



Application

## マウス脾臓の組織凍結と効果比較

製品名

バンバンカー (Cat.No. CS-02-001)

メーカー名

株式会社GCリンフォテック

下記のデータは国内 研究機関のユーザー様のご厚意により掲載させていただきました。

### 概要

緩慢凍結保存試薬は、単離された状態の細胞凍結を想定した製品がほとんどであり、組織凍結における効果はわずかな報告のみであった。そこで今回、市販の緩慢凍結保存試薬にてマウスの脾臓を-80℃で10日間の凍結を行い、解凍後細胞をフローサイトメーターにて比較評価を行った。

その結果、弊社取り扱い製品であるバンバンカーで凍結した場合に、細胞生存率、細胞状態共に最も良好な結果が得られた。

### 検証方法

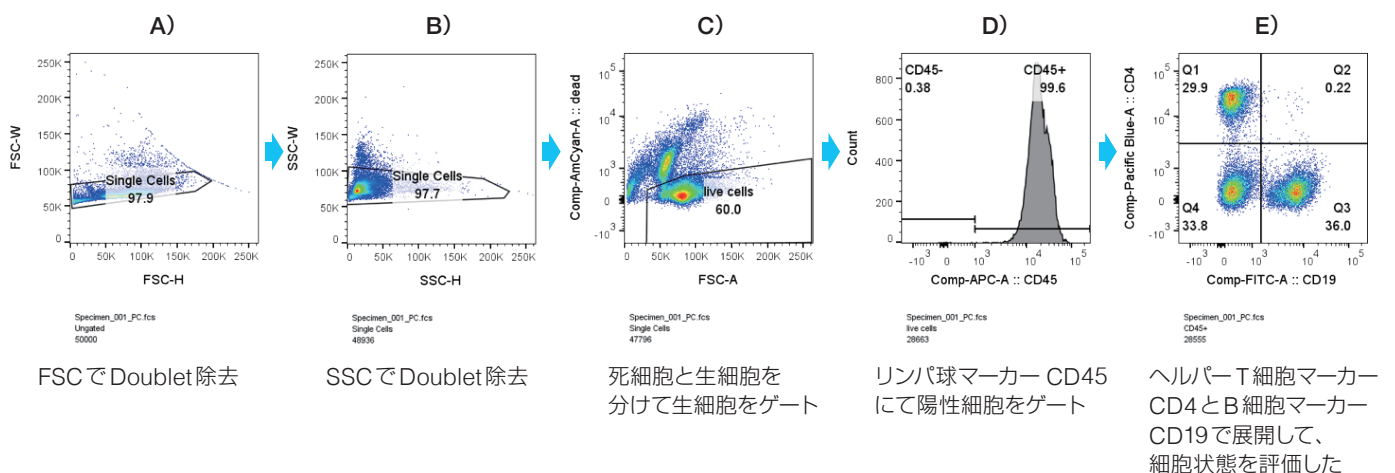
#### 検証方法① 採材からセルカウント

- マウス3匹から脾臓を採材した。
- 1個の脾臓を4等分して、3種類の試薬それぞれ1 mLに浸して-80℃で10日間保管した。
- 37℃のウォーターバスで解凍後、10 mL程度の10%FBSと1%ペニシリンストレプトマイシンを含むRPMI1640に浸して遠心した後、上清を除去した。
- Miltenyi BiotecのgentleMACS™ Octo Dissociatorで脾臓を破碎し、その後細胞を分離した。
- ACK lysis bufferで赤血球を溶血させ、PBSに再懸濁してセルカウンター TC20 (BioRad)で細胞数と生存率を計測した。

#### 検証方法② フローサイトメーター解析

- 細胞懸濁液からそれぞれ10<sup>6</sup>cellsずつ分取した。
- eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506で死細胞染色を行った。
- Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)で処理した。
- APC anti-mouse CD45, Pacific Blue anti-mouse CD4, FITC anti-mouse CD19で細胞表面マーカーを染色した。
- コントロールとして、施設で凍結保存していたナイーブマウスの脾臓細胞を使用した。(組織から細胞を単離して、凍結保存したサンプル)
- フローサイトメーター BD FACSCanto II (ベクトン・ディッキンソン)で解析した。

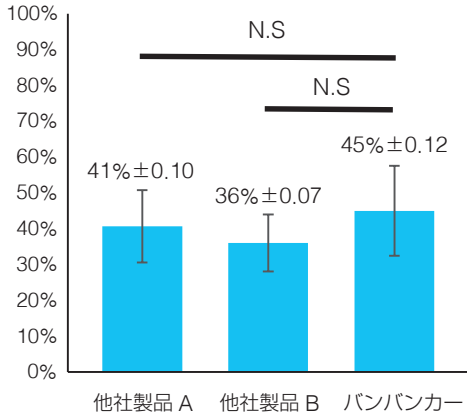
#### <解析方法概要>



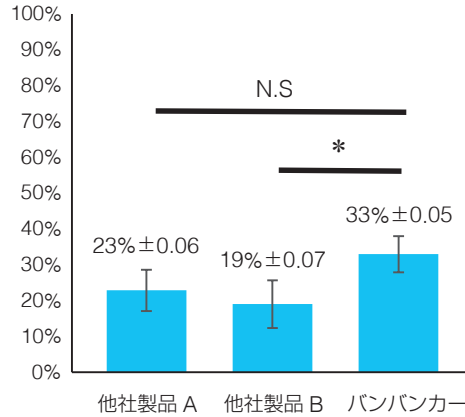
結果

結果① 細胞の生存率

i) セルカウンターによる細胞の生存率



ii) フローサイトメーターによる細胞の生存率

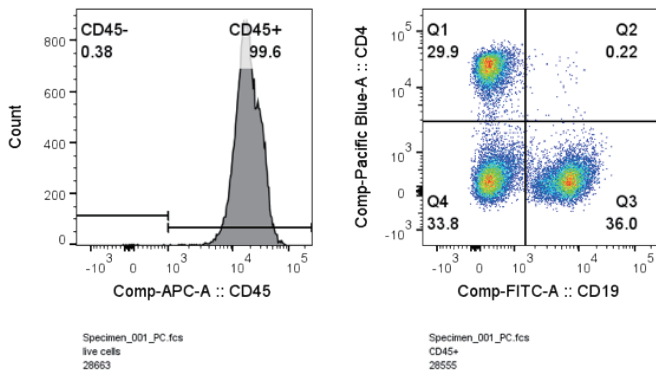


明確な差は得られなかったが、両検討方法共に、バンバンカーが最も高い生存率 (i.45%±0.12、ii.33%±0.05) を示した。

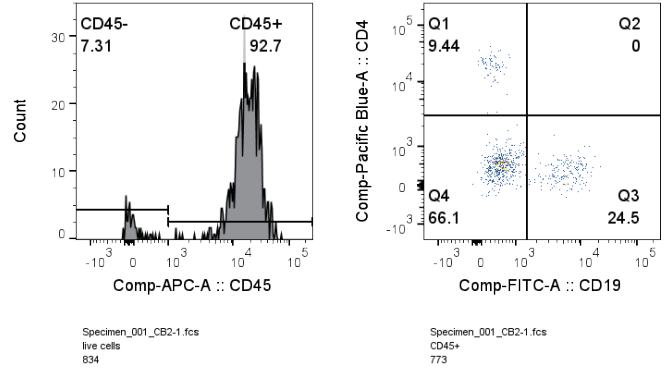
\*Student t-test:n=3, N.S. (not significant) p<0.05

結果② フローサイトメーターの結果

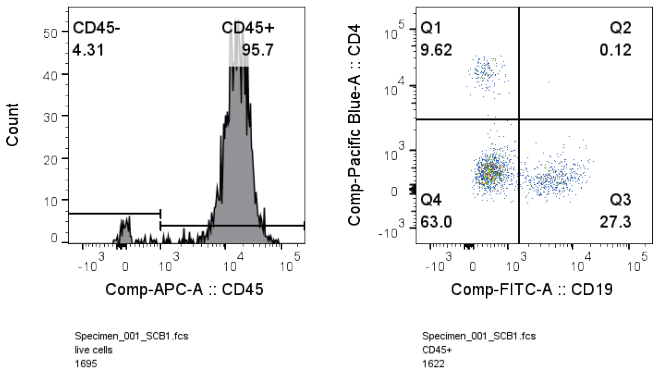
● コントロール



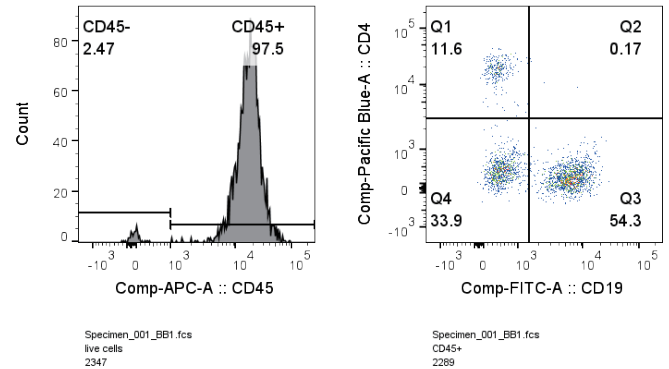
● 他社製品 A



● 他社製品 B



● バンバンカー



バンバンカーで凍結保存した細胞はQ1 (CD4陽性) Q3 (CD19陽性) を示す細胞の割合が多かった。

● まとめ

バンバンカーで保存した場合に、比較的生存率が高く、T細胞、B細胞を維持しながら保存できた。

組織採材後、直ぐに細胞分離までを行う場合は、どうしても操作量が多くなりがちです。このため、組織採材後、直ぐに組織凍結できることは、作業のストップポイントになるため有効だと考えています。今回バンバンカーでは、比較的良好な結果が得られたため、今後この目的でバンバンカーを活用していきたいと考えています。

### 実験①

組織を採材後、すぐに処理する方法では、gentleMACSで破碎して溶血した後に他社製品Aを使って凍結保存しているが、この場合、解凍後の細胞生存率は85~95%程度となります。これを比較すると、本実験における細胞生存率は、いずれも低いと思われます。ただし、これは、i) 実際のP3実験室での作業を想定し、解凍後、組織の粉碎を行った後、細胞の生存率を測定していること、ならびにii) 組織の解凍方法をまだ十分に検討していないためと考えています。

### 実験②

本実験では、他社製品Aと他社製品Bは、共にCD4とCD19の染まり方が悪い点や、生存率が低い傾向などを示すなど、近い結果になりました。この点は、解凍方法やその後の処理を工夫することで、まだ改善できそうな気がしますが現時点では検討は出来ておりません。一方、バンバンカーでは、細胞生存率が比較的良好な印象を受けます。また、Doubletの数も少ない印象を受けます。ただし、比較的CD4の染まり具合が悪いことから、バンバンカーについても、まだ検討の余地があるかもしれません。

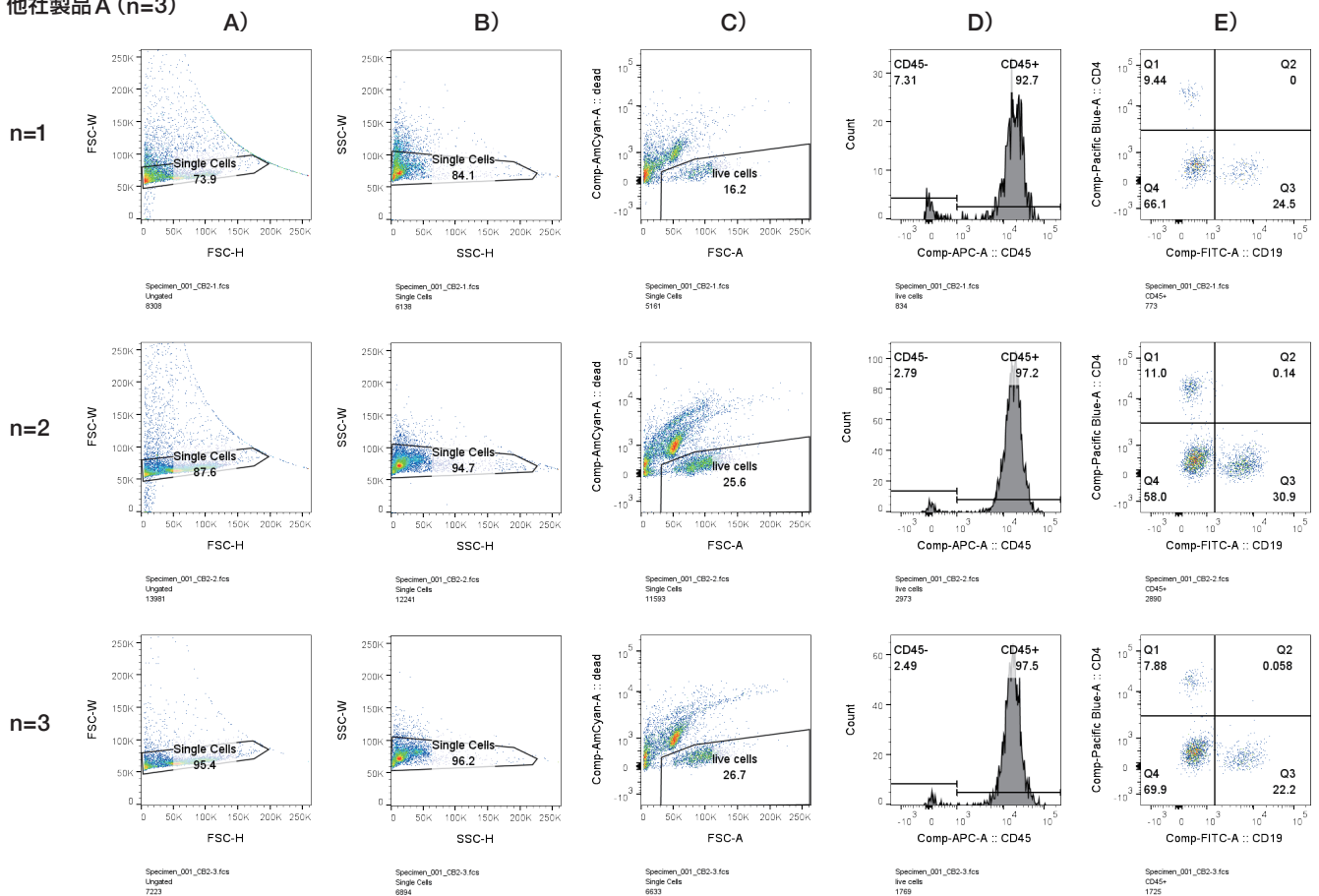


お客様のコメント

## 補足データ

### フローサイトメーター解析結果詳細

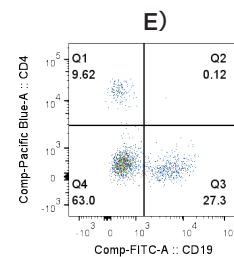
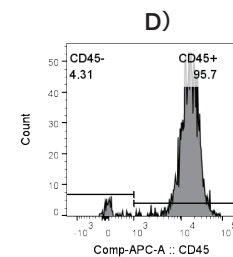
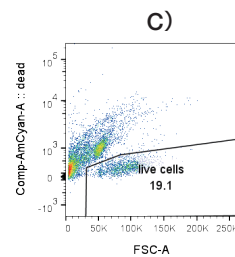
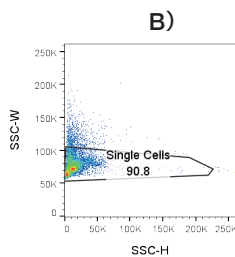
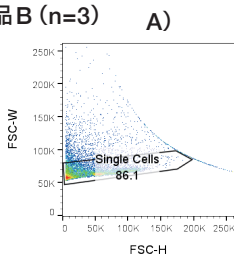
#### ● 他社製品 A (n=3)



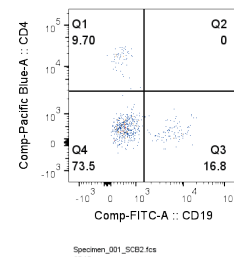
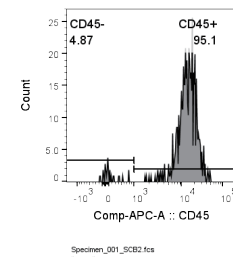
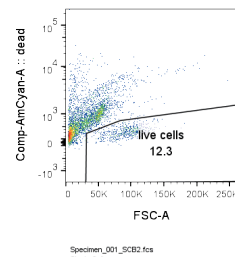
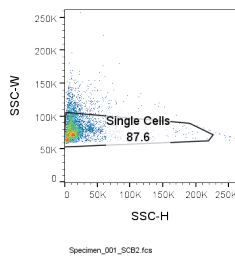
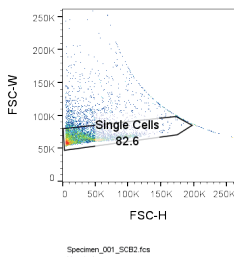


● 他社製品 B (n=3)

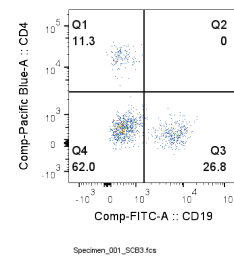
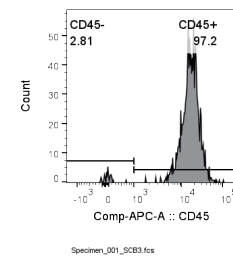
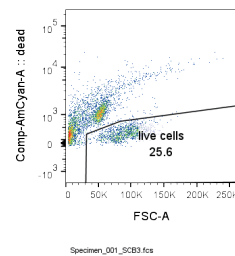
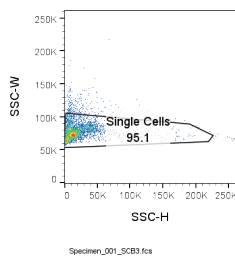
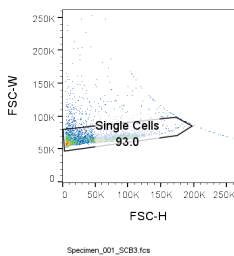
n=1



n=2

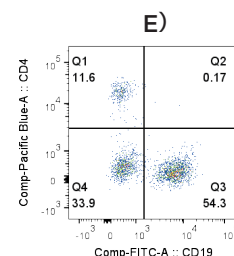
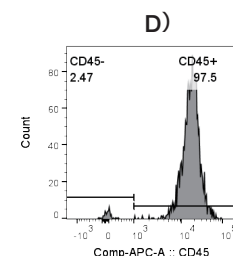
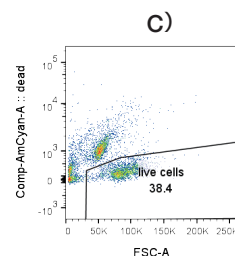
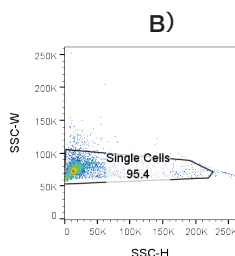
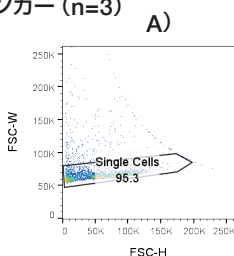


n=3

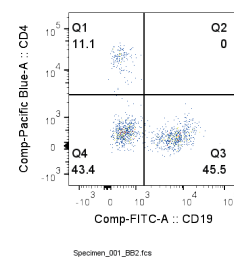
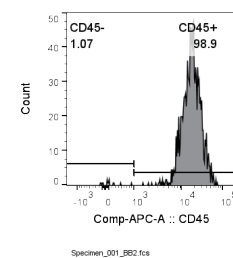
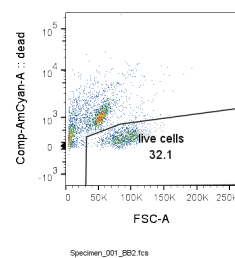
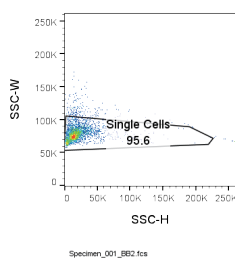
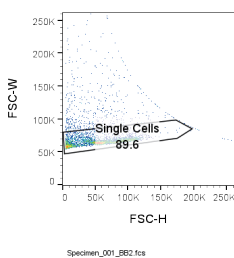


● バンバンカー (n=3)

n=1



n=2



n=3

