

CAR発現生T細胞作製を目的としたアフェレーシスに伴う細胞生存率測定方法の検討

◎坂倉 立紀¹⁾、田中 由美¹⁾、角屋 佳苗¹⁾、丸山 美津子¹⁾、辻 琴羽¹⁾
三重大学医学部附属病院¹⁾

【背景】CAR発現生T細胞作製には、患者から採取したCD3⁺細胞の細胞数以外に細胞生存率の測定が必要である。今回は、細胞生存率算出方法を選択するにあたり、異なる細胞濃度の検体で、7-AADを用いたフローサイトメーターでの同時測定法と、Trypan Blueを用いた視算法での算出方法を比較検討したので報告する。

【方法】測定検体はEDTA-2Kにて採取した末梢血、および血液分離装置にて採取した移植用検体等を用いた。7-AADを用いたフローサイトメーター細胞生存率算出方法：測定検体を、標識抗体（CD3 PE 標識抗体・抗白血球-FITC 標識抗体液：BD）、7-AAD（7・アミノアクチノマイシン-D：BD）で標識し、フローサイトメーター(BD FACSCanto II™)で測定した。生存率(%)は、 $(\text{ViableCD3}^+\text{Tcells}/\text{CD3}^+\text{Tcells}) \times 100$ の計算式で算出した。Trypan Blue 色素排除法による細胞生存率算出方法：測定検体を Lysis Buffer(主成分：塩化アンモニウム塩でホルムアルデヒド非含有、Ammonium Chloride Lysing Solution：BD)で希釈後に0.4w/v% Trypan Blue(和光純薬)で染色し、血球計

算盤で生細胞と死細胞を視算した。生存率(%)は、 $(\text{生細胞数}/\text{全細胞数}) \times 100$ の計算式で算出した。

【結果】7-AADを用いたフローサイトメーターでのCD3⁺細胞数の同時測定法と、Trypan Blue 色素排除法による生存率はそれぞれ、Ave.98.5%(min94.9%-max99.5%)、Ave.98.1%(min97.3%-max100%)であった。また、細胞濃度がどのような検体でも、測定方法間に有意差を認めなかった。ただし、Trypan Blueの生存率におけるSD値は、7-AADと比べて大きくなった。

【考察】細胞濃度が一定程度ある検体では、Trypan Blueによる算出方法と7-AADを用いた算出方法のどちらも安定して細胞生存率を算出できると考えられた。しかし、細胞濃度が低い検体では、血球計算盤内にサンプリングされる細胞集団に偏りが発生し、一度に視算できる細胞数が限られるため、Trypan Blue 色素排除法の算出結果が安定しない。よって、CAR発現生T細胞作製を目的とした細胞生存率の測定には、7-AADを用いたフローサイトメーターでの算出方法が適していると考えられた。連絡先：059-231-5175