

付

以降の項では血液細胞処理に関連する基礎的事項の解説を載せた。検査法については可能な限り標準的方法を各施設で確立しておく必要がある。細胞処理手順については各施設の規模、設備、人員、費用等により差があることは避けられないが、標準作業手順書(SOP)、工程記録等の整備は必須である。各項に、いくつかの施設で用いられているものをもとにして、これらの書類のサンプルを載せた。ただし、内容の詳細に関しては必ずしも試薬説明書と同じではない。まだ十分に整備されていない施設では、これらをダウンロードして各施設で修正を加えて自施設の SOP 整備に役立てていただきたい。

<目次>

1. 細胞処理の一般的事項	2
1.1. クリーンベンチ/安全キャビネットの使用・管理手順.....	2
1.2. 細胞総数と生細胞数の算定	3
1.3. CD34 陽性細胞数測定法	4
1.4. コロニー形成細胞測定法(コロニーアッセイ検査)	7
2. 末梢血幹細胞の処理・凍結保存手順	8
3. 骨髄液からの赤血球除去手順.....	14
4. 骨髄液からの上清除去手順	23
5. 凍結細胞の解凍・輸注の手順	26
6. 細胞処理に用いる試薬など	30

1. 細胞処理の一般的事項

1.1. クリーンベンチ/安全キャビネットの使用・管理手順

<解説>

ヒト由来細胞の分離処理、解凍洗浄に関する無菌操作ならびに各種の細胞調製を行い安全な血液細胞製剤を製造するためには、クリーンベンチ、バイオクリーンベンチまたは安全キャビネットが必要である。クリーンベンチやバイオクリーンベンチと安全キャビネットでは空気の流れが基本的に異なり、安全キャビネットではベンチ内の空気が作業側側に吹き出さないようになっている反面、機種によっては汚染しやすい状態となる。従ってベンチ/キャビネット外の環境も含めて機種を選ぶ必要がある。なお作業者の安全を考えると安全キャビネットが推奨されるが、特に病原微生物陽性の検体を扱う必要がない場合にはクリーンベンチまたはバイオクリーンベンチで支障はない。いずれにしても処理中に開放系操作を含む場合には環境管理されたクリーンベンチを使用することが必要である。クリーンベンチ内を常に清潔に保つこととそのクリーンベンチ内が清潔か否かを確認することは重要であり、汚染されたクリーンベンチを使用しても意味がない。従って、単純にクリーンベンチということではなくクリーンベンチ内の清掃、環境測定を行うことが推奨される。

<定期保守点検>

クリーンルーム清掃・管理手順に従い定期的にパーティクルカウンターおよびエアースンプラーにてクリーンベンチ内環境測定を行うことが望ましい。パーティクルカウンターおよびエアースンプラーの使用方法はそれぞれの機器の手順書に準じる。

クリーンベンチ内の粉塵量測定(パーティクルカウンター使用例)



1.2. 細胞総数と生細胞数の算定

<解説>

造血細胞移植において最も基本的検査である。一般に器械による方法と細胞を染色して顕微鏡して算定する方法がある。

採取された骨髓液や末梢血中の細胞総数測定には測定者の誤差を最小限にすることから自動血球計数装置(Sysmex, Siemens, Beckman Coulter 社製等がある)が推奨される。その場合、定期的にコントロール血球にて測定値が正しいか測定装置そのもののバリデーションを行っておくことが重要である。ただし、骨髓は本来適切な対象検体でなく、脂肪滴や赤芽球系細胞を多く含むため、細胞総数および分画ともに、表示された結果の解釈には注意が必要である。電気抵抗変化またはレーザー光散乱を原理としているものが主流でありそれぞれの器機の性能を十分理解して使用する。骨髓や臍帯血では有核赤血球を多く含むためそれを鑑別できる機種(レーザー光散乱)を使用することが望ましい。また機種によって必要最低限のサンプル量が異なったり、濃度が高すぎると白血球分画が算出できなかったりする場合があるため適宜量を調製・希釈する必要がある。

一方、細胞分離後クリーンルーム内で細胞数を測定したり、解凍後に生細胞率を測定したりする場合には色素により白血球を染色する方法が用いられる。染色した細胞液を血球計算盤とカバーガラス上にできた高さ 0.1mm の部分に注いで顕微鏡で数を数える。染色にはトリパンプルー(Trypan Blue)染色、チュルク氏液(Turk's solution)染色や臍帯血の検査によく用いられるアクリジンオレンジエチジウムブロマイド(Acridine Orange/Ethidium Bromide)染色がある。トリパンプルー法は、トリパンプルー色素が生細胞には取り込まれないが死細胞では取り込まれることを利用して、生細胞と死細胞を見分けるときに役立つ。生細胞は光って見えるが、死細胞は青色に染まる。ただし赤血球にも取り込まれないため赤血球が多い検体では白血球との判別がつかない場合がある。一方、チュルク法は骨髓液や末梢血など赤血球が多くて白血球との見分けがつかない新鮮な検体の場合に用いる。チュルク液を入れると赤血球が溶血するが、どの白血球も濃紺に染まって見えるので死細胞との区別はつかない。死細胞も含みかつ赤血球も多い場合にはアクリジンオレンジエチジウムブロマイド法が適している。これは臍帯血等、解凍した細胞の生細胞率測定に用いられることが多いが、蛍光顕微鏡を必要とする。

血球計算盤(Hemocytometer)には ビルケルチュルク(Burker-Turk)や改良ノイバウエル(Improved Neubauer)が一般的に用いられる。ニュートンリングを作るように計算盤にカバーガラスをスライドさせてかぶせると深さが 0.1mm になる。ディスプレイブル検査キットも市販されていて便利である。

その他、生細胞率のみを確認する場合には フローサイトメトリーで CD45 陽性細胞と Propidium Iodine や 7AAD という色素で染色したり、近年専用の機器(Countess, Invitrogen)で測定したりする方法がある。

<参考文献>

1. 臨床検査法提要 金原出版株式会社

1.3. CD34 陽性細胞数測定法

<解説>

造血幹細胞移植においては造血幹細胞の指標となる CD34 陽性細胞数の測定は非常に重要であり、特に末梢血幹細胞移植と臍帯血移植においては CD34 陽性細胞数と生着率に高い相関がある。国際血液療法・移植学会(The International Society of Hematotherapy and Graft Engineering;ISHAGE)は 1996 年、末梢血およびアフレーシス産物中の CD34 陽性細胞のフローサイトメーター(FCM)による迅速かつ高感度な方法を評価するために Stem Cell Enumeration Committee を編成し、同年ガイドラインを作成した(1999 年 Current Protocol in Cytometry)。また、最近になりわが国でも日本臨床検査標準協議会から「フローサイトメリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン(JCCLS H3-P V1.0)」が出された(http://www.jccls.org/state/pdf/fcf_h3pv1.pdf)。これらの方法では、抗 CD34 抗体の非特異染色の影響をできるだけ少なくするために、抗 CD45 抗体との同時染色を行い、CD45 強陽性の CD34 非特異染色細胞と CD45 弱陽性の CD34 陽性造血前駆細胞とを識別し解析する。

採取後間もない新鮮な末梢血幹細胞検体では全白血球数として CD45 陽性細胞数で代用することができる(デュアルプラットフォーム法)。この方法は簡便だが、フローサイトメリーの他に血球計数装置が必要である。一方、臍帯血や骨髄では CD45 陰性～弱陽性である赤芽球や有核赤血球が多く含まれるため、本方法では不正確となるため推奨されない。

一方、粒子濃度が既知の蛍光標識ポリスチレンラテックス粒子を「内部標準」として資料に加えて測定し、目的細胞の測定イベント数と内部標準粒子の測定イベント数の比例計算を行うことで、血球計数装置を用いずに、フローサイトメリーのみで CD34 陽性細胞数を求めることができる(シングルプラットフォーム法)。この内部標準としては TruCOUNT チューブ(BD 社)や Flow-count(BC 社)がよく用いられる。一方、凍結・解凍した検体を用いる場合には 7-AAD 等の核染色剤により死細胞を検出し解析から除外することが必要である。

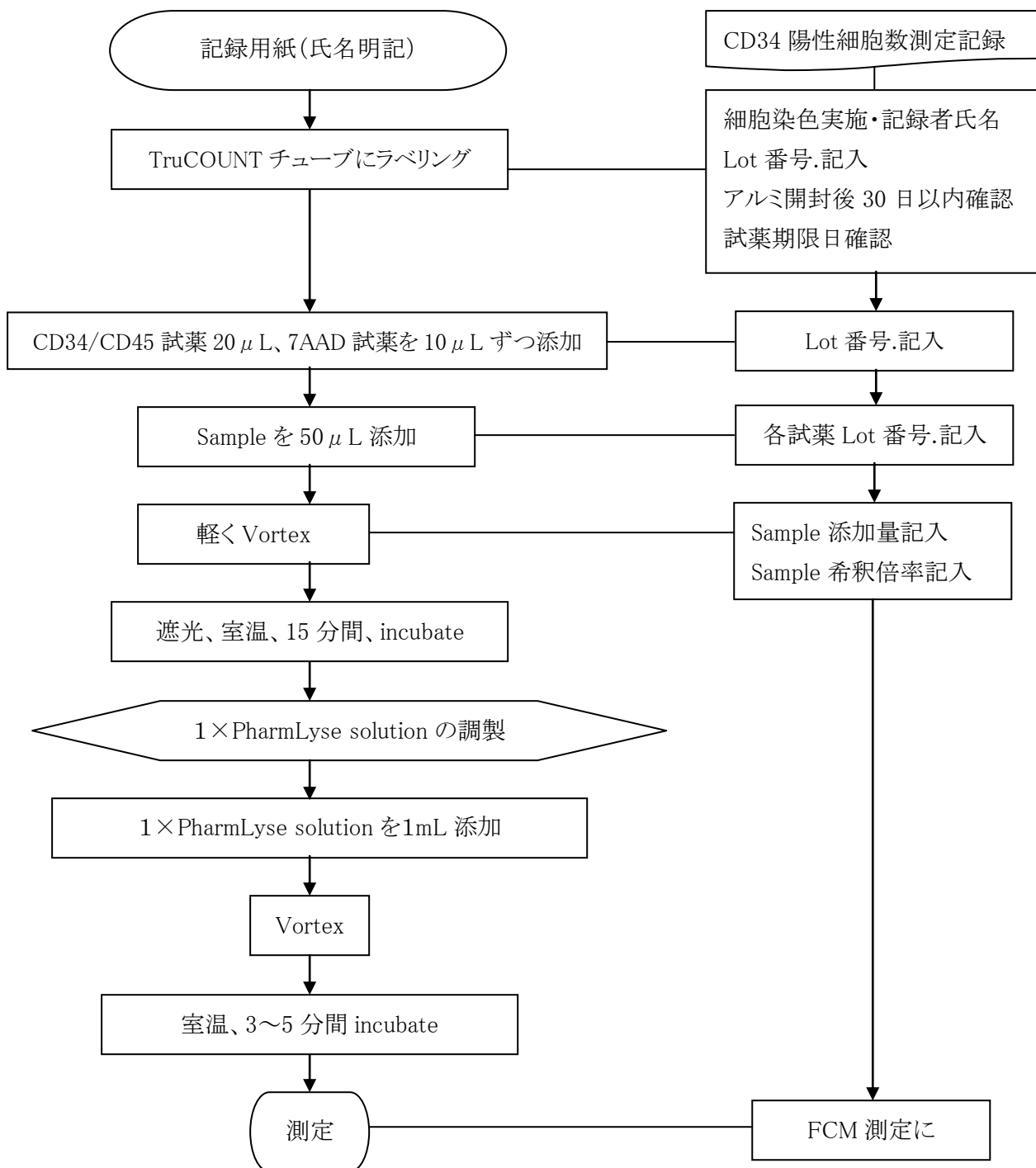
これらの解析は適切な教育訓練を受けた者が実施するべきである。

<参考文献>

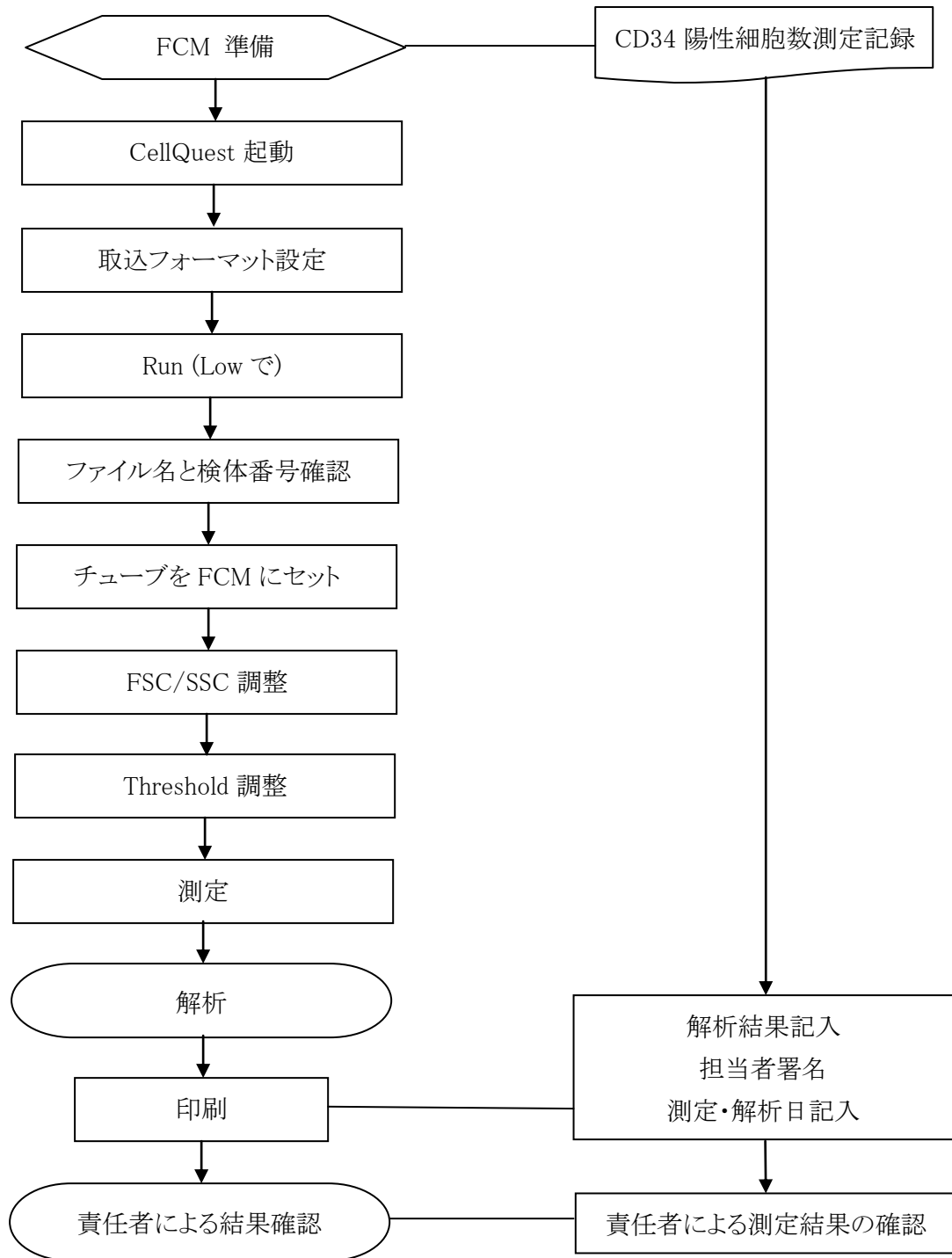
1. BEST STUDY#19-INTERLABORATORY EXCISE Final Protocol for Comments; May 2002
2. BD Technical Protocol Vol.4 「CD34PE/CD45FITC/7AAD による CD34 陽性造血前駆細胞の測定」
3. BD のホームページ <http://www.bdj.co.jp/reagent/articles/1f3pro00000rstm7.html>
4. 塩谷美夏、長村(井上)登紀子、須郷美智子、崔硯、高橋敦子、平井雅子、高橋恒夫、凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法-Procount 法と 7AAD 法による比較検討—Measurement of memasurement of CD34 positive cells in the frozen cord blood: comparison of the procount and 7-AAD methods. 日本輸血学会雑誌.2004; 50 : 605-612
5. 東京臍帯血バンク(東大医科研)CD34 陽性染色手順・測定手順・解析手順書
6. 日本臨床検査標準協議会. フローサイトメリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン(JCCLS H3-P V1.0) (http://www.jccls.org/state/pdf/fcf_h3pv1.pdf)

<CD34 陽性細胞測定法フローチャート(BD 社 TruCOUNT チューブによる染色の場合)>

(A) 抗体による染色



(B) FCM 測定・解析



1.4. コロニー形成細胞測定法(コロニーアッセイ検査)

<解説>

採取された細胞に含まれる造血幹細胞の評価法としては一般には CD34 陽性細胞数測定法の他にコロニー形成細胞測定法がある。一般的には「CD34 陽性細胞＝コロニー形成細胞」ではなく、コロニーを形成できる細胞は増殖能力を有したコロニー前駆細胞である。コロニー前駆細胞には顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞(CFU-GM: colony forming unit-granulocyte/macrophage)、混合コロニー形成細胞(CFU-GEoMM/CFU-Mix)、赤芽球バーストコロニー(BFU-e: burst forming unit-erythrocyte)等がある。本来は CFU-Mix コロニーがより幹細胞に近く多分化能を持つ細胞を反映しているが、数が少なく測定者間のばらつきを配慮して CFU-GM 数を代表として用いることが多い。これらは移植片の生着率に大きく影響すると考えられている。最近では品質管理された培地が市販されているので目的によってそれらを使い分ける。国内で一般的に使用されているのはメチルセルロース培地 MethoCult GF H4434V (Methocult GF H4434V, Stemcell technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) である。一定量の培地に決められた量の単核球や検体を播種して無菌的に培養し、約 2 週間後に増殖してできたコロニー数を倒立顕微鏡下で算定する。播種する細胞数は、作業による誤差を最小限にして正しく計測することが重要である。

<参考文献>

1. Eaves C, et al: Atlas of Human Hematopoietic Colonies. StemCell Technologies Inc., 1995
2. 中畑龍俊、他:メチルセルロース培地を用いた造血細胞のコロニーアッセイ. ベリタス株式会社

2. 末梢血幹細胞の処理・凍結保存手順

<目的>

末梢血幹細胞の凍結保存

<適応>

1. 自家末梢血幹細胞移植
2. 同種末梢血幹細胞移植

<解説>

化学療法に感受性の高い悪性リンパ腫難治例などに対しては自家造血幹細胞移植を併用した大量化学療法により長期無病生存が期待できる。自家末梢血幹細胞移植は、従来行われていた自家骨髄移植と比較して幹細胞採取・保存が容易で移植後速やかな骨髄回復が期待されるため、近年急速に発展してきた。また、血縁者間同種移植においても骨髄移植に替わって末梢血幹細胞移植が広く行われるようになり、現在非血縁ドナーにおいても導入が検討されている。このような自家・同種末梢血幹細胞を採取し凍結保存を行う場合には、作業環境として清潔さが担保できるクリーンベンチまたは安全キャビネット内で処理作業を行い、適切な凍害保護液を選択し凍結する必要がある。

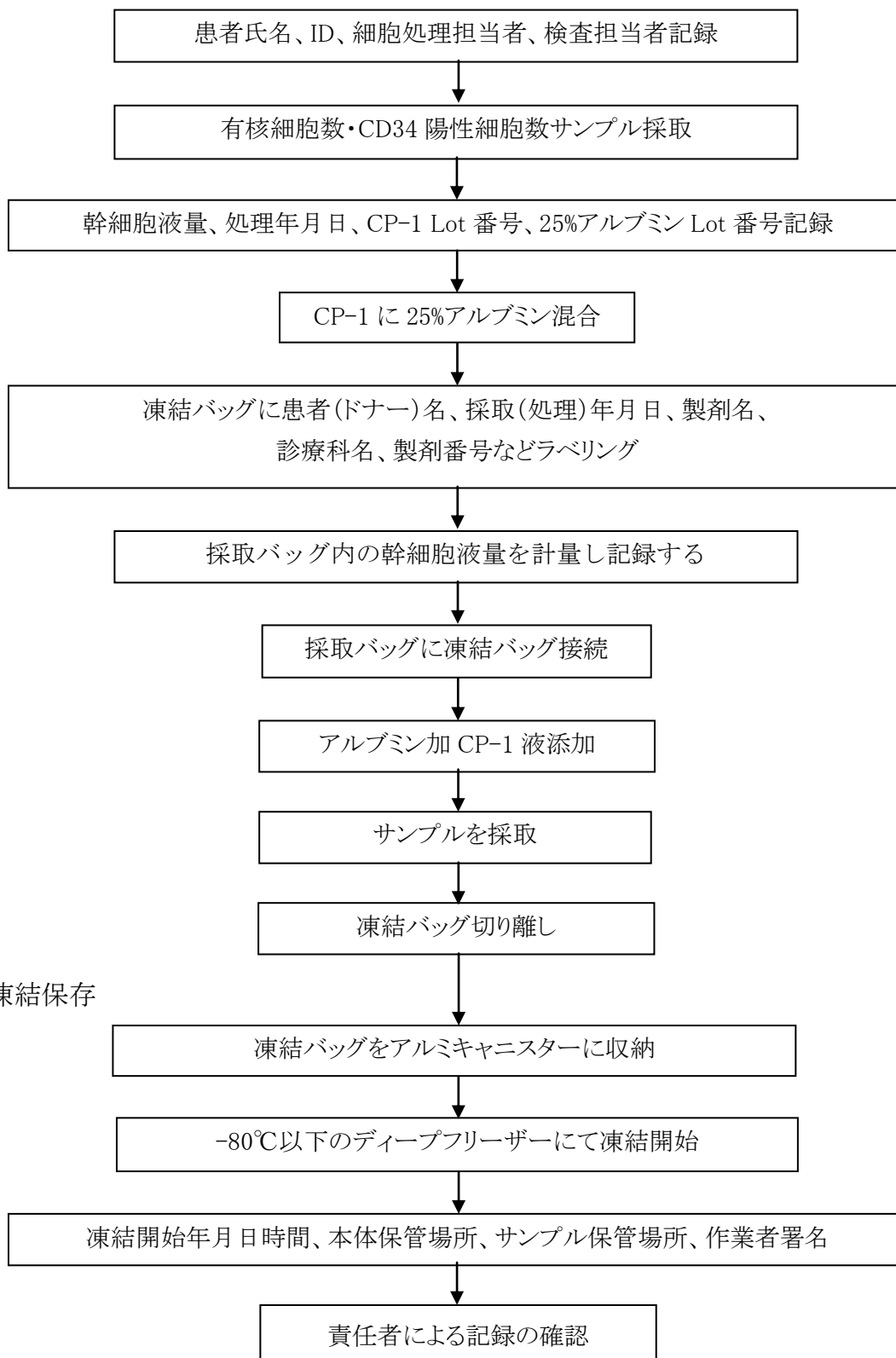
細胞が凍結される場合、細胞外の水成分が先に凍るため細胞外電解質濃度が上がり細胞外浸透圧が上昇する。このため細胞内水分が流出し、細胞が脱水状態となる。この場合細胞内氷晶形成に伴う障害を防止するものが「細胞内凍害防止薬」である。¹⁾ また、「細胞外凍害防止薬」は、細胞外氷晶形成に伴う細胞内水分の損失を防ぎ、浸透圧変化により障害を減らすことが目的である。造血幹細胞の凍結保存には従来DMSOを凍害防止薬として用いられてきた。自己血清あるいはAB血清を加えて最終濃度10%となるように調整して用いられた。凍結時には細胞濃度を単核球として $2-4 \times 10^7$ /mlとなるように調整する必要がある。²⁾ 末梢血幹細胞採取では骨髄液と比較して大量の単核細胞が採取されるが、骨髄液同様の細胞濃度で保存を行った場合には輸注時に大量のDMSOが注入されることになった。その後の研究により末梢血幹細胞では有核細胞として 3×10^8 /mlでもGM-CSFや生細胞率、移植後の血液学的回復において遜色がないことが報告されている。³⁾ 凍結に際しては従来プログラムフリーザーが用いられていたが、1983年にStiffらは5%DMSOと6%HESの混合液を用いて骨髄細胞を -80°C のフリーザーに保管する事でも保存可能であると報告した。⁴⁾ その後Makino、Katayama、Kawanoらが末梢血幹細胞においてもDMSOとHESの混合液を用いればプログラムフリーザーを用いなくても十分なCFU-GM、生細胞率が得られることを報告している。⁵⁻⁷⁾ 現在、研究用試薬としてCP-1(極東製薬工業KK)が市販されており広く造血幹細胞の凍結保存に用いられている。CP-1は生食を含むDimethyl sulfoxide (DMSO)とHydroxyl ethyl starch (HES)との混合液であり、使用時にヒト血清アルブミン液を最終濃度4%となるように添加する。これらヒト血清アルブミン加CP-1を末梢血幹細胞液と等量混合し、 -80°C ディープフリーザーまたはプログラミングフリーザーにて凍結することにより約12ヶ月までは細胞生存率およびCFU-GM回収率も70%以上可能であるとされている。

<参考文献>

1. Low Temp. Med. 1998; 24 : 171-174
2. Rowley SD: Hematopoietic stem cell cryopreservation. A review of current techniques. J. Hematother. 1992; 1 : 233-250
3. Rowley SD, et al: Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. Blood. 83: 2731-2736
4. Stiff PJ, et al: Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. Cryobiology. 1983; 20 : 17
5. Makino S, et al: A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing. Bone Marrow Transplant.1991; 8 : 239-244
6. Kawano Y, et al: Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer. Ann. Hematol. 2004; 83 : 50-54
7. Katayama Y, et al: The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant. 1997; 19 : 283-287

<末梢血幹細胞凍結保存フローチャート(CP-1使用の場合)>

(A) 細胞処理



(B) 凍結保存

自家・同種末梢血幹細胞凍結保存 作業手順書(例)

<処理前>

作業内容	チェック
造血細胞処理工程記録に患者名、ID、PBSC 採取をした担当者、処理担当者、検査担当者を記録する	

<処理作業>

番号	作業内容	チェック
1-1	PBSC採取バックから有核細胞数算定およびCD34陽性細胞測定用サンプルを無菌的に採取する。	
1-2	検査担当者に引き渡す。	
2-1	採取幹細胞液量、処理開始年月日時間、CP-1 Lot番号、25%アルブミンLot番号などを記録する。	
2-2	印刷されたラベルがある場合にはそれを添付しておく。	
3-1	CP-1(100mL用)を専用保冷容器(4℃)に入れ十分冷やしておく。	
3-2	上記の CP-1 に、50mL シリンジで 25%アルブミン 32mL をゆっくり混和しながら加え合計 100mL にする。アルブミンを加えた後に、CP-1 容器の重量を量り記録する(通常、アルブミン添加後の重量はグロスで 181g)。そのまま専用保冷容器(4℃)で保管する。	
4-1	凍結バッグに患者(ドナー)名、採取(処理)年月日、製剤名、診療科名、製剤番号を記載する。印刷されたラベルがある場合にはそれを添付する。	
4-2	作業記録に製剤番号(複数の場合はそれぞれ)を記録する。	
5-1	採取バッグに凍結バッグを接続する。	
5-2	採取バッグ内の幹細胞浮遊液量を50mLシリンジで計量し、記録する。	
5-3	採取幹細胞浮遊液が 100mL に足りない場合にはヘパリン 2mL 加 RPMI 液を加えて計 102mL とする。ヘパリンと RPMI 液を使用した場合には Lot 番号を記録する。	
6-1	細胞浮遊液が入っている凍結バッグを4℃保冷剤で包み、アルブミン加CP-1液を凍結バッグラインから50mLシリンジを用いて凍結バックにゆっくり混和しながら加える。(必要に応じて末梢血幹細胞液は複数の凍結バッグに分ける)	
6-2	注入後は凍結バックから気泡を除去する。	
7-1	2本の凍結サンプルチューブに所属、日付、氏名、サンプル番号を記録する。	
7-2	工程記録に凍結サンプルNoをそれぞれ記録する。	
7-3	凍結用サンプルを採取し、量を記録する。	
7-4	幹細胞液入り凍結バッグをチューブシーラーにてシールし、切り離す。	
7-5	サンプル採取後の凍結本体液量を記録する。	
8-1	処理終了年月日時間を記録する。	

<凍結保存作業>

番号	作業内容	チェック
9-1	幹細胞液入り凍結バッグを規定のアルミキャニスターに入れる。	
9-2	凍結サンプルもできるだけ同一条件になるようにする(同一凍結速度になるような凍結容器を使用する)。	
9-3	-80℃以下のディープフリーザーで凍結を開始する。 (プログラムフリーザーを用いる場合は、本体・凍結サンプルを庫内に入れ、適切な条件で凍結を開始する。)	
10-1	凍結開始年月日時間を記録する。	
10-2	本体保管場所、サンプル保管場所、および凍結作業者氏名を記録する。 (本体・サンプルが複数の場合はそれぞれ記録する。)	

自家・同種末梢血幹細胞凍結保存 作業記録

<処理前>

患者所属		ドナー所属		PBSC採取担当者	
患者氏名		ドナー氏名		処理担当者	
患者ID		ドナーID		凍結担当者	
患者体重		ドナー体重		検査担当者	

<処理作業>

手順書番号	記録項目	記録	備考
1-1	処理前サンプル採取量	mL	
2-1	採取幹細胞液量	mL	
	処理開始年月日時間		
	CP-1 Lot番号		
	25%アルブミンLot番号		
3-2	25%アルブミン量	mL	
4-2	1) 製剤番号		
	2) 製剤番号		
5-2	幹細胞浮遊液量	mL	
5-3	ヘパリン加RPMI液量	mL	
	ヘパリンLot番号		
	RPMI Lot番号		
7-2	1) 凍結サンプル番号		
	2) 凍結サンプル番号		
7-3	1) 凍結サンプル量	mL	
	2) 凍結サンプル量	mL	
7-5	凍結本体液量	mL	
	全有核細胞数	$\times 10^9$ 個	$\times 10^9$ 個/kg(患者)
	全CD34陽性細胞数	$\times 10^6$ 個	$\times 10^6$ 個/kg(患者)
8-1	処理終了年月日時間		

<凍結保存作業>

10-1	凍結開始年月日時間		
10-2	本体保管場所 1)		
	本体保管場所 2)		
	サンプル保管場所 1)		
	サンプル保管場所 2)		

3. 骨髄液からの赤血球除去手順

<目的>

骨髄液からの赤血球除去

<対象>

1. ABO 血液型メジャー不適合同種骨髄移植
2. レシピエントの不規則抗体がドナーの赤血球に反応する同種骨髄移植
3. レシピエントが Rh 陰性で抗 D 抗体を有しドナーが Rh 陽性の同種骨髄移植
4. 自家骨髄移植

<解説>

ドナーとレシピエントに ABO 血液型メジャー不適合(例えば、ドナーが A 型、レシピエントが O 型)がある場合、ドナーの骨髄液に含まれる赤血球はレシピエントの抗 A 抗体や抗 B 抗体と反応し血管内溶血を起こす。また、レシピエントにドナーの赤血球に対する不規則抗体がある場合、ドナーの骨髄液に含まれる赤血球はレシピエントの不規則抗体と反応し血管外溶血を起こす。あるいは、レシピエントが Rh 陰性で抗 D 抗体を有しドナーが Rh 陽性の場合、ドナーの骨髄液に含まれる Rh 陽性赤血球はレシピエントの抗 D 抗体と反応し血管外溶血を起こす。上記の組み合わせの骨髄移植を行う場合、ドナーの骨髄液から赤血球を除くことが必要である。レシピエントが Rh 陰性で抗 D 抗体を有していない場合、ドナーの骨髄液に含まれる Rh 陽性赤血球によって D 抗原に感作され抗 D 抗体が産生される可能性が否定できないため、ドナーの骨髄液から赤血球を除いても良いと考えられる。最近ではほとんど行われなくなったが、自家骨髄移植を行うためには、予め採取した自家の骨髄液から赤血球と顆粒球を除き単核細胞に分離し凍結する必要がある。

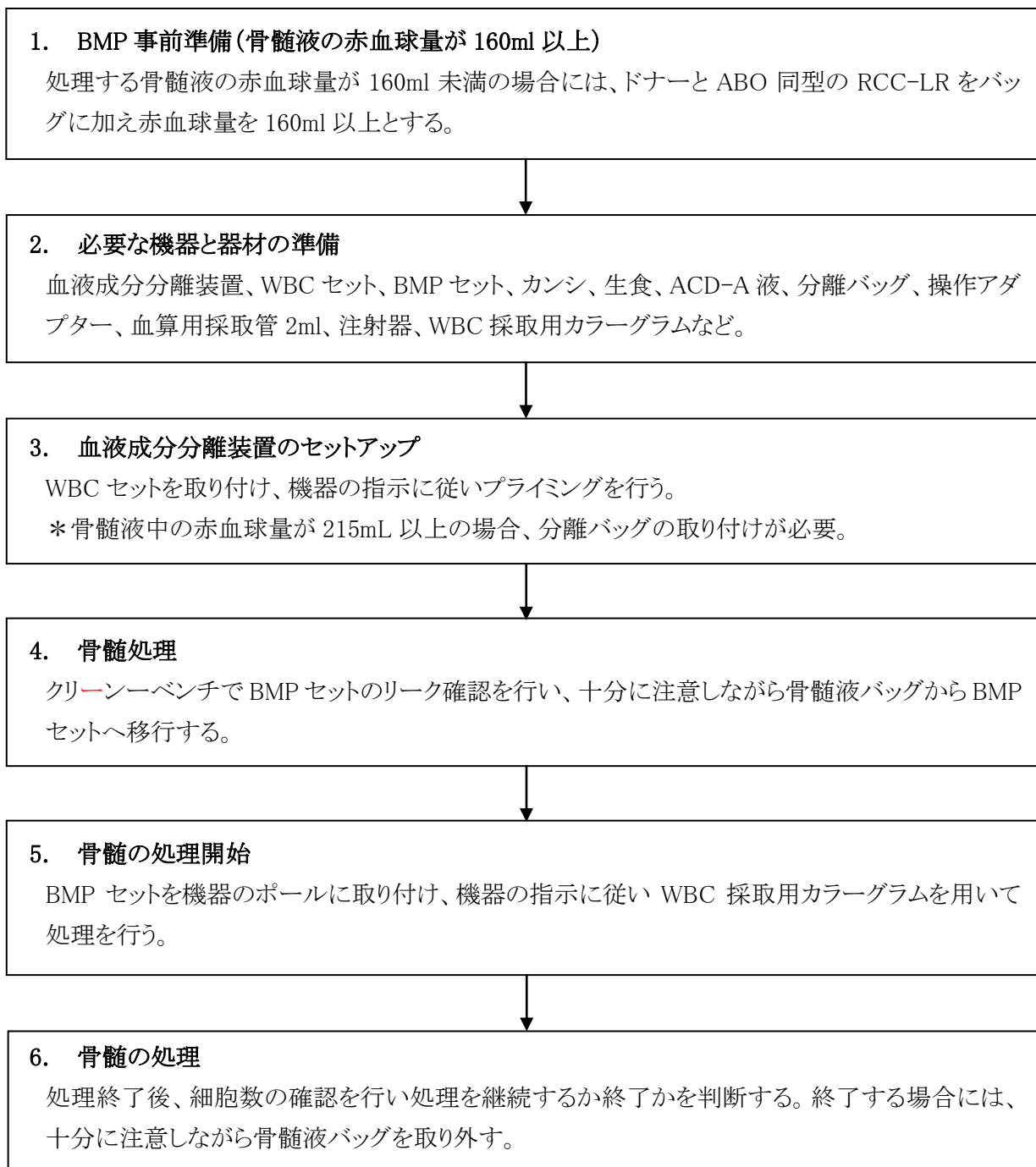
骨髄液から赤血球を除去(単核細胞分離)する方法には、大別して器械を使う方法¹⁾と手作業を含む用手法の2つがある。赤血球除去に用いられる器械には、血液成分分離装置の Spectra と COM.TEC、供血用遠心機の SEPAX 等がある。用手法には、Ficoll を用いた比重遠心法²⁾と赤血球沈降促進剤の hydroxyl ethyl starch (HES)³⁾を用いた方法がある。今回提示する作業工程書には、赤血球除去に最も汎用されている Spectra を用いた方法と赤血球の混入が少ない Ficoll を用いた比重遠心法を示した。Spectra を用いて骨髄液から赤血球除去を行う際には、Spectra に付属している「骨髄液処理(BMP)手順書」を必ず参照すること。なお、なるべく無菌的に処理できる器械による方法が推奨されるが、いずれの方法でもリアルタイムに幹細胞回収率を評価することが難しく、総有核細胞数などから推測するのが実際的である。

<参考文献>

1. Larghero J, et al: ABO-mismatched marrow processing for transplantation: results of 114 procedures and analysis of immediate adverse events and hematopoietic recovery. Transfusion. 2006; 46 : 398-402

2. Jin NR, et al: Preparation of red-blood-cell-depleted marrow for ABO-incompatible marrow transplantation by density-gradient separation using the IBM 2991 blood cell processor. *Exp. Hematol.* 1987; 15 : 93-98
3. Warkentin PI, et al: Transplantation of major ABO-incompatible bone marrow depleted of red cells by hydroxyethyl starch. *Vox. Sang.* 1985; 48 : 89-104

＜単核細胞分離のフローチャート(スペクトラを用いた場合)＞



骨髄液からの赤血球除去(スペクトラを用いた場合) 作業手順書(例)

<処理前>

患者所属		ドナー所属	
患者氏名		ドナー氏名	
患者ID		ドナーID	
処理開始年月日時間			
処理担当者		処理責任者	

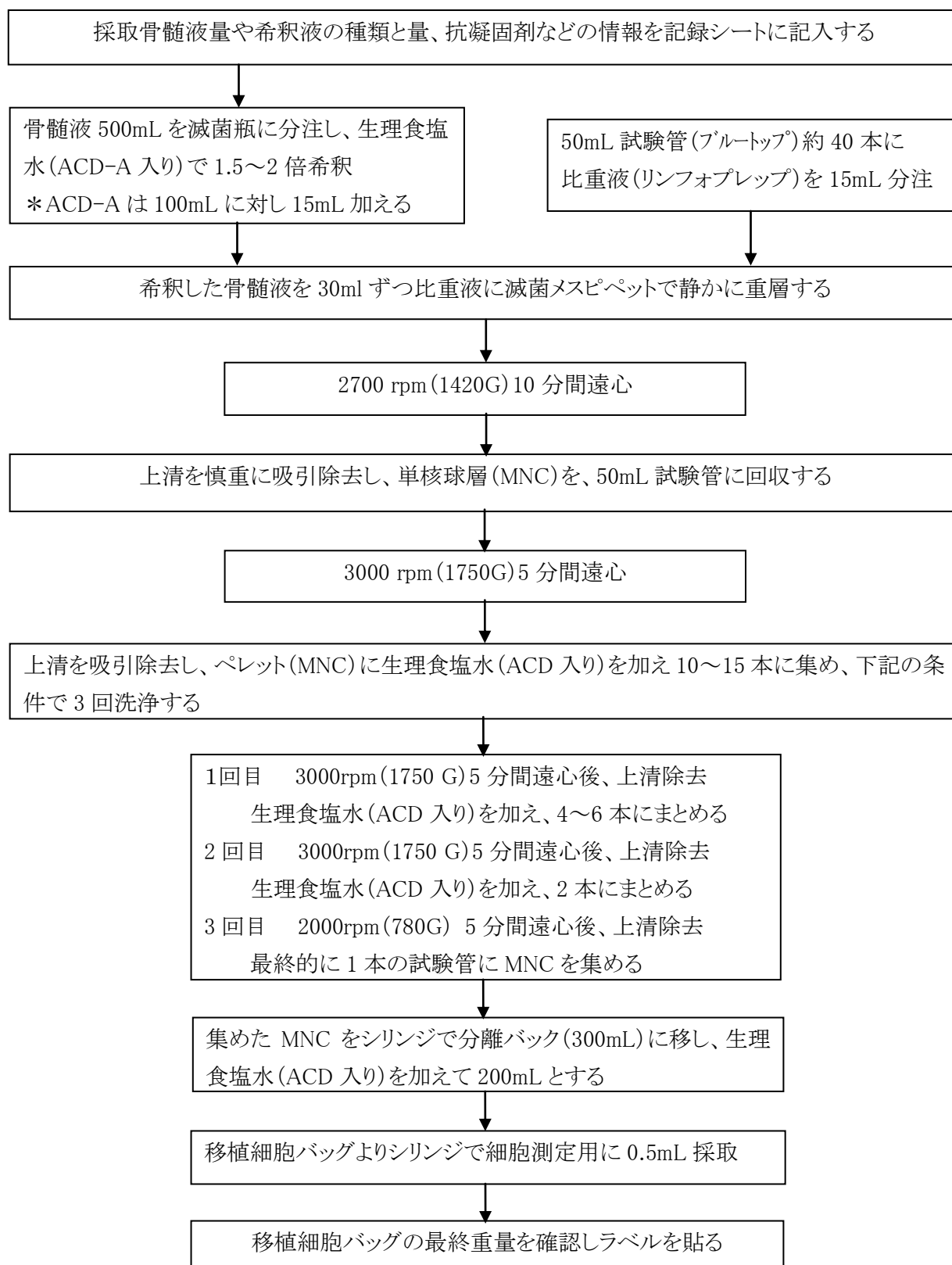
番号	作業内容	チェック
1-1	赤血球量が 160mL 未満の場合には、ドナーと同型の RCC-LR をバッグに加え赤血球量を 160mL 以上とする。	
1-2	必要な機器と器材	
	① COBE Spectra	
	② シングルステージフィルター(白血球用)	
	③ 無菌接合器	
	④ チューブシーラー	
	⑤ カンシ 5 本、ローラーペンチ	
1-3	必要なキット類	
	① WBC セット(白血球採取セット)CATNo70600 6 セット 1 箱	
	② BMP セット(骨髄濃縮用セット)CATNo70630 6 セット 1 箱	
	③ WBC 採取用カラーグラム	
	④ 分離バッグ 1000mL 1枚	
	⑤ 生食 1000mL 1本	
2	COBE Spectra のセットアップ	
	① WBC セット(白血球採取セット)の前準備	
	② 血漿採取分離バッグの取り付け	
	③ 採血返血ラインの処理	
	④ AC ラインの閉鎖	
3	骨髄処理	
	3-1 骨髄液バッグから BMP バッグへ移行	
	3-2 WBC セット(白血球採取セット)の取り付け	
	3-3 キー入力操作	

付 Ver. 1

3-4	処理操作	
4	ラベル発行	
5	作業終了	

製剤番号		製剤量(mL)	
処理終了年月日時間			

<単核球分離のフローチャート(用手法の場合)>



骨髓液からの赤血球除去(用手法の場合) 作業手順書(例)

<処理前>

患者所属		ドナー所属	
患者氏名		ドナー氏名	
患者ID		ドナーID	
処理開始年月日時間			
処理担当者		処理責任者	

番号	作業内容	チェック
1-1	滅菌生理食塩水 500mL バックに、ACD-A 液を 75mL 加える。 (*ACD-A は 100mL に対し 15mL 加える)	
1-2	必要な機器と器材	/
	①シリンジ(2.5mL、10mL、30mL)(各 1 本)	
	②針 18G (約 3 本)	
	③操作アダプター(1 個)	
	④連結管(1個)	
	⑤分離バック(300mL) (1 バック)	
	⑥コップェル(1個)	
	⑦滅菌済みハサミ(各施設で滅菌したもの1個)	
	⑧滅菌広口ビン(500mL)(各施設で滅菌 2 本)	
	⑨滅菌試験管(50mL)(約 60 本)	
	⑩試験管ラック(約 10 本立て 5 個)	
	⑪滅菌ディスポメスピペット(25mL または 10mL)(約 5 本)	
	⑫電動ピペッターまたは滅菌ゴム帽(ディスポメスピペット用)	
	⑬吸引装置(可能であれば)	
	⑭チューブシーラー	
1-3	必要な試薬	/
	①ACD-A 液(250mL)(1 バック)	
	②生理食塩水(500mL)(2 バック)	
	③比重液(リンフォプレップ、250mL)(3 本)	
	④消毒アルコール綿	
2	骨髓処理	/
2-1	採取骨髓液を生理食塩水(ACD 入り)で希釈	
2-2	50mL 試験管に比重液を約 15mL 分注し希釈した骨髓液を重層	

2-3	2700rpm(1420G)で遠心後、単核球層(MNC)を回収し、次に3000rpm(1750G)遠心し、上清を捨て約15本にMNCを集める	
2-4	1回目3000rpm(1750G)遠心後、上清除去し生理食塩水(ACD入り)を加え、約6本にMNCを集める	
2-5	2回目3000rpm(1750G)遠心後、上清除去し生理食塩水(ACD入り)を加え、約2本にMNCを集める	
2-6	3回目2000rpm(780G)遠心後、最終的に1本の試験管にMNCを集める	
2-7	移植単核球をシリンジで分離バック(300mL)に移す	
2-8	滅菌生理食塩水(ACD入り)を加えて、200mLにする	
2-9	移植細胞バックよりシリンジで細胞を抜く	
3	ラベル発行	
4	作業終了	

製剤番号		製剤量(mL)	
処理終了年月日時間			

骨髓血から単核球分離 結果報告書

<情報>

移植患者名 _____ 院内 ID _____ バンク ID _____

年齢 _____ 歳 性別 男・女 体重 _____ kg 病棟 _____

ABO 血液型 _____ Rh _____ 不規則抗体 無・有 (抗 _____)

ドナー名 _____ 院内 ID _____ バンク ID _____

年齢 _____ 歳 性別 男・女 体重 _____ kg 病棟 _____

ABO 血液型 _____ Rh _____ 不規則抗体 無・有 (抗 _____)

<処理前 採取された骨髓細胞>

① 骨髓採取量 _____ mL

② 希釈液 _____ mL 生食 RPMI その他(_____)

③ 抗凝固剤 ヘパリン _____ 単位 ACD-A 液 _____ mL

④ 総量 ① + ② + ③ = Total _____ mL

細胞濃度 _____ $\times 10^4 / \mu\text{L}$ CD34 陽性率 _____ %

総有核細胞数 _____ $\times 10^9 =$ _____ $\times 10^8 / \text{kg}$ (患者体重)

総単核細胞数 _____ $\times 10^9 =$ _____ $\times 10^8 / \text{kg}$ (患者体重)

総 CD34 陽性細胞数 _____ $\times 10^8 =$ _____ $\times 10^6 / \text{kg}$ (患者体重)

特記事項 _____

<処理後 骨髓単核細胞結果>

① 処理後の量 _____ mL

② 希釈液 _____ mL 生食 RPMI その他(_____)

③ 抗凝固剤 ヘパリン _____ 単位 ACD-A 液 _____ mL

④ 総量 ① + ② + ③ = Total _____ mL

最終細胞濃度 _____ $\times 10^4 / \mu\text{L}$ CD34 陽性率 _____ %

総単核細胞数 _____ $\times 10^9 =$ _____ $\times 10^8 / \text{kg}$ (患者体重)

総 CD34 陽性細胞数 _____ $\times 10^8 =$ _____ $\times 10^6 / \text{kg}$ (患者体重)

特記事項 _____

処理担当者 _____

処理日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

責任者 _____

確認日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

4. 骨髄液からの上清除去手順

〈目的〉

骨髄液からの上清除去および濃縮

〈適応〉

1. ABO minor mismatch の同種骨髄移植
2. 骨髄輸注時に中等度以上のアレルギー反応などの有害事象が出現した場合
3. ドナー血清中に臨床的に問題となる不規則抗体がある場合

〈解説〉

バッグ遠心法は骨髄液の上清除去・濃縮に汎用される標準的な方法であり、血液バッグを遠心するための機器や器具を備えた施設であれば実施可能である。なお、自動血漿分離機器(BioSAFE 社の Sepax[®]など)を利用した上清除去も可能であるが、処理量やコストの面から、通常 of 骨髄移植における細胞処理にはあまり適さない。

バッグ遠心法において、細胞の回収率や血漿の除去率を最も左右するのは遠心分離の回数である。遠心分離の回数によって1回法と2回法の2つの方法があり、どちらを選択するかについて明確な基準はない。通常、遠心分離を1回実施する毎に血漿量を10%程度にまで減量することが可能であり、通常 of ABO minor mismatch 同種骨髄移植における上清除去では、1回法によって临床上問題となる溶血性副作用はほぼ回避できる。ただし、抗IgA抗体を有するIgA欠損症患者や過去に輸血後アナフィラキシー反応の既往がある患者など、少量の血漿が含まれていても重篤な副作用を起こす可能性がある場合は、2回法によってより副作用が予防・軽減できる可能性がある。なお、1回の遠心分離によって移植細胞を約10%程度ロスする可能性があるが、一般的に生着率への影響はない。

骨髓液からの上清除去 作業手順書(例)

1. 必要な機器と器具類

- バッグ用遠心機
- 無菌接合機 TSCD
- チューブシーラー
- はかり
- 分離スタンド
- コッヘル
- スライドクランプ

2. 必要な滅菌資材ならびに医薬品類

- 分離バッグ(600mL, 1000mL)
- 連結管
- 操作アダプター
- シリンジ
- 注射針(18G)
- 生理食塩液
- ACD-A 液 またはヘパリン Na 5000 単位

3. 手順

- 処置指示書と患者情報、骨髓ドナー情報を照合し、作業記録書に記入する。
- 骨髓液の入った骨髓バッグを消毒してクリーンベンチ内に入れ、よく混和してサンプルを採取する。一部で細胞数のカウント①を、残りで血液型検査を行う。
- 重量②を測定する。
- 骨髓バッグと遠心用分離バッグを接合し、分離バッグ(600mL)に取り分ける。それに空の分離バッグ(600mL)を接合し、バケットに入れて重量を調整後、遠心分離する(遠心条件の目安は 20℃、500g、10 分)。
- 10%の ACD-A 添加生理食塩液を作成する(またはヘパリン Na 添加生理食塩液)。
- 遠心済み骨髓バッグの上清を分離スタンドで空バッグに移し、クランプ、シールする。
- 10%ACD 生食(またはヘパリン生食)を入れて細胞を浮遊させる。1 回洗浄で複数バッグに分けて遠心した場合は 1000mL 分離バッグにまとめる。
- 2 回洗浄が必要な場合は遠心、上清除去、10%ACD 生食をもう一度実施する。
- サンプルを採取し、細胞数をカウントする。
- 重量を測定する。
- 血漿除去骨髓液を登録し、患者ラベルを骨髓バッグに貼付する。
- 照合の読み合わせを行い出庫する。輸血管理システムに出庫登録する。

骨髓液の血漿除去 結果報告書

- 血縁ドナー
- 非血縁ドナー
- 1回洗浄
- 2回洗浄

<情報>

移植患者名 _____ 院内 ID _____ バンク ID _____

年齢 _____ 歳 性別 男・女 体重 _____ kg 病棟 _____

ABO 血液型 _____ Rh _____ 不規則抗体 無・有 (抗 _____)

ドナー名 _____ 院内 ID _____ バンク ID _____

年齢 _____ 歳 性別 男・女 体重 _____ kg 病棟 _____

ABO 血液型 _____ Rh _____ 不規則抗体 無・有 (抗 _____)

処理前骨髓液

① WBC _____ $\times 10^3$

② 重量 _____ g

総有核細胞数 = _____ $\times 10^9$ = ③ _____ $\times 10^8$ /kg (患者体重)

処理後骨髓液

④ WBC _____ $\times 10^3$

⑤ 重量 _____ g

総有核細胞数 = _____ $\times 10^9$ = ⑥ _____ $\times 10^8$ /kg (患者体重)

回収率 = ⑥ / ③ $\times 100$ = _____ %

特記事項 _____

処理担当者 _____

処理日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

責任者 _____

確認日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

5. 凍結細胞の解凍・輸注の手順

<目的>

凍結細胞の解凍と輸注

<適応>

1. 末梢血幹細胞移植
2. 骨髄移植
3. 臍帯血移植
4. ドナーリンパ球輸注(DLI)など

<解説>

解凍時、細胞外の水分が細胞内より先に解け始め浸透圧が低下し、水分が細胞内へと流入して細胞が膨張して障害を受ける。また、固相から液相に移る場合に時間がかかると、「融解⇔凍結」の平衡状態が生じ、再氷晶形成が起こり、細胞障害がおこる。これらの障害を回避するには 37～40℃程度に保った恒温槽で急速に解凍することが必要である。この時、DMSO や HES などの凍害防止剤が含まれていると、浸透圧低下に伴う細胞内への水分流入が抑制される。その結果、細胞膨張による障害や細胞凝集による回収率の低下が抑えられる。解凍後、DMSO や HES を除くための希釈・洗浄操作を行うと、細胞の凝集塊ができて輸注が困難になったり、無視できない量の細胞損失が生じることが多い。これは浸透圧差などにより細胞が障害され、死細胞から析出した粘着性に富む DNA やフィブリン析出などによると考えられている。DMSO 投与による副作用は軽微であり、解凍後に短時間 DMSO などに暴露されても細胞障害は無視できる範囲なので、解凍後の洗浄操作は一般的に不要である¹⁾。また、解凍時に凍結バッグの破損が見つかることがあるので、滅菌処理された外装バッグの中に入れて解凍することが望ましい。なお、一般的に DMSO は室温で細胞毒性があることが知られているので解凍後はなるべく早く患者に投与する。

DMSO の生体への毒性については、凍結解凍された造血幹細胞とともに投与された場合、アレルギー反応、低血圧、発疹、呼吸困難、腹痛、嘔気、下痢などが起こりうることが報告されている。凍結細胞中に赤血球が多く混入していた場合には、輸注後にヘモグロビン尿を来し、腎機能障害を起こす可能性がある。細胞小凝集塊による低酸素血症、容量負荷に伴う高血圧や頭痛、不整脈などが起こる可能性もある。DMSO の総量が患者体重当たり 10mL あるいは 1g を超える場合には、午前・午後あるいは 2 日に分けて輸注するほうが安全である。

なお、DMSO、HES、RPMI などの試薬は一般的には人体内投与などの臨床での使用は認められておらず、医師の裁量権のもとに使用されているのが現状である。なるべく COA (certificate of analysis) が添付される GMP grade またはそれに準じた製品の使用が望ましい。

<参考資料>

1. Rowley SD, et al: Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. Bone Marrow Transplant. 1993; 11: 389-393
2. Branch DR, et al: Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. Transfusion 1994; 34: 887-890

凍結細胞の解凍・輸注(臍帯血以外) 作業手順書(例)

※臍帯血移植では臍帯血バンクの指針に従うこと。

1. 必要な機器と機材

トレイ 1 個、恒温器 1 台、温度計 1 本、心電図モニター、非観血的動脈酸素濃度モニター(ベッドサイド)、血圧計(ベッドサイド)

2. 必要なキット類など

ビニール袋(大) 1 枚、滅菌保護袋 輸注バッグ数分、キムタオル 1~2 枚、細胞生存率測定セット、赤血球輸血セット(ベッドサイド)

3. 事前準備

- 解凍するバッグの保管場所と数を確認する。
- 患者に最も近い(中心)静脈ライン接続部に生食でプライミングした赤血球輸血セットを接続する。
- 患者に心電図モニターと非観血的酸素モニターを装着する。

4. 解凍処理操作

- 患者の準備ができていることを確認したうえで、担当医は該当の細胞を 1 バッグずつ取り出し解凍する。介助者は金属キャニスターに入ったバッグを患者氏名と採取日を確認して1つ取り出し、担当医が持ったビニール袋に入れる。担当医はビニール袋ごと完全に恒温槽につけ、周囲が少し解けた時点で速やかにビニールを取り出して、キャニスターから細胞の入ったバッグを取り出し、滅菌保護袋に移し、再度袋ごと完全に恒温槽につけシャーベット状になるまで急速にほぼ完全に解かす。
- 担当医は、細胞の入った袋の外観を観察し、液漏れなどが無いことを確認し、袋の水滴をキムタオルで拭き取り、速やかにベッドサイドに細胞を持って行く。
- 担当医は、ベッドサイドで、細胞の入った袋のラベルの患者およびドナー氏名、採取日などを患者・家族および看護師と声出し照合し、赤血球輸血セットを用いて経静脈的に輸注を開始する。
- 初め 5 分はゆっくりとバイタルサインを観察しながら投与し、問題がなければ投与速度を上げ、100mL を 10~15 分で投与する。
- 以上の操作を輸注バッグ分繰り返す。
- 介助者は、担当医が解凍している間に、キャニスターに貼付してあるバーコードによりコンピューター照合をする。また、保管場所にチェックを入れ、取り出したことを記録する。
- 輸注バッグが返却されたら、バッグ内の細胞液を回収し細胞生存率を測定する。すなわち、バッグ内に残っている細胞液を 2.5ml シリンジで回収し、トリパンブルー染色液で 100~200 倍希釈し、以下の式に従って細胞生存率を算出する。細胞生存率が 50%以下であった場合は、管理責任者に報告する。

$$\text{生存率(\%)} = [\text{生細胞数} \div (\text{生細胞数} + \text{死細胞数})] \times 100$$

解凍・輸注 結果報告書

- PBSC 輸注 (自家・血縁同種・非血縁同種)
- 骨髄輸注 (自家・血縁同種・非血縁同種)
- CB 輸注
- DLI 輸注 (非血縁・血縁)

<情報>

移植患者名 _____ 院内 ID _____ バンク ID _____

年齢 _____ 歳 性別 男・女 体重 _____ kg 病棟 _____

ABO 血液型 _____ Rh _____ 不規則抗体 無・有 (抗 _____)

ドナー名 _____ 院内 ID _____ バンク ID _____

年齢 _____ 歳 性別 男・女 体重 _____ kg 病棟 _____

ABO 血液型 _____ Rh _____ 不規則抗体 無・有 (抗 _____)

製剤種類	採取日	製造番号	輸注日	生存率 (%)	外観・備考など

総輸注量 = _____ mL

総有核細胞数 = _____ x10⁹ = _____ x10⁸/kg (患者体重)

総 CD34 陽性細胞数 = _____ x10⁸ = _____ x10⁶/kg (患者体重)

特記事項 _____

処理担当者 _____ 処理日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

責任者 _____ 確認日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

6. 細胞処理に用いる試薬など

細胞処理・凍結保存に用いられる DMSO、HES、RPMI などの試薬は一般的には人体内投与などの臨床での使用は認められておらず、医師の裁量権のもとに使用されているのが現状である。なるべく COA (certificate of analysis) が添付される GMP grade またはそれに準じた製品の使用が望ましい。

<DMSO>

1) CryoSure-DMSO: WAK-Chemie Medical GMBH 社製。滅菌済み DMSO 溶液。Pyrogen-free, Endotoxin-free, Mycoplasma-free が保証されており、ロット毎の Certificate が添付されています。室温暗所保存。1箱 10mLx10 本入り。国内では Funakoshi 取扱(#WAK-DMSO-10)。

2) CryoSure-DEX40: WAK-Chemie Medical GMBH 社製。滅菌済み 55% DMSO+5% Dextran 40 溶液。Pyrogen-free, Endotoxin-free, Mycoplasma-free が保証されており、ロット毎の Certificate が添付されています。4℃、暗所保存。1箱 8mLx10 本入り。国内では Funakoshi 取扱(#WAK-DEX-40)。2008 年以降日本さい帯血バンク 臍帯血の凍結保存に使用している。細胞浮遊液との最終容量の 20% (1/5) 量を加える。

3) CP-1: 多くの国内移植施設で使用されている。極東製薬工業株式会社。

	100mL 用	50mL 用
Hydroxyethyl starch (HES)	12g	6g
DMSO	20mL	5mL
生理食塩水		
Total	68ml	34ml

用時: 100mL 用は 25% ヒト血清アルブミン 32mL を加え、100mL とする。50mL 用は 25% ヒト血清アルブミン 16mL を加え、50mL とする。細胞浮遊液と等量混合する。使用したアルブミンについては、薬事法で定める必要事項を、各施設で定めた専用の記録用紙あるいは電子媒体に記録し 20 年間保存する必要がある。

324042-2

研究用試薬

細胞凍害保護液(extracellular cryoprotectant)

研究用試薬

CP-1

100mL用(製品コードNo.27200)

50mL用(製品コードNo.27202)

—骨髓、末梢血及び臍帯血幹細胞の凍害保護液—

造血幹細胞の凍結保存は、一般的に凍害防止剤としてジメチルスルホキシド(DMSO)が使用されています。しかしながら、DMSO単独ではプログラムフリーザーによる段階凍結法を行い、液体窒素中(-196°C)で保管を行っても幹細胞の回収率の低下が見られることがあり、また長期(1年以上)保存時に、同様に幹細胞回収率の低下を引き起こすことがあります。

本製品「CP-1」は、骨髓、末梢血及び臍帯血幹細胞の凍結保存方法として、hydroxyethyl starch(HES)とDMSOの混合液を用いました。本製品を使用することで長期保存時も含め、安定した凍結保存が可能です。

また短期間(6ヶ月~1年)であれば、本製品「CP-1」を用いることで、段階凍結法を行わずに-80°Cのフリーザーに保管することも可能です(牧野法¹⁾)。

【組成】

	100mL用	50mL用
Hydroxyethyl starch(HES)	12g	6g
Dimethylsulfoxide(DMSO)	10mL	5mL
生理食塩水		
	total 68mL	34mL

用時：100mL用は25%ヒト血清アルブミン32mLを加え、100mLとする。50mL用は25%ヒト血清アルブミン16mLを加え、50mLとする。

(20%ヒト血清アルブミン、自己血漿でも代用可能です。)

【使用上の注意】

1. 本品は、*in vitro*での研究用試薬であり、医療用としては認可されておりません。
2. 本品中の成分は人体に対して以下の様な毒性を示すことがあります。また本品を誤って飲んだ場合には、すぐに吐き出して下さい。眼や皮膚に付いた場合には、すぐに洗浄して下さい。もし異常が見られたらすぐに医師に相談して下さい。

HESの毒性

HESは人体に対する毒性が極めて低いのですが、人体に入ると次の様な症状を示すことがあります。

嘔吐、発熱、悪寒、掻痒、下顎及び耳下腺の腫脹、弱いインフルエンザ様の症状、頭痛、筋肉痛、下肢の末梢浮腫、種々のアナフィラキシー様反応(眼窩周囲の浮腫、蕁麻疹、喘息様喘鳴)、血液希釈や血流亢進及び肺動脈浮腫による出血。
(PHYSICIANS' DESK REFERENCE(1992)P948-950)

DMSOの毒性

DMSOは人体に対する毒性が低いのですが、眼や皮膚に対して次の様な刺激性(腐食性)があります。皮膚に浸透性があり、常時接触していると皮膚吸収で赤色になり、鱗片状剥離が起こったり、場合により吐き気、嘔吐、悪寒、痙攣、視力減少またはアレルギー性作用が起こることがあります。また、イヌ、ウサギ、ブタ等の動物実験では皮下投与によって白内障を引き起こすことが報告されています。

(産業中毒便覧、医歯薬出版)

DMSOの急性毒性：

LD50	経口	ラット	20mg/kg
LD50	静脈	イヌ	2.5g/kg
TDL0	経口	ラット	5g/kg(妊娠6~12日)
TDL0	腹腔	ラット	8g/kg(妊娠6~12日)
TDL0	腹腔	マウス	5g/kg(妊娠6~12日)
TDL0	静脈	ハムスター	50mg/kg(妊娠8日)

3. 本品の廃棄は高圧滅菌で121°C30分以上滅菌した後、適切な処理をして廃棄して下さい。
4. 本品の無菌保証は開封前までです。開封後の無菌性は保証出来かねます。
5. 本誌記載以外の方法で保存された場合には保証期間を完全に保証できないことがあります。
6. 容器が破損していた場合には使用せずに直ちに弊社まで連絡して下さい。

【使用目的】

細胞の凍害保護

【特徴】

- ・DMSOの単独使用時に比べ、長期に安定して保存が可能です。
- ・短期の保存では、段階凍結法を行わずに-80°Cのフリーザーに保存することも可能です(牧野法)。

【使用方法】

すべての操作は無菌的に行ってください。また3及び4の操作は発熱を伴う場合があります。低温(氷浴中)で実施して下さい。

〈プログラムフリーザーによる段階凍結法〉

1. 分離した細胞をPBSで2~3回洗浄後、RPMI1640培地に浮遊させ、細胞密度 $2\sim 10 \times 10^6$ 個/mLに調整します。
2. 25%ヒト血清アルブミン溶液を注射器に100mL用の場合は32mL、50mL用の場合は16mL吸い上げます。
3. 本製品「CP-1」のバイアルのゴム栓を消毒用アルコールなどで殺菌し、2.のアルブミン溶液を本品に少量ずつおだやかに加え、混和します。
4. 2.のヒト血清アルブミンを加えた本品を1で調整した細胞懸濁液にほぼ等量、おだやかに少量ずつ混和します。
(保存用/バッグを利用される場合は、保存/バッグの連結針を2.のヒト血清アルブミンを加えた本品のバイアルのゴム栓に連結し、本品を少量ずつ保存用/バッグ内の細胞懸濁液に流し込みながら、おだやかに混和します。)
5. 速やかに凍結保存用容器に分注して下さい。
6. プログラムフリーザーを用いて-1~-2°C/分の凍結速度で-40°Cまで温度を下げて下さい。(-5°C/分より急速な凍結で細胞の回収率が下がるとの報告²⁾があります。)
7. 更に-90°Cまで-10°C/分の凍結速度で温度を下げて下さい。
8. -90°C前後まで温度が下がったら、液体窒素中で保存して下さい。
9. 使用時は37~40°Cの恒温槽で急速融解してご使用して下さい。(2~3分程度で解凍を終了するのが目安となります。)

324042-2

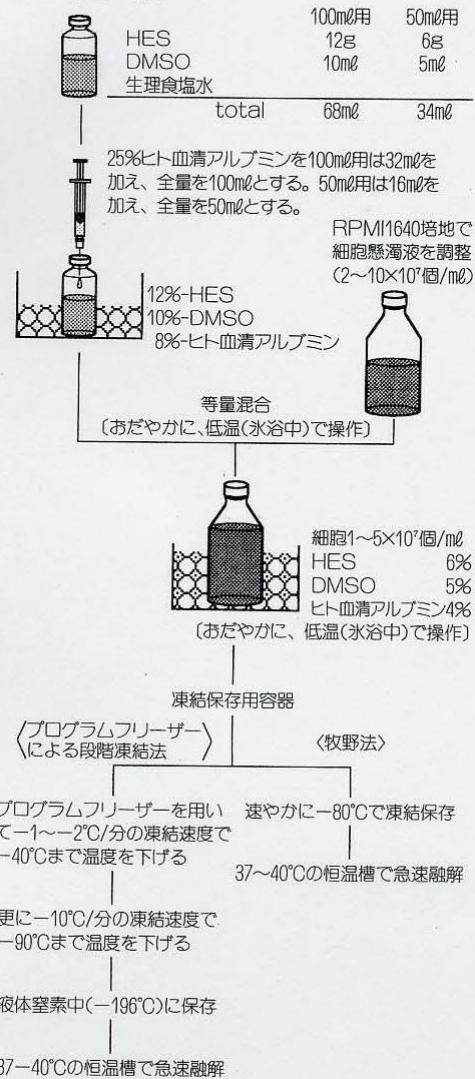
〈牧野法〉

- 1~4までの操作はプログラムフリーザーによる段階凍結法と同様です。
5. 速やかに凍結保存用容器に分注し、-80°Cで保存して下さい(液体窒素中で保存すると安定しているとの報告³⁾があります)。冷却速度は-2°C/分程度が目安です。
6. 使用時は37~40°Cの恒温槽で急速融解してご使用して下さい(2~3分程度で解凍を終了するのが目安となります)。

【取り扱い上の注意】

1. 本品は、無菌充填されておりますので、そのままご使用いただけます。
2. ヒト血清アルブミン添加後は、速やかに使用して下さい。
3. 本品と25%ヒト血清アルブミン及びその混合液と細胞懸濁液を混和する際、発熱しますので必ず混和は低温で行って下さい。
4. 本品を低温で保存されますと成分が析出してることがあります。室温下で保存して下さい。

【フローチャート】



【貯法】

室温保存

【有効期間】

6ヶ月


【包装】

- ・ 100ml用 (製品コードNo.27200) 68ml×6本
- ・ 50ml用 (製品コードNo.27202) 34ml×6本

【参考文献】

- 1) 牧野茂義、原田実根他：骨髓及び末梢血幹細胞の簡便凍結保存法、医学のあゆみ：VOL.151、No.1、1989、10、7。
- 2) S. Makino, of peripheral blood stem cells at -80°C without rate-controlled freezing. : Bone Marrow Transplantation 8(4)1991.
- 3) 中村博行、下坂幸、鳥野隆博、手島博文、平岡諦、正岡徹：造血幹細胞の保存法、臨床病理：7月臨時増刊、特集第99号、1995、7、31
- 4) 牧野茂義：末梢血幹細胞の保存方法、医学のあゆみ：VOL.176、No.9、1996、3、2。
- 5) 田口昇、高橋恒夫、関口定美：末梢血幹細胞凍結保存における冷却速度の影響：第2回日本低温医学会 シンポジウム1-8、1995、11、17
- 6) 河野嘉文、高上洋一：簡易凍結法により保存された末梢血幹細胞の移植後造血再構築機能：第2回日本低温医学会シンポジウム1-10、1995、11、17
- 7) Y. Takae, T. Abe, Y. Kawano, et al. : Comparative analysis of engraftment after cryopreservation of peripheral blood Stem cell autografts by Controlled-versus uncontrolled-rate methods. : Bone Marrow Transplantation 13(6)1994

製造発売元

 極東製薬工業株式会社

〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町7番8号

電話 (03) 5645-5663(代表)