

## 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)

—骨髄、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した。

本製品「CP-1」は、骨髄、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<sup>1)</sup>)。

## 【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(腸食性)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、鱗片状剝離が起こったり、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分間以上滅菌した後、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 $2 \sim 10 \times 10^6$ /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<sup>2)</sup>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

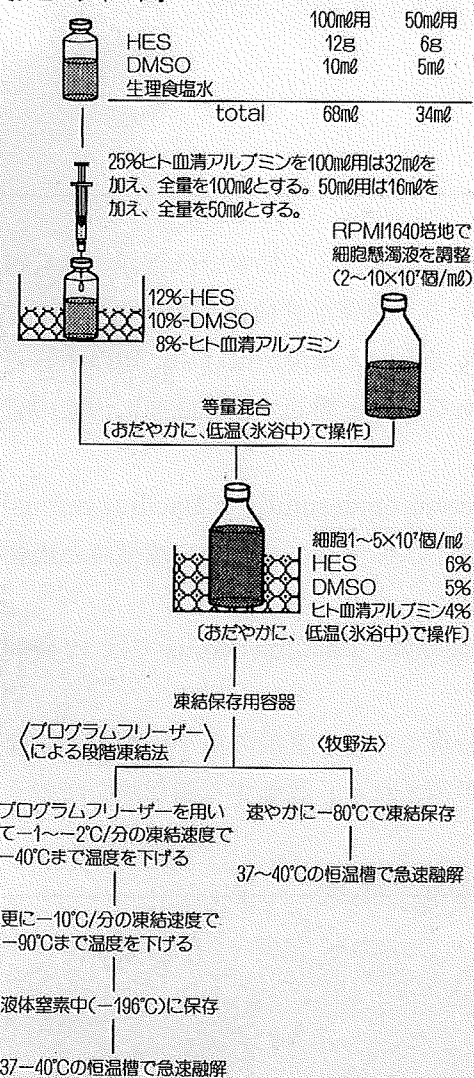
〈牧野法〉

- 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、 $-80^{\circ}\text{C}$ 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<sup>3)</sup>があります)。冷却速度は $-2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 程度が目安です。
6. 使用時は $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ の恒温槽で急速融解してご使用して下さい( $2\sim 3$ 分程度で凍解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くることがあります。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No27200)  
68mℓ×6本
- ・50mℓ用 (製品コードNo27202)  
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：VOL151、No.1、1989、10、7。
- 2) S. Makino, of peripheral blood stem cells at  $-80^{\circ}\text{C}$  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、平岡諒、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：VOL176、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：簡便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. Takaue, 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)

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業  
院内血液製剤の適正な製造体制・順守基準に関する研究 (H20-医薬-一般-006)  
分担研究報告書

近赤外分光法を用いた血小板細菌汚染の非侵襲的検出

主任研究者	大戸 斉	福島県立医科大学 輸血・移植免疫部 教授	
研究協力者	江月将史	同	博士研究員
	川畑絹代	同	主任医療技師
	河野澄夫	(独)農業・食品産業総合研究機構	ユニット長
	サラウオング シンナパー	同	研究員

研究要旨

【背景】血小板輸血には常に細菌汚染の可能性が付きまとう。日本では世界で最も短く、採血後 4 日以内での輸血可能基準と設定されている。細菌培養検査が欧州や米国など広く普及しているが、それでも検出感度以下のレベルでの混入細菌が保存中に増殖する可能性のため、完全に細菌汚染を防ぐことは不可能である。非侵襲的で輸血直前に汚染の有無を調べる検査法が切望されている。

【研究方法】血小板製剤に 2 種の菌種(*Staphylococcus epidermidis* と *Bacillus cereus*)を接種して菌の増加と生化学的的正常の変化、近赤外線二次微分スペクトルの接種時と接種後の差スペクトルを評価した。

【結果】*Staphylococcus epidermidis* では 60 時間以降、*Bacillus cereus* では 42 時間以降では正確に検出可能であった。

【結語】サンプリングを必要としない近赤外線分析で、輸血直前の血小板製剤を細菌の汚染があるか評価しうる技術として発展することが望まれる。評価する菌種数を増やすなどして、改善が必要である。

## A. 研究目的

血小板輸血には極めて稀ではあるが、常に細菌汚染の危険性が付きまとう。日本での輸血基準は世界で最も短く、採血後4日以内と設定されている。細菌培養検査が欧州や米国など広く普及しているが、それでも検出感度以下のレベルでの混入細菌が保存中に増殖する可能性のため、完全に細菌汚染を防ぐことは不可能である。非侵襲的で輸血直前に汚染の有無を調べる検査法が切望されている。

## B. 研究方法

### 1. 細菌種

評価細菌は細菌が増殖しても凝集塊・凝固物が析出されず、外観検査での異常が検出されにくい、*Staphyrococcus epidermidis*と*Bacillus cereus*の2菌種を用いた。

### 2. 近赤外スペクトルの測定および解析法

近赤外スペクトルの測定には FQA-NIR Gun (静岡シブヤ精機) を使用した。解析は The Unscrambler (Camo 社) を用いて PLS (Partial least squares) 回帰分析を実施した。

### 3. 評価方法

ABO 同型の血小板製剤3バッグを一旦プールし、3バッグに再分割し、それぞれ *S. epidermidis* 接種群、*B. cereus* 接種群、細菌を接種しないコントロール群とした。細菌の接種濃度は1~10 CFU/mLになるよう調整した。

評価項目は 1) 血小板製剤内の細菌数カウント(接種時, 72 時間後)、2) 細菌の代謝による成分変化(グルコース, 乳酸, pH)(接種前, 72 時間後)、3) 近赤外スペク

トル測定(接種時から72 時間後まで6 時間毎)とした。

## C. 結果

1. 生菌数カウント: 両菌種とも72 時間後には $10^6$ CFU/mL以上に増加した。

2. 細菌の代謝による成分変化: グルコースはコントロールでは282mg/dLから72 時間後227mg/dL までの減少であったが *S. epidermidis* 接種群では105mg/dL、*B. cereus* 接種群では11mg/dL へと著しく減少した。乳酸はコントロールでは115mg/dL から72 時間後170mg/dL に増加したが、両細菌接種群では200mg/dL 以上に著しく上昇した。pH は両細菌接種群では72 時間後には6.2 以下まで低下した(Table 1)。

3. 近赤外スペクトル測定: 個体差をなくすために、各ポイントで得られたスペクトルの2次微分スペクトルから接種時スペクトルの2次微分スペクトルを引き「差スペクトル」とした。「差スペクトル」を用いて PLS 回帰分析を実施した。コントロールの基準値を0、細菌を接種した製剤の基準値を1とし、full-cross validation により検量線と各製剤の推定感染度を求めた。*B. cereus* は細菌接種後42 時間以降の測定で細菌汚染の擬陽性、擬陰性とも0%となった。*S. Epidermidis* では細菌接種後60 時間以降の測定では擬陽性、擬陰性とも0%となった(Table 2)。

## D. 結語

*S. epidermidis* と *B. cereus* による血小板製剤の細菌汚染の検出が可能であった。サンプリングを必要としない近赤外分光法を用いて細菌混入した血小板製剤を検出する可能性が示された。しかし、感度は必ずしも、

十分とは言えず、今後、菌種を増やしての  
検討、検出感度を上げるための解析方法の  
改良が必要である。

E. 健康被害

なし。

F. 研究発表

学会発表

1. Kawabata K, Ezuki S, Saranwong S,  
Kawano S, Ohto H. A non-invasive  
near infrared system for detecting  
bacterially contaminated platelet  
components. Vox Sanguinis, 2009;  
97(Abstract Presentations from the ISBT  
XXth Regional Congress Asia)

Table 1

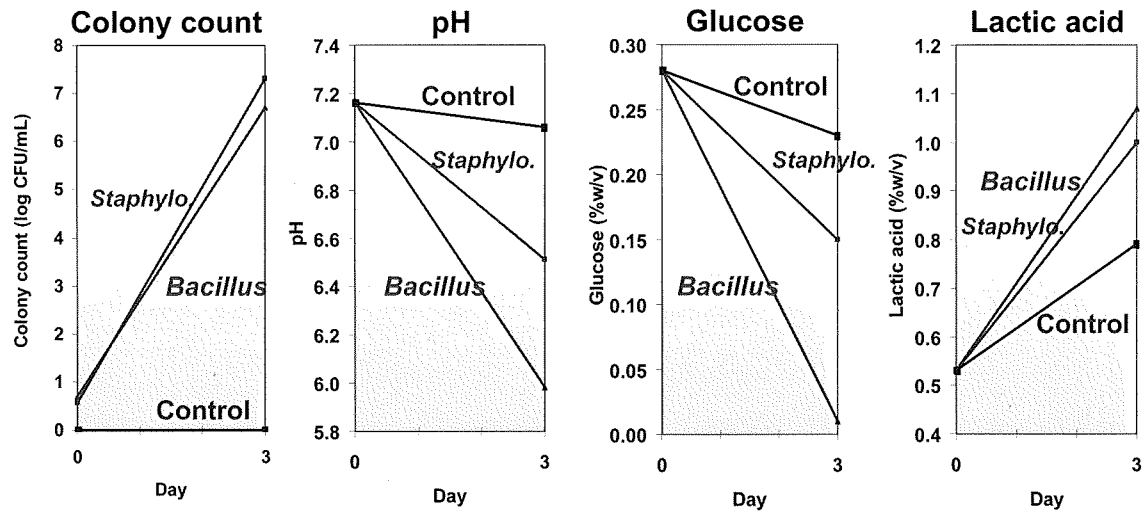
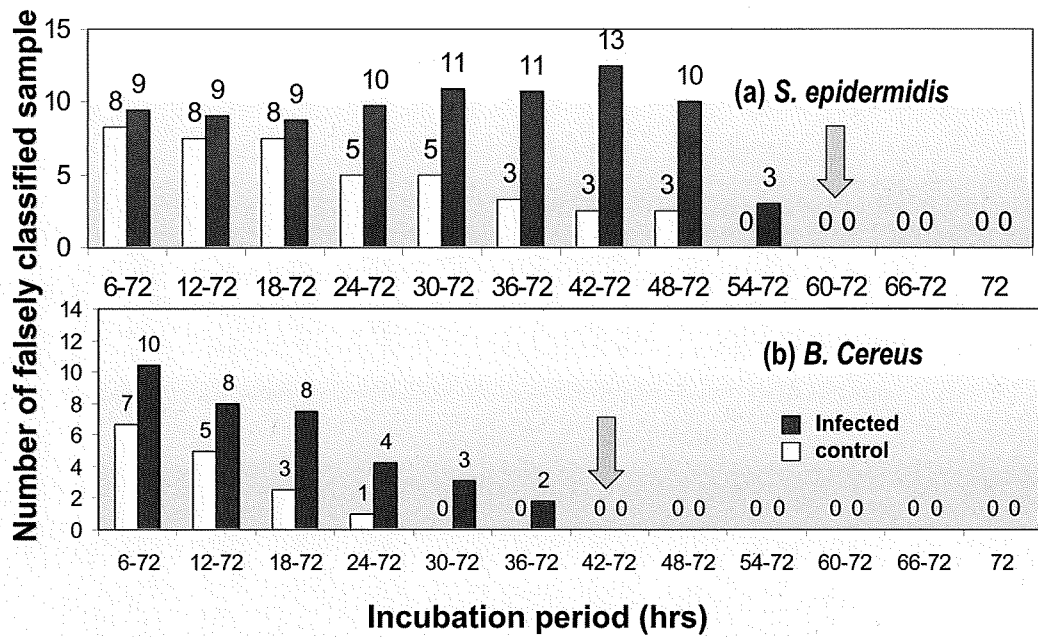


Table 2



平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

院内血液製剤の適正な製造体制・順守基準に関する研究 (H20-医薬-一般-006)  
分担研究報告書

血小板製剤のフィルター使用によるマイクロパーティクル形成への影響

主任研究者 大戸 斉 (福島県立医科大学 輸血・移植免疫部 教授)  
研究協力者 NOLLET Kenneth (福島県立医科大学 輸血・移植免疫部 特任教授)  
斎藤俊一 (福島県立医科大学 輸血・移植免疫部 医療技師)

研究要旨

【目的】 フィルターを用いて白血球除去を施すことにより、全血と濃厚赤血球製剤中の血小板由来マイクロパーティクル (PDMP) 形成は抑制される ( $<100/\mu\text{L}$ )。PDMP は血栓形成に関与し、心筋梗塞や肺梗塞などの疾病の引き金や悪化因子として働く。フィルター処理を施さない赤血球製剤中には大量の PDMP (3,000-7,000/ $\mu\text{L}$ ) が保存中に形成される。血小板製剤は室温で振蕩保存されるが、血小板製剤中の PDMP の動態やフィルターの影響など全く解明されていない。

【方法】 アフェレーシスにて採取した血小板 2 本をプールして、4 検討系 (Control、Filter1、Filter2、Filter3) にて 3 社 (旭化成メディカル、テルモ、Pall) のフィルターを比較検討した。PDMP は Flow cytometry にて測定した。

【結果】 3 社のフィルターはフィルターを使用しない対照と比較しても、また 3 社間でも PDMP 数 ( $<100/\mu\text{L}$ ) に差が見られなかった。また、保存に伴って増加することもなかった ( $<100/\mu\text{L}$ )。白血球由来マイクロパーティクル (LDMP) も同様に白血球除去フィルターの影響を受けることなく、経時的変化も認められなかった。

【考察】 現行の血小板製剤は保存に伴い、PDMP が増加することもなく、また 3 社のフィルターを用いる限りは、PDMP に関する副次影響は考慮する必要性はないものと評価する。



#### A. 目的

輸血血液中に存在するドナー白血球や血小板に由来する副反応を予防するために、白血球除去フィルターが広く使用され、日本では貯留前 Universal 白血球除去が標準輸血となっている。理論上は、保存中に蓄積される各種ケモカインなどが軽度にとどまり、その結果、発熱副作用反応などが減少する。

しかし、白血球除去フィルターには歴史的に赤眼症候群、背部痛や低血圧などが報告されている<sup>1-4</sup>。加えて、マイクロパーティクルの形成によって血栓症や免疫修飾を引き起こす可能性も指摘されている<sup>5-7</sup>。われわれは血小板製剤中の血小板由来マイクロパーティクル (PDMP) の経時的変化とフィルターによる形成抑制/形成促進を評価した。

#### B. 方法

健康成人からアフェレーシス (Amicus) によってそれぞれ 20 単位分 ( $40 \times 10^{10}$ ) を採取し、ABO 同型 2 人分をプールし、均等に 10 単位 ( $20 \times 10^{10}$ ) に相当するように 4 分割した。

無処置対照群と 3 社 (旭化成メディカル、Terumo、Pall) の血小板製剤用白血球除去フィルターで処置した 3 評価群を置いた。

PDMP は小関と野村の方法<sup>8</sup>に従い、Flow Cytometry にて Day1 (当日)、Day5、Day8 に測定した。

#### C. 結果

表 1-1 に示すように、対照群と 3 社のフィルター使用群で、PDMP 数 ( $< 100 / \cdot L$ )

に大きな差異は認めなかった。経時的にも PDMP 数が蓄積されることはなかった。

表 1-2 に示すように、白血球由来マイクロパーティクル (LDMP) も同様に 3 社フィルターは対照群と同水準の LDMP ( $< 150 / \cdot L$ ) にとどまり、経時的に増加することもなかった。

#### D. 考察

今回の検討でフィルターは白血球数を確実に減少させるが、観測した 8 日目までは PDMP や LDMP を増加させることなく、経過することが判明した。血小板製剤の有効期限延長を支持する所見である。

#### E. 健康危険に関する情報

研究に関して、健康被害などはなかった。

#### F. 利益相反

利益相反に該当する件は無い。ただし、研究に使用した血小板製剤用白血球除去フィルターは製造メーカー 3 社から無償で提供を受けた。

#### G. 研究発表

学術集会と学術論文での発表を予定している。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1-1

PDMP events	Day 1 [ $\mu\text{L}$ ]	Day 5 [ $\mu\text{L}$ ]	Day 8 [ $\mu\text{L}$ ]
A 社	43	32	42
B 社	6	47	27
C 社	54	57	33
Not filtered	18	34	43

表 1-2

LDMP events	Day 1 [ $\mu\text{L}$ ]	Day 5 [ $\mu\text{L}$ ]	Day 8 [ $\mu\text{L}$ ]
A 社	147	89	107
B 社	86	140	98
C 社	106	85	88
Not filtered	89	79	72

## 参考文献

1. Alonso-Echanove J, Sippy BD, Chin AE et al. Nationwide outbreak of red eye syndrome associated with transfusion of leukocyte-reduced red blood cell units. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 27:1146-52, 2006.
2. Alvarado-Ramy F, Kuehnert MJ, Alonso-Echanove J et al. A multistate cluster of red blood cell transfusion reactions associated with use of a leucocyte reduction filter. *Transfus Med*, 16:41-8, 2006.
3. Abe H, Ikebuchi K, Shimbo M, Sekiguchi S. Hypotensive reactions with a white cell-reduction filter: activation of kallikrein-kinin cascade in a patient. *Transfusion*, 38:411-2, 1998.
4. Takahashi TA, Abe H, Hosoda M, Nakai K, Sekiguchi S. Bradykinin generation during filtration of platelet concentrates with a white cell-reduction filter. *Transfusion*, 35:967, 1995.
5. Keuren JF, Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW, Lindhout T, Curvers J. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *Br J Haematol*, 134:307-13, 2006.
6. Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, 580:5313-20, 2006.
7. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev*, 20:1-26, 2006.
8. 小関 靖, 野村昌作: 血小板由来マイクロパーティクルの測定法. 利点と問題点. *血栓止血誌*, 15 : 286-292, 2004.

