

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>

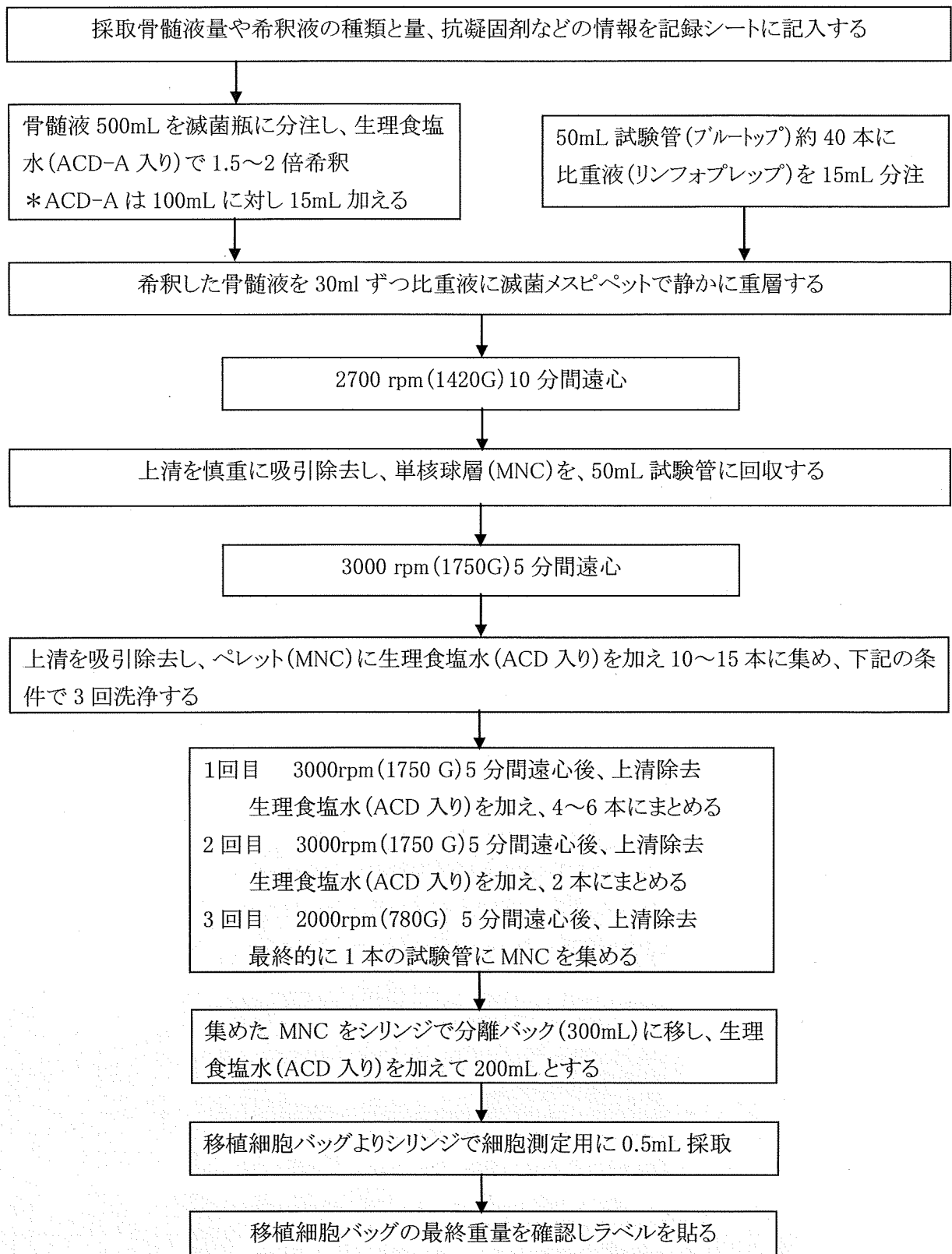
患者所属		ドナー所属	
患者氏名		ドナー氏名	
患者ID		ドナーID	
処理開始年月日時間			
処理担当者		処理責任者	

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	
	⑥ クリーンペンチ	
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	
	⑥ ACD-A 液 500mL 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	
	⑤ BMP バッグのリークテスト	
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	

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)>



骨髄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	骨髄処理	
2-1	採取骨髄液を生理食塩水(ACD 入り)で希釈	
2-2	50mL 試験管に比重液を約 15mL 分注し希釈した骨髄液を重層	

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回法によって臨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

①WBC _____ $\times 10^3$

②重量 _____ g

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

処理後骨髓液

④WBC _____ $\times 10^3$

⑤重量 _____ g

総有核細胞数 = _____ $\times 10^9 =$ ⑥ _____ $\times 10^8/\text{kg}$ (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)
- 骨髓輸注 (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)

CP-1

100mL用(製品コードNo.27200)

50mL用(製品コードNo.27202)

研究用試薬

—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、喘息様肺腫)、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。

(産薬中審便覧、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. 本能書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下さい。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²⁾〉

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2~40×10⁶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³⁾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

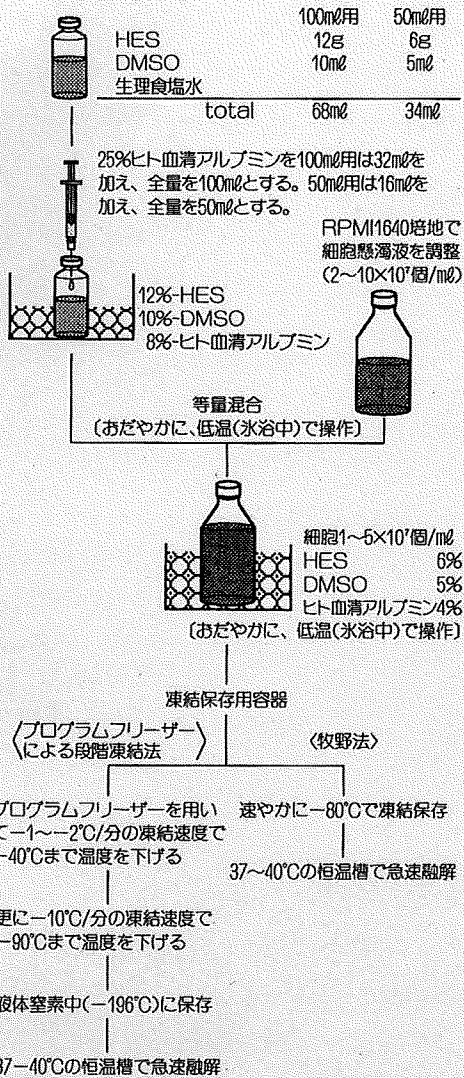
〔牧野法〕

- 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⁹⁾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)

