウンターまたはノイバウエル血球計算盤で有核細胞数をカウントし、元のサンプル中の有核細胞数と濃度を算出します。
詳細は「MethoCult™ 培地を使用したCFUアッセイ」（日本語簡易版）4.1章をご参照ください。
- (2) 処理するサンプルの全量を新しいチューブに移します。
- (3) (2)と等量以上のIMDM + 2% FBS（無血清条件ではIMDM + 25 mM HEPES）で細胞を希釈します。チューブを静かに反転させて混合します。
- (4) 新しい50 mLチューブに15 mLのLymphoprep™を入れます。
※ 冷蔵保存しているLymphoprep™は、室温（15~25°C）に戻してからご使用ください。
※ 50 mLチューブの代わりにSepMate™-50（ST-86450）を使うと、分離後のMNCをすばやく簡単に回収できます。以降の操作はSepMate™-50の操作マニュアルをご参照ください。
- (5) (4)のLymphoprep™の上に、30 mLの(3)の細胞サンプルを明確な層が形成されるように静かに重層します。
※ Lymphoprep™と細胞サンプルが混ざって層が乱れると、遠心分離後に明確な層が形成されません。MNCの回収率が低下する原因となります。
※ 他の容量については、Lymphoprep™の製品情報シートをご参照ください。
- (6) チューブを800 x gで20分間、室温（15~25°C）で遠心分離します（ブレーキはオフ）。
- (7) Lymphoprep™層の界面に存在する灰色から白色のMNC層を乱さないように注意しながら、滅菌ピペットまたはパスツールピペットで上部の血漿層を除去します。
- (8) MNC層を回収し、新しい14 mLチューブに移します。
※ 通常、MNC層にはリンパ球、血小板、単球、および造血コロニー形成細胞が含まれます。
- (9) IMDM + 2% FBS（無血清条件ではIMDM + 25 mM HEPES）を添加し、300 x gで10分間、室温（15~25°C）で遠心分離します（ブレーキはオン）。
- (10) 細胞ペレットを崩さないように、注意深くかつ速やかに上清を除去します。IMDM + 2% FBS（無血清条件ではIMDM + 25 mM HEPES）に細胞を再懸濁し、完全に混合します。
- (11) 300 x gで10分間、室温（15~25°C）で遠心分離します（ブレーキはオン）。

- (12) 再び、注意深くかつ速やかに上清を除去します。
- (13) 細胞ペレットを 1~2 mL の IMDM + 2% FBS (無血清条件では IMDM + 25 mM HEPES) に再懸濁します。調製開始時の細胞数が多ければ、より多く添加するのが望ましいことがあります。
- ※ Lymphoprep™による MNC 分離では、最終的に造血前駆細胞が 2~4 倍濃縮されます。成熟した骨髄細胞は赤血球とともに除去されます。それに応じて播種する細胞の濃度を調整する必要があります。
- 詳細は「MethoCult™ 培地を使用した CFU アッセイ」(日本語簡易版) 5 章をご参照ください。
- (14) (13) の容量を記録し、有核細胞数をカウントします。
- 詳細は「MethoCult™ 培地を使用した CFU アッセイ」(日本語簡易版) 4.1 章をご参照ください。

ヒト凍結臍帯血細胞の融解

- (1) 凍結臍帯血細胞のバイアルを 37°C のウォーターバス中で穏やかに振り、迅速に (2 分以内に) 解凍します。細胞を融解する過程ではボルテックスしないでください。
- (2) 細胞がほぼ完全に融解されたら、バイアルの外側を 70% エタノールまたはイソプロパノールで拭きます。
- (3) 細胞を 15 mL または 50 mL コニカルチューブに移します。
- (4) (3) のチューブを静かに回転させながら、約 1~2 分かけて 10 mL の培地 (D-PBS + 2% FBS、または IMDM + 2% FBS。無血清条件では IMDM + 25 mM HEPES) を、チューブにゆっくりと一滴ずつ加えます。チューブを穏やかに反転させて混合します。
- (5) (4) の細胞懸濁液を 300 x g で 10 分間、室温 (15~25°C) で遠心分離します。
- (6) 細胞ペレットを崩さないように注意しながら、上清を注意深く取り除きます。デカンテーションはしないでください。チューブをゆるやかに弾いて細胞ペレットを再懸濁します。
- オプション: (4)~(6) を繰り返せば死細胞をさらに除去できます。ただし、細胞数が少ないサンプルにはおすすめしません。
- (7) 2 mL の培地 (D-PBS + 2% FBS または IMDM + 2% FBS、無血清条件では IMDM + 25 mM HEPES) をチューブに追加します。
- (8) (7) の容量を記録し、有核細胞数をカウントします。
- 詳細は「MethoCult™ 培地を使用した CFU アッセイ」(日本語簡易版) 4.2 章をご参照ください。

マウス骨髄細胞の調製

通常、6~12 週齢のマウスから骨髄細胞を調製します。若齢または老齢の個体、トランスジェニックマウス、および化合物を処理したマウスでは、系統および週齢が同じ個体を使ってください。骨髄や脾臓から分離した有核細胞の数は週齢により異なります。個体間の評価する場合を除き、2 匹以上の細胞をプールして調製します。

- (1) 所属機関の指針に従いマウスを安楽死させます。
- (2) マウスから大腿骨と脛骨を摘出します。骨に皮膚や筋肉組織が付いていないことを確認してください。
- (3) メスで骨端を切り、骨髄シャフトの内部を露出させます。骨を滅菌した乳鉢に移します。
- ※ 安楽死させた後、可能な限り早く細胞を調製してください。
- (4) 5 mL の適切な培地を乳鉢に添加します。
- ※ マウス骨髄細胞の調製に適した培地には、IMDM + 25 mM HEPES、IMDM + 2% FBS、Alpha MEM、PBS または PBS + 2% FBS などがあります。少量の培地で細胞を調製してください。
- (5) 乳棒で骨を粉砕して骨髄をばらけさせます。
- (6) (5) を 40 μm セルストレーナーを通した後、ピペットで滅菌済みの 50 mL チューブに移します。
- (7) さらに約 5 mL の培地を追加し、培地と骨から赤みがかった色が消えるまで(5)~(6)を繰り返します。
- (8) チューブを 300 x g で 10 分間遠心します。
- (9) 上清を捨て、後続のアッセイに適切な濃度になる量の培地を添加し、細胞を再懸濁します。
- (10) 細胞塊を単細胞 (シングルセル) に分離するために、さらに 21 ゲージ針を取り付けた 3 mL シリンジで懸濁します。針を液面より下に保ちながら 3~4 回繰り返します。
- (11) 調製した細胞懸濁液は使用するまで氷上に静置します。

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-18-16 住友浜松町ビル 6 階
 TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076 URL: <https://www.veritastk.co.jp/>
 技術的なお問い合わせ E-mail: Tech_support@veritastk.co.jp TEL 03-5776-0040 (平日 9 時 - 17 時)