

慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究

～病棟管理の手順（3歳以上対象）～

1. 入院時の準備

入院病棟： 8西病棟

部屋： 易感染性患者の通常通りの入院準備を行う。

移植前処置開始から好中球が増加するまでの期間個室管理を行い、

その後は大部屋への転室可能。

空調管理： 遺伝子治療前は、陽圧換気。

遺伝子治療後、ウイルス拡散の可能性が否定されるまで（ウイルス拡散防止期間）は陰圧換気。

*ウイルス検出検査結果は担当医の指示を受ける。

2. 個室への入退室

入室時

1. ディスポマスク（以下マスク）を装着
2. 前室にて石鹸で前腕部まで手洗い
3. ペーパータオルで水分を完全に拭き取る
4. 擦式消毒液による手指消毒
5. 排泄物処理の際は、ディスポエプロン（以下エプロン）と未滅菌手袋（以下手袋）を着用
6. 入室
7. ベッドサイドで擦式消毒液による手指消毒（手に傷等がある場合は手袋を着用）

退室時

1. エプロンと手袋を脱ぎ、ビニール袋へ入れる
2. ビニール袋とマスクは、前室のオートクレーブ専用袋（ウイルス拡散防止期間のみ）または医療廃棄用段ボールへ入れる。
3. 手洗い後に退室。

注意 *手洗い後は髪や頭、眼鏡などに触れないようにする。

*入室は必要最低限で行う

3. 個室での内服

1. 必要物品を準備し、入退室手順に従って入室
2. ベッドサイド端末でバーコード認証する
3. 擦式消毒液で手指を消毒後、内服介助を行う（手に傷等がある場合は手袋を着用）。
4. 使用した注入器等体液の付着した可能性のあるものは使い捨てとする（ウイルス拡散防止期

4. 食事

- ・ 食事は、造血幹細胞移植ガイドラインに沿った基準で調理された食事をオーダーする。

5. 個室での口腔ケア

- ・ 遺伝子導入後ウイルス拡散防止期間は、歯みがきやうがいを行う際にはガーグルベースンにビニール袋をかぶせて使用。
- ・ 使用后、次亜塩素酸ナトリウムを加えてから室内トイレへ破棄する。使用したビニール袋はその都度オートクレーブ専用袋へ破棄する。

6. 個室での清拭

- ・ ウイルス拡散防止期間は、ディスポタオルを使用する。使用後は、ビニール袋に入れてオートクレーブ専用袋へ破棄する。
- ・ ウイルス拡散防止期間中、汚れた衣類はビニール袋にいれ室内に置き、ウイルス拡散防止期間終了後に家族へ渡す。ウイルス拡散防止期間中に排泄物で汚染された衣類を洗濯する時は、次亜塩素酸ナトリウムで消毒してから洗濯する。ひどく汚染し速やかに処理する必要のある衣類やリネンなどは破棄する。

7. 個室での排泄物の処理

- ・ 遺伝子治療後、拡散防止期間中は「患者排泄物の処理手順」（別紙参照）に従い排泄物の処理を行う。
- ・ 拡散防止期間後は、クリーンルームの処理手順で実施

8. 個室の環境整備

- ・ ウイルス拡散防止期間はクリーンルームと同様の手順で、必ず看護師が行う。手指衛生後、ディスポマスク、プラスチックエプロン、ディスポ手袋を装着する。専用洗剤とディスポ布巾を用いて、クリーンウォールの外面→棚→洗面所→床の順に行う。トイレは、トイレ専用の次亜塩素酸を使用し清掃する。
- ・ ウイルス拡散防止期間後は、クリーンルームの清掃手順で看護助手が実施する。

9. 個室での面会

- ・ 入退室手順に従って入退室を行う。退室の際にはマスクをはずして手を洗う。
- ・ ウイルス拡散防止期間中の面会は、両親に限定する
- ・ 面会前に咳、下痢、発疹、発熱などの感染症状があれば、面会を禁止する。
- ・ 家族は原則エプロンや手袋は不要だが、汚染されたものに触れる場合には標準予防策に従う。
- ・ 必要に応じてディスポキャップを着用する。

病棟用物品リスト

1.1 機材

- 1.1.1 ジャクソンリースセット
- 1.1.2 ジャクソンリース接続用マスク→ 麻酔用マスク
- 1.1.3 血圧計 (TERUMO, 病院用テルモ電子血圧計)
- 1.1.4 体温計 (TERUMO, 病院用テルモ電子体温計)
- 1.1.5 はさみ
- 1.1.6 コッヘル
- 1.1.7 メジャー
- 1.1.8 聴診器
- 1.1.9 オリーブガラス吸引管
- 1.1.10 吸引カップ受け (正しい名称がわかりません)
- 1.1.11 点滴台
- 1.1.12 ガーグルベースン
- 1.1.13 ベースン
- 1.1.14 シャワーボトル
- 1.1.15 ピッチャー
- 1.1.16 計り
- 1.1.17 セントラルバキュームレギュレーター「077.1111」メデラ株式会社
- 1.1.18 セントラルバキュームレギュレーター「077.1100」メデラ株式会社
- 1.1.19 採血枕
- 1.1.20 採血運搬用ケース

1.2 消耗品

- 1.2.1 フォトフォックス (ディスポ吸引びん) 2L 大研医器
- 1.2.2 フォトフォックスプレライナー2L
- 1.2.3 フォトフォックススローストッパー
- 1.2.2 スネークチューブ 30m/箱 (ニプロ NSK-1)
- 1.2.3 グリーンスネークチューブ 30m/箱 (ニプロ NSG)
- 1.2.4 クロルヘキシジングルコン酸塩製剤「ステリクロン® W液 0.02」500ml (健栄製剤株式会社)
- 1.2.5 消毒用エタノール含有浸綿 (アルコール綿)「ワンショットプラス®P」(白十字株式会社)
- 1.2.6 消毒用エタノール含ウェットティッシュ「ショードック®S」250枚入りケース付き・

独立行政法人 国立成育医療研究センター

研究課題名：慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究

版番号：第1版

作成年月日：2012年11月14日

250枚入り詰め替え(白十字株式会社)

- 1.2.7 速乾性擦式アルコール製剤「ゴージョー[®]」350ml (ゴージョージャパン株式会社)
- 1.2.8 アイスノンソフト (株式会社白元)
- 1.2.9 コールド・ホットパック (3M)
- 1.2.10 ラテックスフリーストレッチ (駆血帯)「VACUTAINER[®]」(BECTON DICKINSON)
- 1.2.11 滅菌ガーゼ「滅菌ケーパイン[®]No.7165」1枚入り (川本)
- 1.2.12 滅菌綿棒「大#104」2本入り (川本)
- 1.2.13 未滅菌手袋「シンガープラスチック手袋」Mサイズ100枚入り (宇都宮製作株式会社)
- 1.2.14 未滅菌手袋「シンガープラスチック手袋」Sサイズ100枚入り (宇都宮製作株式会社)

- 1.2.15 処置用シート「クリニカルシートW」巾50cm×30m巻 (アトム)
- 1.2.16 ディスポーザブル注射器材廃棄容器「KEEPER2」(グツツール)
- 1.2.17 次亜塩素酸ナトリウム「キッチンブリーチ」600ml 花王
- 1.2.18 NSアルファキャップ ブルーAC-11 100枚 日昭産業株式会社
- 1.2.19 清掃用の洗剤
- 1.2.20 ボールペン
- 1.2.21 ディスポマスク「スタンダード耳掛け式フェイスマスク」50枚/箱 (3M)
- 1.2.22 ディスポエプロン「ディスポーザブルプラスチックエプロンピンク」50枚/箱オカダ医科
- 1.2.23 伸縮包帯「ハートタイ41000」(オオサキメディカル株式会社)
- 1.2.24 滅菌カップ入綿球「ネオ・パール綿球[®]」EB20-3 (オオサキメディカル株式会社)
- 1.2.25 滅菌綿球「パール綿球」TS14-10 (オオサキメディカル株式会社)
- 1.2.26 エラテックス 3号・5号アルケア
- 1.2.27 「フィクソムル[®]ストレッチF」(テルモ株式会社)
- 1.2.28 スチロールカップ 日昭産業
- 1.2.29 吸引用カテーテル 口・鼻腔用 8Fr・10Fr (トップ)
- 1.2.30 ディスポ薬杯60cc FUJINAP
- 1.2.31 注入器「ジェイフィード[®]注入器」2,5ml・5ml・10ml (JMS)
- 1.2.32 ピペット アズワン
- 1.2.33 創傷用粘着ドレッシング「シルキーポアドレッシング」2号 (アルケア)
- 1.2.34 創傷用粘着ドレッシング「オプサイトIV3000 4007」(smith&nephew)
- 1.2.35 フィルムドレッシング「優肌パーミロール」14R15・14R05 (日東メディカル株式会社)
- 1.2.36 サージカルテープ「マイクロポア1インチ」(3M)
- 1.2.37 電気絶縁用塩化ビニール粘着テープ「ビニールテープ」白 (ヤマト)
- 1.2.38 電気絶縁用塩化ビニール粘着テープ「ビニールテープ」ピンク (ヤマト)

独立行政法人 国立成育医療研究センター

研究課題名：慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究

版番号：第1版

作成年月日：2012年11月14日

- 1.2.39 心電図モニター用電極「ビトロード電極 V-120SK」(日本光電工業)
- 1.2.40 心電図モニター用電極「ケンドール電極」(コヴィデエン)
- 1.2.41 ポージーラップ(フレックスプローブ用) GE 橋河メディカルシステム (MPI)
- 1.2.42 ディスポセンサー「LNOP® Inf-L・Pdt」(マシモ)
- 1.2.43 ビニール袋 30×45 100枚入ひも付き (FUJINAP)
- 1.2.44 医療廃棄物用段ボール
- 1.2.45 ガムテープ(ニチバン)
- 1.2.46 ビニール袋「エコ袋」20L・70L・90L (サンキョウプラスチック株式会社)
- 1.2.47 ビニール袋「透明ポリ袋」30L・45L (システムポリマー株式会社)
- 1.2.48 ペーパータオル「コスモクリーンタオル」200枚入 (株式会社東京紙店)
- 1.2.49 ハンドソープ「ジェントルクレンザー」500ml (ジョンソン&ジョンソン)
- 1.2.50 プラスチックボックス
- 1.2.51 尿道留置カテーテル「シリコーンフォーリーカテーテル」ユニバル型小児用
6Fr. 8Fr. 10Fr. 12Fr. 14Fr. (株式会社ユーシンメディカル)
- 1.2.52 精密尿量計「ウロガード」300ml 閉鎖式 UD-M300 (テルモ株式会社)
- 1.2.54 精密尿量計付閉鎖式採尿バッグ「ウロメーターバッグ 350」2000ml (株式会社メディ
コン)

ME 機器

- 1.3.1 パルスオキシメーター・センサーケーブル Massimo Rainbow SET パルス CO オキシ
メーターラディカル7 (マシモジャパン株式会社)
- 1.3.2 輸液ポンプ「AS700」(アトムメディカル株式会社)
- 1.3.3 シリンジポンプ「S-1235」(アトムメディカル株式会社)
- 1.3.3 酸素流量計「8MFA」(PRECISION MEDICAL)
- 1.3.4 ECG 送信機「ZB-920P 心電図・呼吸」(日本光電工業株式会社)
- 1.3.5 医用テレメータ「WEP-5208」(日本光電株式会社)

国立成育遺伝研究センター

慢性肉芽腫症における造血幹細胞を 標的とした遺伝子治療臨床研究

Standard Operating Procedures

国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部

2012/ /

最適化培地の作製

各種ストック溶液を作成 (□平成____年____月____日作成済み)

<input type="checkbox"/> ファンギゾン	50mg / 20ml dH ₂ O	…2.5mg/ml
<input type="checkbox"/> SCF(Stem cell factor)	50μg / 500μl X-VIVO15	…100ng/μl
<input type="checkbox"/> TPO(Thrombopoietin)	50μg / 500μl X-VIVO15	…100ng/μl
<input type="checkbox"/> Flt3-L	50μg / 500μl X-VIVO15	…100ng/μl
<input type="checkbox"/> rhIL-3	50μg / 500μl X-VIVO15	…100ng/μl

必要量をバッグに注入

<input type="checkbox"/> X-VIVO10	_____ml	
<input type="checkbox"/> 25%HAS	_____ml	f.c. 1%
<input type="checkbox"/> ペニシリンストレプトマイシン	_____ml	f.c. 50U/ml Pen, 50μg/ml Strep
<input type="checkbox"/> ファンギゾン	_____ml	f.c. 2.5μg / ml
<input type="checkbox"/> SCF	_____μl	f.c. 100ng / ml
<input type="checkbox"/> TPO	_____μl	f.c. 100ng / ml
<input type="checkbox"/> Flt3-L	_____μl	f.c. 100ng / ml
<input type="checkbox"/> rhIL-3	_____μl	f.c. 10ng / ml

追加作製 (平成____年____月____日)

<input type="checkbox"/> X-VIVO10	_____ml
<input type="checkbox"/> 25%HAS	_____ml
<input type="checkbox"/> ペニシリンストレプトマイシン	_____ml
<input type="checkbox"/> ファンギゾン	_____ml
<input type="checkbox"/> SCF	_____μl
<input type="checkbox"/> TPO	_____μl
<input type="checkbox"/> Flt3-L	_____μl
<input type="checkbox"/> rhIL-3	_____μl

追加作製 (平成____年____月____日)

<input type="checkbox"/> X-VIVO10	_____ml
<input type="checkbox"/> 25%HAS	_____ml
<input type="checkbox"/> ペニシリンストレプトマイシン	_____ml
<input type="checkbox"/> ファンギゾン	_____ml
<input type="checkbox"/> SCF	_____μl
<input type="checkbox"/> TPO	_____μl
<input type="checkbox"/> Flt3-L	_____μl
<input type="checkbox"/> rhIL-3	_____μl

CliniMACS による CD34 陽性細胞分離

※ミルテニー作成ワークシート参照

CD34 陽性細胞の前刺激 (prestimulation)

1. CD34 陽性細胞回収バッグをルートから分離
2. 遠心分離 SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
TIME : 15min
TEMP : 20°C(R.T)
ACCEL / DECEL : 9 / 1
使用記録記入
3. 遠心後の細胞バッグ、廃液バッグ、培地バッグ、培養バッグ(CultiLife215)を連結
4. 細胞バッグを分離スタンドに設置
5. 廃液バッグを開放し、細胞バッグの上清を廃液バッグに回収
6. 培地バッグから細胞バッグに培地を _____ ml 入れる
7. ペレットを手で優しくもみほぐす
8. 細胞を一部回収
9. cell count : _____ × 10[—] cell / ml × _____ ml
= _____ × 10[—] cell / total (cell viability: _____ %)
10. 1-5 × 10⁵ cell / ml になるように培地を追加する total. _____ ml (_____ ml 追加)
11. 空気抜きをして培養バッグを分離
12. 37°C, 5%CO₂ で 2 日間前刺激を行う

※8 で回収した細胞を保存しておく

平成____年____月____日 (Day3)

資材の確認・準備	Lot No,
RetroNectin	TaKaRa 【T100B】
CultiLife Spin	TaKaRa 【KB630】
テルフレックス分離バッグ 600ml	テルモ 【BB-T060CJ】
テルフュージョン Y 型連結管	テルモ 【TC-Y01】
操作アダプター	テルモ 【TC-MP】
注射針 23G	テルモ 【NN-2332R】
1ml シリンジ	テルモ 【SS-01T】
サフィード延長チューブ	テルモ 【SF-ET3825】
三方活栓 R 型	テルモ 【TS-TR2K】
シリンジ 50ml 針なし	テルモ 【SS-50LZ ロック】
献血アルブミン 25	化血研 【233113621】

check!!

CO₂ インキュベータ H₂O ____ , TEMP ____ °C , CO₂ ____ %

遠心機 : HITACHI CR7

遠心機 : TOMY AX-320 電源入れて 32°C に温めておく

ウイルス ハイブリバッグに入れて 37°C で溶解

CultiLife Spin のレトロネクチンコーティング

レトロネクチンストック溶液を作成 (□平成____年____月____日作成済み)

□レトロネクチン 2.5mg(2.5ml) / 40ml PBS …59 μ g/ml

1. CultiLife Spin(40cm²)に 10ml を注入 59 μ g/ml \times 10ml / 40cm² \rightarrow 9.75 μ g / cm²
2. 室温で 2 時間 rotate
3. PBS で Wash (すぐに使わない場合は 4 $^{\circ}$ C で 1 週間程度まで保存可能)

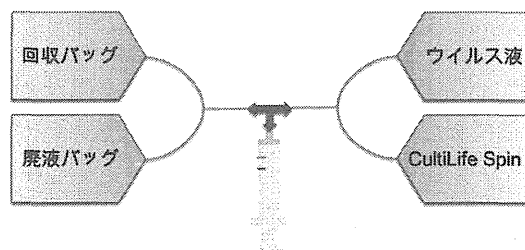
ウイルス液の作製

□ウイルス _____ ml + 10mg/ml protamine _____ μ l (ウイルスの 1/1,000vol.)

↳ 使用ウイルス : _____

細胞の回収～遺伝子導入

1. 培養バッグ、回収バッグ、PBS/1%HSA を連結
2. 培養バッグ内の細胞を回収バッグへ回収
3. 培養バッグから細胞を一部回収
4. cell count : _____ $\times 10$ — cell / ml \times _____ ml
= _____ $\times 10$ — cell / total (cell viability: _____ %)
5. PBS/1%HAS で培養バッグ内を Wash する
6. 回収バッグへ回収 (Wash は 2 回程度行う)
7. 空気抜きをして回収バッグをルートから分離
8. 回収バッグの重さを量る _____ g
9. 遠心分離 □SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
□TIME : 15min
□TEMP : 4 $^{\circ}$ C
□ACCEL / DECEL : 9 / 1
□使用記録記入
10. 遠心後の回収バッグ、廃液バッグ、CultiLife Spin を連結
11. 回収バッグを分離スタンドに設置
12. 廃液バッグを開放し、回収バッグの上清を廃液バッグに回収
13. 廃液バッグのルートを延長チューブに付け替え、シリンジを接続
14. シリンジを用いて回収バッグへ $1-5 \times 10^6$ cell / ml になるようにウイルス液を注入
15. 回収バッグ内の細胞を手でよくもみほぐし、CultiLife Spin に注入 _____ ml
16. 空気抜きをしてバッグを分離
17. 遺伝子導入 □SPEED : 1000G
□TIME : 2hour
□TEMP : 32 $^{\circ}$ C
□ACCEL / DECEL : FAST / SLOW



18. 遺伝子導入後の CultiLife Spin、回収バッグ、PBS/1%HAS を連結
19. CultiLife Spin 内のウイルス液を回収バッグへ回収
20. PBS/1%HAS を回収バッグへ適量入れ、液量を調節する
21. 空気抜きをして回収バッグをルートから分離
22. 遠心分離 SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
TIME : 15min
TEMP : 4°C
ACCEL / DECEL : 9 / 1
使用記録記入

※遠心している間、CultiLife Spin は Medium を入れて 37°C でインキュベートしておく

23. 遠心後の回収バッグ、廃液バッグ、CultiLife Spin、培地バッグを連結
24. 回収バッグを分離スタンドに設置
25. 廃液バッグを開放し、回収バッグの上清を廃液バッグに回収
26. $1-10 \times 10^5$ cell / ml になるように CultiLife Spin に培地を入れる _____ ml
※培地量が少なければ、ルートの途中に三方活栓を接続し、シリンジを用いて量る
27. 空気抜きをして CultiLife Spin を分離
28. 37°C, 5%CO₂ で培養

※25.で回収した廃液を 50ml 回収し、コンタミチェック用に保存しておく
(1ml×5本, 45ml×1本 -80°C)

平成____年____月____日 (Day4)

資材の確認・準備	Lot No,
RetroNectin	TaKaRa 【T100B】
CultiLife Spin	TaKaRa 【KB630】
テルフレックス分離バッグ 600ml	テルモ 【BB-T060CJ】
テルフュージョン Y 型連結管	テルモ 【TC-Y01】
操作アダプター	テルモ 【TC-MP】
注射針 23G	テルモ 【NN-2332R】
1ml シリンジ	
サフィード延長チューブ	テルモ 【SF-ET3825】
三方活栓 R 型	テルモ 【TS-TR2K】
シリンジ 50ml 針なし	テルモ 【SS-50LZ ロック】

check!!

CO₂ インキュベータ H₂O ____ , TEMP ____ °C , CO₂ ____ %

遠心機 : HITACHI CR7

遠心機 : TOMY AX-320 電源入れて 32°C に温めておく

ウイルス ハイブリバッグに入れて 37°C で溶解

細胞の回収～遺伝子導入

1. 培養バッグ、回収バッグ、PBS/1%HSA を連結
2. 培養バッグ内の細胞を回収バッグへ回収
3. 培養バッグから細胞を一部回収
4. cell count : _____ × 10[—] cell / ml × _____ ml
= _____ × 10[—] cell / total (cell viability: _____ %)
5. PBS/1%HAS で培養バッグ内を Wash する
6. 回収バッグへ回収 (Wash は 2 回程度行う)
7. 空気抜きをして回収バッグをルートから分離
8. 回収バッグの重さを量る _____ g
9. 遠心分離 SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
TIME : 15min
TEMP : 4°C
ACCEL / DECEL : 9 / 1
使用記録記入
10. 遠心後の回収バッグ、廃液バッグ、CultiLife Spin を連結
11. 回収バッグを分離スタンドに設置
12. 廃液バッグを開放し、回収バッグの上清を廃液バッグに回収
13. 廃液バッグのルートを延長チューブに付け替え、シリンジを接続
14. シリンジを用いて回収バッグへ 1-5 × 10⁵ cell / ml になるようにウイルス液を注入
15. 回収バッグ内の細胞を手でよくもみほぐし、CultiLife Spin に注入 _____ ml
16. 空気抜きをしてバッグを分離
17. 遺伝子導入 SPEED : 1000G
TIME : 2hour
TEMP : 32°C
ACCEL / DECEL : FAST / SLOW
18. 遺伝子導入後の CultiLife Spin、回収バッグ、PBS/1%HAS を連結
19. CultiLife Spin 内のウイルス液を回収バッグへ回収
20. PBS/1%HAS を回収バッグへ適量入れ、液量を調節する
21. 空気抜きをして回収バッグをルートから分離
22. 遠心分離 SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
TIME : 15min
TEMP : 4°C
ACCEL / DECEL : 9 / 1
使用記録記入

※遠心している間、CultiLife Spin は Medium を入れて 37°C でインキュベートしておく

23. 遠心後の回収バッグ、廃液バッグ、CultiLife Spin、培地バッグを連結
24. 回収バッグを分離スタンドに設置

25. 廃液バッグを開放し、回収バッグの上清を廃液バッグに回収
26. $1-10 \times 10^5$ cell / ml になるように CultiLife Spin に培地を入れる _____ ml
※培地量が少なければ、ルートの途中に三方活栓を接続し、シリンジを用いて量る
27. 空気抜きをして CultiLife Spin を分離
28. 37°C, 5%CO₂ で培養

※25.で回収した廃液を 50ml 回収し、コンタミチェック用に保存しておく
(1ml×5本, 45ml×1本 -80°C)

平成____年____月____日 (Day5)

資材の確認・準備	Lot No,
細胞凍結保護液 CP-1 (50ml)	極東製薬 【27202】
or 細胞凍結保護液 CP-1 (100ml)	極東製薬 【27200】
テルフレックス分離バッグ 600ml	テルモ 【BB-T060CJ】
テルフュージョン Y 型連結管	テルモ 【TC-Y01】
操作アダプター	テルモ 【TC-MP】
注射針 23G	テルモ 【NN-2332R】
1ml シリンジ	
サフィード延長チューブ	テルモ 【SF-ET3825】
三方活栓 R 型	テルモ 【TS-TR2K】
シリンジ 50ml 針なし	テルモ 【SS-50LZ ロック】

check!!

CO₂ インキュベータ H₂O _____ , TEMP _____ °C , CO₂ _____ %

遠心機 : HITACHI CR7

細胞凍結保護液 CP-1 の作製 CP-1 68ml + 25%HAS 32ml

細胞の回収

1. cell count : _____ × 10[—] cell / ml × _____ ml
= _____ × 10[—] cell / total (cell viability: _____ %)
2. 培養バッグ、回収バッグ、PBS/1%HSA を連結
3. 培養バッグ内の細胞を回収バッグへ回収
4. PBS/1%HAS で培養バッグ内を Wash する
5. 回収バッグへ回収 (Wash は 2 回程度行う)
6. 回収バッグをルートから分離
7. 遠心分離 SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
TIME : 15min
TEMP : 4°C
ACCEL / DECEL : 9 / 1
使用記録記入
8. 遠心後の回収バッグ、廃液バッグ、PBS/1%HAS、洗浄バッグ①を連結
※廃液バッグに回収した上清はコンタミチェックを行う
9. 回収バッグを分離スタンドに設置
10. 廃液バッグを開放し、回収バッグの上清を廃液バッグに回収

洗浄

1. 回収した細胞を PBS/1%HAS で洗浄する _____ ml
2. 洗浄バッグ①に細胞を回収し、ルートから分離
3. 遠心分離 SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
TIME : 15min
TEMP : 4°C
ACCEL / DECEL : 9 / 1
使用記録記入
4. 遠心後の洗浄バッグ①、廃液バッグ、PBS/1%HAS、洗浄バッグ②を連結
5. 洗浄バッグ①を分離スタンドに設置
6. 廃液バッグを開放し、洗浄バッグ①の上清を廃液バッグに回収
7. 洗浄バッグ①の細胞を PBS/1%HAS で洗浄する _____ ml
8. 洗浄バッグ②に細胞を回収し、ルートから分離
9. 遠心分離 SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
TIME : 15min
TEMP : 4°C
ACCEL / DECEL : 9 / 1
使用記録記入
10. 遠心後の洗浄バッグ②、廃液バッグ、生食/1%HAS、洗浄バッグ③を連結

11. 洗浄バッグ②を分離スタンドに設置
12. 廃液バッグを開放し、洗浄バッグ②の上清を廃液バッグに回収
13. 洗浄バッグ②の細胞を生食/1%HAS で洗浄する _____ ml
14. 洗浄バッグ③に細胞を回収し、ルートから分離
15. 培養バッグから細胞を一部回収 (cell count, FACS 解析用)

cell count : _____ × 10[—] cell / ml × _____ ml

= _____ × 10[—] cell / total (cell viability: _____ %)
16. 遠心分離
 - SPEED : 200G (回転数 : 840rpm)
 - TIME : 15min
 - TEMP : 4°C
 - ACCEL / DECEL : 9 / 1
 - 使用記録記入
17. 遠心後の洗浄バッグ③、廃液バッグ、生食/1%HAS、シリンジを連結
18. 洗浄バッグ③を分離スタンドに設置
19. 廃液バッグを開放し、洗浄バッグ③の上清を廃液バッグに回収
20. 1×10^7 cell / ml になるように、生食/1%HAS を洗浄バッグ③に注入 _____ ml
21. バッグ内の細胞を手でよくもみほぐし、1ml(1×10^7 cell)を回収(検査用)
22. バッグに輸血用点滴ルートを接続 ※漏れがないことを確認！！
23. 室温で箱に入れて(?)病院へ

※19.で回収した廃液を 50ml 回収し、コンタミチェック用に保存しておく
(1ml×5 本, 45ml×1 本 -80°C)

検査項目 21.で回収した細胞を用いて各種検査を行う

- エンドトキシン確認用 _____ μl
- 細菌確認用 _____ μl
- Mycoplasma 確認用 _____ μl
- その他確認用(RCR) _____ μl

細胞の保存

1. 遠心管を保冷剤で冷やし、混和しながら、細胞/生食/1%HAS と等量の CP-1 を加える
2. 細胞保存用チューブに _____ ml \times _____ 本に分注
ラベル記入
3. 保存用細胞は -150°C に、検査用細胞は -80°C に保存

解析

I. FACS 解析用細胞を使って解析

- ・ CD34_APC
 - ・ CD38_PE
- } staining, FACS 解析

II. 保存用細胞 vial 1-4 を使って確認

コロニーアッセイ

1. 4.4×10^5 cell / tube を 400 μl Comp Medium で懸濁 (1.1×10^6 cell / ml \times 400 μl)
2. MethoCult H4435 Enriched Methylcellulose Medium に細胞を 30 μl (3×10^4 cell) 入れる
3. 激しく混和 3分～
4. 15分静置(泡がなくなるまで)
5. 3cm dish \times 2枚に 1ml (1×10^4 cell) ずつ分注 ※粘性が強いのでゆっくりピペッティング
6. dish に傾斜をつけてゆっくりと回しながら培地を広げる
7. 37°C , 5% CO_2 で培養

コンタミチェック 2.2×10^5 cell / 2ml Comp Meduim / 6 well plate で培養

