

1 目的

本基準は、細胞の性状を変えずに医療施設内で加工・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遡及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 同種および自家骨髄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わ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 非血縁者骨髄採取の適応、責任体制および採取方法については「ドナー適格性判定基準」(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)コーディネートマニュアル」(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 複数の患者の細胞・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 取り違いや汚染・交差汚染を防ぐために、品質検査中および出庫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、作業中、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、有害な化学薬品、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 医療廃棄物は、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てはならない。

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には次項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、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 ドナーの適格性、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・細胞処理部門内でテ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、血液細胞製剤の交差汚染を極力防止すること。

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を実施すること。

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、記録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うけ、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。

検体は確実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のないように運用すること。

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いないか 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法を検討すること。

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、実施者印などを含めた)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を参照すること。

8 保存と解凍

8.1 保存場所

8.1.1 血液細胞製剤を保存する場合には、取違い防止、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 完全に液体窒素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実にあるように、液体窒素タンクの液体窒素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。

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すること。

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

- 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 雑則

12.1 見直し

- 12.1.1 このガイドラインは、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、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 21 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. 臍帯血品質管理基準書、平成 19 年 5 月 12 日改訂
5. 臍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

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。まだ十分に整備されていない施設では、これらを出ウ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	49
1.1. クリーンベンチ/安全キャビネットの使用・管理手順.....	49
1.2. 細胞総数と生細胞数の算定	50
1.3. CD34 陽性細胞数測定法	51
1.4. コロニー形成細胞測定法(コロニーアッセイ検査)	54
2. 末梢血幹細胞の処理・凍結保存手順	55
3. 骨髓液からの赤血球除去手順	61
4. 骨髓液からの上清除去手順	70
5. 凍結細胞の解凍・輸注の手順	73
6. 細胞処理に用いる試薬など	77

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へ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。ディスポーザ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、末梢血およびアフェレーシス産物中の 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。

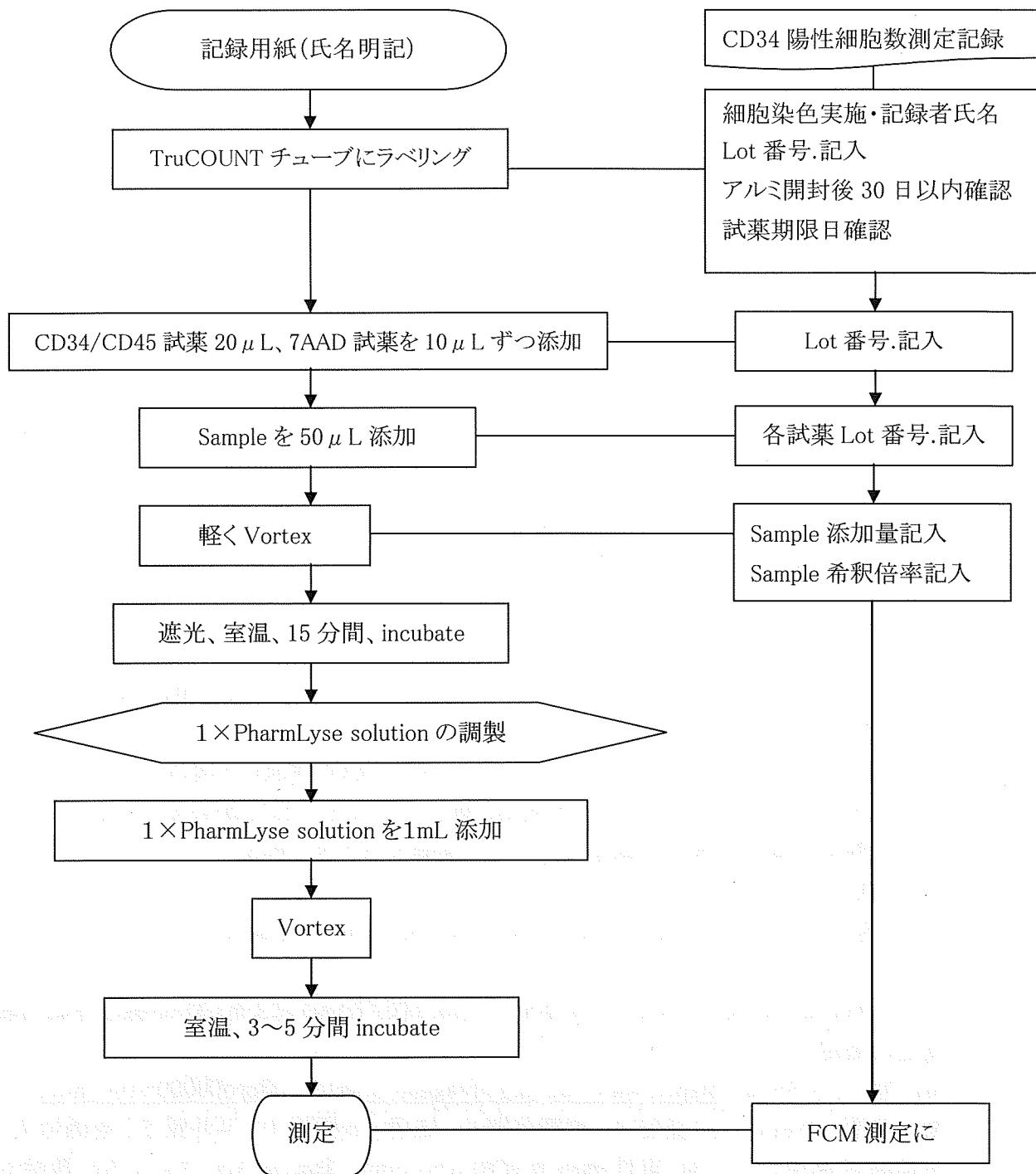
これらの解析は適切な教育訓練を受けた者が実施するべきである。

<参考文献>

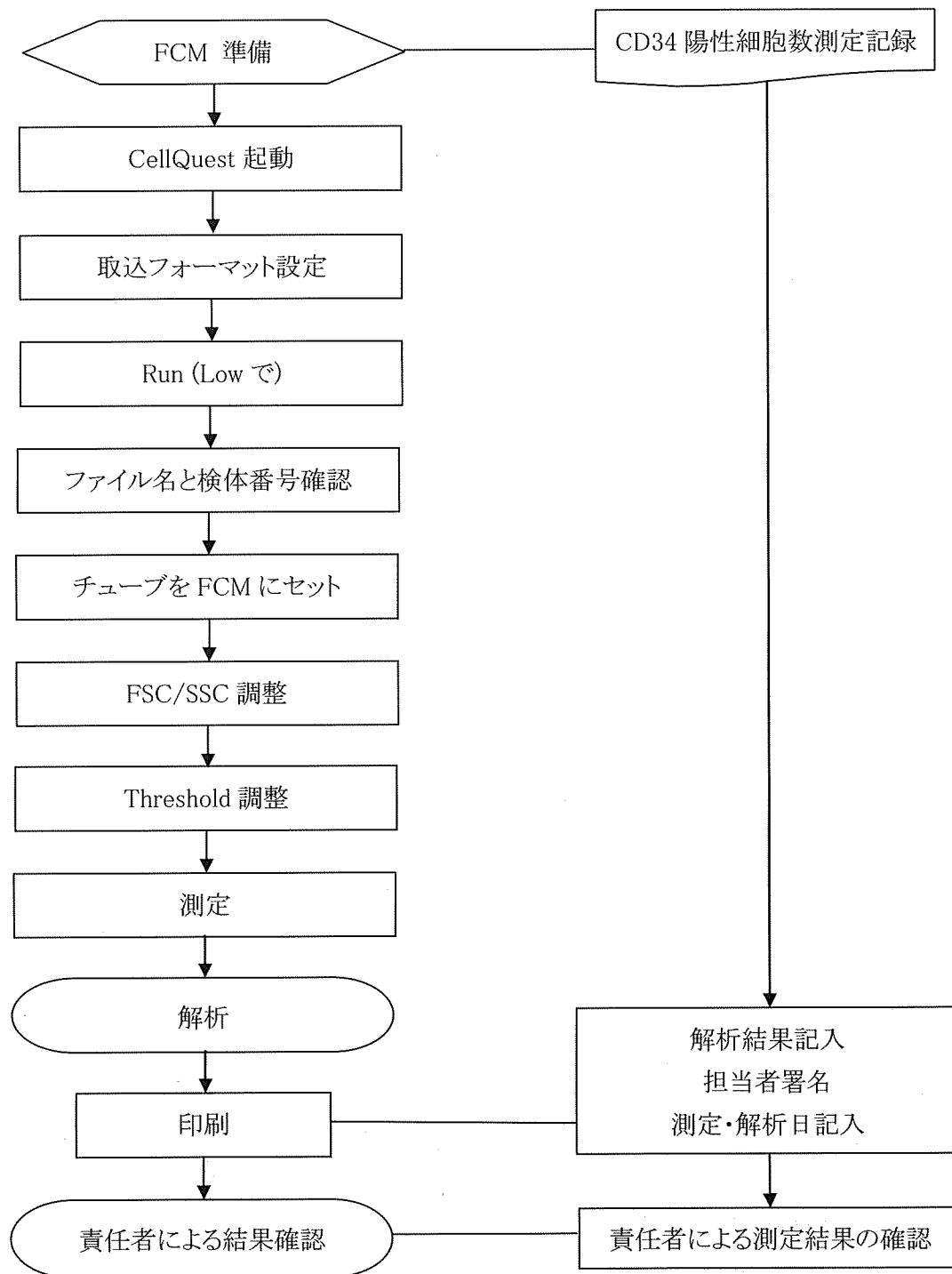
1. BEST STUDY#19-INTERLABORATORY EXCISE Final Protocol for Comments; May 2002
2. BD Technical Protocol Vol.4 「CD34PE/CD45FITC/7AAD による CD34 陽性造血前駆細胞の測定」
3. BD のホームページ <http://www.bdj.co.jp/reagent/articles/1f3pro00000rstm7.html>
4. 塩谷美夏、長村(井上)登紀子、須郷美智子、崔硯、高橋敦子、平井雅子、高橋恒夫、凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法-Procount 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 $2-4 \times 10^7/\text{ml}$ となるように調整する必要があった。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 $3 \times 10^8/\text{ml}$ 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