

8. Storage and thawing

8.1. Storage location

8.1.1. Storage location for blood cell products shall be administered by locking etc. to prevent mixed-up of product, contamination, unapproved carrying-out by outsiders, etc.

8.1.2. Means to minimize mutual contamination shall be taken.

8.1.3. Unauthorized entry to the facility of blood transfusion and cell processing shall be limited.

8.2. Storage period

8.2.1. Storage period for every blood cell product shall be determined.

8.2.2. Retention period for fresh and frozen-thawed products shall be determined as needed.

8.3. Temperature

8.3.1. SOP as needed.

8.4. Monitoring

8.4.1. Refrigerators and freezers for storage of blood cell products should be equipped with monitoring system that can monitor and record the temperature at least every 4 hours.

8.4.2. Continuous temperature monitoring is not required for blood cell products immersed completely in liquid nitrogen.

8.4.3. Continuous observation system to measure liquid nitrogen amount in liquid nitrogen tanks shall be equipped to insure blood cell products are stored in a specific temperature range.

8.5. Alarm systems

8.5.1. Storage tanks should be equipped with alarm system that is active continuously.

8.5.2. Alarm system shall have audible signals or other effective notification ways.

8.5.3. Alternative staff shall be able to respond for alarm conditions on a 24-hr bases even if responsible staff is not around.

8.5.4. Alarm systems should be set up with sufficient safety range.

8.5.5. Alternative ways to keep the blood cell products in a safe temperature rage in case of failure of storage containers.

8.5.6. Alarm system shall be maintained periodically.

8.5.7. Alternative storage device should be prepared.

8.6. Release and transportation

8.6.1. Cells after processing or frozen cells shall be transported promptly from blood transfusion and cell processing department.

8.7. Thawing

8.7.1. Blood cells shall be generally thawed rapidly at 37 °C as principal. Thawed cells should be washed if necessary.

8.7.2. SOP and process record for thawing shall be determined.

8.7.3. Thawed sample should be tested as needed.

8.7.4. Test result of samples should be reported to a physician in charge.

9. Sample preservation

- 9.1. A part of blood products after processing should be preserved as a sample.
- 9.2. Special labels shall be put on samples.
- 9.3. Preserved samples shall be managed in exclusive ledger.

10. Transfusion

- 10.1. Blood cell products transported from blood transfusion and cell processing department shall be transfused to patients by a physician in charge promptly as a general rule.
- 10.2. Physician in charge and nurse shall confirm the following items and cross-check the directions at ward or bedside before transfusion.
 - (1) patient name, (2) donor name, (3) ID, (4) product name, (5) collection date, (6) volume, etc.
- 10.3. Appearance of adverse effect possibly caused by infusion of products shall be reported to a physician in charge and manager of the department.

11. Wastes

- 11.1. Standard of waste of processed cells shall be determined.
- 11.2. Written consent of cell disposal shall be obtained from the patient before cell processing.

12. Miscellaneous provisions

- 12.1. Reexamination

12.1.1. This guideline shall be reexamined and revised over next 5 years after enforcement into consideration such as progress of cell therapy, change of medical and social situation etc, if necessary.

12.2. Enforcement date

12.2.1. This guideline shall be enforced on X/Y/09 (Heisei 21).

References

1. FACT-JACIE International Standards for Cellular Therapy Product Collection, Processing, and Administration. 3rd Edition, FACT, 2007.
2. References of Tokyo Health Safety Research Center
3. Report of Regenerative Medicine Developmental Working Group, 2006.
4. Standard for cord blood quality control, Revised on May 12, 2007.
5. Guidelines for practice of cord blood transplantation, Revised on March 24, 2005.
6. References on blood collection based on the Blood Law. Japanese Red Cross Blood Center.

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	104
1.1. クリーンベンチ/安全キャビネットの使用・管理手順.....	104
1.2. 細胞総数と生細胞数の算定	105
1.3. CD34 陽性細胞数測定法	106
1.4. コロニー形成細胞測定法(コロニーアッセイ検査)	109
2. 末梢血幹細胞の処理・凍結保存手順	110
3. 骨髄液からの赤血球除去手順	116
4. 骨髄液からの上清除去手順	125
5. 凍結細胞の解凍・輸注の手順	128
6. 細胞処理に用いる試薬など	132

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。

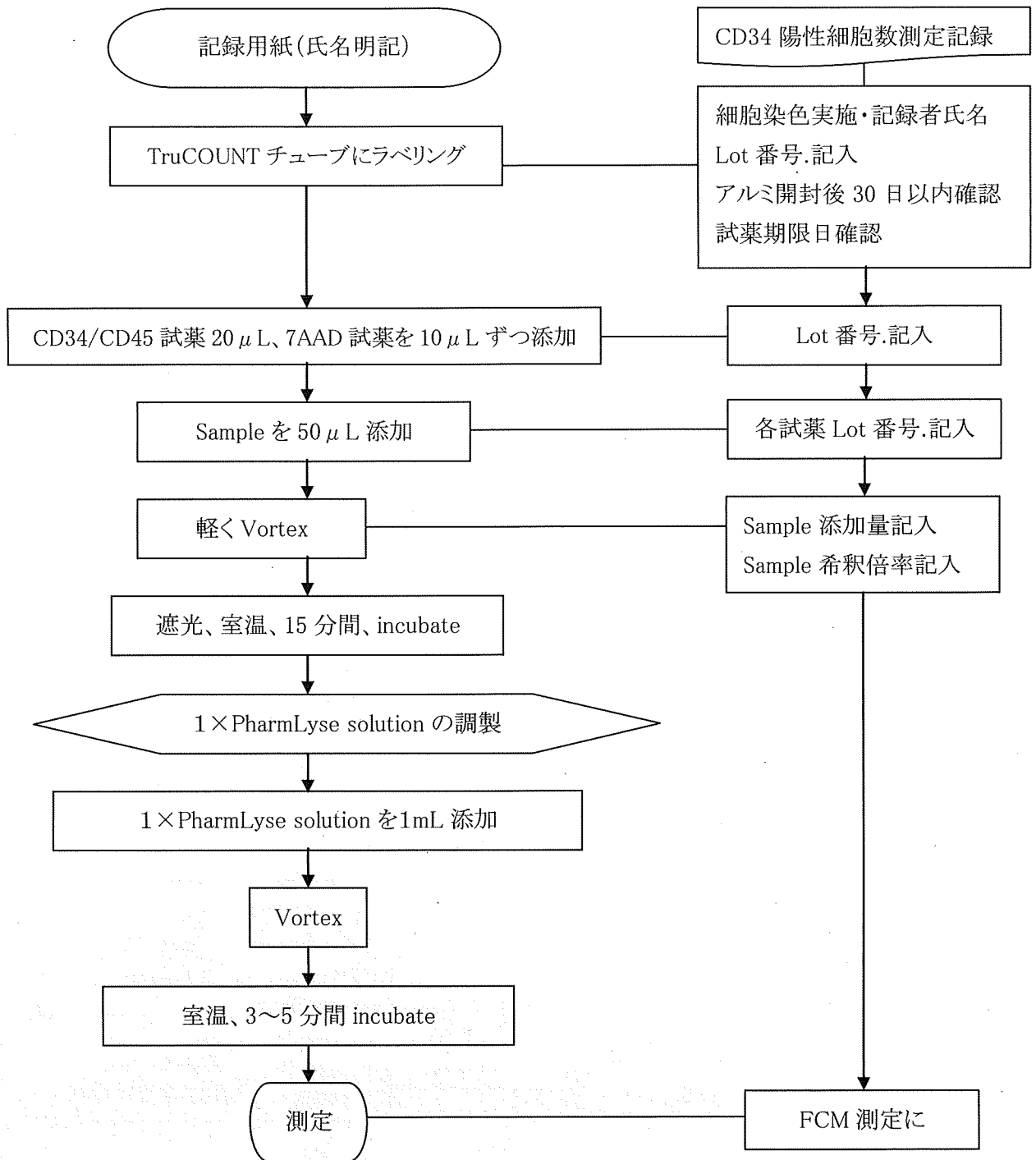
これらの解析は適切な教育訓練を受けた者が実施するべきである。

<参考文献>

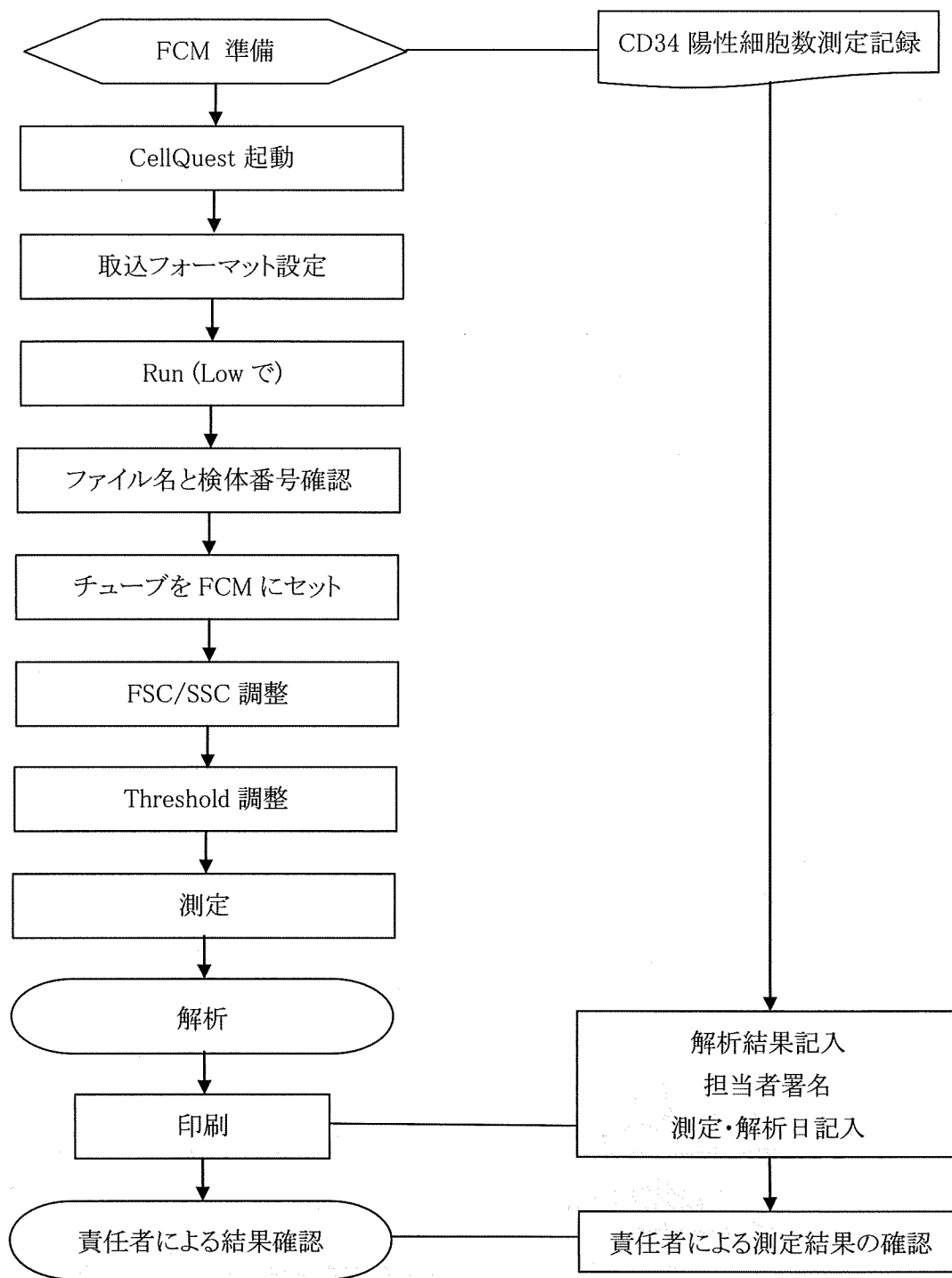
1. BEST STUDY#19-INTERLABORATORY EXCISE Final Protocol for Comments; May 2002
2. BD Technical Protocol Vol.4 「CD34PE/CD45FITC/7AAD による CD34 陽性造血前駆細胞の測定」
3. BD のホームページ <http://www.bdj.co.jp/reagent/articles/1f3pro00000rstm7.html>
4. 塩谷美夏、長村(井上)登紀子、須郷美智子、崔 硯、高橋敦子、平井雅子、高橋恒夫、凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法-Procount 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。

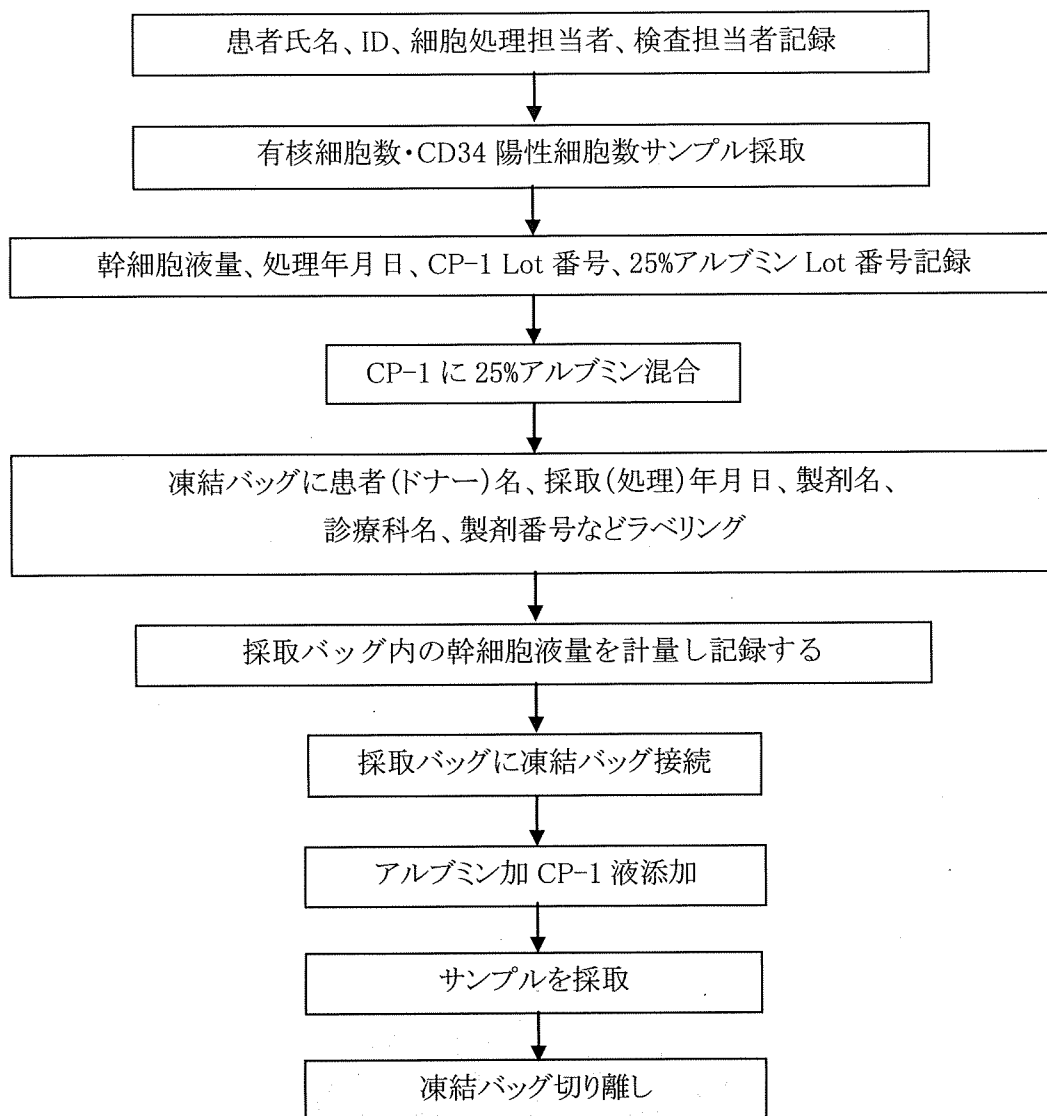
細胞が凍結される場合、細胞外の水成分が先に凍るため細胞外電解質濃度が上がり細胞外浸透圧が上昇する。このため細胞内水分が流出し、細胞が脱水状態となる。この場合細胞内氷晶形成に伴う障害を防止するものが「細胞内凍害防止薬」である。¹⁾ また、「細胞外凍害防止薬」は、細胞外氷晶形成に伴う細胞内水分の損失を防ぎ、浸透圧変化により障害を減らすことが目的である。造血幹細胞の凍結保存には従来DMSOを凍害防止薬として用いられてきた。自己血清あるいはAB血清を加えて最終濃度10%となるように調整して用いられた。凍結時には細胞濃度を単核球として $2-4 \times 10^7$ /mlとなるように調整する必要がある。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>

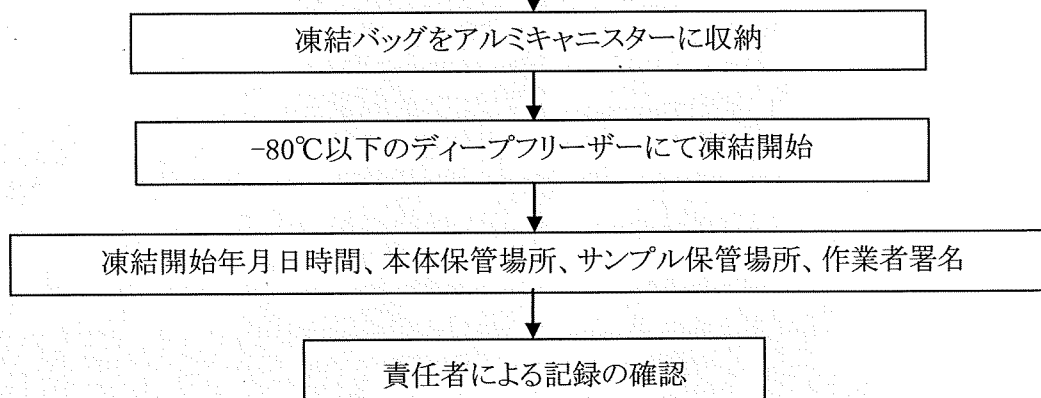
1. Low Temp. Med. 1998; 24 : 171-174
2. Rowley SD: Hematopoietic stem cell cryopreservation. A review of current techniques. J. Hematother. 1992; 1 : 233-250
3. Rowley SD, et al: Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. Blood. 1994; 83: 2731-2736
4. 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、および凍結作業員氏名を記録する。 (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容血を起こす。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)>

