

⑦. 移植施設は凍結した末梢血幹細胞を移植に使用しないと決定次第速やかに廃棄し、財団へ報告する。

(凍結した後、移植に使用されなかった場合の費用負担)

真に凍結が必要なやむを得ない場合として承認され、施設に非が認められず、患者の容態急変等やむを得ず移植に使用できなかった場合は、PBSC採取に係る費用については財団が負担することとする。

2. 採取したPBSCの細胞数が多かった場合について

- ・ 幹細胞提供における幹細胞は、提供者が自己の自由意思に基づき提供し、患者がそれを受諾することによって、患者に帰属するという考え方で整理し、移植後に一部残ったPBSCを凍結保存することを認めるかについては、個別に財団と協議を行うこととなった。

【資料 1】

厚生労働省免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
「同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、
医療、社会的基盤に関する研究」班 研究代表者 宮村耕一

非血縁者末梢血幹細胞採取の最適化
に関する研究

久留米大学 血液・腫瘍内科
長藤宏司

課題

非血縁ドナーに対する
(外来を原則とした)、
安全な同種末梢血幹細胞採取を確立する

課題への対応

当初、最少入院期間、画一的な
採取スケジュールを考えたが、

ドナーと採取病院の地理的關係、採取施設
の状況などを考慮する必要があり

個々の採取施設の現状を尊重する方向へ

外来PBSC採取の検討

—九大病院・虎の門病院—

曜日	月	火	水	木	金	土
外来	○	○	○			
入院				○	○	○
採血	○	○	○	○	○	○
G-CSF注射	○	○	○	○	○	
末梢血幹細胞採取				○	○	

疑問

- ・ 最も効率的に同種PBを採取できるのは、
- ・ Day4開始か
- ・ Day5開始か

対象：1999年10月より2008年7月まで九州大学病院・輸血センターにて
施行した血縁者間同種末梢血幹細胞採取244例のなかで、
日本骨髄移植推進財団の骨髄バンクドナー年齢条件である18歳以上、
55歳以下に該当する症例を対象とする

ドナー症例 199例
年齢 中央値 38歳(18-55)
男：女 93：106
体重 59.6 kg(36.8-87.9)

Recipient
年齢 中央値 38歳(0.4-70)
体重 53.7 kg(4.7-102)

G-CSF 10 μ g/kgまたは400 μ g/m²を連日1回皮下注。
Day4から採取を開始。
採取したCD34陽性細胞数が充分量に達するまでday5,6と随時採取を行う

((アフェレーシスはCOBE Spectralにて実施
採取量は、アフェレーシス脱血速度(血管の太さとかVVRとか)
ドナーの全身状態に依存することが多かった)))

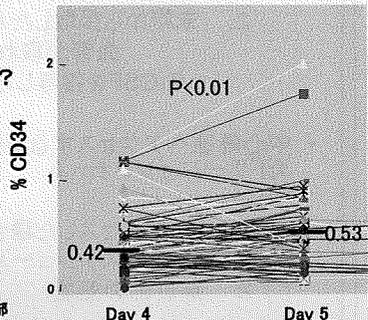
採取開始 day 4 vs day 5

Day4 開始

G-CSFリスク軽減
全拘束期間短縮

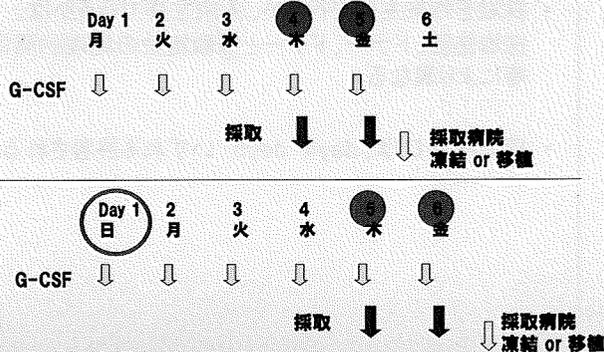
1回採取成功率低下?

2回以上apheresisを施行した患者での
CD34比較 (n=96)



九州大学病院 遺伝子・細胞療法部

Day 4 vs Day 5



Blood access

カテーテル挿入: ドナーのリスクの観点から望ましくない

カテーテル必要: 健康人ドナー: 15/155 (約10%)

九州大学病院 遺伝子・細胞療法部

カテーテル認めないと, 10%の採取不可のリスク

Blood access

カテーテル挿入を認めない場合:

ドナーの意思決定の前, コーディネーター中に
血管(正中静脈)の評価が必要

採取病院の検診でとれそうにないと判断されたらどうする?

G-CSFを打った後で入院後,
十分なフローがとれないとどうする?
採取医が穿刺失敗したらどうする?

Blood access

中心静脈カテーテル挿入について

既存のガイドラインなど

名古屋大学医学部附属病院 中心静脈カテーテル挿入マニュアル
<http://www.mms-net.com/~med.nagoya-u/anesth/cv/CVmanual2.pdf>

日本麻酔科学会
安全な中心静脈カテーテル挿入・管理のための手引き2009
http://www.anesth.or.jp/dbps_data/_material/_localhost/a.pdf

Blood access

中心静脈カテーテル挿入について

中心静脈へのアクセスについて

1. PBドナーの適格性に、採取に適する末梢静脈がある を創る
確認検査時に、適格性を判断
2. 末梢静脈から採取できると判断されていたが
実際に採取したら、血流量が確保できない
血管穿刺がうまくゆかず、末梢静脈が確保できない
3. 上記の場合は、大腿静脈にアクセスする

中心静脈へアクセスする可能性があることを
あらかじめドナーにインフォーム

考察1

- 採取を外来主体で行うか、入院主体で行うかは、採取施設、ドナー、ドナーと採取施設の地理的關係等により異なる
- 採取開始日は、day4 day5 いずれも許容される

考察

- 中心静脈へのアクセスについて
 1. 明らかに末梢からの採取が無理
ドナー適格性について
 2. 末梢から採取したが無理で、移行血管が取れないので、
G-CSFを投与した後に中止は実際的でない
- 中心静脈へアクセスする可能性があることをあらかじめドナーにインフォーム
- 中心静脈にアクセスした場合、後出血に対する対応
 1. 退院のスケジュール
 2. 穿刺部の処置

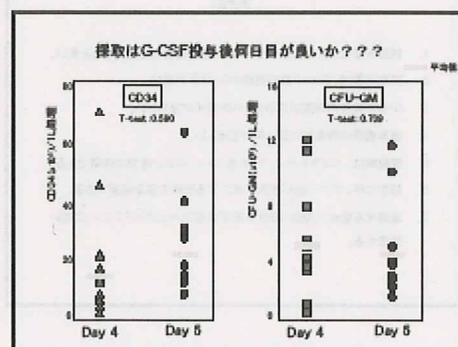
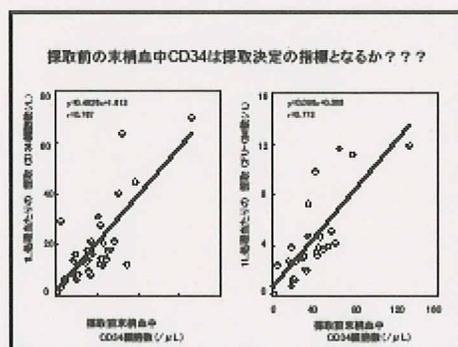
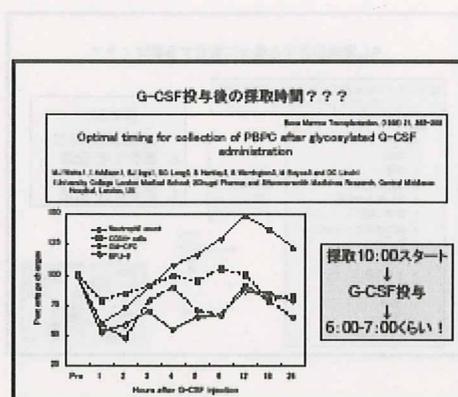
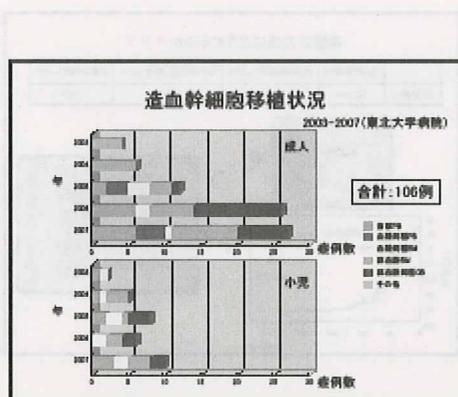
技師の立場から考える
 = 非血縁ドナーからの同種末梢幹細胞移植 =



東北大学 先端医工学治療開発センター 腫瘍応用部門
 伊藤 健夫

目的
 (非血縁ドナーからの採取)

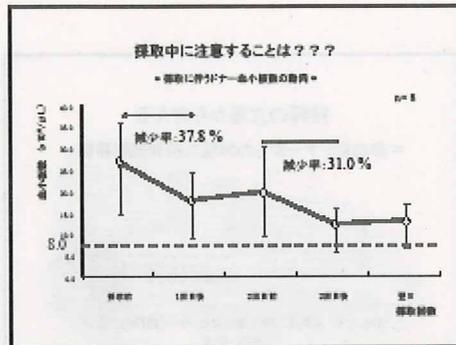
1. 最適な採取のためのG-CSF投与条件
2. ドナーの安全性を考慮した採取環境
3. もし凍結保存する場合に考慮する事



採取場所の環境はどのように考えるか???

兼任職員(輸血部)
 医師 : 1名
 看護師 : 1名
 技師 : 1名

血液検査センター (採血室 1ヶ所)
 成分献血室
 小電解心臓病 高血圧科
 救急カート



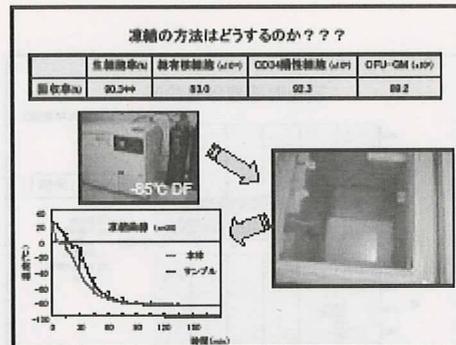
もし凍結保存する場合に考慮する事は???

国内における血液輸送設備のための指針(案)
(日本輸血・製血技術学会)

要するに

1. 細胞処理専用室
2. 清潔作業・記録
3. 検査・記録
4. 保守点検・記録

採血
 はじめに
 1. 目的
 2. 対象
 3. 細胞の採取
 4. 責任者と作業員
 5. 設備・機器
 6. 細胞処理(プロセッシング)
 7. 混入防止
 8. 保存と投与
 9. 検体管理
 10. 教育
 11. 監視
 12. 記録
 参考資料



- ### まとめ
1. 採取決定は、当日の末梢血中CO34陽性細胞数を測定すると良い。
 2. 採取時期は、G-CSF投与開始から5日が良い。
 3. G-CSF投与の時期は採取前3-4時間前が良い。
 4. 採取場所は救急室に近い所が良い。
 5. 採取時は、バイタルチェック・救急カート・病室の環境は必要である。
 6. 採取に伴いドナー血中酸素が減少するため注意が必要である。
 7. 凍結する場合、「輸血・細胞治療学会検出中のガイドライン」に従い作業する。

フローサイトメトリーによるCD34陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLS H3-P V1.0)

Report of the Hematology Standardization Committee Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry (JCCLS H3-P V1.0)

日本臨床検査標準協議会
血液検査標準化検討委員会
フローサイトメトリーワーキンググループ
Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards; JCCLS
Area Committee on Hematology
Subcommittee on Flow Cytometry

本ガイドラインは、JCCLSの協議手順に従って、提案 (Proposed Guideline) と
して公開を致しました。この内容に關しまして、ご意見やコメントを寄取いたし
ますので、JCCLSの事務局までメールやFAXご連絡の程、お願い申し上げます。
メールアドレス: jccle@jccle.org
F A X : 03-3669-9112

目次	3-2. CD34 抗体の選択
はじめに	3-3. CD45 抗体の利用
	3-4. 死細胞検出試薬
	3-5. 陰性コントロール抗体
	3-6. 溶血試薬
	3-7. その他の試薬
1. 目的と意義	4. 試薬調整
2. 検査材料の取り扱い	4-1. 検査材料の評価
2-1. 抗体の取り扱い	4-2. 白血球数の調整
2-1-1. 抗体のサンプリングと検査に用いる 抗体の調整	4-3. 測定手技の適正化
2-1-2. 抗体情報の取得	4-3-1. 抗体試薬の反応
2-1-3. 抗体ラベルの確認	4-3-2. 溶血処理
2-2. 抗体の保存	4-3-3. 洗浄
2-3. 凍結保存抗体の取扱い	4-3-4. 試薬の安定
2-3-1. 凍結解凍後の処理	5. 測定
3. 試薬	5-1. 使用機器の使用条件
3-1. 抗体試薬の使用条件	

れまでの形態学を中心とした造血器腫瘍の診断法
を段階的に進展させた。今では、フローサイトメ
トリーを用いた血液細胞の同定・解析は、造血器
腫瘍の診断には欠かせないものとなっている。

しかしながら、実際の臨床現場への導入が急
進であったこともあり、フローサイトメトリー
の標準化については大きく遅れることとなっ
た。各施設が独自の方法で解析するため、以前
われわれが実施した調査でも、代表的な表面抗
原においてさえ、各施設で分析結果に大きな開
きがあった。日本臨床検査標準協議会 (JCCLS:
Japanese Committee for Clinical Laboratory
Standards) では、フローサイトメトリーの標準
を策定した。

ひとつは、ヒト末梢血を解析するためのガイ
ドラインとして「フローサイトメトリーによる末
梢血リンパ球表面抗原検査に関するガイドライン
(JCCLS H1-A)」を作成し、ついで、造血器腫
瘍細胞を解析するためのガイドラインとして「フ
ローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗
原検査に関するガイドライン (JCCLS H2-P)」
を策定した。前者はすでに approve されている
が、後者については既に public comment の発取
られる予定である。

今回は、近年、造血器腫瘍などの治療に使用さ
れる幹細胞移植において、その成功のポイントと
なる CD34 陽性細胞の解析のためのガイドライ
ンを策定した。本ガイドラインによって、幹細胞
移植がより効果長く推進されることを願うので
ある。

1. 目的と意義

白血病など造血器腫瘍の治療は、その診断法
の進歩とも相俟って、近年急速な発展を遂げてい
る。その中でも、造血器腫瘍は、造血器腫瘍
を完治せしめるものとして注目を集め、多くの症
例で横行されている。また、他の悪性腫瘍の治療
にも、大量の化学療法や放射線療法のうち、幹細胞

5-2. 使用機器の調整および確認
5-3. CD34 陽性細胞数の測定法
5-3-1. デュアルパラットフロー法
5-3-2. シングルパラットフロー法
5-3-3. シングルパラットフロー法の試薬
と操作上の留意点

5-4. ドットプロットの設定
5-4-1. 基本ドットプロット
5-4-2. 死細胞検出試薬を用いる場合の追
加ドットプロット

5-4-3. シングルパラットフロー法におけ
る追加ドットプロット
5-5. 陽性コントロール試薬による機器設定等
の検証

5-5-1. 閾値 (Threshold または Noise
Discrimination) の確認
5-5-2. 蛍光強度の確認
5-5-3. 蛍光コンペンセーションの確認
5-5-4. 陽性コントロールによる CD34 測定
値の確認

5-6. 試薬の測定
5-6-1. 測定までの試薬の保存方法
5-6-2. 測定手順
5-6-3. 測定細胞数
5-6-4. 試薬の吸引 (サンプリング)

6. データ解析と分析結果の解釈と報告
6-1. CD34bright+ 細胞と CD34dim+ 細胞
6-2. 解析の安定性確認と再検査率
6-3. CD34 陽性のコントロールの測定値
6-4. 分析結果の報告
6-5. 分析結果の保存

7. 分析後の作業
8. 文献

はじめに
20世紀の後半、免疫学の急速な発展に伴い、
白血病などの造血器腫瘍の診断・治療にも、その
技術が導入されるようになった。特に細胞融合技
術を駆使したモノクローナル抗体と、流式細胞計測
の幹を集めたフローサイトメトリーの開発は、そ

- 2) **FBSC**の場合、白血球数が多いので検体さらに希釈して測定することが多い。
この場合、赤血球や血小板成分が希釈されるために、溶血試験によってはその作用が相対的に強くなり白血球が壊れる恐れがある。
- 3) 塩化アンモニウム溶血剤は白血球への作用と同様に溶血力そのものも比較的強いが、**CD45**ゲートインジカを行うことで、未溶血の赤血球や血小板の影響を最小限に抑えることが可能である。
- 4) **CD34**陽性細胞数が非常に少なく、かつ検体によっては陽性細胞の蛍光強度が弱いこともあるため、測定による白血球の非特異的蛍光を避けるとともに、散乱光に影響の少ない溶血試験が望ましい。
- 5) 固定剤を含む溶血試験を使用すると、生細胞に傷害を与え細胞の検出が不可能となる。

測定キットや市販の溶血試験を用いる場合は、添付取扱説明書にしたがって調整、保管、使用すること。自家調整の溶血試験を用いる場合は、性能や保存条件と安定性などについて事前に検証する。

3-7. その他の試薬
検体の希釈や洗浄には、リン酸緩衝生理食塩水(**PBS**)、**Ca** イオン、**Mg** イオン(不含) もしくは、ハンクス液(**Hank's BSS**)を用いる。いずれも、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清等の血清タンパクを0.5~2%程度添加することが望ましい。シングルプラットフォーム法で**CD34**陽性細胞数を測定する場合は絶対数測定用試薬については、5-3-2で述べる。

4. 試料調整
CD34陽性細胞の測定では、できるだけ試薬に傷害を与えない調整方法を選択する必要がある。また、未洗浄での測定やシングルプラットフォーム法(5-3-2参照)による**CD34**陽性細胞数の直接測定など、**CD34**陽性細胞の「絶対数」の測定精度を低減するための方法論を積極的に取り入れる。

正については**JCOCLS H2-P** 補遺を参照)。自家調整の試薬を用いる場合は、蛍光色素のロット毎に至適濃度調整等の確認が必要である。
ProCOUNT™ 蛍光色素(等)は、死細胞と生細胞の識別が困難なため、死細胞検出試薬として使用できない。

トリファンブルー法は、分析にあたって検体の生細胞率(**viability**)を確認する目的でよく用いられている。しかしながら、**CD34**陽性細胞測定においては、試薬中の**CD34**陽性細胞の割合が極めて小さいこと、検体中の各種細胞の生細胞率が一律ではないことから、**CD34**陽性細胞の測定値をトリファンブルー法による生細胞率で補正することは適当ではない。

3-5. 陰性コントロール抗体
CD34陽性細胞の測定では、陰性コントロール試薬は、**CD34**陽性細胞の検定よりはむしろ、抗体試薬の非特異的結合の検証に用いられているが、本測定が影響される場合もある⁶⁾。
試薬で精製に測定するための、陰性コントロール抗体は、**CD34**抗体とアイソタイプを揃えるだけでなく、バックグラウンドの蛍光強度レベルも同等にする必要がある。測定キット等の専用コントロール抗体を使用しない場合は予め正常本細胞等で、陰性コントロール抗体の蛍光強度分布が**CD34**陽性細胞の蛍光強度分布と同様であることを確認しておくことが望ましい。

CD45抗体については、用途が**CD34**陽性細胞(**CD45dim**)のゲートインジカであるため、陰性コントロール抗体は不要である。
3-6. 溶血試薬
CD34陽性細胞の測定では、以下の点から塩化アンモニウム溶血剤など白血球への作用が比較的弱い溶血試薬の使用が推奨される。

- 1) 検体が**FBSC** (**Peripheral Blood Stem Cell Harvest**) の場合、採取の過程で赤血球が大幅に除去されているので、溶血力の比較的弱い塩化アンモニウム溶血試薬でも十分に溶血でき

れる必要がある。**CD34**測定キット等を用いる場合は、添付の取扱説明書にしたがって操作する。

4-1. 検体材料の評価

検体を検体材料として受け入れるための基準および**JCOCLS H2-P**を参照する⁷⁾。

測定に死細胞検出試薬を用いない場合は、トリファンブルー法など細胞が壊れない方法によって、検体中の生細胞率(**viability**)を別途確認、記載しておくことが望ましい。ただし、この方法では**CD34**陽性細胞に与える死細胞の検出は不可能である(3-4参照)。

4-2. 白血球数の調整

染色を開始する前に、検体中の白血球数(**WBC**)を測定し、分析に用いる抗体試薬の推奨反応条件(一般に、1テストあたり白血球2000~20000個/ μ L程度であることが多い)の範囲内にあるかどうかを確認する。必要があれば、白血球数が至適範囲内になるように検体を希釈または濃縮する。検体の希釈を行った場合は、その希釈倍率を記載し、測定結果を補正する。

白血球数が多い場合の検体の希釈には、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清等の血清タンパクを添加(0.5~2%程度)した**PBS** (c) またはハンクス液を用いる。白血球数を再測定し、至適範囲内にあることを確認する。

分析に必要な検体量は抗体試薬の取扱説明書に収う。通常は試薬1本あたり検体100 μ Lが目安だが、測定する細胞数によっては、検体量の調整が必要となる場合もある。

4-3. 測定手技の適正化

4-3-1. 抗体試薬の反応

抗体試薬の使用量は、試薬の取扱説明書に従う。ただし、単色用抗体試薬を組み合わせて使用する場合や未洗浄で測定する場合は、試薬の至適用量等について事前に検証し、その結果に基づいて使用する(3-1参照)。抗体試薬の反応は、通常は18~22°Cで15~30分間行うことが多く、検体が分画細胞処理済である等の理由により2~8°Cで抗体試薬反応させる場合は、反応時間について予め検証しておく。

死細胞検出試薬を用いる場合は、試薬の取扱説明書にしたがって使用する。ヨウ化プロピドイウム(**PI**)を用いる場合は、測定の前処理に追加する。

4-3-2. 溶血処理

反応後に溶血処理を行う。

溶血試薬の添加量、溶血に必要な時間や至適温度は溶血試薬によって異なるため、使用する溶血試薬の取扱説明書にしたがって操作する。至適な溶血処理は白血球の破壊や喪失、非特異的蛍光の増大を招くため、溶血の速度と時間には厳格に守る。自家調整の溶血試薬を用いる場合は、至適反応条件について事前に検証しておく。

未溶血から分離した単核細胞分画や分離濃縮した**CD34**陽性細胞分画など、赤血球をほとんど含まない検体の場合には、溶血処理を行わずに次のステップに進んでよい。

4-3-3. 洗浄

試薬の洗浄(遠心分離から上清の除去に至る過程)は最小限に留める。とくに、シングルプラットフォーム法(5-3-2参照)の場合は、洗浄に伴う細胞の損失が測定結果に直接影響するため、通常は洗浄を行わずに測定する。デュアルプラットフォーム法(血球計数による白血球数と**CD34**陽性率から**CD34**陽性細胞数を算定する場合)も、洗浄で全ての白血球分画が同等に回収される保証がないため、できるだけ洗浄を行うべきではない。

洗浄を行う場合の遠心分離の条件については、予め検証しておくことが望ましい。

4-3-4. 試薬の固定

一般にフローサイトメトリーでは、ホルムアルデヒド(パラホルムアルデヒド)等の固定剤により、調整した試薬を固定した後測定する(**JCOCLS H1-A, H2-P**参照)。しかしながら、**CD34**陽性細胞の測定においては、試薬の固定によって**CD34**の蛍光強度の低下やバックグラウンド蛍光の増強がみられることがあるので、注書が必要である。試薬を固定する場合は、**CD34**陽性細胞測定に影響のないことを予め確認しておくことが望ましい。

死細胞検出試薬を使用する場合は、固定剤の作用で死細胞検出に偽陽性を生じるため、試料の固定は要する。

5. 測定

CD34陽性細胞の測定は、ごく少ないCD34陽性細胞をできるだけ精度良く測定するため、ゲーティング方法等に工夫を凝らした方法が提案されている。実際に使用されている代表的な方法として国際細胞学会 (ISCT) が推奨するISHAGE法³⁾があり、この他にも様々なCD34測定法が報告され、かつ使用されている^{4), 10)}。

本ガイドラインでは、ISHAGE法を基本として、測定手順の概要や測定上注意すべき点等について説明することとする。

5-1. 使用機器の条件

使用するフローサイトメーターは、前方散乱光 (FSC)、前方散乱光 (SSC)、CD45 蛍光、CD34 蛍光の最低4パラメータ (3カラー) を測定できること必須である。また、死細胞検出用上の機器の使用も必須である (3カラー) 以上の機器の使用が望ましい。パラメータとして時間軸が取れるとなお良い (5-6-4参照)。

測定及びデータ解析に用いるソフトウェアは、測定式にしたがった複数の解析ゲートの組み合わせ (例えば、ゲートA且つゲートB) が可能であることが望ましい。

CD34測定キット等や専用で使用された測定・解析ソフトウェアを用いる場合は、機器、ソフトウェアおよび試薬の取扱説明書にしたがって、機器調整、試料調整および測定、データ解析等を行う。

5-2. 使用機器の調整および検証

使用機器の光学系および流体系の調整や散乱光/蛍光検出器の性能等については、機器の取扱説明書にしたがって、使用前に正しく調整、確認しておく (詳細はJCCLS H2-Pを参照)。

5-3. CD34陽性細胞の測定法

5-3-1. デュアルパラットフロー法
 検体中のCD34陽性細胞の濃度 (絶対数) は、

フローサイトメトリによって得られる白血球 (CD45陽性細胞) に占めるCD34陽性細胞の割合 (CD34陽性率) と、別途血球計数検査で得られた白血球数 (WBC) から次式で求めることができる。

$$\begin{aligned} \text{CD34絶対数} (\mu\text{L}) &= \text{CD34陽性率} (\%) \\ &\times \text{WBC} (\mu\text{L}) \times \text{検体希釈倍率} \\ &= \frac{\text{CD34陽性イベント数} / \text{CD45陽性イベント数}}{\text{ト数}} \times \text{WBC} (\mu\text{L}) \times \text{検体希釈倍率} \end{aligned}$$

この方法は簡便だが、フローサイトメーターの他に血球計数装置が必要である。また、CD34陽性率を求める際に分母となる「CD45陽性細胞」の解析領域は、精確性に乏しい。

5-3-2. シングルパラットフロー法

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」として試料に加えて測定し、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、血球計数装置を必要とせず、フローサイトメーターのみで目的細胞の絶対数を求めることができる。

CD34陽性細胞絶対数 (μL)

$$= \frac{\text{CD34陽性イベント数} / \text{内部標準イベント数}}{\text{数}} \times \text{内部標準濃度} (\mu\text{L}) \times \text{検体希釈倍率}$$

この方法は、精確性に乏しい「CD45陽性細胞」の解析領域の結果を必要としないので、より信頼性の高いCD34陽性細胞数の測定方法として推奨できる。

5-3-3. シングルパラットフロー法の試薬と検

作上の留意点

シングルパラットフロー法では、絶対数測定用の内部標準粒子試薬が必要となる。濃度既知の標準粒子標準液を測定前に一定量 (通常は検体と等量) 添加するタイプと、予め一定倍数の標準粒子が試薬に封入されているタイプの2種類の粒子が市販されており、いずれも、試薬の製造時に標準粒子の濃度もしくは価数が厳密に検定されている。

シングルパラットフロー法では、測定試料中の標準粒子濃度の精確性が重要となる。したがって、前者 (標準液添加タイプ) では標準粒子試薬の分注精度が、後者 (試薬封入タイプ) では標

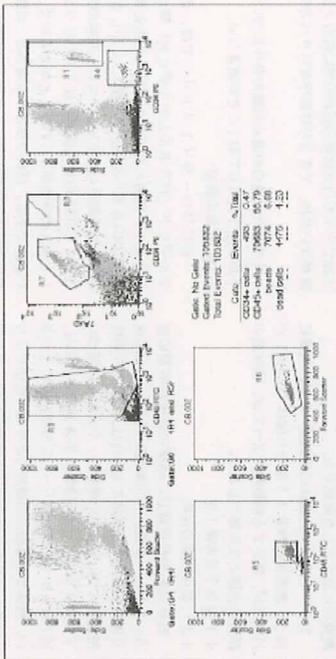


図 5-3-2 内部標準粒子を用いたシングルパラットフロー法解析例

内部標準粒子 (beads, S1) が 7074 イベント、CD34陽性細胞 (CD34+ cells; B6) が 493 イベント、カウントされた数、上記の計算式により絶対数 (cells/μL) をシングルパラットフロー法で算出することができる。CD34陽性細胞絶対数 (cells/μL) = (CD34陽性イベント数 (493) / 内部標準イベント数 (7074)) × 内部標準濃度 (1000 / μL 系) × 検体希釈倍率 (希釈なしなので1倍) = 70
 ※ FACSCount チューブ中のドーズ数はロットにより異なりますが、原則的に 50000 ドーズのベレットになっている。仮って検体量 50 μL を使用すると、1000 / μL の濃度となる。

標準粒子の分散が、検体分注量の精確性ととともに、測定精度上の要因となる。このため、標準粒子試薬の取扱説明書にしたがった、正しい取り扱いを行うことが重要である。特に一定量の標準粒子を測定試料に添加するタイプでは、リバーシビリティゲティング法 (分注する量よりも多めに吸引し、吸引容量のみ排出) により分注精度を高めることが重要である。さらに、使用するベレットは正しくキャリブレーションされている必要がある。なお、標準粒子を添加した試料の安定性は比較的低いので、試料調整後はできるだけ速やかに測定する。

標準粒子は、一般的なフローサイトメーター (488nm 励起) で測定可能な広範な蛍光波長特性を有しているため、抗体試薬や死細胞検出試薬で使用しない蛍光チャンネルを利用して測定することができ。なお、2カラーないし3カラー分析のみ対応している機器の場合でも、標準粒子の

蛍光強度が CD45 や CD34 の蛍光強度に比してはるかに強いことを利用して、蛍光標識抗体と標準粒子を同じ蛍光チャンネルで同時に測定することが可能である。

5-4. ドットプロットの設定

測定に用いる試薬、機器、解析ソフトウェア等の条件にしたがって、各機器で相互設定する。CD34測定キットやプレミックス試薬を使用する場合は、設定条件が指定されている場合はそれに従う。

5-4-1. 基本ドットプロット³⁾

FSC、SSC、CD45 蛍光、CD34 蛍光を用いて、次の順序による新編化処理ゲーティング (logical gating) で CD34陽性造血幹細胞を検出・同定する (図 5-4-1 a~d)。

① SSC/CD45 プロット上で、白血球集団 (CD45陽性細胞) をゲートする (図 5-4-1 a)。

② 白血球集団の SSC/CD34 プロット上で、

CD34陽性細胞をゲートする (図 5-4-1 b)。
 ③ CD34陽性細胞集団の SSC / CD45 プロット
 上で、SSC が低く CD45dim+ の細胞をゲート
 する (図 5-4-1 c)。
 ④ CD34 陽性 CD45dim+ 細胞の SSC / FSC プ

ロット上で、造血幹細胞集団を解析する (図
 5-4-1 d)。
 造血幹細胞の SSC / FSC プロット上の特徴は、
 「SSC は低く、FSC は真から中程度」である。

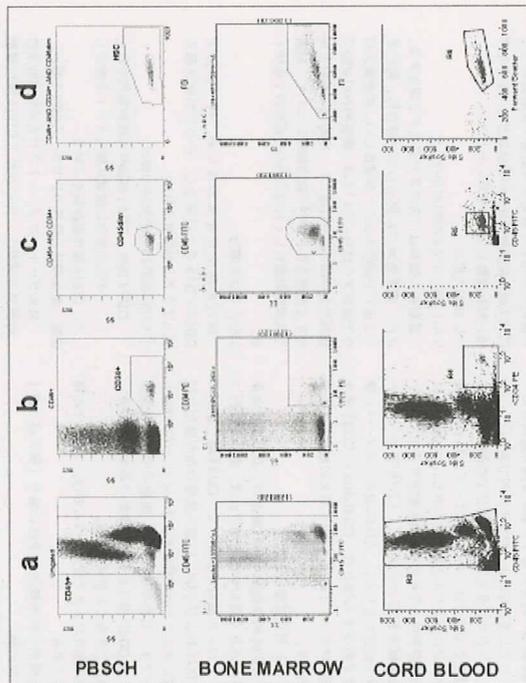


図 5-4-1 基本ドットプロットの例
 末梢血アフェリシス検体 (PBSCH)、脾臓検体 (BONE MARROW)、臍帯血検体 (CORD BLOOD) に
 ついて、a: SSC/CD45 プロット (縦軸が SSC - 以下同様)、b: SSC/CD34 プロット (CD45+ゲート)、c:
 SSC/CD45 プロット (CD45+CD34+ゲート)、d: FSC/SSC プロット (CD34+CD45dim+ゲート) の例を示す。

5-4-2. 死細胞検出用試薬を用いる場合の追加
 ドットプロット (9, 10, 11)

死細胞検出用試薬 (PI または 7-AAD) を用い
 る場合には、別に SSC (または CD34) / 死細胞
 検出用試薬のプロットを作り、死細胞検出用試
 薬が陰性の集団全て (生細胞) もしくは陽性の
 集団 (死細胞) に解析陽性ゲートを設定する (図

5-2)。市販の死細胞検出用試薬を用いる場合は、
 取扱説明書を参考にプロットとゲートを設定す
 る。

5-4-3. シングルプラットフォーム法における追
 加ドットプロット (1)

内部標準粒子試薬を用いたシングルプラット
 フォーム法で CD34 陽性細胞数を真価測定する

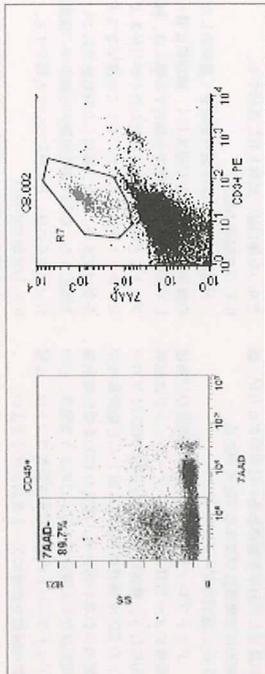


図 5-4-2 死細胞検出用試薬を用いる場合の追加プロットの例
 SSC/7-AAD のプロット (左図)、CD34/7-AAD のプロット (右図) の例を示す

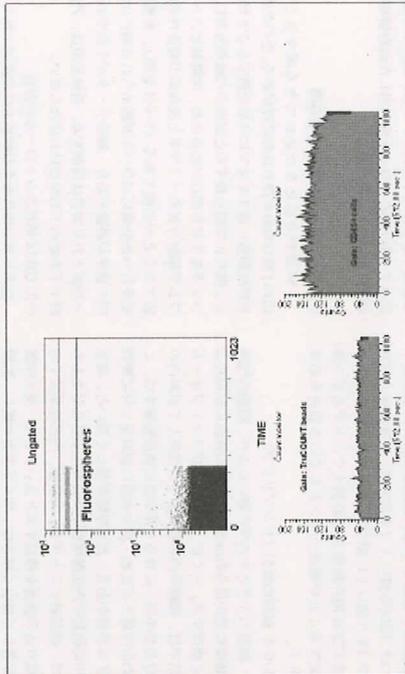


図 5-1 シングルプラットフォーム法の追加プロットの例
 内部標準粒子とは異なるドットプロット (上図)、内部標準粒子および CD45+ 細胞カウントの時間軸ヒスト
 グラム (下図) の例を示す。

場合の設定は、使用する機器や試薬の組み合わせ
 により異なる。内部標準粒子試薬の取扱説明書を
 参考にプロットとゲートを設定する。時間軸を組
 み合わせたプロットを作成しておく、試料測定
 試料測定の前に、適切な陽性コントロール試料

中の機器の状態を確認できる (図 5-4-3)。
 5-5. 陽性コントロール試料による機器設定等の
 検証
 試料測定の前

で各ゲートの大きさを調整するとともに、FSC、SSC、蛍光の強度や閾値 (Threshold) または Noise Discrimination)、蛍光コンペンセーションなどが適当かどうかを確認することが望ましい。

5-5-1. 閾値 (Threshold) または Noise Discrimination) の調整

CD34 陽性細胞は、リンパ球と同程度かやや大きい FSC 強度を有する。FSC 閾値は、FSC / SSC プロット等を参照して、リンパ球集団がカットされることのない位置に設定する。これは、FSC 閾値の設定によって CD34 陽性細胞をカットしてしまわないようにするためである。

シングルプラットフロー法で内部標準粒子を設定する場合は、キットによっては粒子の FSC がリンパ球より小さい場合がある。この場合には、内部標準粒子を基準に閾値を設定するか、あるいは閾値を FSC にはなく、CD45 蛍光パラメータで設定する。CD45 蛍光パラメータに閾値を設定する場合は、CD45dim の CD34 陽性細胞がカットされないように低めに設定する必要がある。

5-5-2. 蛍光強度の調整

CD34 陽性細胞の初期測定時、および高濃度ゲートが大きく変わるときには、適切な陽性コントロール試料を設定して、CD34 陽性細胞の CD34 および CD45 の蛍光強度分布が適切な位置にあることを確認する。さらにシングルプラットフロー法の場合は、細胞の CD34 蛍光および CD45 蛍光と内部標準粒子の蛍光が明確に区別できることを確認する。

測定条件が大きく変わらう場合は、主に以下の場合である。

- ① 機器の使用頻度が少ない場合 (例えば、週 1 回未満)
- ② 測定機器の修理・メンテナンス実施後
- ③ 試料採取のロット変更後

また、測定条件は経時的にも変化し得るため、定期的な同様の確認を行うことが望ましい。

5-5-3. 蛍光コンペンセーションの調整

5-5-2 で蛍光強度を再調整した場合は、蛍光コ

ンペンセーションについても必ず再調整する。

5-5-4. 陽性コントロールによる CD34 陽性細胞の調整

5-5-1 から 5-5-3 の調整が終わった後、CD34 陽性細胞が既知の陽性コントロール試料の測定値から回収率 (CD34 陽性細胞数の実測値と所付値の比率) を計算することによって、閾値調整も含めた測定システム全体を確認することができ、回収率の許容範囲は、陽性コントロール試料の特性等に応じて確認で決定する。陽性コントロール試料は、市販 CD34 陽性コントロール細胞を添加した健康人末梢血や凍結保存した CD34 陽性細胞が既知の検体などを、試料と同様に試料調整したものをいう。

5-6. 試料の測定

5-6-1. 測定までの試料の保存方法

調整後の試料は、測定まで遮光下で保存する。また、調整後直ぐに測定しない場合は、測定まで 2-8℃ で保存することが望ましい。溶血後未洗液中で測定する試料については、調整済みの状態で試料の長時間の保存は難しい。調整済み試料を保存する温度条件と保存可能な期間について、試料の取扱説明書もしくは集約内の付属資料で確認する。

5-6-2. 測定の手順

測定の前準備を高めるため、同一検体で CD34/CD45 を 2 回測定し、その平均値を報告値とする。

① CD34/CD45 染色試料の測定

CD34 陽性、CD45 弱陽性の細胞集団を設定し、その集団を含む領域に陽性ゲートを設定して、CD34 陽性細胞数を求める。

② 同一患者検体の陽性コントロール試料の測定

解析ゲート中にプロットされる非特異的染色細胞数を確認し、先に求めた CD34 陽性細胞数から差し引く。

陽性コントロール試料については、リンパ球サブセット設定等と異なり、解析ゲートの設定が主な目的であり、点に注意が必要である。外国のガイドラインでは、陽性コントロールを必要としないものもある。陽性コントロールについては各

施設で測定し必要に応じて測定すること。

5-6-3. 測定細胞数 (11, 12)

CD34 陽性細胞測定では、目的細胞の数はリンパ球サブセット検査や末梢血陽性細胞検査結果と比べて著しく少ない (検体の濃縮により異なるが、白血球の 0.01% から数% 程度とされる)。したがって、精度の高い測定にはより多くの測定細胞数を必要とする。CD34/CD45 の 1 測定につき 75000 個以上 (すなわち、2 回測定の合計で 15 万個以上) に相当し、あるいは目的細胞数で CD34 陽性細胞を 100 個カウントするまで測定することが最低限として報告される。

5-6-4. 試料の吸引 (サンプリング)

細胞の大きさや比重の違いにより、細胞の沈降速度に差が見られるので、測定の前には試料をよく攪拌する。とくに、シングルプラットフロー法では、細胞や内部標準粒子が沈降して試料内の分布が不均一になると測定値に偏りや影響を及ぼす可能性がある。測定時間が著しく長いと、測定中に細胞や内部標準粒子が沈降する恐れがある。特に、時間経過とともに試料の濃度が低下する恐れがある。取り込み速度を確認するとよい。また、測定時間が著しく長引く場合は、取り込みを中断し、試料管を再度攪拌した後に再び取り込みを継続することが可能である。1 回の測定で長時間に渡り多量の細胞を測定するよりも、2 試料作成し、それぞれ測定した結果を蓄積する方が、最終的には精度が高まる可能性がある。

5-6-5. 試料のゲートティング

ドットプロット上の CD34 陽性細胞の分布は検体によって異なるため、ゲートティングは試料毎に行う。検体によっては、SSC / CD34 プロットの CD34 陽性細胞集団にほとんど陽性細胞が認められない場合や、複数の CD34 陽性細胞集団が存在する場合がある。このような場合、他のドットプロットの細胞分布や陽性コントロール試料の結果を参考にゲートを設定するとよい。

6. ゲート解析および分析結果の解釈と報告

6-1. CD34bright+ 細胞と CD34dim+ 細胞

CD34bright+ 細胞は、既に末梢血陽性細胞の解析として利用されている。CD34dim+ 細胞については、赤芽球系や顆粒球系細胞に方向付けられた細胞と考えられているが、非特異的な細胞と見られることもあるため注意が必要である。非特異的な細胞であるかどうかについては、CD45 の蛍光強度や FSC/SSC プロットを利用した細胞解析を参考に判断する必要がある。

6-2. 解析の安定性確認と再検査

解析性を高めるためにできる限り多くの CD34 陽性細胞を調り込む必要がある。そのため、目標細胞数に達するまでに時間を要することがある。解析に時間を要すると試料中の細胞分布にバラツキを生じる恐れがあるため、時間経過ヒストグラムで細胞分布のパラメータと前体系の安定性を確認することが必要である (5-6-4 参照)。多重測定を行なった結果にバラツキが認められる場合は原因の追求が必要であり、解析ゲートが不良であると判断される場合は再検査する。再検査は、各ゲートで予め決めておかなければならない。

6-3. CD34 陽性コントロールの測定

染色や溶血操作を含む解析方法が適切であることとを確認するため、CD34 陽性細胞を陽性コントロールとして用いることが望ましい (5-5-4 参照)。CD34 陽性コントロールの測定結果が不良となった場合は、試料と共に再検査する。

6-4. 分析結果の報告

分析結果は、CD34 陽性細胞を二重測定した平均値を報告することが望ましく、細胞数は個 / μ L で表記する。分析結果を報告する際には、解析ゲートをどの細胞集団に設定したかが分かるようにプロットを添付するか、もしくは適切なコメントを添付する。また、解析した細胞数についても報告する。CD34 陽性細胞の細胞数の測定を行った場合には、その値についても報告する。

6-5. 分析結果の保存

個人情報保護に十分配慮し分析結果を保存する。保存期間は原則として 5 年間とする。保存す

べき分析データは、CD34陽性細胞測定値を保存する。また、CD34陽性コントロールを測定した場合は、その値も保存する。保存方法については、測定後に解析ゲートを変えて再解析できるようにリストモードデータとして保存することが望ましい。

7. 分析後の作業

次の分析に支障がないように、また安全確保のために、機器の保守とシャットダウン、廃液や使用済みの検体と器具などの廃棄は、適切に行わねばならない。

【文献】

1. 神前昌敏ほか：ヒト造血幹細胞の凍結保存。医学のあゆみ。161:410-412, 1992
2. 牧野茂美ほか：骨髓及び末梢血幹細胞の簡便凍結保存法。医学のあゆみ。151:65-66, 1989
3. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cells determination by flow cytometry. *J Hematotherapy*. 5: 213-226, 1996
4. Schlossman SF, et al (Ed.) : Leukocyte typing V. Oxford University Press, (London) 1995
5. Kishimoto T, et al (Ed.) : Leukocyte typing VI. Garland Publishing, Inc. (New York & London) 1997
6. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, et al. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for

Standards in Haematology. Clin Lab Haematology. 21:301-308, 1999

7. JCCLS 血液検査標準化検討委員会フローサイトメトリーワーキンググループ：フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球表面抗原検査に関するガイドライン (JCCLS H1-AV2.0)。日本臨床検査標準協議会誌。15: 123-136, 2000
8. JCCLS 血液検査標準化検討委員会フローサイトメトリーワーキンググループ：フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関するガイドライン (JCCLS H2-P-V1.0)。日本臨床検査標準協議会誌。18: 69-107, 2003
9. Gratama JW, Orfeo A, Barnett D, et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry*. 34: 128-142, 1998
10. Brocklebank AM and Sparrow RL: Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*. 46: 254-261, 2001
11. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry*. 34: 61-70, 1998
12. NCCLS: Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline. NCCLS Document H45-A. NCCLS Wayne, 1998

院内における血液細胞処理のための指針(案)

- 平成 20 年 02 月 15 日 第 0.1 版作成
- 平成 20 年 02 月 16 日 第 0.2 版作成
- 平成 20 年 06 月 28 日 第 0.3 版作成
- 平成 20 年 10 月 03 日 第 0.4 版作成
- 平成 20 年 10 月 10 日 第 0.5 版作成
- 平成 21 年 02 月 21 日 第 0.51 版作成
- 平成 21 年 05 月 11 日 第 0.52 版作成
- 平成 21 年 06 月 19 日 第 0.53 版作成
- 平成 21 年 07 月 18 日 第 0.8 版作成
- 平成 21 年 09 月 23 日 第 0.9 版作成
- 平成 21 年 11 月 15 日 第 0.91 版作成
- 平成 21 年 11 月 18 日 第 0.92 版作成
- 平成 22 年 02 月 01 日 第 1 版作成

日本輸血・細胞治療学会
日本造血細胞移植学会

系 Ver.1

はじめに

医療施設内で加工・製造される洗浄血小版や造血幹細胞等の院内血液細胞製剤は輸血医療や細胞治療にいまや不可欠である。しかしながら、これらの院内血液細胞製剤は、Good Manufacturing Practice (GMP)の下で日本赤十字社等から供給される血液製剤と異なり、その安全性や品質の保証はいまだに担保されていない。従って、院内血液細胞製剤の扱いは、血液法のもと行政に課された喫緊の課題である。そこで、院内血液細胞製剤を扱う国内のあらゆる施設が遵守すべき最小限の基準(施設ならびに製造・品質管理手順)をここに作成し、血液細胞製剤(生物製剤、生物由来製品、臨床研究用細胞・組織製剤等)における院内血液細胞製剤の原則上の位置づけを明確にするとともに、血液法の基本方針に則り、院内血液細胞製剤の安全性の向上、適正使用の推進、そして安定供給の確保への行政ならびに医療機関の取り組みを促すことを目標とする。

本基準の作成は、関連学会(日本輸血・細胞治療学会、日本造血細胞移植学会)の相互連携のもと行われた。さらに引用原稿のひとつとして、FACT-JACIE2006年第 3 版(Part C および D)の細胞治療製剤の採取、細胞処理基準を参考としたが、わが国既存の諸基準に整合する文書体系とした。また、輸血・細胞処理部門のわが国の現状を考慮し、必ずしも現在の大半の施設が満たす基準ではなく「目指すべき基準(理想的な基準)」の内容も含めた。

今後、海外、特に欧米の最新の指針と同等の基準となるべく、適宜内容を見直し、改定を加えることができるようにする。このようなガイドラインを作成することによって、将来的に輸血・細胞処理部門認定や有害事象の監視体制を構築することも可能と考えられる。

目次

はじめに..... 2

1. 目的..... 4

2. 対象..... 4

3. 細胞の採取..... 4

4. 責任者と作業員..... 5

5. 設備・機器..... 6

6. 細胞処理(プロセッシング)..... 7

7. 払い出し..... 10

8. 保存と解凍..... 11

9. 検体保存..... 13

10. 投与..... 13

11. 廃棄..... 14

12. 雑則..... 14

参考資料..... 14

付

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
 - 1.2. 細胞数と生細胞率の算定
 - 1.3. CD34 陽性細胞数測定法
 - 1.4. コロニー形成細胞測定法(コロニーアッセイ検査)
2. 末梢血幹細胞の処理・凍結保存手順
3. 骨髓液からの赤血球除去手順
4. 骨髓液からの上清除去手順
5. 凍結細胞の解凍・輸注の手順
6. 細胞処理に用いる試薬など

1 目的

本基準は、細胞の性状を変えることなく医療施設内で加工・製造される院内血液細胞(以下、「血液細胞製剤」と称し、主に造血幹細胞等を意味する)の製造工程において、安全で高い品質を確保し、また製造された血液細胞製剤に問題があった場合に原因等の調査・調査を可能にすることを目的とする。

2 対象

- 2.1 主に造血幹細胞移植に関連して院内で実施される下記の細胞採取・処理・凍結保管を本ガイドラインの対象とする。
 - 2.1.1 同種および自家末梢血幹細胞移植における凍結保存と解凍
 - 2.1.2 同種および自家骨髓移植における移植片骨髄の赤血球除去、血漿除去および単核球の分離、凍結保存と解凍
 - 2.1.3 造血幹細胞移植に関連したドナーリンパ球輸注 (donor lymphocyte infusion; DLI)のためのリンパ球の採取・凍結保存と解凍
 - 2.1.4 臍帯血移植における細胞保存と解凍

2.2 除外基準

- 2.2.1 本ガイドラインは臨床研究として行われる細胞療法や再生治療に関する細胞処理は対象としない。

2.3 対象とする施設

- 2.3.1 項目「2.1」の処理を院内で実施する全ての病院を本ガイドラインの対象とする。

3 細胞の採取

- 3.1 採取施設は該当する法律や規定に従う必要がある。
 - 3.1.1 非血縁者骨髓採取の適否、責任体制および採取方法については「付ナ

一通格性判定基準」(骨髄移植推進財団第5版 2007年4月1日)および「骨髄採取マニュアル」(骨髄移植推進財団第3版 2004年12月1日)を遵守する。血縁者間ドナーからの採取の適応、責任体制および採取方法に関しても、これに準ずることが望ましい。

3.1.2 末梢血幹細胞採取の適応、責任体制および採取方法については「末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン」(改訂第3版 2003年4月21日)を遵守する。

3.1.3 非血縁者ドナーの DLI のためのリンパ球採取の適応、責任体制および採取方法については「ドナーリンパ球輸注(DLI)コーディネーターマニュアル」(骨髄移植推進財団第2版 2003年11月1日)を遵守する。血縁者ドナーの DLI の場合も、これに準ずることが望ましい。

3.2 血縁者ドナーからの採取の場合には必ず採取前に「血縁造血幹細胞ドナー(骨髄/末梢血)団体傷害保険」の説明を行うこと。

4 責任者と作業員

4.1 総括責任者

4.1.1 総括責任者を置くこと。総括責任者は医師とし、製造された血液細胞製剤を用いて輸血・細胞療法が行われる診療科長・部長等が該当する。

4.1.2 総括責任者はこれらの基準が適切に整備・運用されるよう努めること。

4.1.3 総括責任者は別が望ましいが、以下の責任者と兼任可能とする。

4.2 細胞採取責任者

4.2.1 細胞採取責任者は細胞採取に習熟した医師であること。

4.2.2 細胞採取責任者は血液細胞が適切な技術のもとに採取され、適切に管理されるよう努めること。

4.2.3 細胞採取責任者は適宜作業員の教育を行うこと。

4.3 細胞処理責任者

4.3.1 細胞処理責任者は細胞処理に習熟した医師であること。なお、細胞処理責任者は品質管理責任者と異なることが望ましい。

4.3.2 細胞処理責任者は血液細胞が適切な技術のもとに処理され、適切に管理されるよう努めること。

4.3.3 細胞処理責任者は適宜作業員の教育を行うこと。

4.4 品質管理責任者

4.4.1 輸血・細胞処理部門には品質管理責任者を置くこと。なお、品質管理責任者は細胞処理責任者と異なることが望ましい。

4.4.2 品質管理責任者は、これらの基準が適切に当該施設において整備・運用および改定・承認されるよう、体制を整え維持すること。

4.4.3 品質管理責任者は適宜作業員の教育を行うこと。

4.5 他の作業員

4.5.1 作業員は予め細胞プロセッシングに係る十分な教育訓練を受け、全ての工程に習熟していること。

5 設備・機器

5.1 閉鎖系で細胞プロセッシングを行う場合には、専用の機器(血液成分採血装置等)を用いること。

5.2 開放系で細胞プロセッシングを行う場合には、(バイオ)クリーンベンチまたは安全キャビネットを完備する。専用の部屋や場所を確保することが望ましい。

5.3 細胞プロセッシングに関わる設備と機器に関しては、定期的に整備・保守点検を行うこと。

5.4 細胞プロセッシングに関わる機器の定期的整備・保守点検および修理の記録を保管すること。保存機器に関しては「8 保存と解凍」の項を参照する。

6 細胞処理(プロセッシング)

6.1 概要

6.1.1 この基準は輸血・細胞処理部門において行われる細胞処理・保存および提供のあらゆる工程に適用される。

6.2 環境

6.2.1 必要な処理を行うのに十分な広さを有し、機器や物品が機能的に配置されていることが望ましい。

6.2.1.1 細胞プロセッシングを行う場所は、十分な照明、換気、給排水が整備され、清潔な環境であることが望ましい。

6.2.1.2 複製の患者の細胞・検体を同じ場所で同時に扱わないこと。

6.2.1.3 部外者の立ち入りが制限されていること。

6.2.1.4 血液細胞製剤を取り扱う場合は、専用の場所を決めることが望ましい。

6.2.2 処理を行うための機器を備えていること。

6.2.2.1 機器に関しては「5 設備・機器」の項を参照すること。

6.2.3 取り換えや汚染・交差汚染を防ぐために、品質検査中および出荷前の血液細胞製剤を保管する場所を設置し、管理することが望ましい。

(※交差汚染とは、製造施設において、原料または製品が他の異種原料または製品によって汚染されること。)

6.2.4 安全管理

6.2.4.1 輸血・細胞処理部門においては、作業員、患者、ドナー、訪問

者の健康と安全への危険性を最小限にするよう配慮すること。

6.2.5 伝染性微生物、有毒な化学薬品、放射線性危険物に作業員が暴露した場合の対応方法を各施設の安全マニュアル内に整備すること。

6.2.6 医薬院薬物は、該当する法律および施設の規定に従って、人や環境に危害が及ばないように適切に処理すること。

6.2.7 作業環境を清潔・衛生的かつ整然と維持・管理すること。

6.2.8 作業中は手袋、ヘアークャップ、マスクおよび専用衣を着用すること。なお、専用衣で作業場外に出るはならない。

6.3 細胞処理の目的と方法

6.3.1 輸血・細胞処理部門は、各作業に対する標準作業手順書(SOP)を整備すること。各 SOPには次に掲げる項目を含むことが望ましい。

- ①目的、②機器と消耗品、③各作業工程(必要に応じて図表で示す)、④指示書、工程記録など

6.3.2 細胞処理担当者には最新の SOPを所持し、作業時はいつでも参照できるようにすること。

6.3.3 新規の手順、ならびに手順が改定された場合には、細胞処理責任者は実行前に内容を確認・審査すること。

6.3.4 特定生物由来製品を使用した場合、裏書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年間保存すること。また、電子媒体に保存する場合には、定期的にデータのバックアップを取ること。

6.4 工程管理

6.4.1 患者担当医からの申込書や指示書等があること。

6.4.2 血液細胞製剤の払い出しまでの間に以下の情報を得ること。

- ① ドナーの適合性、②患者担当医の連絡先等
- 6.4.3 可能な限り生細胞率と回収率を評価することが望ましい。
- 6.4.4 工程手順が新規または改定された場合は、可能なかぎり実施前に輸血・細胞処理部門内でアストランを行い検証することが望ましい。
- 6.4.5 SOPは、重要項目および検査が明確にされていること。
- 6.4.6 出庫に際しての適合基準を各施設で定めておくこと。
- 6.4.7 処理は無菌的に行い、血液細胞製剤の交叉汚染を権力防止すること。
 - 6.4.7.1開放系での処理には(バイオ)クリーンベンチまたは安全キャビネット内等清浄を確保できる場所で実施すること。
- 6.4.8 細胞処理後の検体については細菌・真菌検査(たとえば血液培養と同じ方法)を行うことが望ましい。
 - 6.4.8.1菌検査が陽性であった場合には、その旨を当該部門責任者および担当医等に速やかに連絡し、対処法を検討すること。
 - 6.4.8.2対処法は事前に取り決めておくことが望ましい。
- 6.4.9 作業工程記録書を作成すること。
 - 6.4.9.1細胞処理工程ごとに、作業者が行うべき内容を明記し、記載することが望ましい。
 - 6.4.9.2重要な試薬、消耗品のロット番号、使用期限、製造メーカーや重要な機器(例えば細胞分離装置)の種類などを記載すること。
- 6.4.10 細胞処理責任者は、細胞処理ごとに工程記録を審査すること。血液細胞製剤を払い出す前に行うのが原則であるが、やむをえない場合は担当医が払い出す時に審査したものをすみやかに再確認すること。
 - 6.4.10.1 担当医および当該部門責任者は、最終産物が適合していない場合には速やかに連絡をとり、対処法について検討すること。
 - 6.4.10.2 作業工程において特記すべきことがあればその旨を工程記録に記載すること。
- 6.4.11 検査には次項を含むことが望ましい。

- 検体は凍害にドナーまたは患者と連結可能であること(取り違い防止)。
 - 6.4.11.1 血液細胞製剤の評価のために必要な検査
 - ① 全ての血液細胞製剤に関して、総有核細胞数と生細胞率(凍結した場合)
 - ② 末梢血幹細胞製剤の場合にはCD34陽性細胞数
 - ③ 細菌・真菌検査
 - 6.4.11.2 細胞処理前後の細胞集団が異なる場合には細胞集団を立証可能な検査
 - 6.4.11.3 検査方法や機器の信頼性、精度、実行性を監視するための検査(校正、保守・点検)
- 6.5 ラベル
- 6.5.1 ラベルは、血液細胞製剤または作業工程ごとに取り違いないように使用する。
 - 6.5.2 細胞材料または製剤の受入時に、ラベルや名前等が間違っていないか2人以上で照合すること。
 - 6.5.3 細胞処理途中のバッグや資料、検査検体にも識別できるラベルを貼付または記載すること。
 - 6.5.4 出庫する血液細胞製剤のラベルや名前等に誤りがないか2人以上で照合すること。
 - 6.5.5 ラベルには以下の内容は記載すること。
 - ①識別番号、②産物名(製剤名)、③(必要に応じて)患者名、④(必要に応じて)ドナー名、⑤採取日時
 - 6.5.6 細胞処理後の本体に付随した参照検体にも項目「6.6.5」と同様の識別ラベルを貼付または記載すること。

7 払い出し

7.1 血液細胞製剤の払い出しの基準

7.1.1 原則として払い出し前に血液細胞製剤の工程記録が細胞処理責任者によって審査され、適合しない場合には必要に応じて担当医も含めて対処を検討すること。

7.2 払い出しに際しては2名以上で製剤の外観、ラベルや名前等を目視確認すること。

7.3 払い出しの記録

7.3.1 血液細胞製剤が払い出される時には工程記録に以下の事項を記載しておくことが望ましい。

- ①払い出し日時、②(必要に応じて、表向き印などを含めた)適合票、③(必要に応じて)血液細胞製剤を受け取った人の名前(署名)

7.4 病棟への直接搬送

7.4.1 細胞処理が必要なく、直接病棟へ血液細胞製剤を搬送する場合には、上記のラベル、記録に関して該当部分参照すること。

8 保存と搬入

8.1 保存場所

8.1.1 血液細胞製剤を保存する場合には、取塵い防止、汚染防止、部外者による無断持ち出し防止のために、必要に応じて施錠するなどして、保存する場所を管理すること。

8.1.2 交差汚染を最小限にする手段が講じられていること。

8.1.3 輸血・細胞処理部門には部外者の立ち入りは制限されていること。

8.2 保存期間

8.2.1 血液細胞製剤ごとに保管する期間を定めること。

8.2.2 必要に応じて新鮮製剤および凍結解凍後の使用期限を定めること。

8.3 温度

8.3.1 必要に応じて各製剤に適した保存温度(範囲)をSOPに定めること。

8.4 モニタリング

8.4.1 血液細胞製剤の保存のための冷蔵庫や冷凍庫は、少なくとも4時間毎に温度を継続的にモニターし記録するシステムを備えていることが望ましい。

8.4.2 完全に液体室内に浸された血液細胞製剤には、継続的な温度モニターは不要である。

8.4.3 血液細胞製剤が特定の温度範囲内に確保できるように、液体室内タンクの液体室内の量を継続的に監視するシステムがあること。

8.5 警報装置

8.5.1 保存庫には継続的な警報システムが設置されていることが望ましい。

8.5.2 警報システムは警告音または効果的な連絡方法を備えていること。

8.5.3 現場周囲に作業員がいなくても、24時間体制で代行者が対応できる体制であること。

8.5.4 警報の設定は十分な安全域をもって設定すること。

8.5.5 万一保管容器が故障した場合に、血液細胞製剤が安全な温度に保てるような方法を講ずること。

8.5.6 警報装置は定期的に保守すること。

8.5.7 代替え容器を備えておくことが望ましい。

案 Ver.1

- 8.6 払い出しと搬送
- 8.6.1 細胞処理が終了した生細胞または凍結細胞は、輸血・細胞処理部門から、速やかに搬送すること。
- 8.7 解凍
- 8.7.1 血液細胞の解凍は、37℃急速解凍を原則とする。必要に応じて洗浄を行うこと。
- 8.7.2 解凍のための SOP、工程記録を定めること。
- 8.7.3 必要に応じて解凍サンプルの検査を行うこと。
- 8.7.4 検査結果を患者担当医に報告すること。

9 検体保存

- 9.1 処理の終わった細胞の一部を検体として保存することが望ましい。
- 9.2 検体には専用のラベルを貼付すること。
- 9.3 保存した検体は専用の台帳で管理すること。

10 投与

- 10.1 輸血・細胞処理部門から搬送された血液細胞製剤は、原則として担当医が速やかに患者に投与すること。
- 10.2 患者への投与前に、患者担当医および看護師は、病棟あるいはベッドサイドで、輸血製剤に準じた方法で指示書と以下の点について照合確認を行うこと。
- ①患者氏名、②ドナー氏名、③ID、④製剤名、⑤採取日、⑥容量など

・ 13 ・

案 Ver.1

- 10.3 製剤投与によると思われる副作用が出現した場合には、担当医および当該部門責任者に連絡すること。

11 廃棄

- 11.1 処理した細胞を廃棄する場合の基準を定めること。
- 11.2 細胞処理を行う前に、予め細胞の廃棄承諾書を患者から得ること。

12 細則

12.1 見直し

- 12.1.1 このガイドラインは、細胞療法は、細胞療法は、細胞療法の進歩や医学的、社会的情勢の変化等を勘案して、必要に応じて、又は施行後5年を目途として、検討を加えた上で見直しを行うものとする。

12.2 施行期日

- 12.2.1 このガイドラインは平成22年 X 月 X 日より施行する。

参考資料

1. FACT-JACIE International Standards for Cellular Therapy Product Collection, Processing and Administration, 3rd Edition.
2. 東京都健康安全研究センター資料
3. 平成18年度再生医療 開発 WG 報告書
4. 脐帯血品質管理基準書、平成19年5月12日改訂
5. 脐帯血移植の実施のための技術指針、平成17年3月24日改訂
6. 血液法に基づく採血業務についての資料、日本赤十字血液センター

・ 14 ・