

## himac APPLICATION

No.48 SEPTEMBER 1992

題目 エルトリエータロータによるヒト単球の分離

機種 高速冷却遠心機用エルトリエータロータ SRR6Y

エルトリエータロータ SRR6Y を用いてヒト単核球画分から単球とリンパ球を分離した例

エルトリエータロータは遠心力だけではなく、遠心力と対向する流れによる力の二つの力を利用して、細胞レベルの大きさのもの（2~50  $\mu\text{m}$ 程度）を分離するロータです。このロータを利用すると、遠心力だけでは難しい細胞のサイズごとの分離が可能となります。例えば、白血球中の単核球画分から単球とリンパ球の分離、肝細胞における非実質細胞からの、伊東細胞（FSC）や類洞内皮細胞、クッパー細胞の分離に用いることができます。分離にはモノクローナル抗体などの特殊な試薬を必要としないので、細胞の生存率を損なうことがなく、また細胞表面に対する刺激が少ない状態での分離が期待できます。

#### 1. 分離結果

- (1) フラクション1に高純度のリンパ球が得られました。
- (2) フラクション3とフラクション4に単球が約90%の純度で得られました。
- (3) フラクション5以降に顆粒球の流出が認められました。

以下に分離前 (Fig.1) とフラクション1 (Fig.2)、フラクション3 (Fig.3)、フラクション5 (Fig.4) の分離結果の顕微鏡写真を示します。(染色: ライト・ギムザ染色)

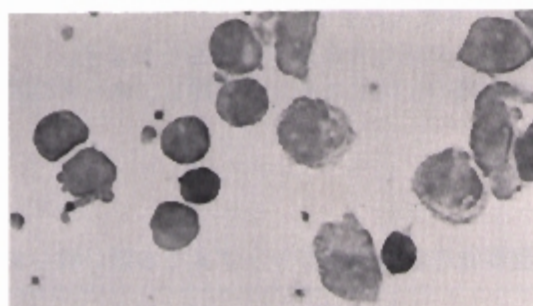


Fig. 1 分離前

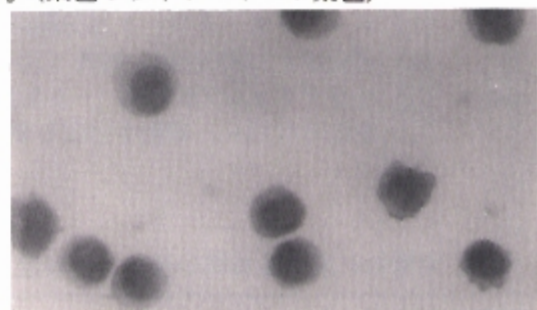


Fig. 2 フラクション 1

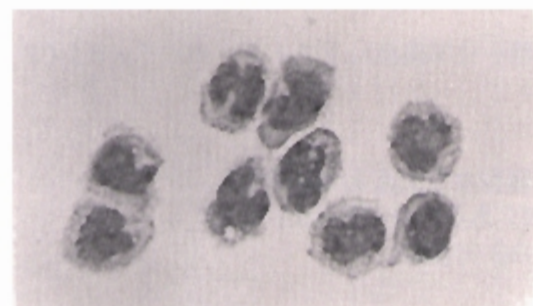


Fig. 3 フラクション 3

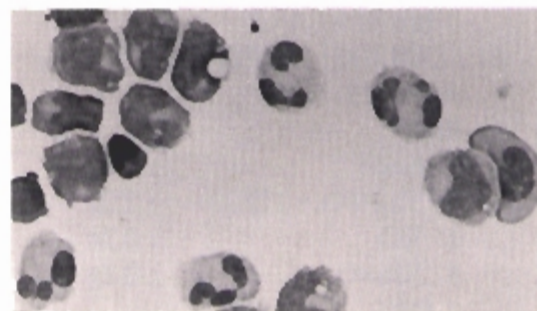


Fig. 4 フラクション 5

表1 分離条件と結果の一覧表

フラクション	回転数 (rpm)	流量 (ml/min)	分画時間 (min)	分画量 (ml)	細胞数 ( $\times 10^3$ )	細胞の割合 (%)			備考
						単球	リンパ球	顆粒球	
分離前	—	—	—	—	9.9	38.3	61.7	< 0.1	Fig.1
1	2,000	10	10	100	3.46	< 0.1	> 99.9	0	Fig.2
2	2,000	12	8.3	100	1.65	76.6	23.4	0	
3	2,000	14	10.7	150	1.33	91.0	9.0	0	Fig.3
4	2,000	16	12.5	200	0.42	91.0	9.0	0	
5	2,000	18	11.1	200	0.06	24.9	68.6	6.5	Fig.4
6	2,000	20	10	200	0.03	*	*	*	
7	stop	20	10	200	0.32	35.6	62.9	1.5	
合計	—	—	72.6	1,150	7.27	—	—	—	

\*) フラクション6の細胞の割合はフラクション5とほぼ同様でした。

## 2. 分離手順

### 2-1. 単核球の分離

- (1) ヘパリン、EDTAなどの抗凝固剤を含む新鮮血100mlを用意します。
- (2) 遠心チューブ<sup>1)</sup>を18本用意し、これらに単核球分離用の比重液<sup>2)</sup>を3mlずつ入れます。
- (3) 次に、(1)の血液を希釈せずに6mlずつ比重液の上に静かに重層します。18本目は17本目に重層した血液と等量の生食液を重層し、バランス調整を行います。
- (4) 日立CR5DL形多本架冷却遠心機にRT3S6形スイングロータ、スクウェアラックYEを用い、1,400rpm、30分(20℃)遠心します。
- (5) 遠心後のチューブ上部の血漿部分はアスピレータなどで捨て、チューブ中央部に形成されたパフィーコート<sup>3)</sup>を2~4本の新しい遠心チューブに集めます。
- (6) それぞれのチューブにPBS(-)<sup>3)</sup>を加え、チューブ1本あたり約10mlとし、(4)の遠心機とロータ、ラックを用い、1,000rpm、5~10分(20℃)遠心し細胞を洗浄します。
- (7) 上清を捨て、PBS(-)を約2mlずつ加え細胞を再懸濁させ、1本の遠心チューブに集め、最終10mlとなるようにPBS(-)を加えます。これがエルトリエータロータ用分離試料となります。

### 2-2. エルトリエータロータによる分離

- (1) エルトリエータロータ用分離試料をサンプルボトルに入れます。
- (2) 回転数：2,000rpm、流量：10ml/minから、表1に示した条件で分離を行います。
- (3) フラクション7はPBS(-)を流した状態で遠心機のSTOPスイッチを押し、ロータの回転を止めながら、細胞を回収します。

なお、本資料に関するお問い合わせは日立工機(株)精機事業部応用開発グループまでお願い致します。

- 1) コーニング製滅菌チューブ(14ml,  $\phi 17 \times 100$ mm, コードNo.25225ST17PO: 岩城硝子)などの、チューブ容量10~15ml、チューブ内径15~17mm程度の遠心チューブ。(丸底のポリプロピレン製が望ましい。)
- 2) 「LSM溶液」(和光純薬)、「リンフォ・プレップ」(第一化学薬品)、「フィコール・バック」(ファルマシア)など。
- 3) 組成
 

1. NaCl	: 8.0g	}	これらに蒸留水を加え1,000mlとし、 1N NaOHあるいは1N HClにて pH7.2 $\pm$ 0.2に調製。
2. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	: 2.9g		
3. KCl	: 0.2g		
4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: 0.2g		

これに、  
0.01 (W/V) % EDTA - 2Na  
1 (V/V) % FBS (FCS)などのタンパク質 (BSAの場合には0.1 (W/V) %) を添加したもの。