

造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト

Textbook of Cell Processing

for Hematopoietic Stem Cell Transplantation

(初版)

2015 年 3 月



一般社団法人

日本輸血・細胞治療学会

JSTMCT (The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy)

日本造血細胞移植学会



JSHCT

The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation

<協力団体>



JMDP

日本骨髓バンク

序文

近年、造血幹細胞移植を代表とする細胞療法の発展に伴い、細胞を適正に採取、処理、管理、投与する必要性が益々高まっている。製造された細胞の性状を評価するためには、細胞処理に係わる検査を適正に行う必要がある。日本輸血・細胞治療学会は、日常診療に用いる細胞の採取、処理、管理、投与が適正に行われることの指導監督を使命の1つとしている。輸血療法については、血液型検査、不規則抗体検査、交差適合試験などの輸血検査、輸血用血液製剤の保管管理の方法と投与に係わる留意事項などを網羅した様々なテキストが存在している。一方、日常診療として行われる細胞療法(主に造血幹細胞移植)に用いる細胞の処理に係わるテキストは存在せず、施設ごとに独自のマニュアルを用いて治療に用いる細胞の製造を行っている。

日本輸血・細胞治療学会の細胞治療委員会は、第60回日本輸血・細胞治療学会総会(平成24年5月)から、毎年の同学会の総会で細胞の採取・処理等に係るテクニカルセミナーを開催している。「造血細胞の処理・操作・アッセイのためのテキスト ver.1.0」を作成し、第1回のテクニカルセミナー参加者(平成24年5月)に無償配布したところ大変好評であった。そこで、本テキストの内容を更に充実させ、執筆項目と執筆者を増やし、新たな「造血幹細胞移植のための細胞取り扱いに関するテキスト(初版)」を発行する運びとなった。執筆者は、細胞治療委員会および関連する委員会の委員で、造血幹細胞の採取・処理の経験と造詣が深い方々である。本テキストが、細胞処理の標準化を促し、各施設での造血幹細胞移植をはじめとする細胞治療成績の向上に貢献することを大いに期待している。なお、本テキストの作成は、平成26年度厚生労働科学研究委託費(難治性疾患等実用化研究事業(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 移植医療技術開発研究分野))「造血幹細胞移植に用いる細胞の安全な処理・保存・品質管理体制の確立に関する研究」(H26-難治等(免)-一般-105)(主任研究者 田野崎隆二)の一環として行われた。

2015年3月

日本輸血・細胞治療学会
細胞治療委員会
室井 一男
田野崎 隆二
理事長
半田 誠

序文

1970年代に始まった造血幹細胞移植は、様々な血液疾患の標準的な根治療法として定着し、今も成長を続けている治療法である。当初は HLA が適合した血縁者ドナー骨髓細胞が移植に用いる唯一の造血幹細胞ソースであったが、現在では骨髓に加えて末梢血、臍帯血、さらにこれらの細胞を in vitro で増幅した細胞などが用いられるようになり、移植に用いられる細胞ソースは多様化が進んでいる。HLA の barrier も乗り越えられるようになった。さらに、同種造血幹細胞移植に於いては、移植後の同種免疫反応に付随する抗腫瘍効果が造血器腫瘍に対する移植の成功には大きな役割を果たすことが臨床データから示され、移植後免疫反応を非特異的に増幅させるドナーリンパ球輸注などの細胞治療がある程度の効果を上げてきた。しかし最近では、移植後大量エンドキサン投与などの、移植後免疫抑制剤投与を必要としない移植片対宿主病予防法が開発され、移植後の選択的な免疫療法のプラットフォームが整えられるようになり、将来的には CART 細胞などの近年注目されている新たな細胞治療の導入も期待されている。

一方で、新たな細胞療法として着実に成長を続ける造血幹細胞移植医療をより多くの患者さんに提供する為には、治療に用いる様々な細胞の質を担保することが不可欠である。我が国は世界でも有数の造血幹細胞移植大国であるが、造血幹細胞移植医療体制は欧米のそれとは大きく異なる。多数の施設で様々な造血幹細胞移植が施行されているという特徴があり、我々にはその医療の質の担保と均てん化を図ることが求められている。現在、造血幹細胞移植に関して制定された法律の枠組みの中で様々な試みがなされている。この度、日本輸血・細胞治療学会と日本造血細胞移植学会が連携して造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキストを発刊することは極めてタイムリーなことであり、我々の目指す目的達成に大きく貢献することが期待される。本テキストの内容は臨床の現場に十分に配慮されており、造血幹細胞移植医療に携わる多くの方々に大いに役立つ内容となっているので、是非ご活用いただければ幸である。

2015 年 3 月

日本造血細胞移植学会理事長
岡本 真一郎

編集

日本輸血・細胞治療学会 細胞治療委員会

室井 一男

田野崎 隆二

執筆者一覧（五十音順）

いけだ かずひこ
池田 和彦

公立大学法人 福島県立医科大学 輸血・移植免疫学講座、同 循環器・血液内科学
講座

いとう つねお
伊藤 経夫

国立大学法人 北海道大学 北海道大学病院 臨床研究開発センター

うえだ やすのり
上田 恭典

公益財団法人 大原記念倉敷中央医療機構 倉敷中央病院 血液内科・血液治療セン
ター

うえむら ともえ
上村 知恵

慶應義塾大学病院 輸血・細胞療法センター

おがみ かずお
尾上 和夫

国立大学法人 東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部

おがわ かずえい
小川 一英

公立大学法人 福島県立医科大学 循環器・血液内科学講座

おくやま よしき
奥山 美樹

がん・感染症センター 都立駒込病院 輸血・細胞治療科

かなもり へいお
金森 平和

地方独立行政法人 神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 血液内科

きくた あつし
菊田 敦

公立大学法人 福島県立医科大学 小児腫瘍科

きしの こうじ
岸野 光司

自治医科大学附属病院 輸血・細胞移植部

たかなし み の こ
高梨 美乃子

日本赤十字社 血液事業本部

た の さき りゅうじ
田野崎 隆二

国立研究開発法人 国立がん研究センター中央病院 輸血療法科

造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト

てしま たかのり
豊嶋 崇徳

国立大学法人 北海道大学大学院医学研究科 血液内科

ながむら と き こ
長村 登紀子

国立大学法人 東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部

ふじもり よしひろ
藤盛 好啓

兵庫医科大学病院 輸血・細胞治療センター

まつもと まゆみ
松本 真弓

社会医療法人神鋼記念会 神鋼記念病院 血液病センター 高密度無菌治療室

むろい かずお
室井 一男

自治医科大学附属病院 輸血・細胞移植部

目 次

第 1 章	骨髓採取	6
第 2 章	末梢血幹細胞採取	13
第 3 章	末梢血幹細胞採取における看護師の役割	24
第 4 章	骨髓バンクドナーのコーディネートについて	36
第 5 章	院内における血液細胞処理のための指針の概要	40
第 6 章	衛生・保存管理・環境整備	48
第 7 章	細胞処理の基本的操作と生細胞数の測定	63
第 8 章	CD34 陽性細胞数の測定	74
第 9 章	コロニー培養とコロニー形成細胞の測定	82
第 10 章	末梢血幹細胞の処理と凍結保存	91
第 11 章	骨髓液からの赤血球除去	101
第 12 章	骨髓液の血漿除去	114
第 13 章	造血幹細胞の融解と輸注	119
第 14 章	輸血管理システムを利用した造血幹細胞の管理とバイオビジランス	127
第 15 章	骨髓バンクを介する骨髓細胞、ドナーリンパ球、末梢血幹細胞の取り扱い	131
第 16 章	輸血に用いる顆粒球の取り扱い	136
第 17 章	海外における細胞処理ガイドラインおよび規制の現状	145
第 18 章	Q & A	147

<参考資料>

院内における血液細胞処理のための指針(平成 22 年 5 月 27 日第 1 版)	155
同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン (2010 年 6 月 30 日改訂第 4 版)	171
非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル(2010 年 10 月 1 日暫定版)	181
細胞凍結保護液 CP-1 説明書	197

第 1 章 骨髄採取

はじめに

骨髄採取法はトーマスの原法¹⁾に基づく方法が改変された形で行われている。本項では同種骨髄移植のための骨髄採取の概略について概説する。詳細については「骨髄採取マニュアル 第 4 版」²⁾も参照していただきたい。

骨髄採取全体の流れ（図 1）

血液疾患患者において、疾患の状態により主治医が必要と判断すれば human leukocyte antigen (HLA) が適合したドナーの検索を開始する。

血縁ドナー候補者は造血幹細胞提供に関する自由な意志決定ができにくく、細心の倫理的配慮が必要である。HLA の結果が判明した後に提供を拒否する事態も懸念されるため、HLA 検査を行う前にも骨髄提供の実際、危険性、同意に関する任意性を十分に説明し、協力的な場合にのみ HLA を検査する。骨髄バンクのドナー候補においてはドナー登録時に HLA 検査が行われている。HLA 一致者が得られればドナー候補者として意志の確認や健康診断等、適格性の判断を行う。

骨髄バンクを介した非血縁ドナーの場合、ドナープールからのドナー選定や採取施設と移植実施施設の日程調整などにより、長期の準備期間を要する傾向にあり、2013 年度の平均コーディネート期間は約 4 か月である。

骨髄採取準備が整うと、ドナーは麻酔科受診、自己血貯血を経て骨髄採取を施行される。採取された骨髄血は移植施設、または自施設内（血縁ドナーの場合）であれば移植病棟に搬送され患者に輸注される。採取後、ドナーは合併症の有無を厳重に確認されてから退院となり、その後も経過を観察される。

骨髄採取の準備

HLA 検査の結果に基づき骨髄移植のドナー候補者が選定されれば、下記の手順に従い準備を進める。末梢血幹細胞移植ドナーと異なり、全身麻酔の準備や自己血貯血が必要である²⁾。ドナーには危険性と負担が伴うため、採取前のインフォームドコンセントと健康診断が必須である。

【手順】

1. 問診や一般検査などの結果に基づいて健康状態に問題が無いことを確認する。並行して HLA の確認検査（骨髄バンクドナーの場合）や血液型検査も行われる。
2. 骨髄提供の意志を書面で確認する（骨髄バンクにおいては最終同意となる）。
3. 術前健康診断を行う。表1に非血縁者ドナーの検査項目を示す。血縁ドナーの場合もこれに準じて検診を進める。

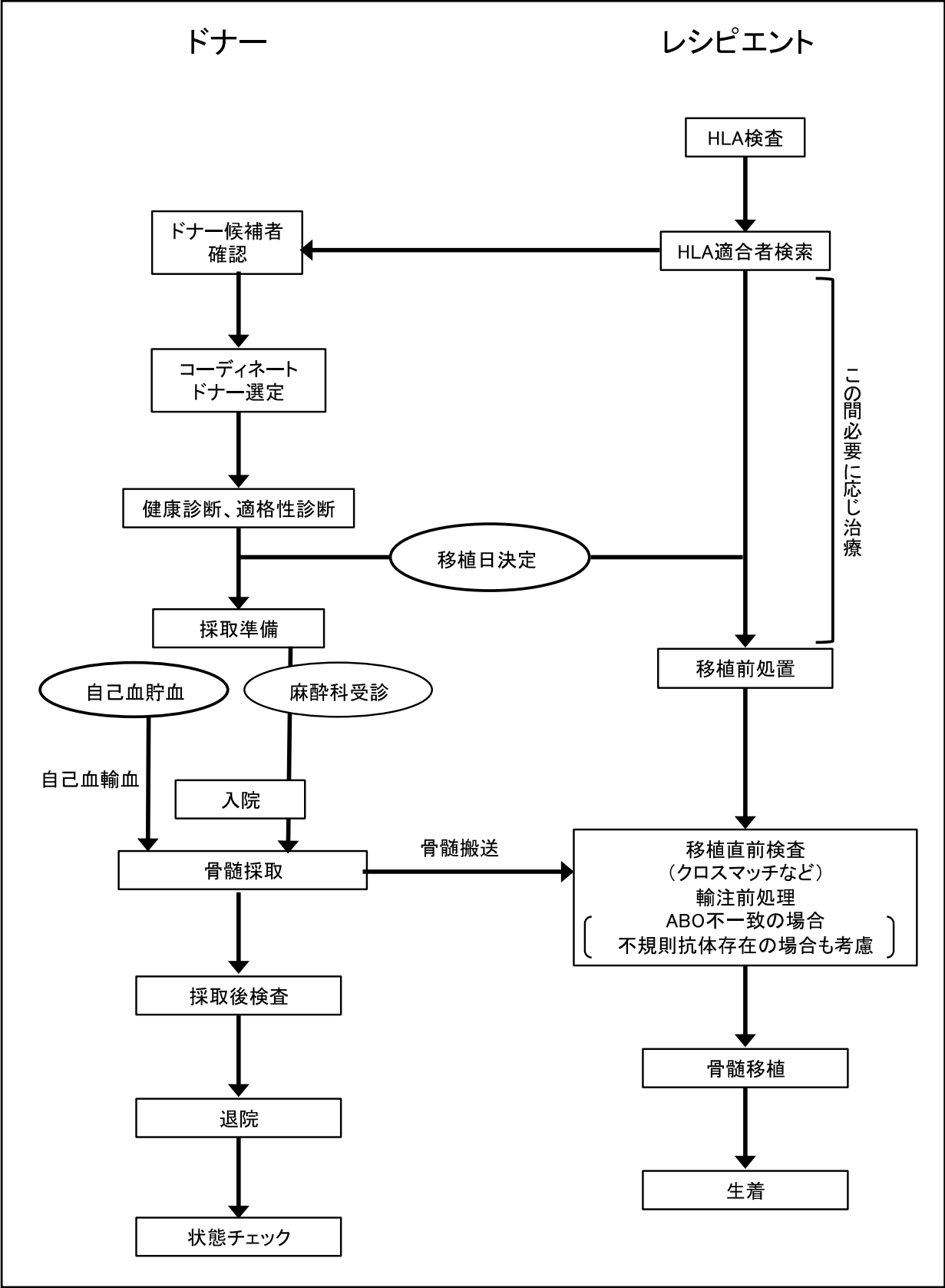


図 1 骨髄採取全体の流れ

表 1 術前健康診断（必須検査項目、日本骨髄バンク 骨髄採取マニュアル 第 4 版²⁾ 手続編より）

血算	WBC・RBC・Hb・Hct・MCV・MCH・MCHC・Plt・WBC 分画
生化学	TP・ALB・T-Bil・GOT (AST)・GPT (ALT)・ γ -GTP・CPK・BUN・CRE・LDH
感染症	梅毒(STS・TPHA)・HBs 抗原・HBc 抗体・HBs 抗体・HCV 抗体・HTLV-I 抗体・HIV1/2・CMV 抗体
凝固系	PT・APTT
胸部 X 線、心電図、検尿、呼吸機能、血圧、理学所見、(必要時)妊娠検査	

※他の検査(生化学検査および凝固系検査等)については採取施設の判断で実施。また、下記を必要に応じて行う。

- ドナーの不規則抗体
- Rh 型の詳細(レシピエントが不規則抗体を有する場合)
- キメリズム解析の準備(STR 法の場合)
- サイトメガロウイルス抗体価(レシピエントが未感染の場合)、その他ウイルス検査

4. ドナーの適格性を判断する。ドナーとしての適格性が確定した後に採取を中止することは、レシピエントの予後に直接関わるため、原則として行うべきではない。従って、この段階におけるドナー適格性の判断は極めて重要である。自己血貯血時の問診で問題が発覚した事例もあり、注意する。非血縁者における保留・中止の場合は速やかに骨髄バンク担当地区事務局に連絡する。

5. 骨髄採取計画量及び自己血貯血量を決定する。

- 骨髄採取計画量: 下記の標準採取量とドナー上限量の少ない方とする。
 - 標準採取量 (mL) = 患者体重 kg \times 15 mL/kg
 - ドナー上限量: ドナー術前検診時のヘモグロビン (Hb) 値による採取上限量(男女とも)
 1. 12.5 g/dL 未満の場合、ドナー体重 1kgあたり、12mL/kg 以下
 2. 13.0 g/dL 未満の場合、ドナー体重 1kgあたり、15mL/kg 以下
 3. 13.5 g/dL 未満の場合、ドナー体重 1kgあたり、18mL/kg 以下
 4. 13.5 g/dL 以上の場合、ドナー体重 1kgあたり、20mL/kg 以下

※男性 13.0 g/dL 未満、女性 12.0 g/dL 未満は採取中止または保留になる。

- 最大採取量: ドナー上限量と採取上限量の少ない方とする。
 - ドナー上限量: 上述
 - 採取上限量: 自己血貯血総量+400mL (採取時の実出血量が 400mL 以下となるようにする)

※自己血貯血総量は骨髄採取計画量 — (100～400mL) の範囲で設定。800mL 以下が望ましい。その結果、最大の骨髄採取量は 1200 mL となる。

6. 自己血貯血

- 最初の貯血開始前に自己血貯血自体についてのインフォームドコンセントを得る。
- 発熱、頭痛、下痢、食欲不振などの症状がみられる場合は自己血採血を延期する。
- 自己血貯血総量を遵守し、1回の貯血量は400mLまたは循環血液量の10%以内を上限として回数を決定する。総貯血量は800mL以下が望ましい。
- 自己血採血は骨髄採取7日前に完了する。
- 採取バッグはCPDA液(有効期間35日)またはCPD液(有効期間21日)の全血冷蔵保存とする。
- 自己血貯血時の検査等において異常が発見された場合には速やかに担当地区事務局に連絡する。
- 鉄剤投与を積極的に考慮する。
- エリスロポエチンは投与しない。
- 非血縁者間骨髄採取時に返血すべき自己血が返血されなかった事例が報告されており³⁾、関連部署間の連絡及び確認に十分注意する。

7. 入院

- 問診と採取直前検査を行い手術に備える。表2に非血縁ドナーの検査項目を示す。血縁ドナーもこれに準じる。

表2 術前検査(必須検査項目)

血算	WBC・RBC・Hb・PLT
生化学	TP・ALB・T-Bil・GOT(AST)・GPT(ALT)・BUN・CRE・CPK

※他の検査については採取施設の判断で実施。

骨髄採取の実際

骨髄採取は2～4名の採取チームにより、気管内挿管による全身麻酔下において行われる。腹臥位で腸骨の上後腸骨棘付近より穿刺し、シリンジにて採取する^{2),5)}。

(1) 麻酔

- 麻酔方法は麻酔科担当医の判断に任され、日本麻酔科学会の「骨髄バンクドナーに対する麻酔管理について」の指針に従い行われる。
- 全身麻酔中のモニタリングは日本麻酔科学会による「安全な麻酔のためのモニター指針」に従って行われる。

(2) 骨髄採取

- 一般の手術に従いタイムアウト(術者が声を出し皆で確認)等をきっちりと行う。
- 穿刺部位は上後腸骨棘を中心として腸骨稜の後ろ1/3から行う。神経や血管の走行について

は骨髓採取マニュアルを参照のこと。

- 穿刺針は成人ドナーの場合 11～13G のディスポ針を用いる。なるべく細く、短い(2 inch が推奨される)ほうが好ましい。
- 採取速度は 500mL/30 分以下とする。
- 採取開始後自己血輸血も開始する。忘れずに自己血の全バッグを輸注する。
- 実出血量(採取骨髓量-自己血量) < 400mL とする。採取開始時と採取中間時点で有核細胞数を測定し目標細胞数を目指すが、ドナーの安全性を優先し、過量採取にならないようにする。レシピエント体重あたり 3.0×10^8 細胞/kg を目標とするが、 2.0×10^8 細胞/kg 以下でも生着は可能である。ただし、非血縁ドナーにおいてレシピエント体重あたり 1.0×10^8 細胞/kg 未満の場合はドナー安全委員会に報告する必要がある。
- 採取時の所見として、膀胱カテーテル挿入に伴う血尿、80mmHg 以下の血圧低下(収縮期)、上室性・心室性不整脈、歯のぐらつき、不穏状態、穿刺針の損傷、その他の合併症の有無を確認する。
- 非血縁者ドナーの場合、採取報告書(速報)として、麻酔法、採取に使用した針、同種血使用の有無を事務局に報告する。合併症があれば併せて報告する。

(3) 骨髓液の処理

- 希釈液として生食を、抗凝固薬としてヘパリンを使用する。
- ヘパリンの最終濃度は約 10 単位/mL とする。例えば、希釈液を含めて総骨髓採取量が 800ml であればヘパリン約 8,000 単位、1200ml であれば約 12,000 単位とする。
- コレクション・コンテナーに組み込まれた 850 μ m フィルターと、500 μ m と 200 μ m の 2 段階のフィルターで骨片や脂肪塊を除く処置を行った後、輸血バッグにつめられ、バッグはリークを予防するために二重にシールされる²⁾。バッグは破損なども考慮し複数に分ける。最近では通常ボーンマロウコレクションキット [型式: 4R2107H (製造元: フェンウォールインク、販売元: パルメディカル社)] またはボーンマロウコレクションシステム (製造元: バイオアクセス社、販売元: バクスター社) 等、市販のディスポーザブルキットが用いられているが、金属性のフィルターを使用している施設もある。
- 輸注においては、ABO および Rh 型の一致度によって処理の必要性が異なる(表 3)^{2),4)}。詳細は 11～12 章を参照されたい。
- 目視による凝集や骨片の有無の確認が必要である。
- 産物の細胞数及び必要に応じ交差適合試験を行う。

(4) 骨髓採取後のドナー管理

- ドナーは術後において、バイタルサインと理学所見のチェック、一般検査や問診等によりモニタリングされ、有害事象の有無を確認される。
- 採取後所見: 採取翌日の排尿時痛、咽頭痛、38℃以上の発熱、感染症、肝障害、採取穿刺部位の異常、解熱剤の投与、抗生物質の投与、鎮痛剤の投与、鉄剤投与の有無。また、痛みの程

度、採取翌日の歩行、その他の合併症についてチェックしておく(※)。

- 退院後 1 か月以内(非血縁ドナーでは 2～3 週間)に血液検査(血算・生化学・検尿)と問診(日常生活復帰度、社会生活復帰度)を確認する。

※非血縁ドナーにおいて採取後合併症が生じた場合、必ず骨髓バンク担当地区事務局に報告する。

表 3 ABO 不適合の種類と必要な処理

不適合の種類	定義(ドナー→レシピエント)	骨髓液に必要な処理
ABO主不適合	レシピエント血清中に抗体が存在 (AB→A or B; A, B, or AB→O)	自動血球分離装置による赤血球除去
ABO副不適合	ドナー血清中に抗体が存在 (O→A, B, or AB; A or B→AB)	血漿除去(通常、遠心法を用いる)
ABO主副不適合	両者 (A→B; B→A)	自動血球分離装置による赤血球除去*

*自動血球分離装置により単核球を回収し、血漿も除去。単核球の回収率に注意する。11～12 章を参照。

Q & A

Q. 骨髓液の希釈液として何が最適か。

<解説>

移植に用いる骨髓液の希釈液として、かつてはメディウムの RPMI 1640 とヘパリンが用いられていたが、RPMI 1640 の生体内における安全性が確立していないため近年では生理食塩水が用いられるようになった。抗凝固薬については本邦においてはヘパリンが用いられている。ヘパリンは約 10 単位/mL と生食を使用するため、1,000mL あたり最大 1 万単位になる。このため、未処理においてはレシピエントに無視できない量のヘパリンが輸注される。APTT が延長して脳出血を起こした事例もあり⁵⁾、出血傾向の増悪や HIT(ヘパリン起因性血小板減少症)などの合併症が起こる可能性も留意すべきである。なお、海外においては ACD も用いられており⁷⁻⁸⁾、今後検討する必要もあるかもしれない。

参考文献

- 1) Thomas ED, Storb R. Technique for human marrow grafting. Blood. 1970;36:507-15.
- 2) 骨髓採取マニュアル 第 4 版. (<http://www.jmdp.or.jp/medical/work/manual.html>)
- 3) 日野雅之、山根孝久、中前博久. 自家・同種骨髓・末梢血幹細胞の採取方法、ドナーの安全管理. みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床. 神田善伸編. 医薬ジャーナル社; 2008. p.200-5.
- 4) Monthly JMDP 平成 26 年 4 月 15 日
(http://www.jmdp.or.jp/documents/file/07_about_us/monthly/monthly14_04_15.pdf)
- 5) 加藤栄史. 骨髓移植. 新版 日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム. 日本輸血・細胞治療学会認定医制度審議会カリキュラム委員会 編. 2012. P.269-72.
- 6) (公財)骨髓移植推進財団 医療委員会. 骨髓移植直後に患者さんが脳出血を併発した事例について

(ご報告) 2013 年 1 月 15 日.

(http://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_f/2013_01_15.pdf)

- 7) Guidelines for the collection, processing and storage of human bone marrow and peripheral stem cells for transplantation. Prepared by the BCSH Blood Transfusion Task Force. Transfus Med. 1994;4:165-72.
- 8) Goldman JM, for the WMDA Executive Committee. A special report: bone marrow transplants using volunteer donors: recommendations and requirements for a standardized practice throughout the world, 1994 update. Blood. 1994;84:2833-9.

(池田和彦、小川一英)

第2章 末梢血幹細胞採取

はじめに

末梢血中には、通常、造血幹細胞等の未分化な細胞はほとんど流れていない。しかし、抗腫瘍剤による骨髄抑制の回復期には、骨髄中より末梢血中にこれらの細胞が一時的に動員され濃度が上昇することがわかり¹⁾、この時期の細胞を繰り返し採取して移植に用いることが行われていた²⁾。その後、末梢血中に造血前駆細胞が動員される時期に、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などの造血刺激因子の投与を併用することで、造血前駆細胞の動員が非常に増幅されることが判明し³⁾、現在、日本では、腫瘍性疾患での自家造血幹細胞移植に際しては、抗腫瘍剤による骨髄抑制の回復期に G-CSF を併用して、動員された末梢血幹細胞を採取し移植に用いることが一般的に行われている。また、さらに G-CSF 単独でも大量に投与することで、造血前駆細胞、造血幹細胞が末梢血中に動員されることが判明し³⁾、健常ドナーからの採取が可能となった。造血幹細胞の Chemokine receptor 4(CXCR4)と骨髄間質細胞の Stroma derived factor-1 α (SDF-1 α) との結合を阻害し、幹細胞の動員を容易にする plerixafor を G-CSF と併用することで、さらに動員が容易になるが⁴⁾、わが国では承認されていない。

本稿では、末梢血幹細胞採取の考え方、具体的な留意点を中心に述べる。日本輸血・細胞治療学会、日本造血細胞移植学会、日本骨髄バンクから、関連したガイドライン⁵⁾やマニュアル⁶⁾が示されているので、参照されたい。現在、末梢血幹細胞採取は、主にテルモ BCT の COBE Spectra、Spectra Optia、Fresenius の COM.TEC を用いて行われている。個々の機種の手扱いについては、各製品のマニュアルを参考にされたい。

自家末梢血幹細胞動員と採取の時期

(1) 化学療法を併用する場合

疲弊した造血環境からの採取は、十分量の幹細胞採取を困難にする。このため、移植適応患者については、出来るだけ採取の容易な時期に計画的な採取が望ましい。

化学療法後の血球回復期に採取する。採取直前の化学療法は強力なものが望ましい。ニトロソウレアは用いない。シクロフォスファミド、シタラビン、エトポシドを含むレジメンがよく用いられ、治療強度が弱い場合には、これらの薬剤を増量してもよい。

1) G-CSF の開始時期

経過中、特に感染等が生じていない場合には、骨髄抑制からの回復時期に G-CSF を開始する。血球回復の判断には、網状赤血球の反転増加、単球、血小板、好中球数の反転増加のいずれかが生じるタイミングで G-CSF を開始すると、白血球の回復に同期して CD34 陽性細胞が増加し、採取のタイミングがとりやすい。感染症を生じた場合には、好中球数を確保するため、前治療の強さに応じて、G-CSF の早期の開始を考慮する。

2) G-CSF の投与量

G-CSF の投与量は、基本的には添付文書の範囲内で施設の方法で行う。

当科では、Filgrastim 200 μ g/ m^2 皮下注、もしくは Lenograstim 5 μ g/kg 皮下注を 1 日 1 回行っている。

3) 採取時期

白血球数の回復が急峻であれば、確実な採取が期待できる。白血球数 6,000 \sim 10,000/ μ L を中心に、3,000 \sim 20,000/ μ L 程度の範囲内で採取を開始する。採取のタイミングの決定には、末梢血の CD34 陽性細胞の数、HPC の数の推移を測定することでも可能である。採取が週末にかかり、保存も含めて施行が困難な場合には、途中で G-CSF の減量やスキップが可能な場合もある (図1)。

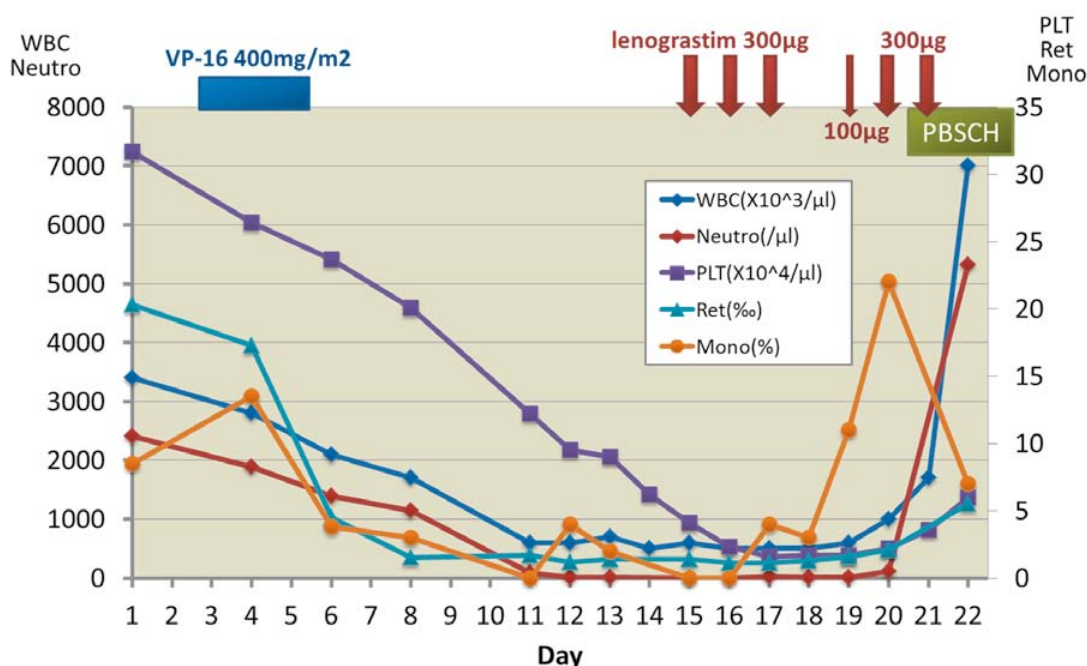


図1 幹細胞動員中に G-CSF をスキップした例

(2) G-CSF 単独での幹細胞動員

化学療法施行歴のある患者における G-CSF 単剤での幹細胞の動員については、ドナーからの採取に準じるが、必要量の採取が困難な場合が多いことが予想される。

健常人ドナーからの造血幹細胞採取

(1) 末梢血幹細胞採取におけるドナー選択の特殊性

G-CSF投与によって、白血球数が増加し機能が亢進するとともに、血小板凝集能が亢進し血栓傾向が増す。従って、血管にリスクがある場合、血栓症や虚血性疾患発症のリスクが増大するため、末梢血幹細胞採取ドナーとしては不適格となる。コントロール不良の高血圧症(収縮期血圧>160mmHg、もしくは拡張期血圧>100mmHg)、コントロール不良の脂質異常症 (総コレステロール>240mg/dL)は、このような理由から、

基本的に不適格となる⁵⁾。また脾臓破裂の報告があり、脾腫について、腹部超音波検査で確認することが望ましい。G-CSF大量投与による長期的なリスクについては長期に及ぶ観察が必要であるが、我が国での日本造血細胞移植学会の前向き研究や、EBMTでの後ろ向き研究では、造血器腫瘍の増加はみとめられていない。また、骨髄バンクドナーでは、肘静脈に十分に脱血可能な血管が1本確保できない場合には、ドナー不適格となる⁶⁾。ドナーの適格性の指標については、造血細胞移植 同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン⁵⁾を参照されたい。

(2) ドナーよりの採取

ドナー年齢は、通常 18 歳以上 60 歳以下とされている。ただし 61 歳以上 65 歳以下、10 歳以上 18 歳以下については、各施設のしかるべき機関の承認を受ける必要がある⁶⁾。10 歳未満の小児は末梢血幹細胞ドナーとはしない。

血縁ドナーの安全確保、依頼する過程でのドナーの人権への配慮と倫理性の確保は必須の問題であり、主治医以外の医師が、中立の立場でインフォームドコンセントを取る必要があり、可能であれば、造血細胞移植コーディネーターの関与が望ましい。年少者の場合は、特に配慮が必要である。G-CSF 単独投与で採取を行う。

1) G-CSF の投与

G-CSF の使用量は、Filgrastim $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ (ドナー体表面積)、Lenograstim $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (ドナー体重) 皮下注である⁵⁾。 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (ドナー体重)/日までは、G-CSF 用量依存性に CD34 陽性細胞動員が増し、副作用も許容範囲とされる⁷⁾。米国での Filgrastim の標準使用量は、 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ と、我が国での Lenograstim での量であることに留意する必要がある。

G-CSF を 1 日 1 回もしくは 2 分割し皮下注して、4 日目ないし 5 日目から採取を開始する。採取は、最終の G-CSF 投与から、2 ないし 4 時間経過した後以降で開始する⁸⁾。1 日で、十分量が採取できなかった場合には、翌日も G-CSF を投与し、採取する。6 日間 G-CSF を投与した場合、脾臓破裂の危険性が増すといわれており、特に注意が必要である⁹⁾。また、7 日間の投与では、動員される幹細胞数は低下するといわれているので、通常は行わない¹⁰⁾。NMDP(米国骨髄バンク)では、5 日目と必要なら 6 日目の採取を行うが、6 日間採取する場合でも、G-CSF 投与は 5 日間のみである¹¹⁾。

2) G-CSF 投与の副作用

G-CSF 投与により、ショック、間質性肺炎といった重篤なものから、骨痛、全身倦怠、インフルエンザ様症状、肝酵素上昇など様々な全身症状が生じる可能性がある。G-CSF の外来投与が行われている NMDP でも、初日は医療機関での受診が義務付けられている¹¹⁾。骨痛に対しては、出血傾向を助長する可能性のあるアセチルサリチル酸は用いない。G-CSF による過剰な白血球増加、血小板減少、副作用としての全身症状の出現に対応した減量基準が定められている⁶⁾(表1)。診療体制が整えば、G-CSF の外来投与は問題ない。現在は一部の施設でしか行われていないが、末梢血幹細胞移植の利点でもあるので、積極的に検討する必要がある。

表 1 G-CSF の減量・中止基準

検査所見			G-CSF 投与量の減量・中止
白血球数	50,000/ μ L 以上		50%減量
	75,000/ μ L 以上		投与中止
血小板	100,000/ μ L 未満		50%減量
	50,000/ μ L 未満		投与中止
症状	程度	Grade (CTC) *	G-CSF 投与量の減量・中止
骨痛	自制不能	4	50%減量、24 時間後改善されなければ投与中止
頭痛	自制不能	4	50%減量、24 時間後改善されなければ投与中止
吐き気	経口摂取不可能	3 以上	投与中止
嘔吐	24 時間で 2～5 回嘔吐	2	50%減量
	24 時間で 6 回以上嘔吐	3 以上	投与中止
身体反応	痛みもしくは腫れを伴う炎症・静脈炎		50%減量、24 時間後改善されなければ投与中止

*CTC: Common Toxicity Criteria ; 共通毒性基準

(日本骨髄バンク 非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル暫定版 2010 より引用改変)

バスキュラーアクセス

処理血流量が多いほど、採取 CD34 陽性細胞数は多くなる。しっかりした脱血路の確保は、安定したアフエレーシスにとって重要である。中心静脈の確保は、アフエレーシスを容易にするが、幹細胞採取に伴う死亡事故の一部は、内頸静脈などのバスキュラーアクセス確保に関連している¹²⁾。このため、わが国では中心静脈を確保する場合は、大腿静脈に限っている。骨髄バンクでは、末梢でのルート確保が義務付けられ、採取当日に、末梢ルートによるアフエレーシスが困難な場合にのみ許容されている⁶⁾。末梢から脱血するときは 16～18G 側孔付留置針を用いると十分な血流を確保しやすい。大腿静脈を確保する場合、しばしば、ダブルルーメンの留置カテーテルが用いられるが、血栓症のリスク等にも十分配慮する必要がある。大腿静脈確保に側孔付留置針を用いると 16G 程度の太さで十分な血流を得ることが出来る。留置針の場合は、末梢も含めアフエレーシス終了後毎回抜針する。大腿静脈穿刺を行った場合には、採取当日は入院が必要である⁶⁾。

小児患者における自家末梢血幹細胞採取に際しては、年齢体格に合わせた選択が必要であるが、乳児においても、橈骨動脈に 22G の留置針を使用することで、20～25mL/分の血流を得ることが可能である。返血路も同様に 22G 留置針が必要である。我々は、10 か月 8kg の乳児より幹細胞採取を行った経験がある。低体重患児の幹細胞採取については、十分な経験と設備の整った施設で慎重に行う必要がある。

抗凝固剤

通常は、ACD-A 液を用いる。一部の施設で少量のヘパリンの添加が行われている。

処理血液量の決定

(1) 採取量

採取量は、現在、幹細胞採取量によく相関するとされる CD34 陽性細胞数で評価されることが多い。しばしば、 $2 \times 10^6/\text{kg}$ が最低目標量とされる。ただし、この量以下では移植が成立しないわけではないこと、この量が至適量ではないことに留意する必要がある。CD34 陽性細胞の測定に当たっては、出来る限り国際的に標準化された方法であるシングルプラットフォーム法による測定が望ましい¹³⁾。

(2) 目標処理量の決定

採取に当たっては、遠心装置の特性、各施設の手技によって差異はあるが、脱血されて遠心分離装置を通過した造血幹細胞、前駆細胞は、一定の割合で回収されることに留意する。従って、本来は、採取時の末梢血中の CD34 陽性細胞数より、回収量は推測可能である。ただし、実際の採取施行中の予期せぬ変動のリスクもあるため、我々は、自家末梢血幹細胞採取では $100\text{mL}/\text{kg}$ (患者体重)、ドナー採取では $50\text{mL}/\text{kg}$ (ドナー体重)処理した時点で、採取 CD34 陽性細胞数を測定し目標処理量を設定している。最大血液処理量については、自家末梢血幹細胞採取においては特に定まっていない。Large volume leukapheresis (LVL)という大量処理をする方法も海外ではよく用いられ、1日で $400\text{mL}/\text{kg}$ (患者体重)を越える処理を行うことがある。ただし、健常人ドナーからの採取にあたっては、血縁ドナーからは $300\text{mL}/\text{kg}$ (ドナー体重)、非血縁ドナーからは $250\text{mL}/\text{kg}$ (ドナー体重)が採取の上限として定められている⁵⁾¹²⁾。この際最も問題となるのは血小板数の低下である。採取された幹細胞を含む細胞浮遊液中には、大量の血小板が含まれているため、特に大量の処理を行う場合には、血小板数の低下に留意する必要があり、アフエレーシス中の血小板測定が望ましい。このような点に留意しながら、ドナーの負担を考慮して出来る限り 1 日で採取が終了出来るように計画してゆくことが望ましい。

自験例より見た、開始時末梢血中の CD34 陽性細胞数と採取 CD34 陽性細胞数、開始時の血中 CD34 陽性細胞数より推測した、遠心分離装置内を通過した CD34 陽性細胞総数と採取 CD34 陽性細胞数の相関の検討結果を示す (図2)(図3)。

採取中の留意点

(1) 血小板減少

アフエレーシス中の血小板数の低下は、特にドナーにとっては、最も留意すべき点である。ドナーからの採取の場合は、終了時の血小板数で $5 \text{ 万}/\mu\text{L}$ 程度を下限とするのが妥当であろう。開始時と途中での末梢血血小板数の測定で、血小板減少の程度は推測可能である。特に処理量を上限近くに設定する場合には、血小板数の減少の予想と血小板数の採取途中での確認が必要である。ドナーでは、アフエレーシス終了時 $8 \text{ 万}/\mu\text{L}$ 以下の場合、採取した細胞浮遊液から、多血小板血漿 (PRP) を分離して輸注することが勧められている⁵⁾⁶⁾。自家採取の場合には、採取時点で血小板数が回復傾向にあり、当日で採取が終了す

る場合は、5 万/ μ L 以下であっても PRP の輸注は必要としない。Spectra Optiaを用いた自験例での血小板減少と処理量の相関を示す (図4)。

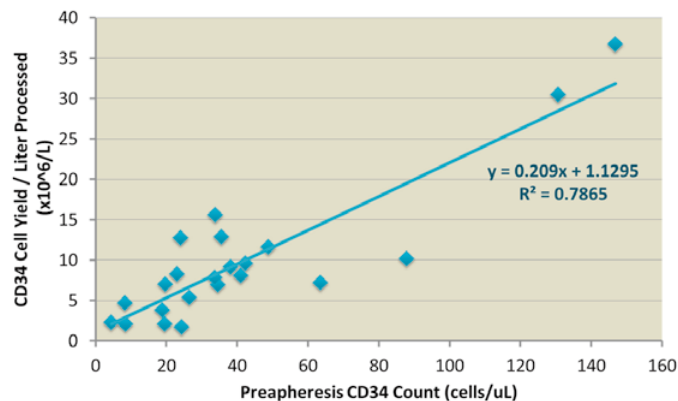


図2 採取前末梢血中 CD34 陽性細胞濃度と処理量

(↑ 図2 採取前末梢血中 CD34⁺濃度と PBSC 中 CD34⁺濃度の関係

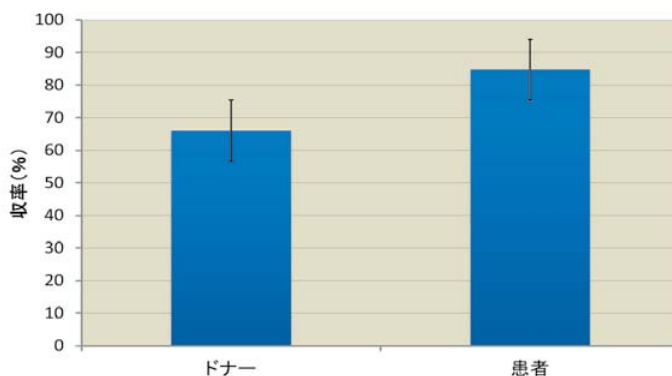


図3 CD34 陽性細胞数収率の比較

細胞濃度より

見た収率 (Spectra Optia)

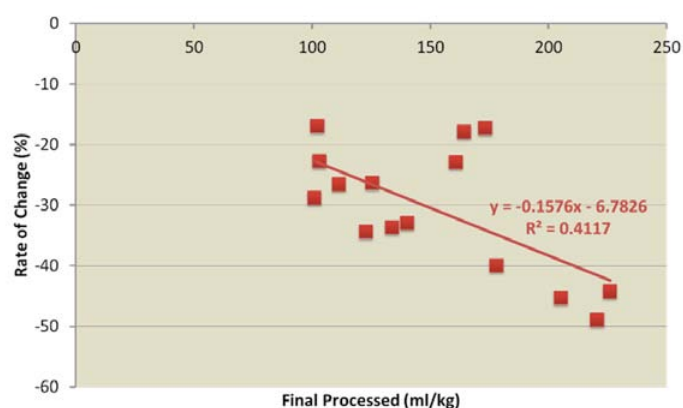


図4 血液処理量と血小板数の推移 (ドナー)
(Spectra Optia)

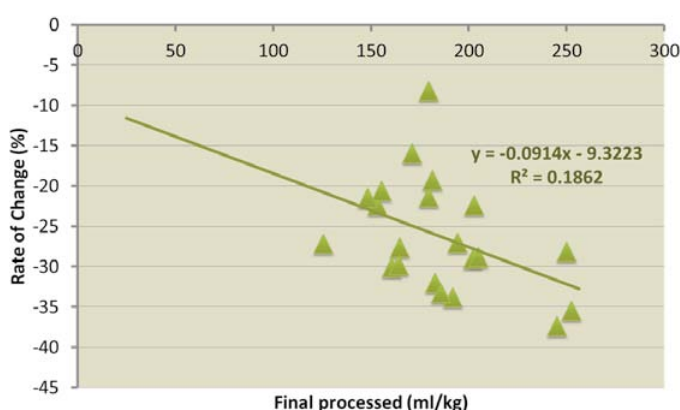


図5 処理量とイオン化Caの低下 (ドナー)
ti (Spectra)

(2) 低カルシウム血症

低カルシウム血症は、総カルシウム濃度ではなく、カルシウムイオン濃度で評価する。採取中の ACD-A 液の注入による Ca イオン濃度の低下は、副作用の出現に最も大きく関係する。発症しやすさは、単位時間あたりの ACD-A 液注入量と持続時間に規定される。グルコン酸カルシウムの静脈内投与により補正する。末梢血幹細胞採取は長時間に及ぶので、グルコン酸カルシウム溶液を返血路の末梢側より持続注入するとコントロールしやすい。グルコン酸カルシウム投与下でも、イオン化カルシウム値は低下するが、口唇や手指のしびれ等の臨床症状に注意し、症状が深刻化する前に対応する。グルコン酸カルシウムの投与量を増すか、脱血速度を落とすことによって、単位時間あたりの ACD-A 注入量を減らすことで対応する。両者を同時に行うこともある。

当科では、血流量の上限をドナー1.2x 体重(kg)/分、患者 1.6x 体重(kg)/分とし、ACD-A 液は機械の初期設定の対血流比 1:12 で開始、グルコン酸カルシウムは、返血路の穿刺針に近い部位から、返血血液に持続注入している。ドナーでは 15A を生理食塩水 500mL に溶解、80~120mL/時(900~1,350mg/時)、患者では 20A を生理食塩水 500mL に溶解、100~150mL/時(1,400~2,100mg/時)で持続注入する。このような大量の投与下で、自覚症状はない場合でも図5に示すように低カルシウム血症が生じている。グルコン酸カルシウムの注入量は、脱血速度、処理量、処理時間によって異なるので、各施設の方法に適した注入量を決定する必要がある。

(3) 迷走神経反射などの血圧低下

アフエレーシス前に十分なコミュニケーションをとり緊張をほぐすことが重要である。貼付用局所麻酔剤を 30 分程度前に使用することで、痛みを軽減することが望ましい。

症状がアフエレーシス開始直後に生じたときは、脱血を中止し、採血側より補液し、返血側より返血を続けつつ反応を見ながら次の処置を考慮する。

症状が経過中に生じたときには、さらに低カルシウム血症に起因するものでないかを考慮しつつ、対応を取る。

(4) 血小板凝集

特に、採取開始時の血小板数が多いドナーからの末梢血幹細胞採取では、回路内で血小板凝集が生じることにより、効率の良い幹細胞の回収が困難になる場合がある。特に遠心分離装置より流出した直後の細胞浮遊液に凝集が認められる場合には早急な対応が必要である。遠心後は問題なく、返血路のローターでしごかれた後に発生した凝集は、静置することで回復する場合が多い。凝集が生じた場合には、ACD-A 液の流入比率を増す(多くの場合は同時に脱血流量を下げる。)ことで改善を図る。

(5) 回路の閉塞、脱血困難

血管確保の不調による脱血圧の低下、返血圧の上昇に際しては、抗凝固された回路内では約 3 分間程度は機械が停止した状態でも問題は生じないので、その程度の時間内であれば、体外循環を中止した状態で血管の再確保を行う。脱血もしくは返血不能の状態が続くことが予想される場合には、血液の代わりに、10mL/分程度の低流量で生理食塩水を流しながら、遠心分離装置を止めることなく血管を確保し再開する。

おわりに

ドナーからの末梢血幹細胞採取は、骨髄採取に比べて明らかに終了後のドナーの負担が少ない方法である。また、現在までに、ドナーに対する長期的合併症についても、大きな問題はないであろうと考えられている。一方で採取に関連した可能性のある死亡の報告は、すべて海外からで、血縁ドナーでは 11 例で報告され、そのうち 2 例はアフエレーシス、血管確保に直接関連したミスであり、6例は血管障害、1 例は病歴聴取の不備(鎌状赤血球症)であった(表2)。手技的な問題の確認と、適切なドナー選択によって回避可能な例が多いことが推測される。このほか非血縁ドナー1名の、内頸静脈確保時のミスでの死亡が報告

されている¹²⁾。わが国でも最近、自家末梢血幹細胞採取のための内頸静脈確保に関連した死亡例が報告された。

このように、全身麻酔を必要としない末梢血幹細胞採取においても、死亡例がむしろ骨髄採取より多い点は忘れてはならない。しかし適切な管理で危険を回避可能であることが推測される。一方で、末梢血幹細胞採取は骨髄移植に比べて、明らかに採取後のドナーの負担は少ない。また、G-CSF の投与も、米国では、ボランティアドナーに対しても初回と採取直前をのぞいて基本的に自宅で行われ、一部では自己注射も行われている¹¹⁾。G-CSF の外来投与をはじめ、末梢血幹細胞採取の利点を利用しうる診療体制の確保によって、今後さらに、現在わずかしかな行われていない非血縁者間の末梢血幹細胞移植(採取)も、実施する機会が増すことが予想される。最後に当科で使用を検討中の、幹細胞採取、ドナーリンパ球採取、顆粒球採取用の指示書案を添付した。途中での収量等を見ながら、アフエレーシスの現場で追記してゆく形を取っている。参考にしていただければ幸いである。

表 2 末梢血幹細胞採取での血縁ドナー死亡例

症例	発生年	年齢・性別	発症日	死因
1	1997 年以前	61 歳・女性	採取 4 日後	心不全(気管支喘息・高血圧・冠動脈疾患があった)
2	1997 年以前	57 歳・女性	帰宅後 24 時間以内	脳卒中(既往歴不詳)
3	1996 年	64 歳・男性	G-CSF 投与終了後	心筋梗塞(冠動脈疾患があった)
4	1998 年	73 歳・男性	採取数日後	脳血管障害(高血圧・狭心症の既往歴があった)
5	2000 年以前	67 歳・男性	G-CSF 投与 6 日目頃 (4 日目と 6 日目に採取)	硬膜下血腫(腹部大動脈瘤手術歴・心筋梗塞の既往があった)
6	1999 年	47 歳・男性	G-CSF 投与 4 日目	鎌状赤血球貧血クライシス (鎌状赤血球貧血の既往があった)
7	2000 年以前	未報告・男性	未報告	脳血管障害(既往歴不詳)
8	2001 年以前	50 歳・女性	カテーテル抜去直後	空気血栓(内頸静脈にカテーテルを挿入し採取した事例における採取時技術ミス)
9	不詳	43 歳・男性	15 日後死亡 (発生日不詳)	心拍停止(高血圧・喫煙者・採取との関連は不明)
10	不詳	52 歳・男性	17 日後死亡 (発生日不詳)	心拍停止 (喫煙者・採取との関連は不明)
11	不詳	27 歳・男性	採取時	心拍停止(採取時技術ミス)

(骨髄バンク「ドナーのためのハンドブック」より改変引用)

造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト

＜ 採取指示書 ＞ 採取日； 20 . 月 日 No1

採取方法； ☐末梢血幹細胞（自家・同種） ☐ドナーリンパ球 ☐顆粒球 採取回数；1・2・3 回目

主治医；_____（血液内科・小児科）

ID；_____ 氏名；_____ 性別；男・女 年齢；_____才

レシピエント情報；血縁；ID _____ 氏名 _____ 非血縁；バンク ID _____ -

リドカインアレルギー（ なし ・ あり ） 特記事項：

		指示者	指示受	施行者
使用機器	<input type="checkbox"/> Spectra Optia <input type="checkbox"/> COBE Spectra			
目標細胞数	<input type="checkbox"/> CD34 陽性細胞総数 _____ ×10*8個 体重当たり： _____ ×10*6/kg 個 <input type="checkbox"/> リンパ球数 _____ ×10*8個 もしくは CD3陽性細胞総数 _____ ×10*8 個 体重当たり： _____ ×10*6/kg 個 <input type="checkbox"/> 顆粒球 _____ ×10*9 個			
入力情報 当日データ	身長：_____ cm 体重： _____ kg 小児 25kg 以下 TBV： _____ mL 血液処理上限量 _____ mL (受血者体重 _____ kg)	WBC： _____ ×10*3/ μ L Ht : _____ % (初期設定 _____ %) PLT： _____ ×10*4/ μ L		
カルチコール量	<input type="checkbox"/> 自家：カルチコール 20A+生食 500mL ヘース 100mL/h開始～150mL/hまで <input type="checkbox"/> 同種：カルチコール 15A+生食 500mL ヘース 80mL/h開始～120mL/h まで <input type="checkbox"/> 小児：カルチコール4A+生食 100mL ヘース 10～20mL/h			
パスキュラ アクセス	返血ライン <input type="checkbox"/> (右・左) 肘部・前腕部・手背静脈 <input type="checkbox"/> _____ 穿刺針 <input type="checkbox"/> クランピングチューブ付メデ'イカットカニューラ 17G <input type="checkbox"/> スーパーキャス(20G・22G) <input type="checkbox"/> _____ 脱血ライン <input type="checkbox"/> (右・左) 大腿静脈 <input type="checkbox"/> (右・左) 肘部・前腕部静脈 <input type="checkbox"/> 小児(右・左) _____ 動脈 穿刺針 <input type="checkbox"/> メデ'イカットカニューラ 16G <input type="checkbox"/> アンギ'オカット 22G <input type="checkbox"/> _____			
小児 25kg 以下	カスタムプライム : RBC2 単位 200ml 使用 Ht _____ % 流量 50ml/分 リンスバック : <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり			
採取流量 上限	<input type="checkbox"/> 自家：患者体重 kg × 1.6mL/分まで = _____ mL/分まで (AC 比； 1:12～15 まで) <input type="checkbox"/> 同種：ドナー体重 × 1.2mL/分まで = _____ mL/分まで (AC 比； 1:8～12 まで)			
サンプリング	<input type="checkbox"/> PB 時 _____ mL 処理時 採取回数 _____ 回目予定 自家：総採血量が 体重 kg × 100mL に近似する時点で 同種：総採血量が ドナー体重 × 50mL に近似する時点で <input type="checkbox"/> DLI 時 1500mL 処理時 <input type="checkbox"/> 顆粒球時 _____			
最終採取量	_____ mL 採取工程 _____ 回まで (Optia 時)			
細胞処理	分割方法 _____ 分割 もしくは比率 _____			
	No1. _____ g	No2. _____ g	No3. _____ g	No4. _____ g
	No5. _____ g	No6. _____ g	No7. _____ g	No8. _____ g
自己多血小 板血漿 返血基準	輸注 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし 自家：翌日採取がある場合、血小板数 5 万/ μ l 以下、 ない場合は、1.5 万/ μ L 以下で輸注 血縁：翌日採取がある場合、血小板数 10 万/ μ L 以下、 ない場合は、5万/ μ L 以下で輸注 非血縁：翌日採取がある場合、血小板数 10 万/ μ L 以下、 ない場合は、8 万/ μ L 以下で輸注			

参考文献

- 1) Storb R, Epstein RB, Sale GE, et al. Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of the baboons by cross circulation. *Blood*. 1977;50:537-42.
- 2) Korblyng M, Dorken B, Ho AD, et al. Autologous transplantation of blood-derived hematopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood*. 1986;67:529-32.
- 3) Gianni AM, Siena S, Bregni M, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet*. 1989;2:580-5.
- 4) Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*. 2005;201:1307-18.
- 5) 日本造血細胞移植学会、日本輸血・細胞治療学会編. 造血細胞移植 同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン(2010年6月30日 改訂第4版) (<http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Document/Guideline/Ref10-2.pdf>)
- 6) 日本骨髄バンク. 非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル 暫定版 2010 (http://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/f-up03a.pdf)
- 7) Waller CF, Bertz H, Wenger MK, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: efficacy and toxicity of a high-dose rhG-CSF regimen. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18:279-83.
- 8) Vasu F, Leitman SF, Tisdale JF et al. Donor demographic and laboratory predictors of allogeneic peripheral blood stem cell mobilization in an ethnically diverse population. *Blood*. 2008;112:2092-10.
- 9) Hölig K. G-CSF in healthy allogeneic stem cell donors. *Transfus Med Hemother*. 2013;40:225-35
- 10) Anderlini P, Korblyng M, Dale D, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors. *Blood*. 1997;90:903-8.
- 11) Miller J. Filgrastim-mobilized peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation with unrelated donors. A protocol of The National Marrow Donor Program.Ver14.0, 2009
- 12) 日本骨髄バンク. ドナーのためのハンドブック 2013 (http://www.jmdp.or.jp/documents/file/02_donation/handbook20131001.pdf)
- 13) Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry*. 1998;34:61-70.

(上田恭典)

第3章 末梢血幹細胞採取における看護師の役割

アフエレーシス

アフエレーシスはリスクを伴う侵襲的手段であり、アフエレーシスに伴う危険性を十分に理解し、注意深くアフエレーシスを実施することが要求される。

安全なアフエレーシスを行うには、アフエレーシスの実施体制を整備する必要がある(図 1)。アフエレーシス全体に責任を持つ責任医師は、輸血部門の責任者かつ輸血認定医であることが望ましいとされている。アフエレーシスを行う血液成分採血装置の運転操作や管理は臨床工学技士が担当し、また現場でドナーや患者のケアを担う看護師は、学会認定のアフエレーシスナースであることが理想的である。アフエレーシスは、責任医師の監督の下このようなスタッフが連携して行われている。その中でも看護師は、患者やドナーと身近に接する機会が多く、アフエレーシスに関する正しい知識と看護技術を習得することは、より質と安全性の高いアフエレーシスが提供できると考えられる¹⁾。

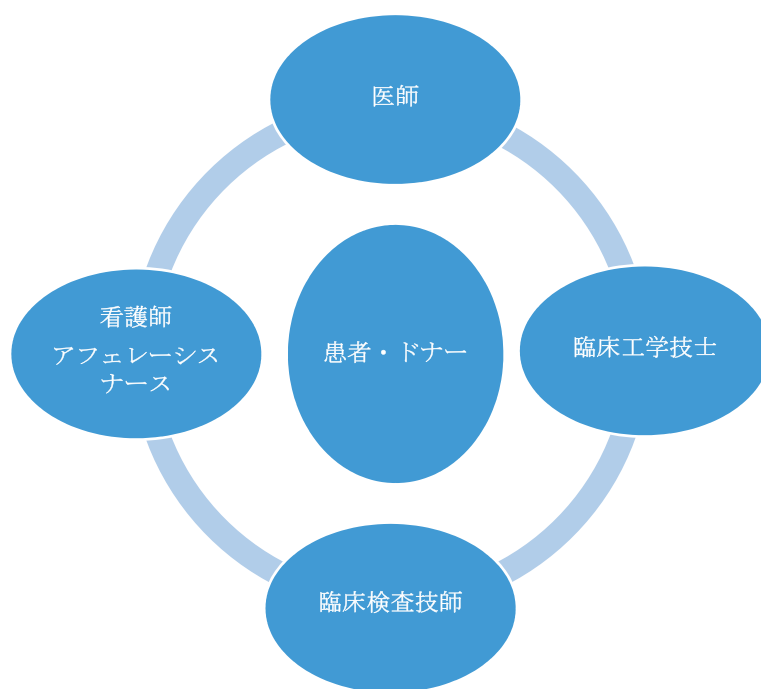


図1 アフエレーシスの実施体制

アフエレーシスにおける看護師の役割

- ① アフエレーシスの原理と血液成分採血装置の操作方法を理解している。
- ② アフエレーシスに関係した様々な副作用の対応が出来る。
- ③ 採取中の観察が行え、症状の早期発見が出来る。
- ④ 身体面、精神面などの苦痛を緩和出来る看護技術が提供できる¹⁾。

アフレーシス看護の実際～神鋼記念病院での取り組み～

神鋼記念病院でのアフレーシス看護の実際を例として述べる。

(1) アフレーシスの事前準備

1) オリエンテーションの実施

パンフレットやクリニカルパスを用いてアフレーシスの流れ、注意事項を説明し採取前の疑問の解決や不安の軽減を図る(図 2)。

2) 患者、ドナーの情報収集

採取への受け止め方、思い、理解度、体調などを情報収集し、患者及びドナーの身体的、精神的状況を把握する。

3) 穿刺する静脈の確認

上肢の血管からルート確保ができない場合は、深部静脈からのルート確保となるため、静脈血管を確認しておく。このことについて、あらかじめ患者及びドナーの承諾を得ておく。骨髄バンクドナーの場合には、上肢である程度太い血管を確保できないドナーは末梢血幹細胞ドナーとして不適格とするが、適格と判断されていたドナーが、採取当日に血管確保できなかった場合には、習熟した医師による大腿静脈へのアクセスのみ可能とされている⁹⁾。

4) 同意書の確認

採取前日までに、採取同意書等の書類を確認する。

5) 必要物品の準備

- ①血液成分採血装置、②機器で使用する専用回路および薬剤(生理食塩液 1,000mL、ACD-A 液)、
③チューブシーラー、④シリンジポンプ、⑤グルコン酸カルシウム溶液(5mL)×6 本、
⑥生理食塩液 20mL(当院での使用量)、

＜ルート確保に必要な物品＞⑦消毒用アルコール綿、⑧イソジン®、⑨固定用テープ、⑩駆血帯、

- ⑪滅菌手袋、⑫ペアン 2 本、⑬16-18G 穿刺針 2 本、⑭ペンレス® 2 枚、⑮ハンドクリップ、⑯止血バンド

＜その他＞心電図、酸素飽和モニター、血圧計、体温計、便器又は尿器、ガーグルベースン、
採取記録用紙、救急カート、酸素、吸引器

テレビ、DVD、掛け物、タオル、クッション、ティッシュペーパー

6) 血液成分採血装置の準備

実際に看護師が採取操作をしない場合でも、データ入力(性別、身長、体重、ヘマトクリット値など)の設定時は、指差し呼称しながら一緒に確認する。

入退院診療計画書

年 月 日

末梢血幹細胞採取を受けられる方へ 署名		様		担当医	看護師
入院日	月 日 ()	採取日	月 日 ()	採取日	月 日 ()
		1日目	2日目		
採取に對する不安がない		・疼痛がコントロールできる ・採取に伴う副作用がない			
処置		<ul style="list-style-type: none"> ・採血と体重測定があります。 ・7時と19時に皮下注射をします (採取が終われば注射はありません) ・採取開始時間は、10時頃を予定しています。 ・採取の30分前に、採血部位に痛みを和らげるテープをはります。 ・採取室で心電図モニター、血圧計、酸素飽和モニターをつけます。 ・採血用と返血用の2本の回路が必要なため、両方の腕の血管に針をします。 ・採取が始まれば適宜血圧、脈、体温などをはかります。 ・採取が終われば、腕の針を抜きます。 ・腕の血管が細い場合には、足の付け根の太い血管にカテーテルを挿入します。 			
食事		<ul style="list-style-type: none"> ・特別な栄養管理(有 無) ・制限はありません ・朝食は、食べて下さい。 ・採取中は、食事を取れません。必ず飲み物とストローをご持参ください。 			
安静度		<ul style="list-style-type: none"> ・制限はありません。外出は可能ですが、届けの記入をお願いします。 			
排泄		<ul style="list-style-type: none"> ・採取中は、面胸や体の動きが制限されます。体の向きを変えたり、痛みがあれば遠慮なく看護師にお知らせください。 ・採取中は、ベッド上での排泄となります。カーテンを閉め、スタッフは扉を外すなど、できるだけ配慮させていただきます。 ・足にカテーテルを挿入している場合は、採取後はトイレ歩行のみできます。 			
清潔		<ul style="list-style-type: none"> ・入浴は控えてください。採取後4時間以降であればシャワーは出来ます。 ・入浴は控えてください。 			
その他		<ul style="list-style-type: none"> ・1回の採取時間は約3時間です。ラジオやCD等を準備して頂いてもかまいません。 ・テレビやDVDを観ることができます。観たいDVDがありましたらご持参ください。 ・採取が始まると血液が機械に流れる時に、血液が固まるのを防ぐために抗凝固剤を使用します。 ・そのため血液の中のカルシウムが少なくなり、唇や手の先がしびれるという症状が出る場合があります。 ・それを予防するためにカルシウム剤を注入しながら血液を体に戻しますが、気分不快などの体の不調があまりありません。 ・カテーテルを挿入した場合には、必要量の細胞数を確認してから、カテーテルを抜きます。 ・カテーテルを抜いた後は、止血が確認できるまでベッド上で安静にして頂きます。 			
		<ul style="list-style-type: none"> ・白血球を増やす注射の副作用に発熱、頭痛、腰痛、関節痛、発疹、動悸、下痢のむくみ、悪心・嘔吐、ふらつきなどがあります。薬剤で症状を和らげることができます。 			

～採取が安全で楽に行えるようお手伝いさせていただきます。遠慮なく何でもお話しください～

医療法人社団神鋼会 神鋼病院 血液内科

図2 神鋼記念病院 クリニカルパス「末梢血幹細胞採取を受けられる方へ」

(2) アフェレーシス開始までの看護

- 1) 検査データの最終確認や当日の体調について問診を行い、バイタルサインをチェックし採取困難な体調不良が無いことを確認する。
- 2) 穿刺部に局所麻酔剤のリドカインテープ(ペンレス®)を、アフェレーシス開始 30 分前に貼付し、穿刺部の疼痛緩和を図る。
- 3) 患者及びドナー来室時は、名前を名乗ってもらい、リストバンドなどで本人確認を行い同時に同意書の確認も行う。
- 4) 排泄を済ませている事を確認しベッドへ案内し臥床させる。
- 5) 声掛けにて緊張をほぐして、テレビや DVD など気持ちリラックス出来る環境を整える。
- 6) 心電図・酸素飽和モニター、血圧計を装着する。
- 7) 穿刺は、医師又は医師の指示の下であれば看護師の穿刺は可能であるが、穿刺が深すぎた場合には、動脈穿刺、神経損傷を起こす危険性があり慎重に穿刺を行う。穿刺時の痺れ、灼熱間、電激痛などの訴えに注意し損傷の可能性があれば、直ちに抜針しアフェレーシスを中止する。両側前肘部の静脈を用いることが望ましいが、ルート確保が困難な場合は、深部静脈からの確保となる。しかしあらかじめ患者及びドナーの了承と同意書が必要である。
- 8) ラインの接続、穿刺ルートの固定を確実にを行う。

< 穿刺部位の消毒 >

1. 穿刺者は、あらかじめ手洗いをしておく。
2. ヨード過敏症の有無を確認する。
3. 消毒後は穿刺部位に絶対に触れない。
4. 血管を探りながら穿刺する場合には、必ず滅菌手袋を着用する。

< 穿刺部位の消毒方法 >

1. 穿刺部位を中心に 70%イソプロパノールまたは消毒用エタノールで皮膚の汚れをふき取る(全方向にわたって綿球を変えて行う)。
2. 10%ポビドンヨード液を用いて、穿刺部位から外側に向かって 8 cm 程度、同心円を描くように消毒する。
3. ポビドンヨード液では少なくとも 2 分以上、ポビドンアルコールでは少なくとも 30 秒以上乾燥させる。ポビドンヨードは原則としてアフェレーシス終了まで除去しない。
4. ヨード過敏症の患者には、ポビドンヨードの代わりに 0.5%グルコン酸クロルヘキシジンアルコールを用いる³⁾。(日本自己血輸血学会の採血部位の消毒方法を推奨する)

(3) アフェレーシス中の看護

- 1) 採取が開始すれば、全身倦怠感、手足の痺れや気分不快などがあれば、直ぐに伝えるように声をかける。
- 2) 採取中は、シリンジポンプに準備したグルコン酸カルシウムを持続投与する。
(グルコン酸カルシウム溶液(5mL)6A+生食 20mL を 16mL/ hr)。
- 3) 心電図、酸素飽和度、血圧のモニターを行い、アフェレーシス中は常時監視体制を取り、バイタルサイン、患者及びドナーの状態、穿刺部位、採取の様子を観察する。フローシートや電子カルテに、アフェレーシスの全過程を記録する(図 3)。症状が出現した場合の早期発見に努める(全身倦怠感、血管迷走神経反射、低カルシウム血症など)。
- 4) 採取による苦痛な思いを緩和するための看護援助を行う(適宜体位変換、水分摂取の介助、掻痒感、排泄、室温調整、寝具類の調整など)。特に水分をこまめに補給することは、副作用防止にも繋がる。また、必要に応じてマッサージを行うなどして緊張を和らげる。
- 5) 採血側の血流が不安定な場合には、マンシェットを利用して更に圧迫を(30～40mmHg 程度)加えるか、ハンドクリップを使用すると血流の安定化が得られる。
- 6) アフェレーシス中、血液成分採血装置の異常、トラブルへの対応は迅速に行い、不安感や不信感を与えないようにする。不安感や気分不良などへつながりやすい。トラブルに遭遇した場合、事情を適切に説明し対応する。
- 7) 急変時に迅速な対応ができるように、緊急時発生マニュアルや協力体制を整えておく。

末梢血幹細胞採取フローシート

月日氏名:

目標:①末梢血幹細胞が安全安楽に採取できる②採取に対する不安を軽減する③副作用を早期に発見する

時間		入室時 (:)	開始直後 (:)	30分・1時間 (:)	90分・2時間 (:)	150分・3時間 (:)	終了直後 (:)
HR	T BP						
140	40 170						
120	39 150						
100	38 130						
80	37 110						
60	36 90						
40	35 70						
30	34 50						
ルームモニター		装着	→	→	→	→	OFF
SpO ₂							
(注射)							
カルチコール		→	→	→	→	→	→
(観察項目)							
穿刺部痛							
口唇痺れ							
手指痺れ							
チアノーゼ							
冷汗							
頭痛							
全身倦怠感							
嘔気・嘔吐							
腰痛							
看護記録							
サイン							

図 3 神鋼記念病院「末梢血幹細胞採取フローシート」

(4) アフェレーシス中の副作用と合併症の予防と対処について

1. 全身倦怠感
2. 血管迷走神経反射
3. 低カルシウム血症
4. 血小板減少
5. 神経損傷
6. 動脈穿刺
7. 呼吸困難
8. アレルギー反応
9. 血栓性静脈炎

1) 全身倦怠感

約 30%で全身倦怠感を訴える²⁾。少しでも疲労感が軽減出来るように、リラックスさせるような会話や環境を作り、適宜体位変換やマッサージ、水分摂取の介助を行う。

2) 血管迷走神経反射 (vasovagal reaction; VVR)

採血に伴う副作用としては最も頻度が高い。採血中、または採血前に起こることもある。心理的不安、緊張、睡眠不足、若しくは採血に伴う神経生理学的反応による。採取中は、声掛けを多く行い表情や返答に異変がないか注意し初期症状の段階で発見できるようにする。

① 症状

気分不良、顔面蒼白、冷汗、悪心、あくびなどが見られる。さらに嘔吐、腹痛、意識消失、痙攣などが出現する。バイタルサイン上、血圧低下、徐脈、呼吸数低下がみられる。

② 対処方法

- ・ 心電図モニターの準備は必須であり、バイタルサインを確認する。
- ・ 患者及びドナーに安心するよう声をかけ、同時に仰臥位にして下肢を挙上する。
- ・ 衣服をゆるめ、足元は保温する。
- ・ 悪心がある場合は、ゆっくりと深呼吸させ、嘔吐に備えて顔を横に向けガーグルベースンを準備する。
- ・ 採血速度の流量を落とす。または採血を一時中断する。
- ・ 発見時は、医師に報告し指示を受ける。アトロピン硫酸塩、エチレフリン塩酸塩、エフェドリン塩酸塩などを直ちに静注するための準備をしておく。低血圧が改善しない場合、乳酸加リンゲル液または生理食塩液にて輸液を行う。
- ・ 失神した場合は、名前を呼ぶなど声をかける。また舌根沈下の恐れがある場合は気道確保を図る。
- ・ 回復後は水分補給を行い十分休息させる。

表1 血管迷走神経反射(VVR)の判定基準

	必須症状	他の症状
I 度	血圧低下 徐脈 (>40/分)	顔面蒼白・冷汗 悪心などの症状を伴うもの
II 度	I 度に加えて意識消失 徐脈 (≤40/分) 血圧低下 (<90mmHg)	嘔吐
III 度	II 度に加えて痙攣・失禁	

- 1) 必須症状・所見がなければ、血管迷走神経反射とは言わない。
- 2) II 度では、意識消失の症状を認めることを必須とする。なお、嘔吐をみても必須症状が II 度に該当しなければ I 度とする⁴⁾。

3) 低カルシウム血症

抗凝固剤として用いる ACD-A 液によりクエン酸中毒を発生することがある。採取後半に出現することが多い。

①症状

手指、口唇のしびれ感、倦怠感、寒気、気分不快で始まり、さらに悪心、嘔吐、痙攣、意識消失に至ることもある。

②対処方法

- ・ 症状が軽度の場合には、ACD-A 液を減量するか返血速度を遅くするなどして経過観察をする。
- ・ 投与中のグルコン酸カルシウムの速度を速める。
- ・ グルコン酸カルシウム 5～10mL/hr の持続注入によってほとんどの場合予防することができる。しかし、アフエレーシス中はクエン酸中毒の危険(10mL/hr のカルシウム液の持続注入でも発生しうる場合がある)がありうるので注意する²⁾。

4) 血小板減少症

アフエレーシスにより、血小板は減少するため、採血ライン、返血ラインの抜針後、十分に圧迫し止血を確認する。出血傾向を避けるため、G-CSF 投与時からアフエレーシス終了までアスピリン製剤は使用しない²⁾。

5) 神経損傷

静脈採血では、筋膜上の皮神経(知覚神経)や肘部静脈上の皮神経を損傷することはあっても、正中神経など重大な神経を損傷することはない。しかし稀に穿刺針を深く刺入することにより筋膜を貫き正中神経を損傷することがある⁵⁾。

①症状

穿刺時の痺れ、灼熱感、電激痛を訴える。

②対処方法

- ・ 神経損傷の可能性があれば、直ちに抜針しアフエレーシスを中止する。
- ・ 疼痛の部位、程度、運動障害、知覚障害の有無を調べる。
- ・ 局所の保温と安静を促し専門医（ペインクリニック）などを受診する。
- ・ 医師の判断のもとで十分に経過を観察する。

6) 動脈穿刺

穿刺が深すぎた場合には動脈を損傷することがある。

①症状

皮下出血、肘関節部の圧迫感、腫脹、

②対処方法

ただちに抜針し、約 30 分圧迫し 1 時間程度安静を保ち止血を確認する。24 時間は軽い圧迫を加え固定し止血の再確認を行う⁶⁾。

7) 呼吸困難

空気塞栓は、返血ルートから空気が入ることにより生じる。カテーテル抜去直後に生じた報告もある⁷⁾。また肺水腫やアナフィラキシーでも呼吸困難を生じることがある。

①症状

胸痛、呼吸障害からショックとなる。

②対処方法

直ちにアフエレーシスを中止し酸素投与を行う。

8) アレルギー反応

成分採血キットの滅菌に使用されているエチレンオキサイドガス(EOG)などが原因で起こる。

①症状

蕁麻疹、発熱、喘鳴などがみられる。

②対処方法

抗ヒスタミン剤などの使用。

9) 血栓性静脈炎

皮膚消毒が不完全な場合や、消毒液による炎症などにより症状が出現する。また汚れた手で穿刺部位に触れ、リンパ管炎を起こすことがある。穿刺部位の確実な消毒方法と清潔操作で行うことが必要である。その他、G-CSF 投与により著明な白血球上昇、特に骨髓回復期からの急激な変化のため、数々の身体反応を伴うことがあり、呼吸困難、間質性肺炎をきたすこともあるため採取後も慎重な経過観察が必要である⁴⁾。

①症状

穿刺部位から静脈の走行に沿った上行性の発赤腫脹、線状の硬結やリンパ節の腫脹、牽引痛がみられる。

②対処方法

本症を疑う場合は、専門医を受診する

（５）アフエレーシス後の看護

- 1) 止血を確実にを行い出血や血腫を防ぐ。翌日の穿刺と採取に大きく影響するため、採血部位の観察を十分に行う。
- 2) バイタルサイン、体調や疲労感を確認し、採血（血算・生化学検査）を行う。
- 3) 初回排泄は看護師の見守りで行う。血管迷走神経反射などの意識喪失による転倒、打撲による二次的事故を防ぐ。男性は座位で排泄するように説明する。
- 4) 採取バッグの外観、採血量、採取バッグのラベルを確認する。ラベルには、氏名、生年月日、ID 番号、診療科名、採血者、採取月日、末梢血幹細胞など、個人を確認できる内容記載する。また採取バッグから細胞数・CD34 陽性細胞測定用サンプルを取り、速やかに検査室へ届ける。
- 5) 血液成分採血装置の最終確認をする（採血量、ACD 液使用量、処理量、時間）。
- 6) 採取後の注意点を説明し（図4）、採取の労をねぎらう。
- 7) 病棟看護師へ採取の経過や採取後の注意点を申し送り、車椅子で病室へ帰室する。
- 8) アフエレーシス中の全過程を記録用紙や電子カルテに記録する。
- 9) 健常人ドナーからの末梢血幹細胞採取に関するガイドラインより、採取終了時の血小板数が、 $80,000/\mu\text{L}$ 以下では自己多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) を作成してドナーに返血することが望ましい。また、このような場合には翌日以降の採取を中止することを考慮する²⁾。

おわりに

アフエレーシスには、看護師が担える役割が多くある。採取前のオリエンテーションの実施は、患者およびドナーとの信頼関係を築く機会となり、アフエレーシス当日の安心感に繋げられる。また事前に得られた情報により、問題の早期発見、重症化予防が行え、アフエレーシスの安全と質を向上させることができる。看護師が、アフエレーシスに関する知識と必要な看護能力を身に付け、看護の役割をアフエレーシスの中で、発揮し活動していくことが望まれている。

末梢血幹細胞採取を受けられた方へ

（採取後の注意）

- ① 採取部位は、もまずに圧迫します。
- ② 止血バンドは1時間後に看護師が外します。
- ③ 水分を十分に補給しましょう。（水、お茶、ジュースなどで）
- ④ 激しい運動はさけましょう。
- ⑤ 食事はきちんととり、早めに休息をとりましょう。
- ⑥ 採取直後の喫煙は、避けて下さい。
- ⑦ 当日は入浴を控え、採取後4時間以降であればシャワーは可能です。翌日の入浴は可能ですが、体調に変化がある場合はやめましょう。
- ⑧ 特に、2時間以内は重い荷物を持ったり、力を入れすぎないようにしましょう。
- ⑨ 針を刺したところや周りが、青くなったり腫れたりすることがあります。通常は、自然に1～3週間で治りますが、気になる場合はご相談下さい。
- ⑩ 採取後、1週間程度は過度の運動（マラソン、水泳など）は避けて下さい。
- ⑪ 痛みが出たり、気分が悪くなられたら早めに、看護師又は採取担当医師にお知らせ下さい。

（採取後1カ月間の注意）

末梢血幹細胞採取から約1か月間は以下のような副作用が起きる可能性がありますので、ご自身の健康管理に十分に注意して下さい。当てはまる症状が見られる場合はご連絡下さい。緊急を要する場合は、救急医療をお受け下さい。その際、医療機関へ末梢血幹細胞採取を行った事をお伝え下さい。

○頭痛 ○胸の痛み ○出血しやすく、血がとまりにくい ○下肢のむくみ ○発熱
○貧血症状（めまい、ふらつき）

連絡先

〒651-0072

神戸市中央区脇浜町1丁目4-47

TEL078-261-6711（病院代表）

神鋼病院 血液内科 採取担当医_____にご連絡下さい。

採取後1週間～1か月までの間に、採取後の健康診断に来て頂きます。

外来受診日 月 日 曜日 時

図4 神鋼記念病院「末梢血幹細胞採取を受けられた方へ」

参考文献

- 1) 室井一男(監). 理想的なアフエーシスをめざして. DVD. 桜映画社, 2013.
- 2) 日本骨髄バンク. 非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル暫定版. 2010.
- 3) 日本自己血輸血学会. 貯血式自己血輸血の概要と実際:安全な自己血輸血の推進を求めて. 改訂第3版. 東京:日本自己血輸血学会; 2011. p.16-17.
- 4) 厚生省血液研究事業. 供血者保護のための採血基準設定に関する研究. 昭和59年度研究報告書. 1985.
- 5) 坂井建雄、橋本尚詞. 上肢の血管と神経, 全部わかる人体解剖図. 東京:成美堂出版; 2010. p.224-5.
- 6) 大戸斉、室井一男編. 末梢血幹細胞採取と成分採血, 医師と看護師によるアフエーシスの理解と実践. 大阪;医薬ジャーナル社; 2011. p.64-7.

(松本 真弓)

第4章 骨髄バンクドナーのコーディネートについて

はじめに

同種造血幹細胞移植は、白血病に代表される造血器悪性腫瘍の根治的治療の一つとして広く行われている。現在、移植細胞源としては、骨髄、末梢血幹細胞、臍帯血が利用可能であり、患者の状況やヒト白血球抗原(human leukocyte antigen; HLA)一致同胞の有無等を考慮して、その選択が行われている。移植細胞の違いは、生着や移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)、移植関連合併症等に影響をもたらすことが知られているが、移植前処置や GVHD 予防の工夫および支持療法や合併症に対する治療の進歩によって、移植細胞による治療成績の差異はなくなりつつある。

一般に HLA 一致同胞ドナーが第一選択になるが、HLA 一致同胞が得られる確率は4分の1である。従って、血縁者の中で HLA の一致したドナーを見つけれられる患者は約30%にとどまっている。本邦における最近の同種造血幹細胞移植は3,000件/年を超え、移植細胞源の内訳は、血縁ドナー、骨髄バンクドナー、臍帯血が各3分1となっている。少子化という時代背景も含め、骨髄バンクおよび臍帯血バンクの充実が求められている。本項では、公益財団法人 日本骨髄バンク(以下、骨髄バンク)のドナーコーディネートについて概説する。

骨髄バンクの現状

骨髄バンクのドナー登録は1992年に始まり、1993年1月に骨髄バンクを介した1例目の非血縁者間骨髄移植が行われた。末梢血幹細胞の提供は2010年10月に保険収載され、2011年3月に1例目の非血縁者間末梢血幹細胞移植が行われた。2015年5月末現在で、ドナー登録数は451,982人、患者登録数は2,767人、移植数の累計は18,253例となっている。

「移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律」(2013年12月に施行)によって、移植に用いる造血幹細胞(骨髄・末梢血幹細胞・臍帯血)の適切な提供の推進に関して、基本理念が定められ、国の責務等が明らかにされた。これに伴い、骨髄バンクは、骨髄・末梢血幹細胞のあっせん事業として規制を受けることになり、これまで以上に、提供する造血幹細胞の質の担保とドナーの安全確保が求められることになった。

骨髄バンクドナーのコーディネートの実際

(1) ドナー登録から最終同意面談まで(図1)

ドナーの登録は、日本赤十字社の献血ルームや献血併行型集団登録会、ドナー集団登録会などの機会に行われる。ドナーと患者の HLA が適合すると、候補者になったことがドナーに通知され、提供の意思確認・健康状態やご家族の意向等のアンケートが行われる。次に、最寄りの施設で確認検査(コーディネーターからの詳しい説明、調整医師による医学的な説明、問診・採血)を行う。問診や血液検査で異常がないことが確認されると、ドナーに最終同意面談の連絡がされ、コーディネーター、調整医師、立会人同席のもとにドナーとご家族の最終的な提供意思の確認が行われる。ドナー候補の通知から最終

同意までには通常～3 ヶ月を要し、ドナーは最終同意後に提供意思の撤回はできない。この時点で、ドナー側および患者側の希望を合わせて、骨髄提供か末梢血幹細胞提供か、最終決定が行われる。

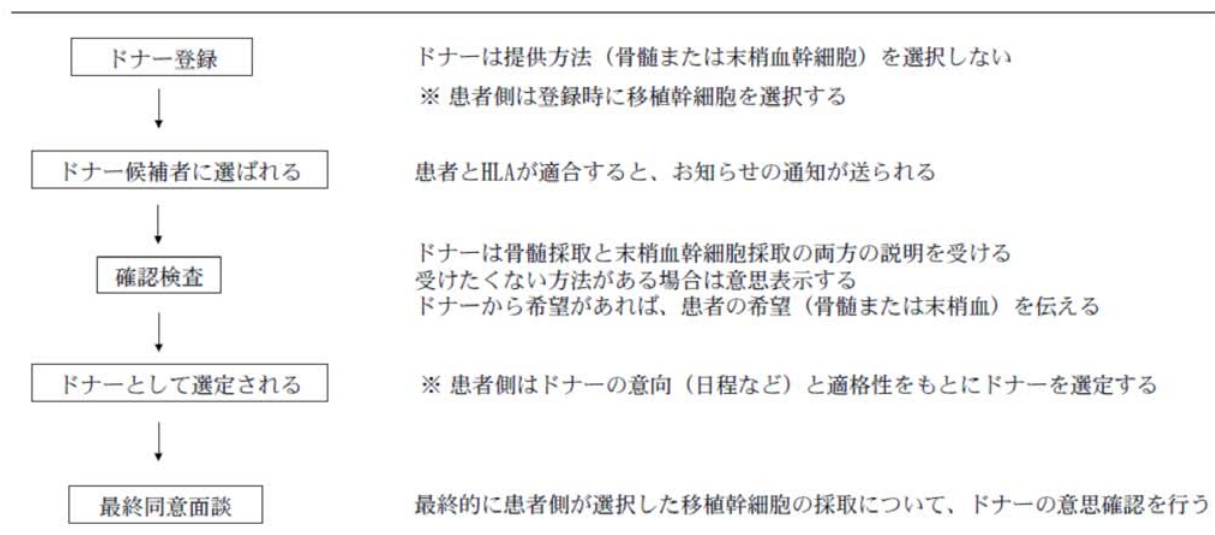


図1 ドナー登録から最終同意面談まで

（2）最終同意面談から骨髄採取・末梢血幹細胞採取まで（図2）

最終同意後に採取施設が決定され、提供日の約1ヶ月前に採取施設（骨髄バンクの認定施設）で、最終的な健康診断が行われる。

骨髄提供の場合は、必要に応じて自己血の貯血（400～800mL）が行われる。骨髄提供に要する入院期間は3泊4日が最も多く、ドナーは入院後にも血液検査を含む健康チェックが行われる。骨髄採取は全身麻酔下で行われ、患者が成人の場合は800～1,200mLの骨髄液が採取される。これにより、通常 $2 \sim 3 \times 10^8$ 個/患者体重の有核細胞が採取可能である。

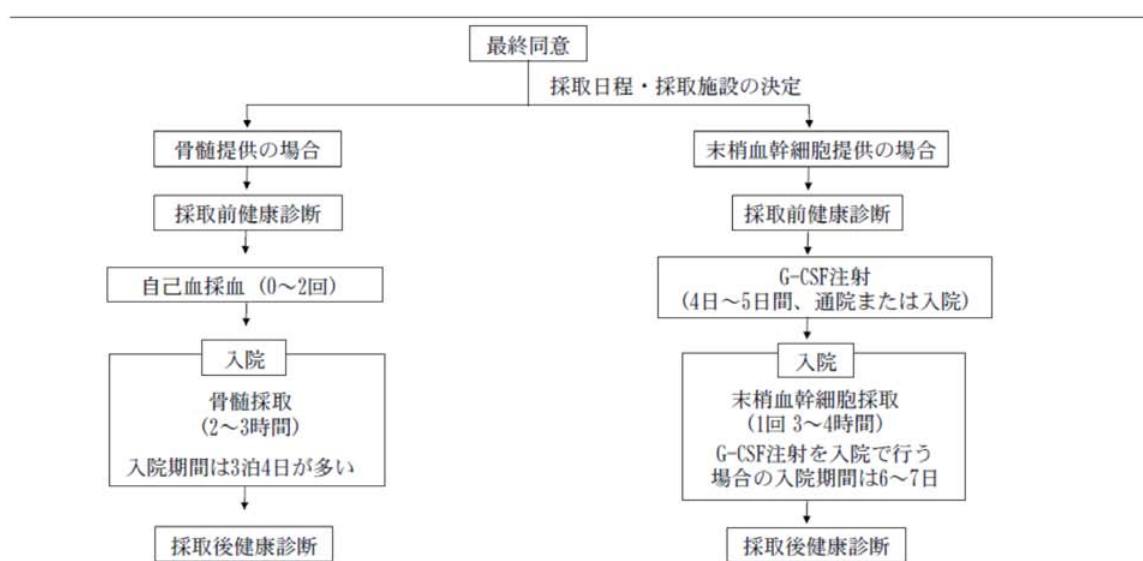


図2 最終同意から幹細胞採取・術後健康診断まで

末梢血幹細胞提供の場合は、G-CSF が 4～5 日間投与され(通院または入院)、幹細胞が末梢血中に動員された後に血液成分分離装置を用いて幹細胞採取が行われる。アフエレーシスでは 200～250mL/ドナー体重の血液処理(3～4 時間)により、 2×10^6 /患者体重以上の CD34 陽性細胞(造血幹細胞)が多くの場合採取可能である。これに満たない場合は、翌日に再度幹細胞採取が必要になることがある。

(3) 採取後のフォロー

退院後はバンクのコーディネーターが電話で体調を確認し、採取から 2～3 週間には採取病院で健康診断を行う。

骨髄提供・移植と末梢血幹細胞提供・移植の相違

ドナーおよび患者からみた、それぞれの特徴を表 1 に示す。ドナー側からみた大きな相違は、骨髄採取には全身麻酔が必要であり、末梢血幹細胞採取には G-CSF の投与と体外循環による処置が必要な点である。患者側から考えた場合は、末梢血幹細胞移植はドナーのリンパ球が多く移植されるため、骨髄移植よりも GVHD が増加する。一方、この GVHD が強く現れることで、残存している白血病細胞を攻撃する移植片対白血病効果(graft-versus-leukemia effect; GVL 効果)が期待される。

表1 骨髄移植と末梢血幹細胞移植の比較(非血縁者間移植)

骨髄移植		末梢血幹細胞移植
ドナー側		
長所	<ul style="list-style-type: none"> ・ G-CSF の投与が不要 ・ 体外循環が不要 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 自己血貯血が不要 ・ 全身麻酔が不要 ・ 提供後の社会復帰が早い
短所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 自己血貯血を要することが多い ・ 全身麻酔が必要 ・ 穿刺に伴う合併症のリスクがある ・ まれに腰痛などの長期にわたる合併症がある 	<ul style="list-style-type: none"> ・ G-CSF 投与による副作用の出現 ・ 体外循環に伴うリスクがある ・ G-CSF 投与による長期間にわたる安全性は不明
患者側		
長所	<ul style="list-style-type: none"> ・ GVL 効果(*1)を期待しない再生不良性貧血に適している ・ 慢性GVHD(*2)が末梢血幹細胞移植に比べて少ない 	<ul style="list-style-type: none"> ・ コーディネート期間がやや短い ・ 造血回復が早く、生着不全が少ない ・ リンパ球が多く含まれるため、GVL 効果が期待される
短所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 移植日までのコーディネート期間が長い 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 稀に十分な幹細胞が得られないことがある ・ 慢性GVHDが多い

*1 移植片対白血病効果、*2 移植片対宿主病

起こり得る合併症

(1) 骨髄提供

これまでに報告された主な合併症には、一過性のものとして、骨髄採取中の血圧低下や不整脈がある。また、前歯損傷、尿道損傷、喉頭肉芽腫、血栓症、後腹膜や腸腰部の出血・血腫、C 型肝炎の発症、

採取部位や臀部の長期間のしびれや痛みなどが報告されている。骨髄提供者の死亡例は海外で 3 例（うち 1 例は非血縁ドナー）、国内で 1 例報告されている。

（２）末梢血幹細胞提供

G-CSF の副作用として、骨痛、頭痛、悪心・嘔吐、発熱、紅斑、倦怠感、発疹、肝機能異常、尿酸値上昇、腎機能障害、脾腫、血小板減少等がある。重篤な副作用として、アレルギー反応に伴うショック、狭心症発作、脳血管障害、脾臓破裂、急性虹彩炎などの報告がある。長期的な安全性に関しては不明な点もあり、ドナーの長期フォローアップを現在も行っている。

アフレーシスに伴う合併症として、血管迷走神経反射、クエン酸中毒、採血時の穿刺に関連した皮下出血・血腫・神経損傷、アレルギー反応、過換気症候群、血栓性静脈炎等が知られている。末梢血幹細胞提供者の死亡例は国内では発生していないが、これまでに 12 例の死亡例が海外から報告されている。

（３）後遺障害保険適用事例

過去 20 年間（1995 年～2014 年 3 月末）で、末梢神経障害、腰部神経根症、穿刺部の持続疼痛、臀部カウザルギー等で 32 例に後遺障害保険が適用されている。

ドナーリンパ球輸注（donor lymphocyte infusion; DLI）

DLI とは、ドナーからリンパ球を採取して、EB ウイルスによる移植後の B リンパ球増殖性疾患や白血病再発に対して治療目的で輸注する治療法である。骨髄・末梢血幹細胞採取の同意とは別に、新たに説明を受け同意を得たうえで、リンパ球を全血献血あるいは成分献血と同様の方法で採血する。

骨髄・末梢血幹細胞の凍結

骨髄バンクでは、骨髄・末梢血幹細胞を凍結して移植に用いることは原則として認めていない。しかし、移植直前に患者の状態が急変して、移植の延期が避けられない場合には例外的に骨髄液の凍結が認められることがある。また、末梢血幹細胞採取では、採取された細胞数が 1 回の移植量を上回った場合に、余剰分を凍結保存することを認めている。

おわりに

骨髄提供後のアンケート結果では、77% のドナーが再提供の依頼があれば協力すると回答している。ボランティアドナーの善意によって、多くの難治性血液腫瘍患者が病を克服し、社会復帰を果たしている。ドナーの安全を確保することによって、骨髄バンク事業が発展してきたことを再確認したい。

参考文献

- 1) 日本骨髄バンク. ドナーのためのハンドブック

http://www.jmdp.or.jp/documents/file/02_donation/handbook20140815.pdf

（金森 平和）

第5章 院内における血液細胞処理のための指針の概要

はじめに

輸血療法は、血液法、薬事法、学会からの指針等で幅広く規制され、安全対策が十分に構築されている。最近、移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律(平成 24 年 9 月 12 日)が公布されたが、院内で造血幹細胞移植に用いる細胞の処理から投与に到る一連の過程への言及はない。平成 22 年 6 月日本輸血・細胞治療学会が中心となり日本造血細胞移植学会と共同で、「院内における血液細胞処理のための指針第 1 版」を作成し通知した^{1,2)}(図1)。本「指針」は、骨髄バンクにも取り入れられている。本「指針」は、FACT-JACIE2006 年第 3 版(Part C および D)の細胞治療製剤の採取、細胞処理基準を参考に作成したが、わが国既存の諸基準に整合する文書体系とした。また 輸血・細胞処理部門のわが国の現状を考慮し、必ずしも現在の大半の施設が満たす基準ではなく「目指すべき基準(理想的な基準)」の内容も含めた。

全国の主な病院を対象とした「輸血業務に関する総合的アンケート調査」によると、造血幹細胞移植に用いる細胞の処理・凍結・保管・管理・払い出しを担当する主な職種は、臨床検査技師であった^{3, 4)}。本「指針」の中で、細胞処理を行う作業員及び品質管理責任者は、医師ばかりでなく臨床検査技師も相応しいと考えられる。適正な条件のもと安全な血液細胞製剤を製造するために、血液細胞の処理に携わる者は、本「指針」及び細胞処理全般の知識と技術を十分に習得することが必要である。

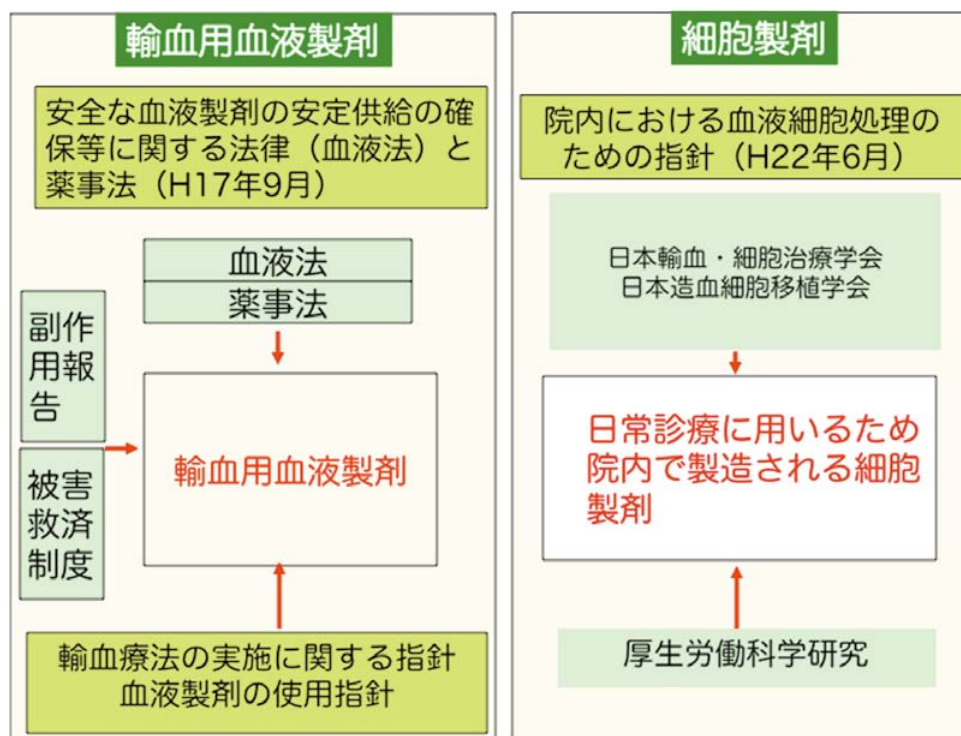


図1 輸血用血液製剤と血液細胞製剤に対する規制

「指針」の概略

「指針」は、はじめに、目的、対象、細胞の採取、責任者と作業員、設備・機器、細胞処理(プロセッシング)、払い出し、保存と解凍、検体保存、投与、廃棄、雑則、参考資料からなっている。本「指針」の対象範囲(図2)と細胞プロセッシングにおける作業員、設備、作業、環境との関係を示す(図3)。



図2 「指針」の対象範囲

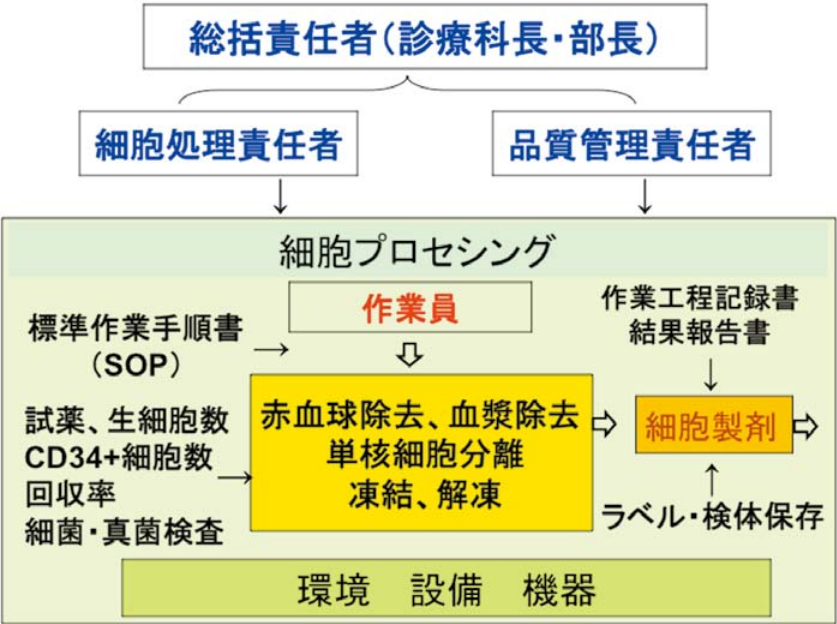


図3 作業員、作業、設備、環境との関係

(1) 目的

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

日常診療としての造血幹細胞移植に関連して院内で実施される細胞採取・処理・凍結保管が対象であり、臨床研究として行われる細胞療法や再生治療に係る細胞処理は対象としない。

(3) 細胞の採取

骨髄採取は、骨髄バンクの骨髄採取マニュアル第4版(<http://www.jmdp.or.jp/medical/work/manual.html>)を遵守する。末梢血幹細胞採取は、骨髄バンクの非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル暫定版(2010年10月1日)(<http://www.jmdp.or.jp/medical/work/manual.html>)や日本造血細胞移植学会の同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン(2010年6月30日、改訂第4版)(http://www.jshct.com/guideline/allo_pbsct_guide.shtml)を遵守する。

(4) 責任者と作業員

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。総括責任者は、以下の責任者を兼任することができる。細胞採取責任者は、細胞採取に習熟した医師である。細胞処理責任者は、細胞処理に習熟した医師である。品質管理責任者は、細胞の処理に係る設備、運用、体制を管理するが、細胞処理責任者を兼務しないことが望ましい(図4)。品質管理責任者と作業員は、臨床検査技師を念頭に置いている。細胞プロセッシングの作業中は、手袋、ヘアークャップ、マスク、専用衣を着用する。

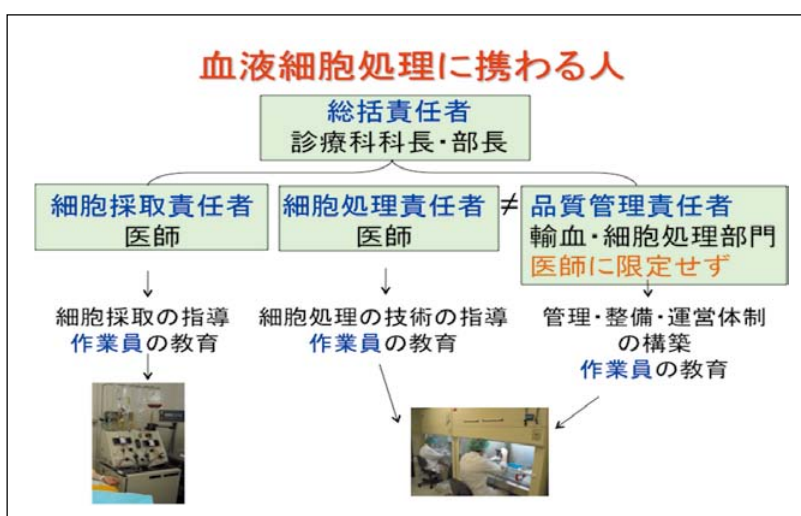


図4 責任者と作業員

（５）設備・機器

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（血液成分分離装置等）を用いる。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（図5）。



図5 設備・機器 血液成分採血装置(左, 中)と安全キャビネット(右)

（６）細胞処理（細胞プロセッシング）

患者担当医からの申込書や指示書等があること。作業中は、手袋、ヘアーキャップ、マスクおよび専用衣を着用する。輸血・細胞処理部門は、各作業に対する標準作業手順書(SOP、サイドメモ)を整備する（図6）。SOPには、①目的、②機器と消耗品、③各作業工程、④指示書、工程記録等を含む。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記録し20年間保存する（図7）。出庫に際しての適合基準を各施設で定めておく。細胞処理後の検体については、細菌・真菌検査を行うことが望ましい。作業工程記録書を作成する。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の種類等を記載する。細胞処理責任者は、細胞処理ごとに工程記録を審査する。血液細胞製剤の評価のために必要な検査は、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・真菌検査である。可能な限り回収率を評価する。出庫する血液細胞製剤のラベルや名前等に誤りがないか2人以上で照合する。ラベルには以下の内容は記載する。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。

I-7 自家・同種末梢血幹細胞解凍作業手順書(上清分離なしの場合)

<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	
患者バンクID		ドナーバンクID	
処理開始年月日時間			

番号	作業内容	チェック
1-1	必要な機器と器材	
	①シリンジ(2.5mL)	
	②針 18G,22G (各 2 本)	
	③操作アダプター(1 個)	
	④試験管	
	⑤無菌ピペット 5ml、1ml(ファルコン)	
	⑥滅菌フリーザーバック	
	⑦恒温槽	
	⑧キムタオル	
2	PBSC 解凍	
2-1	受付台帳と細胞 1 バック目の読み合わせを行う。	
2-2	凍結したバックを 37℃の恒温槽で急速解凍	
2-3	操作アダプターを取付け細胞を 0.5ml～1.0ml 抜き、細胞数カウント、細胞数 2×10^4 /ml で細胞培養、CD34 陽性細胞測定、viability 用を行う。	
2-4	移植細胞バックをシステムにて割り付け、払い出し照合を行い主治医と読み合わせを行う。	
2-5	無菌治療部にて JUMP システムで照合、移植開始後を行う。約 1 時間で投与する。	
2-6	投与終了後、重い副作用がないことが確認されたら、2 バック目のある場合は輸血・細胞移植部の担当者に <u>解凍開始の指示</u> がくる。	
2-7	<u>2 バック目も上記の方法に従い解凍</u> し、患者に輸注する。	

処理終了年月日時間			
-----------	--	--	--

処理実施日

年

月

日

作業員

確認日

年

月

日

細胞処理責任者

確認日

年

月

日

品質管理責任者

確認日

年

月

日

総括責任者

図6 標準作業手順書の例

チェック形式で作業を確認し、作業員と責任者は署名する。

処理前後細胞数: 前 _____ /ml 後 _____ /ml
処理前後絶対数: 前 4.7×10^7 後 _____
解凍後生細胞数: _____ /ml
解凍後生細胞絶対数: _____
CP-1 Lot 番号: _____ アルブミン Lot 番号: 製造番号 N351EN 20%
ヘパリン Lot 番号: _____ RPMI Lot 番号: 724444
培養細胞/dish _____ /ml

Dish 数	1	2	3	平均
Mix				
GM				
MΦ				
BFU-E				
総数				

作業員: _____ 品質管理責任者: _____ 輸移責任者: _____

図7 特定生物由来製品使用記録
アルブミン等の特定生物由来製品を使用した場合には、専用の記録紙等に記録し20年間保存する。

(7) 払い出し

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る。血液製剤と同様に、ラベル、適合票、指示書等を発行する(図8)。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(図9)。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)。

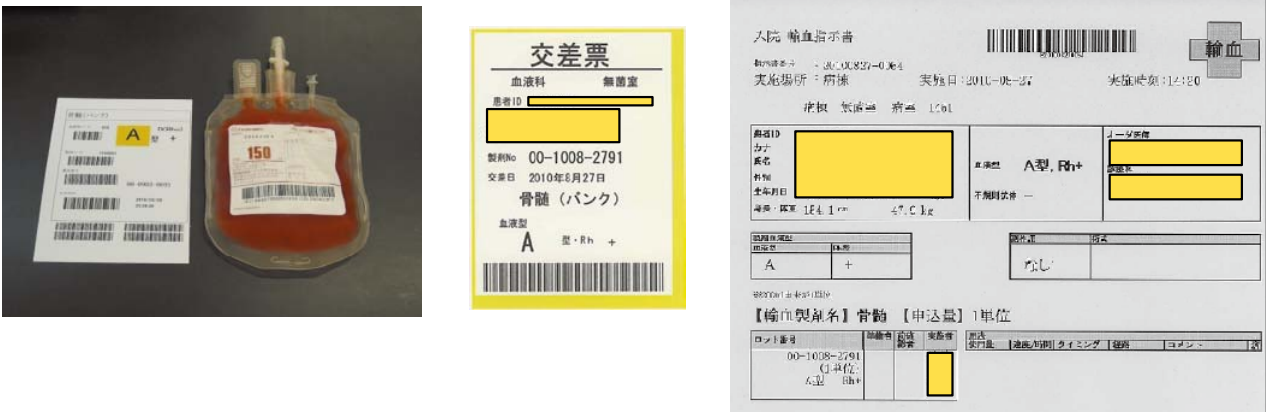


図8 血液細胞製剤、ラベル、適合票、指示書

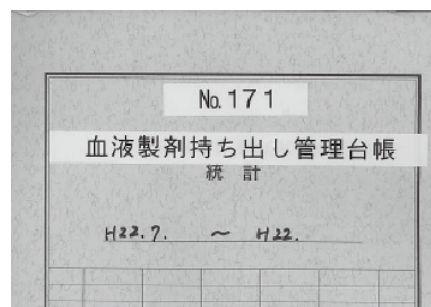


図9 払い出し

払い出しに際しては、血液製剤と同様に読み合わせ確認し持ち出し台帳等に記録する。

(8) 保存と解凍

保存する場所を管理する(図 10)。血液細胞製剤ごとに保管する期間を定める。必要に応じて各製剤に適した保存温度(範囲)を SOP に定めておく。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。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。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。解凍のための SOP、工程記録を定める。必要に応じて解凍サンプルの検査を行う。機器の保守点検や無停電コンセントの対応が必要。



図10 血液細胞製剤と検査用検体の保管

検体のサンプル(左)、冷凍庫(中)、液体窒素タンク(右)

(9) 検体保存

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(図10)。

(10) 投与

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(図11)。①患者氏名、②ドナー氏名、③ID、④製剤名、⑤採取日、⑥容量等。製剤投与により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。



図11 血液細胞製剤投与前の照合確認
血液製剤と同様に、投与前に照合確認を行う。

(11) 廃棄

処理した細胞を廃棄する場合の基準を定めておく。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。

参考文献

- 1) 室井一男. 細胞治療のための cell processing の要点 院内における血液細胞処理のための指針の概要. 医学のあゆみ. 2010;235:139-44.
- 2) 田野崎隆二, 室井一男, 長村登紀子, 他. 院内における血液細胞処理のための指針. 日本輸血細胞治療学会誌. 2011;57:184-7.
- 3) 池田和真, 長村登紀子, 田野崎隆二, 他. 日本輸血・細胞治療学会による「輸血業務に関する総合的アンケート調査」における細胞治療に用いる細胞の採取、処理、保管に関する 2008 年の現状. 日本輸血細胞治療学会誌. 2010;56:639-44.
- 4) 室井一男. 全国輸血アンケート調査からみた日本の輸血医療の変化 院内細胞処理・凍結保存・保管. 日本輸血細胞治療学会誌. 2013;59:219.

(室井 一男)

第6章 衛生・保存管理・環境整備

衛生管理

細胞製剤の調製作業を行うにあたり、最も基本的なことは「清潔な調製」を可能にする管理が求められる。細胞製剤は、他の薬剤と異なり「滅菌」が出来ないため汚染・コンタミに注意する必要がある。

(1) 作業者の手洗い

細胞調製前および後には、必ず手洗いを施行する。手洗いは、衛生学的手洗いを実施する。手順は、①手指をこすり合わせて、良く泡立てる。②両手の指の間をこすり合わせる。③手背をもう片方の手のひらでこする。④指先でもう片方の手のひらをこすり、爪と指先を洗う。⑤第1指をもう片方の手で包み、こする。⑥両手首までいねいにこする。⑦流水で十分洗い流す。⑧ペーパータオルで拭いて、しっかり乾燥させる。図1に流水を用いる場合の手洗い方法を記す。



図1 流水を用いる場合の方法

(2) 作業者の健康

「健康な細胞製剤は、健康な培養作業者から製造される」の基本概念があります。製造作業者は、日常的に健康に配慮する必要があります。特に感染症および怪我は、細胞への影響もあるが、製造作業者自身を危険にさらす場合がある。また、細胞製造を管理する者としては、作業者に職場で実施している定期健康診断の受診を勧め、定期的な健康管理も含めて実施するようにする。

細胞製剤製造前の健康管理記録は、参考資料として図 2 を参照のこと。

[illegible]

図2 健康管理記録の一例

(3) 作業者の服装

細胞製造の場合の最も重要な汚染源は、「ヒト」である。作業実施の場合の服装については、作業場面と場所により異なると考えられる。作業場所の清浄度から考えると表 1 のようになる。

表 1 作業現場の清浄度基準¹⁾

空気の清浄度 (ISO クラス分類)	作業時の最大許容粒子数	作業時の空中 浮遊菌数 (CFU/ m ³)	場所および 作業内容
	0.5 μ m 以上 (コ/m ³)		
グレード A (ISO 5)	3,520	<1	安全キャビネット (細胞と区域内の空気が直接 接接触する場所)
グレード B (ISO 7)	352,000	≤10	細胞調製室:安全キャビネ ットが設置されている作業室 (直接支持区域)
グレード C (ISO 8)	3,520,000	≤100	細胞調製室以外の部屋 (間接支持区域)
グレード D	作業形態により異なる		一般作業区域

服装の種類による微粒子の発生状況を考えた場合に、衣服内に圧力変動が生じるため内部のホコリが袖口や襟元から外部に出る事が知られている。

図 3 に示すような、1.一般白衣形式、2.化繊のセパレート形式、3.クリーンスーツのようにそれぞれの服装をして、図 4 に示すような行動をしたとする。(a)は、空気の流れる方向に対して静止前向き、横向き、後ろ向きでホコリの数を測定した場合。(b)は、空気の流れる方向に対して前向きで、腕の上下運動を 30 回と上体の前屈を 30 回行いホコリの数を測定した場合。(c)は、空気の流れる方向に対して前向きで、首の上下左右運動を 30 回と足踏みを 30 回行った。この状況でホコリの数を測定してみると、表 2 に示すような結果であった。服装の種類 1～3 の状態で、(a)～(c)のような歩行などの動作が加わると多くのホコリが発生することがわかる。中でも、比較的ホコリの少ない服装は、「3. クリーンスーツ」となり、このような服装が望ましいが、病院内施設では細胞処理の方法に即したレベルを検討する。「院内における血液細胞処理のための指針」には、「6.2.8 作業中は手袋、ヘアキャップ、マスクおよび専用衣を着用すること。」と既定されている。したがって、クリーンスーツ形式までは要求されていないが、手袋、ヘアキャップ、マスクは、病院の汎用品を使用し、専用衣については、図 3 の「1.一般白衣形式」が現実的であるが、表 2 および図 4 に示されるようにホコリの発生量が多いためクリーンベンチや安全キャビネット内での作業においては、ホコリの発生を極力少なくするために「白衣の袖口を手袋の中に入れる」等の工夫が必要である。



図 3 服装の種類

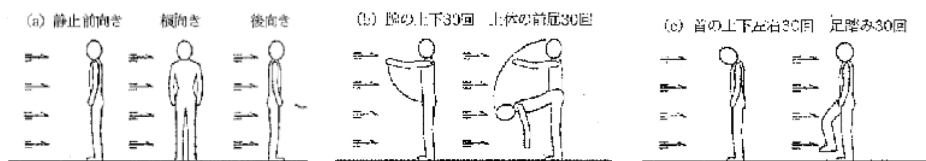


図 4 体動の種類²⁾

表 2 服装の種類と動作からの発塵²⁾

服装の種類	動作(a)	動作(b)	動作(c)
1	58,856	168,207	434,226
2	5,187	28,158	93,366
3	9,336	63,729	89,992

単位 (コ/min)

(4) 細胞調製室の清掃

清掃は、作業毎に行う「日常清掃」と期日を決めて行う「定期清掃」がある。細胞調製室や細胞製剤について清浄度を維持管理し、製剤への汚染防止をするため清掃方法や製造頻度をあらかじめ決めておく事が重要である。

清掃に用いる消毒薬の一般的な選択は、①対象部生物に殺菌性があること、②作業性が良いこと、③細胞および人体に影響が少ないこと、④原液の安定性があり保存が容易なこと、⑤低濃度で殺菌性があり殺菌時間が短いこと、⑥製造機器への残留性・吸着性が少ないこと、⑦構造設備や機器への腐食性が少ないこと、⑧周囲の環境に対して汚染が少ないこと、⑨低コストであること³⁾。このような条件を考慮すると、「消毒用アルコール」が一般的だと考える。

清掃に必要な用具・清掃方法は、施設により異なるが一般的なものを紹介する。

1) 清掃用具

- ① 消毒用アルコール(スプレー容器付)
- ② 不織布(使い捨て)
- ③ 粘着テープ付クリーナー
- ④ 使い捨てマイクロファイバークロスモップ
- ⑤ ビニールゴミ袋

2) 清掃方法

- ① 安全キャビネットは、内部天上、奥・側面および作業面を消毒用アルコール塗布した不織布で一筆書きになるように清拭する。これを作業前・後に行う。
- ② 作業台や機器表面を消毒用アルコール塗布した不織布で一筆書きになるように清拭する。
- ③ 床は、はじめに粘着テープ付クリーナーで大きなホコリを除去する(図 5)。次に使い捨てマイクロファイバークロスモップに消毒用アルコールをしみ込ませて床を清拭する。(図 6)
- ④ 消毒用アルコールで清拭する場合は、拭き取るのと同時に細菌を消毒用アルコールに封じ込めて殺菌効果をだすために「0.3mm くらいの膜を作る」ように実施する。
- ⑤ 床清掃の場合は、清浄度の高いほうから低い方に順に清拭し、最終的に出口から退室する。



図 5 粘着テープ付クリーナーでホコリ除去



図 6 モップで消毒用アルコール清拭

細胞製剤の保存管理

(1) 凍結保存方法

この項は、「第10章 末梢血幹細胞の処理と凍結保存」を参照。

(2) 凍結保存時の入庫管理

医療現場では、患者や物を取り違えるというエラーが経験される。これらは「混同」と呼ばれ、同じような物が近くにあると発生しやすい。また、「乗っ取り型エラー」とは、頭の中で同時に複数の情報処理を行っていると発生しやすい。「中断によるやり忘れ」は、作業中に別の業務が割り込むと、やりかけの作業を忘れてしまう記憶上のエラーである⁵⁾。

複数の細胞製剤を扱う場合も同様のことが想定される。細胞製剤の調製が終了して保管する場合は、同じような形状の容器による取り違い(混同)防止、部外者による無断持ち出し防止のために、専用の保管容器に収納することと、必要に応じて施錠も考慮する⁶⁾。

入庫時の混同防止対策として、保管容器には施錠・暗証番号等で適切に管理する。同時に複数の製剤を入庫する場合は特に注意が必要であり、細胞製剤に添付されているラベル情報を間違いなく識別する情報(ドナー識別、採取部位の識別に係わるものを含む)を分かりやすく表示すること⁷⁾。

ラベル情報は、出荷時も識別しやすい表示とし、細胞製剤を使用する臨床医も簡単に認識出来る事が重要である。患者名、患者 ID、製造年月日、製剤番号、製剤名、投与予定日等を明記する。このような情報は、保管管理システムに入力して、保管中の管理や出荷時の払い出し確認情報として使用する。

(3) 細胞製剤使用時の出庫管理

出庫に際して確認すべきことは、患者名、患者 ID、製造年月日、製剤番号、製剤名、投与予定日等の細胞製剤情報である。この情報は製剤本体および保管容器にラベルとして添付するべきです。出庫する場合は、細胞製剤と一緒に「払出票」添付する。内容は、患者名、患者 ID、製造年月日、製剤番号、製剤名、投与予定日、出庫先施設・診療科名、主治医の氏名等を記載するべきで、出庫者と搬送者で内容の確認を行うこと。払出票に双方の署名をすることで、間違防止対策となる⁴⁾⁷⁾。

(4) 搬送容器

搬送に使用する容器については、細胞製剤の状態(室温・凍結保管等)により異なる。種々の容器が市販されているが、重要な事は、目的地に到着して管理が引き継がれるまで「細胞製剤の品質保持」を担保する性能を有していることである⁷⁾。

使用者側もこれら条件が満たされるか確認後に使用することが大切である。

環境管理

(1) 清浄度

1) 浮遊細菌と浮遊粒子の関係

細胞製造施設の清浄度レベルについては、前掲の表 1 に示したように製造環境により種々の規格があるので、グレード B 以上を対象とした例について以下説明する。環境を管理するにあたり空気中のホコリ(浮遊粒子)を計測することは、細胞製剤の品質を保証する上で重要である。細胞製剤製造でホコリが重用視される理由は、ホコリの上に細菌が付着して空气中を浮遊するため汚染の原因になる。ホコリの大きさ(粒径)と付着している細菌数には相関が認められるという報告がある。

湯 懷鵬ら⁸⁾は、表 3 のように浮遊細菌と粒径別トータル浮遊粒子濃度の相関性を検討したが、最も相関性のある粒径は、 $2.0\mu\text{m}$ 以上であり相関係数 0.716、二番目に高い相関が、 $1.0\mu\text{m}$ 以上で相関係数は 0.708 であったとしている。

表 3 浮遊細菌濃度と粒径別トータル浮遊粒子濃度との相関性

粒径範囲 (μm)	≥ 2.0	≥ 1.0	2.0-10.0	2.0-5.0	1.0-10.0	1.0-5.0	≥ 5.0
相関係数	0.716	0.708	0.704	0.699	0.698	0.694	0.681
標準偏差	0.3490	0.3520	0.3545	0.3561	0.3563	0.3578	0.3647

また、図 7 は、 $\geq 2.0\mu\text{m}$ トータル浮遊粒子濃度と浮遊細菌濃度を測定した散布図、会期曲線、95%確率の予測上限・下限を示す。

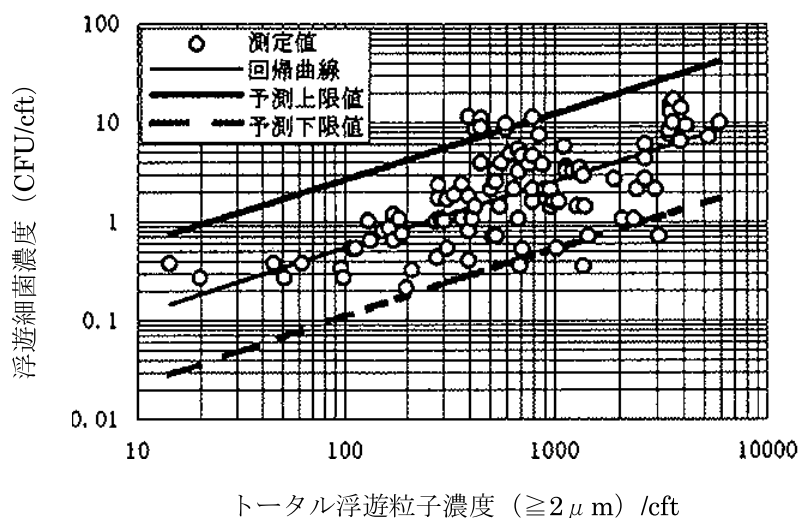
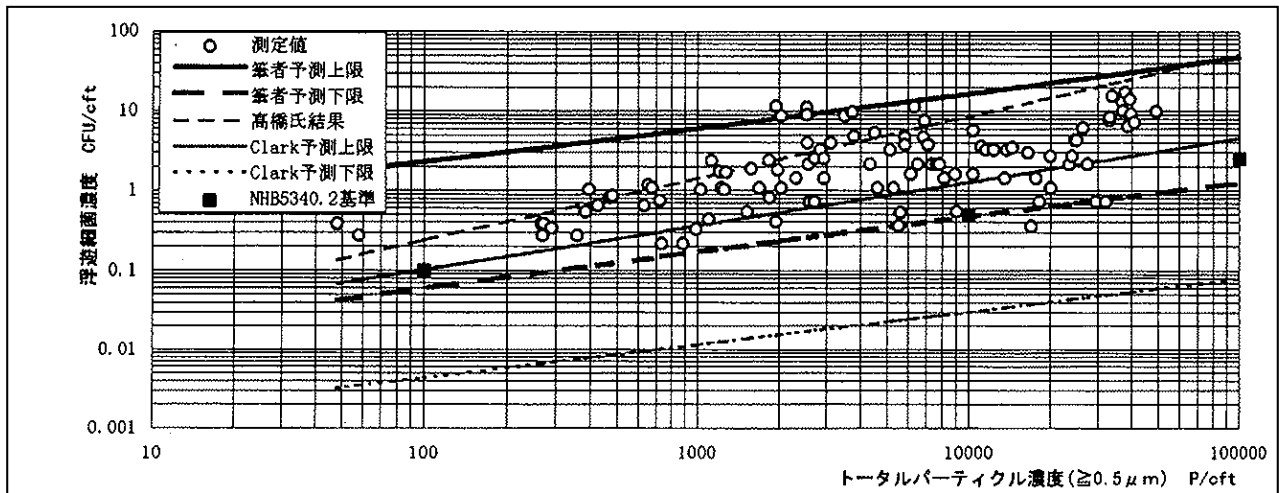


図 7 浮遊細菌とトータル浮遊粒子($\geq 2\mu\text{m}$)との相関⁸⁾

高橋⁹⁾は、病院における空気中浮遊微生物について、大粒径微粒子と比べると $0.5\mu\text{m}$ 以上および $1.0\mu\text{m}$ 以上の小粒径微粒子数と浮遊微生物との相関が高い傾向が見られるとしている。

そこで、 $0.5\mu\text{m}$ 以上のトータル浮遊粒子数と浮遊細菌数の相関を調べてみると、図 8 の浮遊細菌とトー

タルパーティクル($\leq 0.5 \mu m$)の相関において、表 1 に示す空気清浄度基準の作業時の空中浮遊菌数と比較してみると、グレード A,B,C の基準に対しては、グラフ中の予測上限値(実線)から下限値(点線)内にほぼ当てはまる事が分かった。したがって、空気中のホコリを計測することは、間接的に空気中の浮遊細菌を証明することになると考える。しかし、これは HEPA フィルターで処理された空気と製品の間に汚染源となる物が介在しない事が条件となる¹⁰⁾。



(※p/cft : 1 フィート立方体中の浮遊粒子数)

図 8 浮遊細菌とトータルパーティクル($\leq 0.5 \mu m$)の相関⁸⁾

2) 浮遊粒子数の測定方法

清浄度(浮遊粒子数)の測定は、パーティクルカウンター(図 9)を用いる。各社種々の機種が販売されているが下記に一例を紹介する。



図 9 パーティクルカウンターの一例

＜パーティクルカウンターの使用方法の例＞

1. 試料の採取・測定

- ① 本体全体を消毒用アルコールで清拭し、スイッチを ON にする。
- ② 測定条件が 0.1cf、60 秒間吸引であることを確認する。
- ③ 「START/STOP スイッチ」を ON にして測定開始する。
- ④ 終了後表示された値は、1.0cf に換算された値となり、それを測定区域の「試験記録」に記録する。
- ⑤ 判定基準の単位に従い記録値を換算し、「試験記録」に記録する。

2. 判定

- ① 換算値(コ/ｍ³)＝測定値(コ/cf) x 35.2
- ② 判定基準は、上記表 1 を参照する。

（２）空中浮遊菌

環境試験に用いられる微生物測定法には、空中浮遊菌数測定法、落下菌数測定法、表面付着菌数測定法等がある。その内、空中浮遊菌数測定、落下菌数測定は、空気中に浮遊している細菌を半定量的に証明する方法である。表面付着菌数測定は、個体（細胞調整室壁・床および設置機器等）の表面に付着している細菌を定量的に証明する方法である。

1) 空中浮遊菌の測定法

空中浮遊菌又は表面付着菌の捕集や測定に関しては、種々のサンプリング装置及び方法がある。モニタリングの目的及び対象物によって、適切なサンプリング装置及び方法を選定することが重要である。

衝突式サンプリング方法は、捕集される空気の培地への衝突速度が捕集された微生物粒子に悪影響を与えないで、かつ微生物を捕集するのに十分な速度であること。また、空気の吸引量は、培地の物理的・化学的特性を大きく変えないこと。一般的に使用される衝突型サンプリング浮遊菌数測定装置には、①スリットサンプラー、②アンダーセンサンプラー、③ピンホールサンプラー、④遠心型サンプラーがある。

①スリットサンプラー

回転するカンテン培地に一定サイズのスリットを通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置で、培地の回転速度及びスリットと培地表面との距離を調節して測定し、最大1時間まで時系列的に微生物の推移を把握することができる。

②アンダーセンサンプラー

多孔板とカンテン培地を数段組み合わせて、培地に多孔板を通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置であり、空気中の微生物の分布を測定するのに適している。

③ピンホールサンプラー

スリットサンプラーのスリット部分がピンホールになった装置で、回転するカンテン培地に数個のピンホールを通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する。

④遠心型サンプラー

回転羽根を回転し、一定流量で吸引した空気を周囲に固定したカンテン培地のストリップに吹きつけて微生物を捕集する装置で、機器の持ち運びが容易で局所の測定に適している¹⁾。

2) スリットサンプラー空中浮遊菌測定の実際

一例として、スリットサンプラー空中浮遊菌測定について記載する。結果は、単位容積(m^3)あたりのコロニー(菌)数で表示され、判断基準は、要求される清浄度(作業区域)により日本薬局方に定められている。測定法、判定方法については、下記に紹介する。

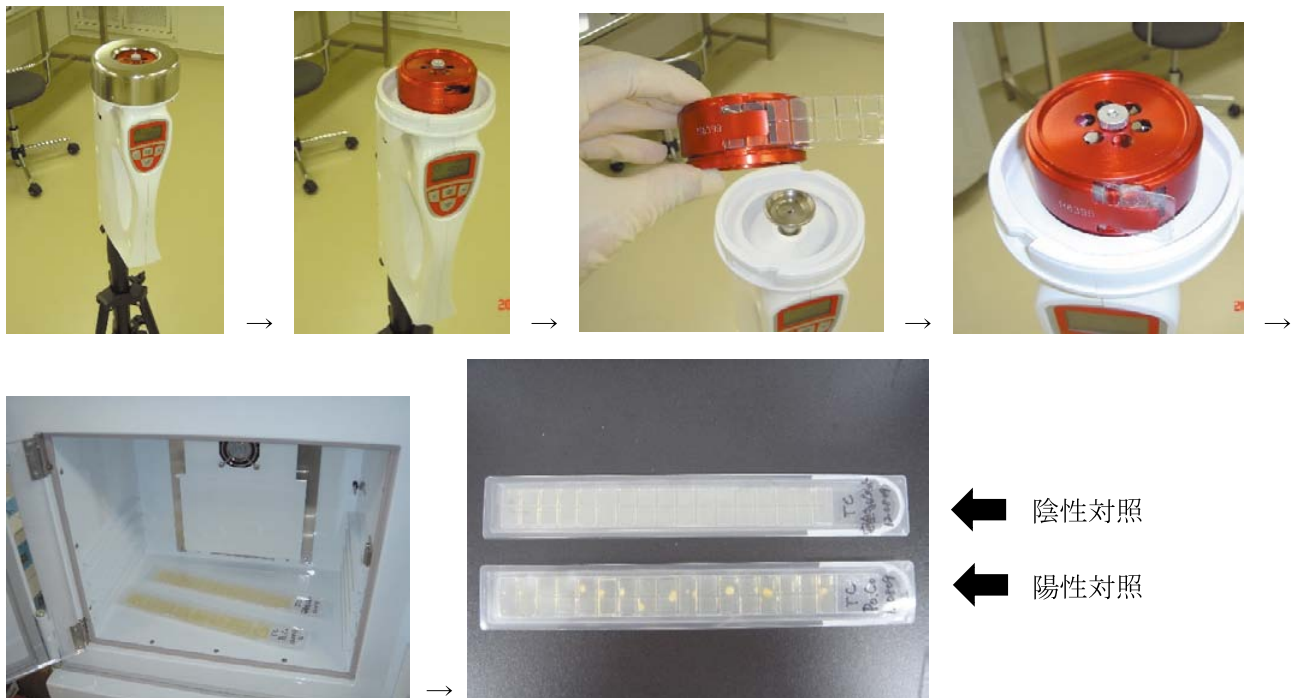


図 10 スリットサンプラー空中浮遊菌測定の手順

1. 測定方法

- ①アガーストリップ(培地)をローターにセットする。
- ②本体にローターを取り付ける。
- ③室内測定の場合は、床面より約 100cm(作業面の高さと同様)とする。
- ④本体の電源 ON とする。
- ⑤サンプリング吸引量を設定する。(安全キャビネット-500L, 無菌区域-500L, 清浄区域-200L)
- ⑥本体スイッチ ON。吸引開始。
- ⑦吸引終了すると自動的に停止する。
- ⑧アガーストリップをローターから取り出す。
- ⑨アガーストリップを付属ケースにいれラベリングする。

2. アガーストリップの培養

- ①アガーストリップを適切な温度で培養する。
- ②アガーストリップ上のコロニー数を計数する。
- ③「浮遊菌試験記録」に記載する。

3. 判定基準

①菌数の計算方法

1 m^3 中の菌数 (CFU/ m^3) = 培地上のコロニー数 / サンプリング吸引量 (L) $\times 1,000$ (L)

②清浄度基準(表 1)を参照する。

3) 清浄度及び空中浮遊菌の測定場所

日常的な測定場所としては、細胞製剤が環境に暴露される所、または作業者の介入がある所、周辺区域の影響を受けやすい所等を考慮して選定する。比較的空気の動きが少ない所(ワーストポイント)も測定場所に選定して管理する事を奨める。表 4 に測定場所の面積に対する測定箇所数の一例を示す¹⁾。

表 4 クリーンルームの面積に対応した最小サンプリング数

クリーンルームの面積 (m^2)	最少ポイント数
≤ 2	1
≤ 4	2
≤ 6	3
≤ 8	4
≤ 10	5
≤ 24	6
≤ 28	7
≤ 32	8
≤ 36	9
≤ 52	10

(3) 室圧

細胞調製施設の製造環境管理には、上記に示した「清浄度」「空中浮遊菌」の他に「室圧」、「室温・湿度」等があり、これらのデータを記録・保存することが重要である。

現在の室圧管理は、重要な区域である細胞調製室を比較的平圧に維持するために更衣室の圧力を高くし、脱衣室の圧力を低く保つ仕組みが一般的である(図 11A、B)。更衣室・脱衣室に高低差をつけることで、一種の「エアロック室」の役割を持たせる意味がある。つまり細胞調製室を外界から切り離す「平圧封じ込め」状態が可能となる。無菌操作区域とその他支持区域と間には、エアロックを設け、室間差圧および気流の逆転が起きないように、十分な差圧を設けること。扉を閉じた状態で隣接する部屋に対して 10～15Pa またはそれ以上の差圧を維持することが望ましい¹¹⁾。これは、バイオハザード封じ込めとバイオクリーン環境維持の両方が可能な配置となるが、維持管理・コスト面では膨大となる。

一方、従来の方法であるクリーンルーム設計は、重要な細胞調製室の室圧が最も高く、その他支援区域に向かうに従い室圧が減少する作りとなっている(図 11C)。基本的に細胞調製室では清潔なものを製造することを目的とした考え方である。しかし、造血幹細胞調製を目的とした細胞調製室としては、製剤の特性、ランニングコスト、業務管理等を考慮するとクリーンルームの考え方である従来の細胞調製室の圧力管理が妥当と考える。

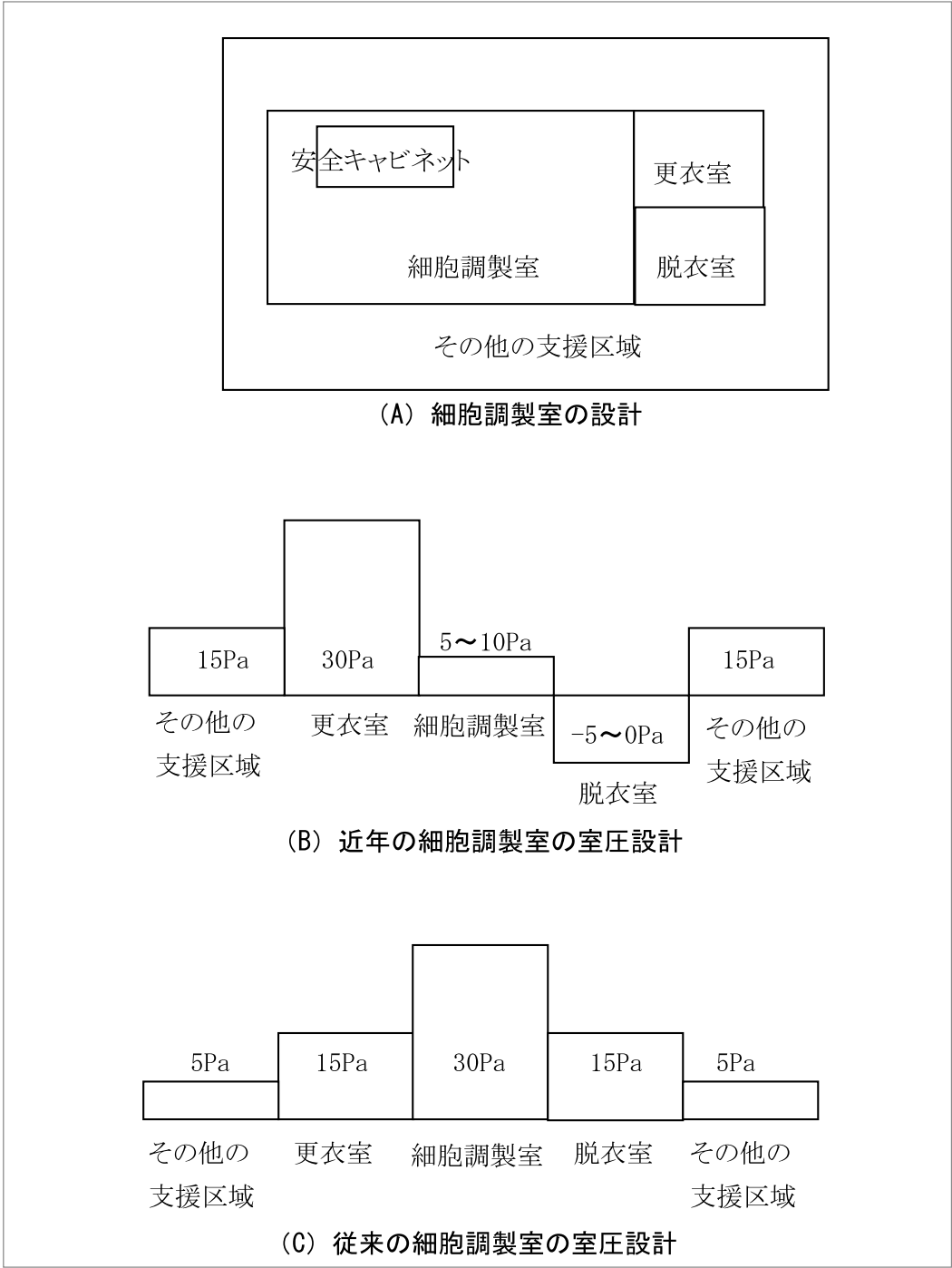


図 11 細胞調製室の室圧設計

（４）室温・湿度

製剤を製造する場合に作業者は専用の服装に着替えるか、または重ね着をする。細胞調製室は、冷蔵庫・遠心機等の発熱する機器が設置されているため、作業中に暑くなることもある。作業者には快適作業温度を提供するため、室温を若干下げて設定した方が作業効率が上がる。また、環境菌（浮遊菌・付着菌）の増殖を抑える意味でも室温は少し下げて適切な温度（例えば 20℃前後）で管理すると良い。細胞調製室の湿度は、環境菌（特にカビ）のことを優先に考えると極力乾燥状態にしたいが、静電気によってホコリが付着してクリーン環境の維持が難しくなる場合がある。また、作業者の労働環境を考慮すると作業に影響の無い適切な湿度（例えば 50%前後）に設定することを勧める。

環境管理を行ったデータは、それぞれの記録を保管することが重要である。そのためには、日常的に記録するための記録様式を定めておき、担当者が不在の場合でも代理者が記載可能な様式を作成する事を奨める。

細胞調製施設内の機器管理

細胞調製を行うための機器は、安全キャビネットおよびクリーンベンチ、冷却遠心機、冷凍冷蔵庫、保存用超低温冷凍庫、液体窒素タンク等がある。このような機器については、点検も含む使用手順書（マニュアル）や日常・定期点検記録等の文書類を整備する。

（１）安全キャビネットおよびクリーンベンチ

細胞調製を実施する際に最も清潔状態を要求される機器である。日常的に消毒用アルコールで清拭を行い清潔にしておく。また、日常の可動時には、ファンの動作状況、風量等がいつもと同じかを確認後に作業する。定期的に HEPA フィルターの圧損試験、風量・風速等を専門業者の点検を受ける。毎年 1 回は定期点検（保守点検）を実施するようにする⁶⁾。

（２）冷却遠心機

細胞を濃縮または回収するため用いるが、通常は 300～500 mL のバッグが遠心出来るものを準備する。遠心はバッグが縦に立ち、バケットはスイングするものが良い。また、50 mL 程度の遠心管も回せるバケットも準備すると便利である。これは、種々の試薬・細胞サンプルの調製に使用する場合がある。冷却条件は、4～15℃前後を用いる場合が多い。冷却遠心機は稼働の際に多くの発塵が想定される。高速で回転するため、局所的に細胞調製室の空気の流れが乱れる可能性があるため設置場所は、安全キャビネットまたはクリーンベンチから離れた細胞調製室の風下側に設置すべきである。業務で使用する場合は、遠心速度や遠心時間を作業記録に記載することを奨める。

（３）冷凍冷蔵庫・超低温フリーザー

冷凍冷蔵庫は主に試薬や保冷剤の保管に用いられる。稼働条件は、保管する物によるが、冷蔵は 4～6℃、冷凍は－25～－30℃くらいであるが、業務内容に合わせて温度および収納容量を選択する。

超低温フリーザーは、細胞製品の凍結保管に用いられる。温度は－80℃、－150℃のものが一般的であ

る。温度機能、保管容量は保管する細胞製剤の種類・数量により選択すべきである。

冷凍冷蔵庫および超低温フリーザーには、自記温度記録装置または自動温度監視システムを接続すること。自動温度監視システムは、複数の冷蔵庫やフリーザーが接続可能であり、モニター上に設置場所がビジュアル的にレイアウトされ、さらに異常発生時は、定められた携帯電話にメール発報も可能である。これらの監視機器は、細胞製品や試薬の保管管理において連続的に温度監視が可能であり、品質管理としても大変重要である。また上記監視が困難な場合は、2～3 回/日に目視で温度を確認して専用の記録用紙に記載して保管する。

(4) 機器管理と記録

細胞調製を実施するにあたり、使用する機器が正常に可動するかが重要であるが、その情報は記録から確認することが出来る。機器管理の種類については、①日常点検、②定期点検(年1回程度)がある。

① 日常点検

作業の前または後に機器が正常に可動するか、または可動したかを記載するもので、点検記録のようなチェックリスト形式が良いと考える。一例を図 12 で紹介する。

記載方法は、作業前に機器を起動させて状態が正常であれば「○」を記載する場合と、作業終了後に正常終了出来たことを「○」を記載する場合があり状況に応じた記載とする。機器の監視項目で、温度や回転数等具体的な数値が表示されるものは、その数値を点検記録に記載する。したがって、記録は機器別にして監視する機器の側に置く方が現実的と考える。また、機器に異常があった場合は、「×」を記載して、状況コメントする欄も設けた方が良い。

[illegible]

図 12 機器管理記録の一例

②定期点検

細胞調製施設内で機器を使用するにあたり、保守点検（メンテナンス）行う。細胞調製を実施する際に重要な機器については、年に 1 回程度の点検が必要である。点検内容に関しては、各機器メーカーで種々の項目が規定されているため施設の状況に合わせて実施していただきたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省. 第十六改正日本薬局方第一追補(無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法). 2012. p.208-11.
- 2) 日本空気清浄協会. クリーンルーム環境の計画と設計. 東京:株式会社オーム社; 2000. p.28-9.
- 3) 松山晃文. 細胞調製施設の構造・運用について.
<http://www.pmda.go.jp/guide/kagakuiinkai/saibou/h250515gijishidai/file/shiryo1-2.pdf>(2014 年 9 月現在)
- 4) 中島和恵. 再生医療における安全・質向上に必要な基礎知識. 再生医療. 日本再生医療学会雑誌. 2014;13:40-3.
- 5) 日本輸血・細胞治療学会. 院内における血液細胞処理のための指針. 日本輸血細胞治療学会誌. 2011;57:184-7.
- 6) 厚生労働省. ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品の製造管理・品質管理の考え方について. 2008, 3.
- 7) 湯懷鵬. 微生物粒子とトータルパーティクルとの相関関係. 日本建築学会大会学術講演, 1997.9
- 8) 高橋泰子. 病院環境におけるエアロゾル:浮遊微生物の動態とその制御. エアロゾル研究. 1992; 7:106-12.
- 9) GMP ハード研究会. 医薬品原薬工場の GMP ハード対応に関するガイドブック 第 2 版. 株式会社じほう, 2009.
- 10) 厚生労働省. 無菌操作による無菌医薬品の製造に関する指針. 2011,22.

(伊藤 経夫、長村 登紀子)

第 7 章 細胞処理の基本的操作と生細胞数の測定

細胞処理の基本的操作

(1) 概念

ヒト由来細胞を医療として用いる治療を細胞治療といい、その治療のために行う作業を細胞処理という。造血細胞移植における細胞処理は一般的に表1のような場合であり、その手技自体はこれまでの造血細胞移植の歴史の中でほぼ確立されてきた。

非血縁者の造血幹細胞採取では、「移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律(平成 24 年法律第 90 号)」および関連省令(省令第138号および139号)に従う必要がある。血縁者間、自家移植にはこの法律は適応されないが、日本輸血・細胞治療学会および日本造血細胞移植学会が共同で策定した「院内における血液細胞処理のための指針」に準じて、各施設の設備を含めた環境(インフラ)と運用(手順)を改良していくことが求められている。さらに、今年度「再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするために施策の総合的な推進に関する法律(平成 25 年 4 月 26 日成立、5 月 10 日公布・施行)」が施行され、造血幹細胞移植のルーチン以外の細胞治療における細胞治療用製品に関しては、Good Manufacture Practice (GMP)に代わる新たな基準として再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準(Good Gene, Cellular, and Tissue-based Products Manufacturing Practice; GCTP)が適応されることとなっている。また、本学会でも新たに制定予定の「細胞治療認定管理師」制度において、細胞処理の基本的操作を習得しておくことは非常に重要である。

表 1 造血細胞移植における細胞処理 ¹⁾²⁾

細胞ソース	適応	細胞処理種類
骨髄	血液型主不適合時(Major mismatch) 例: 患者 O 型、ドナー A 型	単核球分離(赤血球除去)
	血液型主/副不適合時(Major/Minor mismatch) 例: 患者 A 型、ドナー B 型	単核球分離 + 血漿除去
	血液型副不適合時(Minor mismatch) 例: 患者 A 型、ドナー O 型	血漿除去
	自家骨髄移植	単核球分離 + 凍結
末梢血幹細胞	血液型不適合時(Minor mismatch)	血漿除去
	自家末梢血幹細胞移植	凍結
ドナーリンパ球輸注	血液型副不適合時(Minor mismatch)	血漿除去
臍帯血	凍結保存	HES 法分離 ³⁾ による赤血球減量
	副作用等で DMSO を洗浄したい場合	アルブミンデキストラン希釈洗浄 ⁴⁾
その他	CD34 ⁺ 細胞輸注	Positive 選択(CliniMACS 等にて分離)

(2) 細胞処理後の目標

少ない細胞数での移植は 生着不全の危険性が高い。施設によって基準は若干異なると考えられるが、概ね造血細胞移植(未凍結時)のために表2に掲げられる有核細胞数・CD34⁺細胞数・CFU-GM 数以上の細胞が得られるように努める。自施設の細胞回収率(処理後/処理前細胞数)から処理後の大体の細胞数、さらには凍結解凍後の細胞数が予測できるようになれば理想的である。

表2 各種造血幹細胞移植に必要とする細胞数(理想的目標)^{1) 2) 5)}

検体	骨髄移植	末梢血幹細胞移植	臍帯血移植(凍結時)
有核細胞数	$2 \times 10^8/\text{kg}$	$4 \times 10^8/\text{kg}$	$2 \times 10^7/\text{kg}$
CD34 ⁺ 細胞数	$2 \times 10^6/\text{kg}$	$2 \sim 5 \times 10^6/\text{kg}$	$1 \times 10^5/\text{kg}$
CFU-GM	$1.5 \sim 2 \times 10^5/\text{kg}$	$1.5 \sim 2 \times 10^5/\text{kg}^{4)}$	$5 \times 10^4/\text{kg}$

(3) 環境

細胞処理にあたっては、「院内における血液細胞処理のための指針」の細胞処理の項、環境の項に従って、以下が整備されていることが望ましい。

十分な広さ、照明、換気を有し、機器や物品が機能的に配置された清潔かつ静かな環境を確保すること。特に、開放系作業を伴う場合には、(バイオ)クリーンベンチまたは安全キャビネットが必要である。無菌接合装置等でチューブとチューブを連結する場合には閉鎖系での処理と考えられるため、通常の部屋でも処理は可能である。

また、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サンプラーにてクリーンベンチまたは完全キャビネット内の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サンプラーの使用方法是それぞれの機器の手順書に準じる。詳細は「第7章 衛生・保存管理、環境整備」の項を参照のこと。

(4) GMP (GCTP) の基本概念

造血幹細胞移植用細胞の調製において、GMP(GCTP)の基本概念(1.人為的な誤りを最小限にする。2.汚染、品質低下の防止、3.品質保証システムの確立)を順守するためには省令や指針に掲げてある多くの事項がある。しかし、全てを網羅することは特に造血細胞移植医療の現場と離れている施設も多い。ここでは著者のこれまでの経験から、特に留意して欲しい事項を列記する。

- ① 複数の患者の細胞・検体を同じ場所で同時に扱わない。
- ② 取り違い防止のためにラベルを確実にすること。名無しの状態にしない。
- ③ 細胞調製や検査に使用する試薬・消耗品の有効期限を確認する。特に検査試薬は忘れがちである。
- ④ 細胞調製の方法についての基本的な清潔操作の教育を実施すること。国内では報告がないが、海外では移植用骨髄液、末梢血幹細胞移植細胞での細菌・真菌汚染率は0～1.3%^{6) 7)}である。例えば、汚染を最小限にするためにシリンジは1回の吸引、吐出とするなど、基本操作を教育すること。
- ⑤ 手順書と工程記録を作成すること。

- ⑥ 部外者の立ち入りを制限するとともに、作業者の安全管理に配慮すること。
- ⑦ 臨床検体専用の場所を決めること。特に臨床検体を放射線やUVが照射される場所に置かないこと。
特にクリーンルームやパスボックスにUV照明がある場合には注意が必要である(品質低下の防止)。

各章の手順はあくまでも参考であり、常に自施設にあったより安全でより品質のよいものを目指すべきである。本テキストを参考に、自分たちの手順を確立されることを望む。

生細胞数の測定

(1) 細胞数の測定

造血細胞移植において最も基本かつ重要な検査である。細胞処理調製過程や機器の品質管理用や回収率を計算する際のデータとしても使われる。一般に自動血球測定装置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分析装置(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、こうした機器は、末梢血を測定するものであって、骨髓は本来適切な対象検体でなく、幼若血小板、凝集塊、脂肪滴や赤芽球系細胞を多く含むため¹⁾、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。末梢血幹細胞も同様であり、濃度が濃すぎると不正確な値と分画となる。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。なお、自動血球分析装置では、生細胞と死細胞は区別できない。

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し目視で算定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、Trypan Blue(トリパンプルー)染色、Turk's solution(チュルク氏液)染色や特殊な例として Acridine Orange/Ethidium Bromide 染色(エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ)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エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色法やアクリジン・オレンジ/PI 染色が有用である。臍帯血解凍時の生細胞率測定の際に用いられることが多いが、蛍光顕微鏡を必要とする。

近年、公的臍帯血バンクではフローサイトメリーにて CD45 陽性細胞分画および CD34 陽性細胞分画の

7AAD 陰性細胞率を計算する方法が用いられている。また、市販されている専用の機器 (Countess, Invitrogen) で測定することも可能である。ここでは安価な従来行われているトリパンブルー・チュルク染色ならびに赤血球を多く含む検体を測定するエチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色法を示す。

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。

(2) 適応

表1 細胞数測定とその対象

総有核細胞数	自動血球分析装置	<ul style="list-style-type: none"> ● 総白血球数 (または有核細胞数) を測定。機種によっては分画も可能。方法は各機種のマニュアルに準じる。 ● 骨髓、末梢血幹細胞採取時の患者/ドナー末梢血、末梢血幹細胞採取時産物、臍帯血
	チュルク	<ul style="list-style-type: none"> ● 総有核細胞数を測定。
生細胞数	トリパンブルー染色法 (TB)、エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色法 (EB/AO)、フローサイトメトリーで 7AAD 陰性/CD45 陽性細胞数にて算出する方法 (CD45/7AAD)、蛍光色素 (AO/PI) 染色などがある。	<ul style="list-style-type: none"> ● 生細胞率を測定 ● 凍結解凍臍帯血、解凍骨髓・解凍末梢血幹細胞、解凍骨髓、解凍末梢血幹細胞

(3) 方法

1) チュルク氏液染色とビルケルチュルク血球計算盤の使用手順⁸⁾

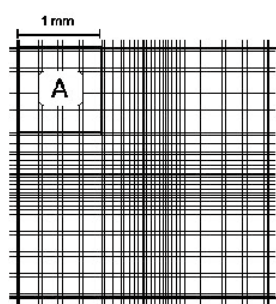
① 表 2 に従い、必要物品を準備する。

表 2 必要物品

品名	個数
<input type="checkbox"/> チュルク氏液 (チュルク液) / トリパンブルー液	適量
<input type="checkbox"/> ビルケルチュルク血球計算盤	1 枚
<input type="checkbox"/> カバーガラス	1 枚
<input type="checkbox"/> 顕微鏡	1 台
<input type="checkbox"/> ピペッター (P20 または P10)、ピペッター (P100 または P200)	各 1
<input type="checkbox"/> チップ (Yellow tip)	適量
<input type="checkbox"/> 96 穴 U 字型プレート (マイクロチューブでも可)	1

- ② 検体（細胞浮遊液）をよく攪拌またはピペッティングする。
- ③ ビルケルチュルク血球計算盤にカバーガラスを計算盤にのせ、ニュートンリングを作りながらスライドさせる。ニュートンリングができた状態では深さが 0.1mm となる。その枠のクレンメを閉じると高さが 0.1mm になるセットもある。カバーセットにより、ニュートンリング形成が不要な計算盤もある。
- ④ 96 穴-U 字型プレート の 1 穴 に 0.4% (w/v) チュルク液をマイクロピペットで 90 μ L 採り、良く攪拌した検体（細胞浮遊液）10 μ L を加えて良くピペッティングする（=10 倍希釈）。希釈倍率は、検体によって各自調整すること。自動血球分析装置で約 1,000/ μ L に調整すると、各視野が 100 程度となる。
- ⑤ チュルク液/細胞浮遊液混合液 10~20 μ L をピペッターで、血球計算盤の片方又は両方の枠(チェンバー)に入れる。このときチップの先端をカバーガラスの端に注意深く触れさせると、各チェンバーが毛細管現象により満たされる。チェンバーを満たす量は多過ぎても少な過ぎてもいけない。
- ⑥ 区画 A から四隅の 1 mm² 区画内の全細胞を数える (図 1A、B)。濃紺色に見える細胞を数える（チュルク液では生・死細胞の区別はできない）。

A. 全体



B. 各区画

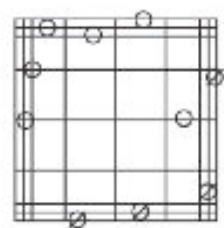


図 1 血球計算盤

Aで示した大区画は一辺 1mm 面積1mm²であり、同じ面積を右上、右下、左下と大区画4つを数える。

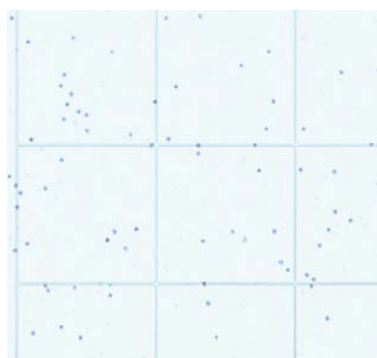


図 2 チュルク染色の実際の顕微鏡写真

注1) 各区画(図 1B)の境界の中央線に触れている細胞のうち、上側と左側にあるものは数え、下側と右側にあるものは数えない。

注2) 塊を形成している細胞が 10%を超える場合、チュルク/細胞浮遊液混合液だけでなく元の細胞浮遊液も十分にピペッティングを行ない、細胞が拡散していることを確認し全ての手順をやり直す。各 4 大区画内が、100 個程度が理想の希釈である。多い場合には適切な希釈係数に調節し直す。また精度を保つため新しいサンプルを用いて計数の手順を繰り返す。

- ⑦ 細胞密度と総細胞数を計算する。各区画(図 1B)のカバーガラスとの間にできた空間の容積は $10^{-4} \text{ cm}^3 (=0.1 \text{ mm}^3)$ になる。 1 cm^3 は 1 mL に相当するため、 1 mL 当たりの細胞密度と総細胞数は以下の式で算出する。

- 1 mL 当たりの細胞数 = 1 区画の平均細胞数 \times 希釈係数 $\times 10^4$
 例) 4 区画の合計が 200 個 (1 区画の平均細胞数 = 50) の場合、
 $200 \div 4 \times 10$ (希釈倍数) $\times 10^4 = 50 \times 10^6 / \text{mL}$
- 総細胞数 = 1 mL 当たりの細胞数 \times 検体細胞浮遊液の元の容量
 例) $5.0 \times 10^6 (/ \text{mL}) \times 120 \text{ mL}$ (元の容量) $= 6.0 \times 10^8$ 細胞

2) トリパンプルー染色とビルケルチュルク血球計算盤の使用手順⁸⁾

- ① 表 2 に従い、必要物品を準備する。
- ② 検体(細胞浮遊液)をよく攪拌またはピペッティングする。
- ③ ビルケルチュルク血球計算盤にカバーガラスを計算盤にのせて、セットする。
- ④ 96 穴-U 字型プレート の 1 穴にトリパンプルー液をマイクロピペットで $90 \mu \text{L}$ 採り、良く攪拌した検体(細胞浮遊液) $10 \mu \text{L}$ を加えて良くピペッティングする(=10 倍希釈)。希釈倍率は、検体によって各自調整すること。自動血球分析装置で約 $1,000 / \mu \text{L}$ に調整すると、各視野が 100 程度となる。
- ⑤ トリパンプルー液/細胞浮遊液混合液 $10 \sim 20 \mu \text{L}$ をピペッターで、血球計算盤の片方又は両方の枠(チェンバー)に入れる。このときチップの先端をカバーガラスの端に注意深く触れさせ、各チェンバーが毛細管現象により満たされる。チェンバーを満たす量は多過ぎても少な過ぎてもいけない。
- ⑥ 区画Aから四隅の 1 mm^2 区画内の全細胞を数える(図 1)。死細胞は青色に染色。生細胞は光って見える。生細胞と死細胞は別々に数える。注意点は、チュルク液染色の項参照のこと。

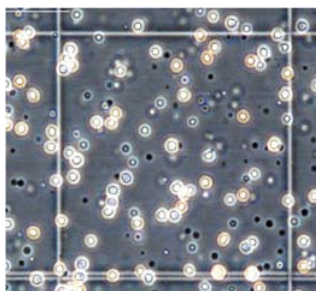


図 3 トリパンプルー染色の実際の顕微鏡写真

- ⑦ 細胞密度と総細胞数を以下の式で算出する(前項参照)。
- 1 mL 当たりの細胞数 = 1 区画の平均細胞数 \times 希釈係数 $\times 10^4$
- ⑧ 生存率の計算
- 生細胞率(%) = 生細胞の総数 \div 総細胞数 $\times 100$
- 例) 1 区画における生細胞の平均数が 80 の場合、死細胞数の平均が 20 の場合:
- $$\text{生細胞率}(\%) = 80 (\text{生細胞}) \div (80 + 20) (\text{生細胞} + \text{死細胞}) \times 100 = 80\%$$

3) エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色法⁹⁾

(赤血球が多い検体でかつ解凍検査のための生細胞率測定法)

- ① グローブを着用し、試薬の準備をする。
 - 原液(100 倍)：1mL の 95%エタノール溶液に Ethidium Bromide 50mg と Acridine Orange 15mg を溶解し、49mL の蒸留水を加え、よく混合する。1mL ずつ分取し-20℃で凍結保存しておく。
 - 染色液(1 倍)：1mL の原液(100 倍)を PBS で 100 倍希釈する。よく混合し、4℃で保管する。使用期限は 1 ヶ月間である。

注) エチジウム・ブロマイドとアクリジン・オレンジは発ガン性物質である。グローブを着用して使用し、試薬の取り扱い及び廃棄には十分注意する。

- ② 機器の準備：蛍光顕微鏡のランプを点け、血球計算盤、及びカバーガラスも準備しておく。
- ③ サンプル(細胞懸濁液)を PBS で適宜希釈する。白血球数が約 1×10^3 cells/ μ L が理想。測定サンプル 25 μ L に対して、1×染色液 25 μ L を混合する(等量混合)。
- ④ 血球計算盤へ混合液を注入し、蛍光顕微鏡で測定する。
- ⑤ 蛍光顕微鏡は、はじめに可視光で 100～400 倍にて細胞を観察し、計算盤の各区画がはっきり分かるように、調節する。
- ⑥ 可視光を点灯したまま、蛍光のスイッチを入れ、細胞を観察する。生細胞はミドリ色(アクリジン・オレンジ)、死細胞はオレンジ色(エチジウム・ブロマイド)として観察される。
- ⑦ ミドリ色とオレンジ色を区別してカウントし、記入用紙に記録する。図 1A の区画Aから四隅の 1 mm² 区画内の全細胞を数える。

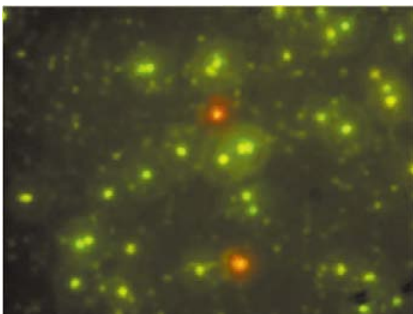


図 4.エチジウム・ブロマイド/アクリジン・オレンジ染色の実際の顕微鏡写真

生細胞はミドリ色(アクリジン・オレンジ)、死細胞はオレンジ色(エチジウム・ブロマイドが細胞内に入り核を染める)。

- ⑧ 以下の計算は トリパンプブルー染色と同様である。

4) フローサイトメリーによる生細胞率の算出方法

CD34 陽性細胞数を測定するときに合わせて実施する。

詳細は、「第9章 CD34 陽性細胞の測定」の項に譲るが、図 5 に示すように、CD45 陽性細胞数(R3)分画の死細胞数(R7; 水色)を除いた数を生細胞率とする。好中球分画では死細胞(水色)が多いことがわかる。CD45 または CD34 陽性分画のうち、7AAD 陰性細胞比が生細胞率となる。

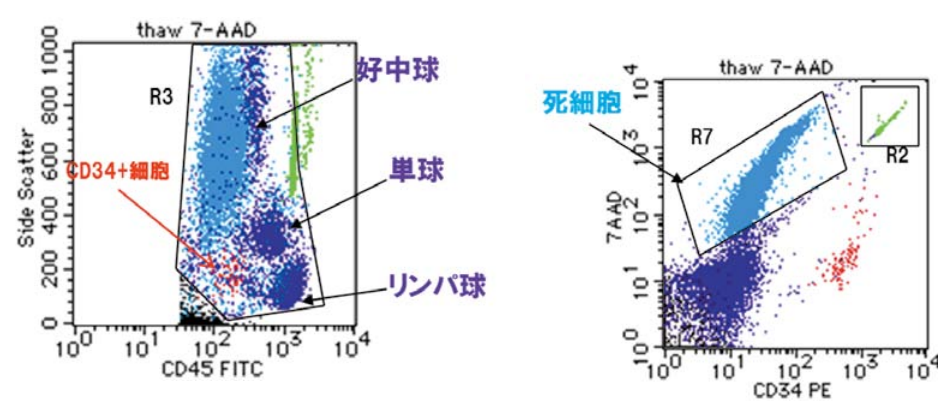


図5 CD34 陽性細胞測定時のフローサイトメトリー図

移植サンプル検査工程記録(例)

Inspection Processing Record of Thawed unit for transplantation
□骨髄・□末梢血幹細胞・□臍帯血

ドナー番号 Donor ID	患者 ID/氏名	実施検査項目 Items of inspection
		血球計算 CBC・白血球生存率 Viability・ コロニーアッセイ Colony・CD34 ⁺ /CD3 ⁺ FACS
検査日 Date of Inspection	希釈倍率 Dilution	
Date yy/m/dd / /	サンプル量 × B: (倍)	
Volume of TRANSPLANT/TRANSFUSION unit	A: ml	

*各細胞数濃度/μl × Volume (unit) = Total Unit 細胞数/ Unit である。

血球計算 CBC 実施記録者氏名 Execution/Record person Name :

使用血球計算機 Equipment	Sysmex XE ,Others()	有核細胞濃度 NC Concentration	C:実測値 × B = × 10 ³ / μ L
Calculation Formula	C × A × 10 ³ =		× 10 ⁸ cells/Unit

生存率測定 Viability 実施記録者氏名 Execution/Record person Name :

測定開始時 Start time	Time: 時	染色液 Staining Lot No.	
	W 1	W 2	W 3 W 4 合計 sum
生存細胞 Viable (緑 green)			
死細胞 Dead (橙 Orange)			
D:生存率 Viability (生存細胞濃度 viable conc.) / (生存細胞濃度 viable + 死細胞濃度 dead) × 100 = %			

C F U 播種 Colony plating 実施記録者氏名 Execution/Record person Name :

培地名 Name of medium	製造元 Company	Lot No.
MethoCult GF H4434V	ベリタス Vellitas	
管理番号 Control No.	ビペット 10 μ L	クリーンベンチ
	D01	輸血部(〇〇)
播種量 (〇つける) Plating volume	CO ₂ インキュベーター	輸血部・その他()
	_____ μ L・_____ μ L	

C F U カウント CFU count 実施記録者氏名 Execution/Record person Name :

カウント日 Date of Counting	Mm/dd: /				
	BFU-e	CFU-GM	CFU-Mix	Total	
播種量 μ L					
① (個/dish)					
② (個/dish)					
E:濃度 Conc. (個/μ L) (①+②) × 2.75/2 / 播種量 × B					
F: Total CFU ExA × 10 ³					

ドナー番号 DONOR ID

CD34⁺細胞 CD34+cell 染色実施 Staining・記録者氏名 Name :

測定実施 Measurement・記録者氏名 Name :

Lot No.	TRUCOUNTTube	CD34Antibody	CD3Antibody	Lysing Sol. (Pharm lyse)
Lot No.	CD4/8 Antibody			
管理番号 Control No.	ピペット Pipet 20 μ L	ピペット Pipet 200 μ L	ピペット Pipet 1000 μ L	FACS 測定機
染色開始日時 Staining start date	Beads count/Trucount tube		Sample 添加量 Sample Addition	
d/h 日 時			50 μ L	
測定日時 Measurement date	解析日 Analysis date		希釈倍率 Dilution x	
d/h 日 時	Mm/dd: /		x	
Beads count/測定値	CD34 ⁺ 実数/ 測定値中 CD34+ No/ measure		CD34 ⁺ 濃度 CD34+ concentration=F*	
			/ μ L	
G: Total CD34 F x A x 10 ³ =			x 10 ⁶ cells/Unit	
	CD3 実数/ 測定値中 CD3+ No/measure		CD3 ⁺ 濃度 CD3+ concentration=CD3c**	
			/ μ L	
Total CD3 CD3c x A x 10 ³ =			x 10 ⁷ cells/Unit	
CD4+CD8- %	CD4-CD8 +%	CD4-CD8- %	CD4+CD8+ %	CD4+ total: Total CD3 x (CD4+CD8-%)=
				x 10 ⁷ cells/Unit
				CD8+ total: Total CD3 x (CD4+CD8-%)=
				x 10 ⁷ cells/Unit

$$* : \frac{\text{CD34}^+ \square \square}{\text{Beads} \square \square \square} \times \frac{\text{BeadsCount} / \text{Trucount tube}}{50\mu\text{l}} \times \text{Dilution} = \text{CD34 concentration}$$

$$** : \frac{\text{CD3}^+ \square \square}{\text{Beads} \square \square \square} \times \frac{\text{BeadsCount} / \text{Trucount tube}}{50\mu\text{l}} \times \text{Dilution} = \text{CD3 concentration}$$

参考文献

- 1) Technical Manual Committee V-TV. Technical Manual AABB (日本語版). 13th ed. AABB; 2002. p.569-600.
- 2) 神田善伸. 造血幹細胞移植診療マニュアル. 日本医学館; 2006. p.23-7.
- 3) Cord blood transplantation and haematopoietic precursor cells. Vox Sang. 2005;89:172-6.
- 4) Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:10119-22.
- 5) Lasky LC JN. Quality assurance in marrow processing. In; A Manual of Current Techniques. Philadelphia: FA Davis; 1992. p.386-443.
- 6) Sacher RA. Bone marrow processing for transplantation. Bone marrow and stem cell processing: A Manual of Techniques. Philadelphia: FA Davis; 1992. p.1-16.
- 7) Webb IJ, Andersen JW, et al. Sources and sequel of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: Implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. Transfusion. 1996;36:782-8.
- 8) 臨床検査法提要. 改訂第 33 版 金原出版株式会社
- 9) “Viability Staining Using Ethidium Bromide and Acridine Orange” From Cytometry Source Book: Becton Dickinson Immunocytometry Systems.

(長村 登紀子)

第8章 CD34 陽性細胞数の測定

はじめに

同種末梢血幹細胞移植においては細胞採取の指標をCD34陽性細胞数、患者体重あたり $2 \times 10^6/\text{kg}$ としている¹⁾。CD34陽性細胞数がそれ以下でも生着は可能であると考えられているが²⁾、最低必要量は不明である。2011年以降は日本骨髄バンク(JMDP)を介する非血縁者間末梢血幹細胞移植が開始され、採取施設と移植施設が異なる場合に備えて医療機関検査室間のCD34細胞結果の相同性が望まれている。

CD34陽性細胞数の測定は国際的にInternational Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE, 現International Society for Cellular Therapy; ISCT) の推奨に基づき、かつ標準粒子を用いて検査を行う事が妥当である^{3,4)}。単独にCD34抗体、CD45抗体を選択し、死細胞検出用試薬や標準粒子と組み合わせ、文献に従ってgatingを設定する事も可能である⁵⁾。しかしながら臨床現場において検査系の条件設定、校正やバリデーションを行う事は非現実的であろうし、また検査室では意図せずともISHAGE法のgating趣旨を誤解する可能性もある⁶⁾。一方、ISHAGEの推奨する方法に即して調整され評価もされた試薬キットが入手可能であり⁷⁾、更にメーカーが推奨するソフトウェアを用いることにより意図しない誤りを防ぐことができる。本稿では代表的な2社のシングルプラットフォーム法キットを用いる方法を紹介する。

検体

検体ラベリング等は基本的なマニュアルに従う。

一般的に検査前の検体の保管はすべきでない。凍結保存されない検体では、 $2-8^{\circ}\text{C}$ の冷蔵保存が可能な場合もあるが、その場合でも、保管条件の評価が必要である。凍結融解後の検体は可及的速やかに測定する。

通常は検体に付随する自動細胞解析装置などによる細胞濃度などの基本的データがあると考えられる。検体の種類と細胞濃度より、希釈の必要性を判断する。

機器

機器の性能として、前方散乱光(FS)、側方散乱光(SS)、CD45-FITC (FL1)、CD34-PE (FL2)、および死細胞検出用試薬の7-AAD蛍光も含めた5パラメータ(3カラー)以上の機器を使用する。Beckman Coulter社のCytomics FC 500/Navios, Becton-Dickinson社のFACSCanto™II等が使われている。

検出系の感度や漏れ込み補正等は検査結果に大きく影響するので、フローサイトメーターは使用前に正しく調整する事が必要である。精度管理の為に標準粒子、標準細胞等を用いて定期的な調整を行う。

試薬・資材

基本的試薬は以下のものである：

- ①CD45-FITC、②CD34-PE、③7-aminoactinomycin-D (7-AAD)、④内部標準粒子

⑤10x塩化アンモニウム溶血剤

キット化されているものを紹介する。

- (1) Stem-Kit (Beckman Coulter社)(CD45-FITC/CD34-PE, CD45-FITC/Isoclonic™ Control-PE, Stem-Count Fluorospheres, 10x concentrated Ammonium Chloride Lysing Solution, 7-AAD Viability Dye)
 - (2) BD Stem Cell Enumeration Kitシステム(Becton Dickinson社)(CD45 FITC/CD34 PE, 7-AAD核染色剤, 10x 塩化アンモニウムベース溶血剤, BD Trucount™ チューブ)
- 資材として、各メーカー指定のテストチューブ、シース液や洗浄液が必要である。

検体の調製と測定

(1) Stem-Kit (ベックマンコールター社)

- ① 検体用チューブを3本準備し、検体番号とSEQ番号(1~3)を記入する。
- ② チューブ1,2に7-AADとCD45-FITC/CD34-PEを各20μLずつ添加する。
- ③ チューブ3に7-AADとCD45-FITC/Isoclonic™ Control-PEを各20μLずつ添加する。
- ④ 全てに検体を100μL添加する。
- ⑤ チューブ内容物を十分に混和する。
- ⑥ 室温・暗所で20分間反応させる。
- ⑦ 溶血剤NH₄Cl Lysing Solutionを精製水で10倍に希釈し各チューブに2mL添加する。(溶血剤は用時調製)
- ⑧ 上記チューブ内容物を十分に混和する。
- ⑨ 室温・暗所で10分間反応させる。
- ⑩ Stem-Count Fluorospheresを100μL添加し、十分に混和する。
- ⑪ stemCXP softwareにより解析する。

(2) BD Stem Cell Enumeration Kit (ベクトンディッキンソン社)

- ① BD Trucount™ チューブに検体番号を記入する。
(検体毎に2本ずつ準備し測定することを推奨⁸⁾。)
- ② BD Trucount™ チューブにBD Stem Cell reagent (CD45 FITC/CD34 PE)とBD 7-AAD reagentを20μLずつ添加する。
- ③ 検体を十分に攪拌する。
- ④ BD Trucount™ チューブに検体を100μL添加する。
- ⑤ 上記Tube内容物を十分に混和する。
- ⑥ 室温・暗所で20分間反応させる。
- ⑦ BD Trucount™ チューブに精製水で10倍希釈した塩化アンモニウムベース溶血剤(x1)を2mL添加する。
- ⑧ 上記Tube内容物を十分に混和する。
- ⑨ 室温・暗所で5~10分間反応させる。
- ⑩ BD CellQuest Pro Software あるいはBD FACSCanto™ Clinical Softwareにより解析する。

解析について

基本は、生細胞かつCD34陽性、CD45弱陽性の集団を選択し、それが前方散乱(FS)、側方散乱(SS)でリンパ球領域にはいる事を確認する。同時に内部標準粒子を測定し、それにより検体容量を計算する。解析データとして、CD45陽性細胞領域に75,000以上、あるいはCD34陽性細胞領域に100以上の細胞が認められていることを確認する。

(1) Stem-Kitで調製した検体をFC500にて測定し、stemCXP softwareにて解析する場合を示す⁸⁾。

① ドットプロット第1画面は CD45-FITC と SS。

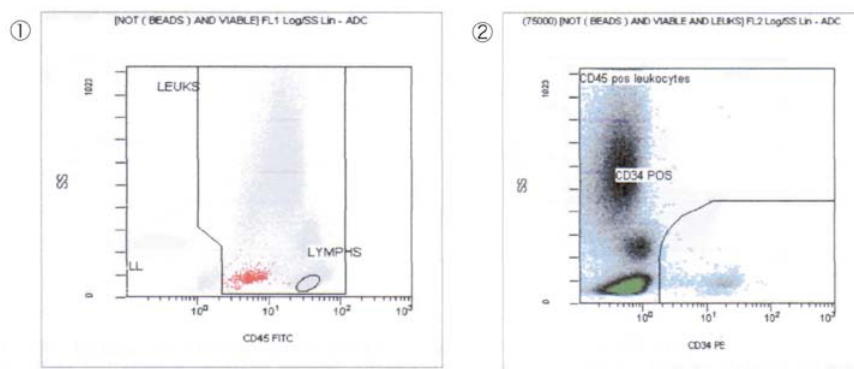
7-AAD 陰性(ドットプロット第 8 画面)、かつ CD45 陽性領域を設定する。

CD45 陽性細胞領域を、赤血球や細胞膜などを含まない様に設定する。

CD45 強陽性、低 SS のリンパ球領域を設定する。

② ドットプロット第 2 画面は CD34-PE と SS。

生細胞かつ CD45 陽性細胞の中で CD34 陽性細胞が含まれる領域を設定する。



③ ドットプロット第 3 画面は CD45-FITC と SS

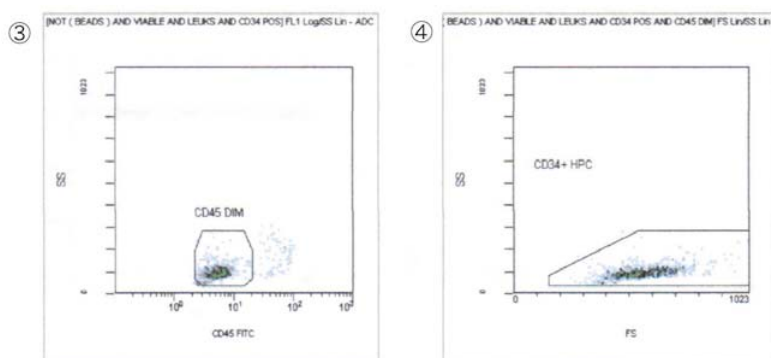
CD45 弱陽性細胞領域を設定する。

生細胞かつ CD45 陽性かつ CD34 陽性細胞から CD45 強陽性を除外する。

④ドットプロット第 4 画面は FS と SS。

中程度以下の SS、中から高 FS を含む領域を設定する。

③で設定した細胞がリンパ球領域に入る事を確認する。



⑤ ドットプロット第 5 画面は FS と SS.

ドットプロット第 4 画面と同じ、中程度以下の SS、中から高 FS の領域を設定する。

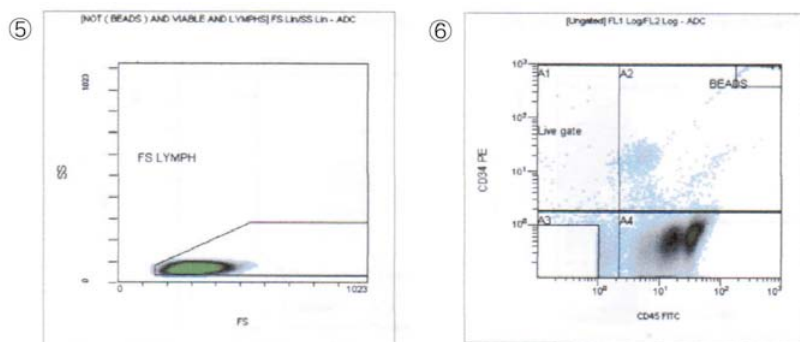
ドットプロット第 1 画面で設定したリンパ球が表示されるので、ドットプロット第 4 画面のリージョン設定の参考にする。

⑥ ドットプロット第 6 画面は CD45-FITC と CD34-PE.

CD45 陽性領域設定の下限を確認、再設定する。

Stem-Count Fluorosphere を含む様に標準粒子領域を設定する(右上)。

左下の FITC-PE 陰性領域を設定する。(debris)

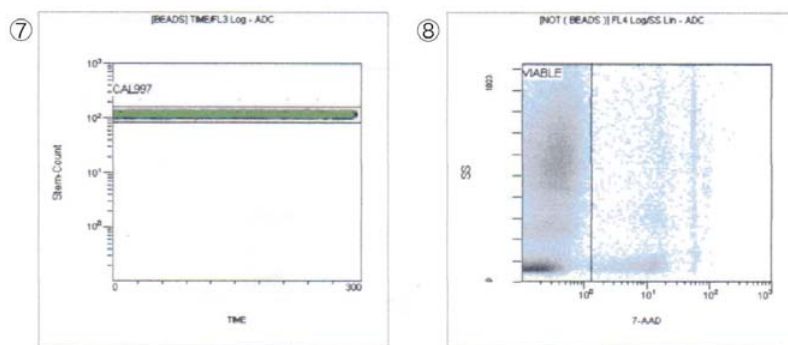


⑦ ドットプロット第 7 画面は time と Stem-Count Fluorosphere.

標準粒子を計数する領域を設定する。

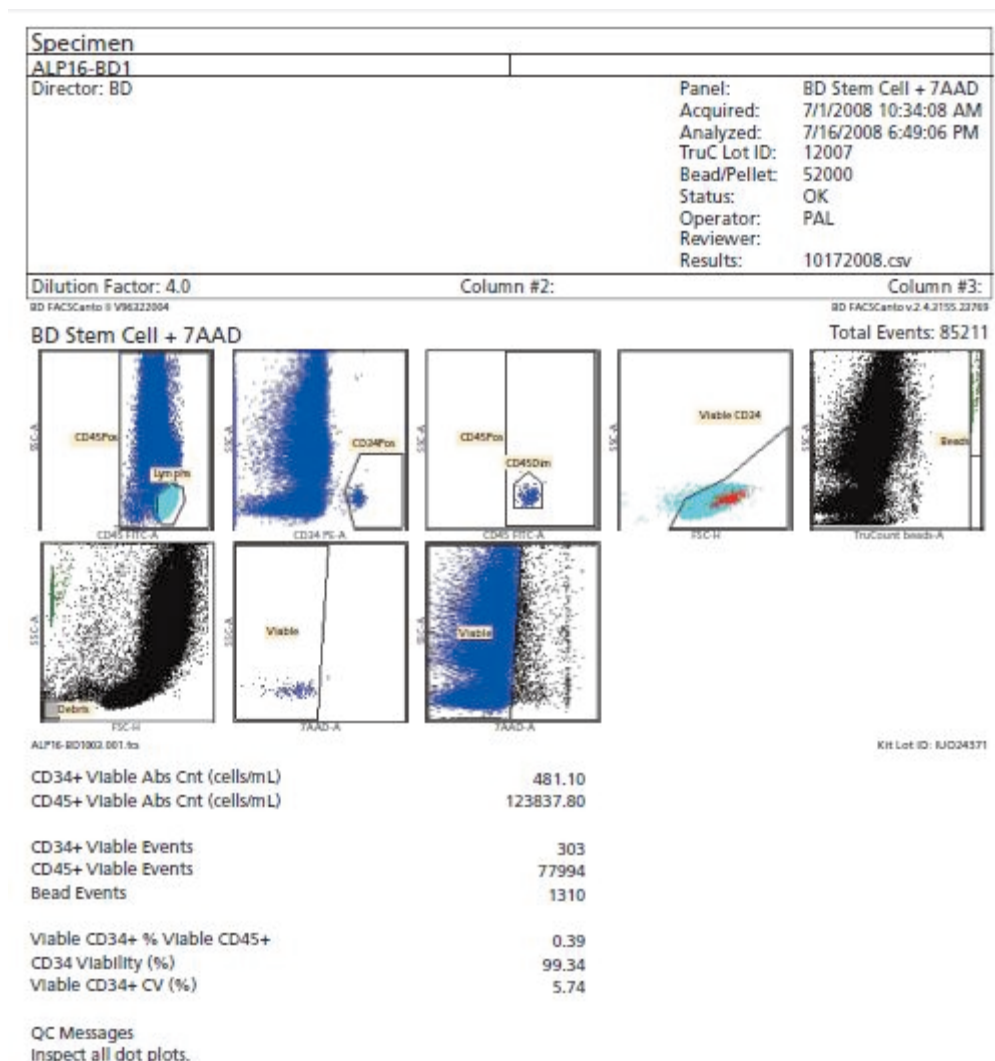
⑧ ドットプロット第 8 画面は 7-AAD と SS.

7-AAD 陰性領域(生細胞領域)を設定する。



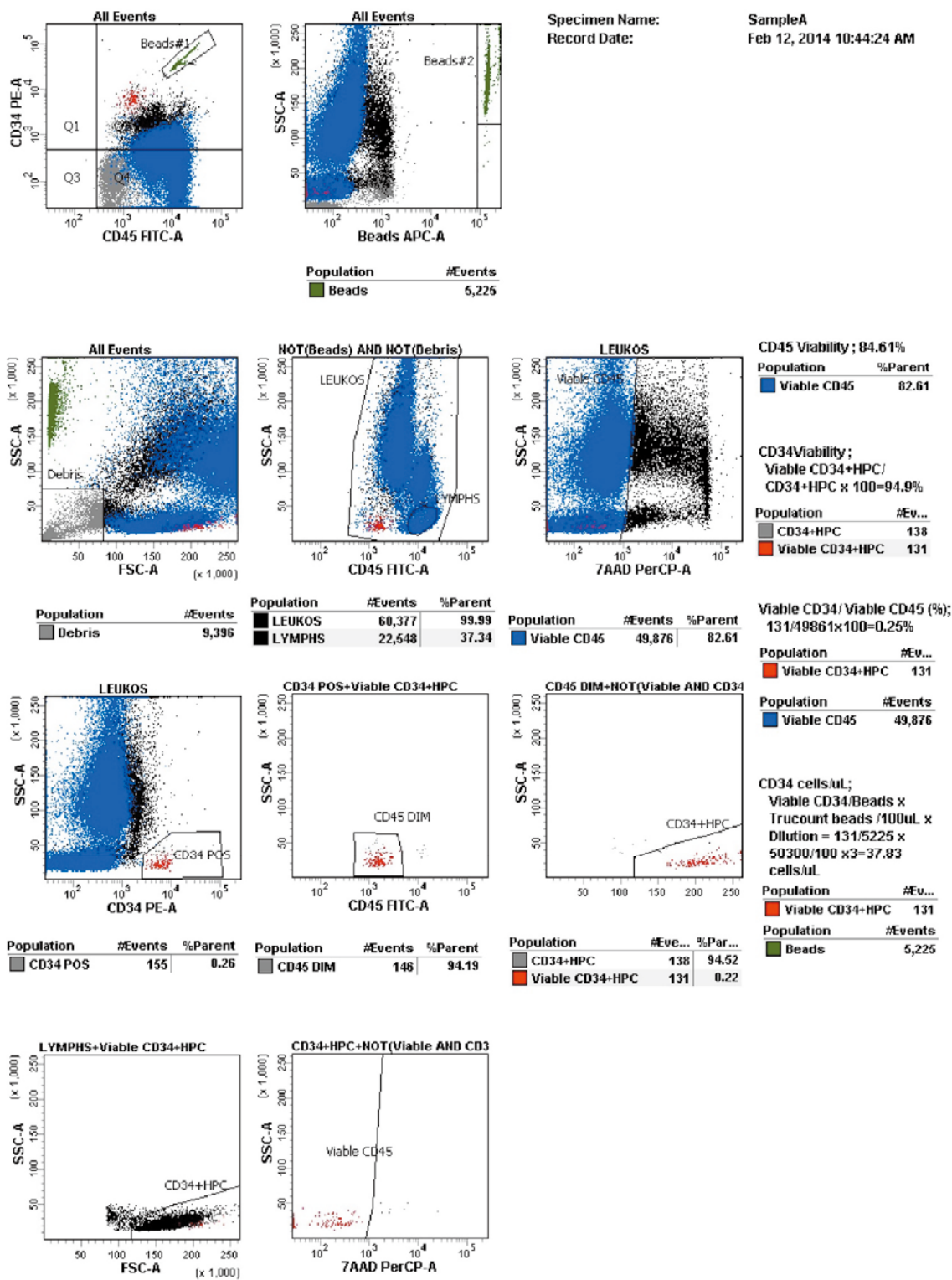
⑤から⑧まで、この順である必要はないが、それぞれの画面を確認する事が重要である。

(2) BD Stem Cell Enumeration Kit を用いて検体を調製、BD FACSCanto™ II フローサイトメーターにて測定、FACSCanto™ Clinicalソフトウェアによる自動解析による結果を示す¹⁰⁾。



この解析では、前述の⑦time/microsphere ドットプロットの代わりにSS/trucount beadsに展開し、また FS/SSドットプロットにてdebrisの領域が設定されている。

いずれのキット／解析においても、ドットプロット上の領域設定が、望む細胞群をとらえていないと疑う場合には、躊躇なく再解析を行う。新鮮検体で死細胞がないと確信して7-AADを省略する場合には、検査上はすべて生細胞となる。尚、2014年以降、臍帯血バンクでは提供前検査でCD34数測定を行うときに、CD45陽性細胞領域、CD34陽性細胞領域での7-AAD陰性細胞割合(生細胞率)を測定している¹¹⁾。次ページに各領域の生細胞率を、BD FACSCanto™ II フローサイトメーター により測定、BD FACSDiva™ ソフトウェアにて解析した例を示す。



記録

- ・ 測定値は所定の記録用紙に記録する。
- ・ 検体の希釈率、採取細胞容量から「総CD34陽性細胞数」を算出する。
- ・ 担当者、責任者などを記載する。
- ・ 使用した試薬、資材のロット番号、使用期限等を記録する。必ずしも測定記録と同一用紙である必要はない。(機器管理、試薬管理として別に管理されている場合)

データの評価および検査室間差

フローサイトメーターは精密機器であり、また検体によってはgating設定が難しい場合もあり、データの妥当性については常に検証することが重要である。日頃より、CD45陽性領域カウントによる細胞数と自動血球計数装置での白血球数との比、およびCD34陽性細胞数とコロニー形成細胞数の比を計算しておくことを推奨する。

本稿で紹介したシングルプラットフォーム法では、検体の洗浄操作をなくし、極力誤差を少なくする様に設計されている。しかしながら、試験検体の調製に伴う過誤、検体の攪拌やピペッティング操作などによる誤差は起こりうる。これらの誤差の可能性を常に意識し、技術レベルの把握をしておく。使用するピペットの校正、試薬の管理なども最終的な検査精度に影響する。「総CD34陽性細胞数」の計算には採取細胞液量の測定も含まれ、よって天秤の校正も必要である。

最終的には以下のような検定を通じて検査室間差を小さくする事が理想である。

- ・ 各測定者の操作の安定性
同一検体を一定の割合で希釈し、細胞数を測定する。
- ・ 検査室におけるデータの安定性
同一検体を反復して調製、測定し、データの安定性を確認する。
- ・ 多施設検定
同一検体を多施設に配布し、各検査室のデータ近似性を検定する。

本邦のさい帯血バンクは毎年、協力して多施設検定を行ってきた。2014年度以降は造血幹細胞提供支援機関の「臍帯血の品質向上のための共同事業」の一環として継続している。過去10カ所以上の検査室に凍結検体を配布しての検定では、標準偏差を平均値で除したCV値が、大体10%から30%程度、2014年度は6か所の検査室が参加し10%程度であった。機器自体の校正に用いられる標準細胞による測定値に15%の幅を許容しているだけに、多施設検定でCV値をそれ以下にする事は困難と考えられる。移植のための細胞採取と細胞数測定にあたっては、方法が統一されたとしても、常に測定誤差と検査室間差を意識する必要がある。末梢血幹細胞移植の発展と本邦の移植成績の解析のためにも、移植施設における検査法の統一が望ましい。

参考資料

- 1) 日本骨髄バンク. 非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル暫定版.
(http://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/f-up03a.pdf)
- 2) 日本造血細胞移植学会、日本輸血・細胞治療学会. 造血細胞移植; 同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン (2010年6月30日 改訂第4版)
(http://www.jshct.com/guideline/pdf/allo_pbsct_guide_4.pdf)
(<http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Document/Guideline/Ref10-2.pdf>)
- 3) Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother. 1996;3:213-226.
- 4) Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry. 1998;34:61-70.
- 5) 日本臨床検査標準協議会. フローサイトメトリーによるCD34陽性細胞検出に関するガイドライン(提案、JCCLS H3-P V1.0) (http://www.jccls.org/state/pdf/fct_h3pv1.pdf)
- 6) Whitby A, Whitby L, Fletcher M, et al. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? Cytometry Part B 2012;82B:9-17.
- 7) Sutherland DR, Nayyar R, Acton E, et al. Comparison of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto cytometers. Cytotherapy. 2009;11:595-605.
- 8) Eurocord, Netcord. Assesment of CD34+ cell count in thawed Cord Blod Units; Operative protocol, version 3. (Released 2011年8月23日)
http://www.bc-cytometry.com/Data/db_search/stem-kit.htm (2015年1月21日)
<http://www.bdj.co.jp/reagent/products/stem-cell-enumeration-kit.html> (2015年1月21日)
- 9) 移植に用いる臍帯血の品質の確保のための基準に関する省令の運用に関する指針(ガイドライン)
http://www.hourei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t_document.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=2220&PAGE=1 (2015年1月21日)

(高梨 美乃子)

第9章 コロニー培養とコロニー形成細胞の測定

解説

採取し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 陽性細胞数の測定とともにコロニーアッセイがある。CD34 陽性細胞＝コロニー形成細胞とは限らないが、正の相関関係にある。前者は造血幹細胞の表面マーカーを横断的に観察するものであり、後者は造血前駆細胞の造血能を増殖・分化という観点から時間的に観察するものである。原理は、造血幹細胞を含んだ血液細胞に造血因子を加えてメチルセルロース(半流動培地)で培養すると、その中の造血前駆細胞は増殖・分化して細胞集塊を形成する。この細胞集塊をコロニーといい、このコロニーの形態形状を観察するというものである。一つのコロニーは1個の造血前駆細胞由来の細胞集団であり、一般的には20個以上の場合をコロニーといい、それ以下をクラスターとよぶ。コロニーの色、形、構成している細胞形態からそのもとに由来する前駆細胞を同定することができる。メチルセルロースを用いて Interleukin-3 (IL-3), Erythropoietin (EPO), その他 Stem Cell Factor (SCF), Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte macrophage CSF (GM-CSF)等のサイトカインを加え、37℃、5%CO₂、湿度 100%の条件下のインキュベータ内で、14 日間培養する。これにより形成され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(colony forming unit-granulocyte/macrophage : CFU-GM), 赤芽球バーストコロニー形成細胞(burst forming unit-erythrocyte:BFU-E), 混合コロニー形成細胞(CFU-GEoMM/CFU-Mix)等がある。CFU-Mix は、CFU-GM/G BFU-E を内包し、骨髄系、赤血球系への分化能を呈しているため、この中では最も造血幹細胞に近い細胞を反映していると考えられる。本来は巨核球も含まれるべきであるが、CFU-megakaryocyte (CFU-Meg)は、Thrombopoietin (TPO)存在下の特殊な培養法でのみ観察でき、区別には熟練を要する。しかし、CFU-Mix は数が少なく、測定者間のばらつきが大きいので、CFU-GM 数のみを提示する場合も多い。CFU-GM(+CFU-Mix)数は、CD34 陽性細胞数と高い相関性があり、造血幹細胞中に何個の前駆細胞が含まれているか、実数として表示できる。CFU-Mix の段階から骨髄系に分化したコロニーが CFU-GM であり、顆粒球(好中球)とマクロファージからなる。さらに分化すると、CFU-G または CFU-M として観察され、各々マクロファージと顆粒球のみから形成される。赤血球系にコミットした造血前駆細胞 BFU-E は赤芽球バースト及び CFU-E(colony forming unit-erythroid)赤血球コロニーとして観察される。

なお、培養に加えるサイトカインは、新たなサイトカインの発見等により、時代や施設によって異なる。骨髄移植施設によっては長い歴史の中で一貫して同一のサイトカインを用いて検討している場合もあるが、近年は他施設間で培地を統一する場合もある。いずれにしても施設でも指針を明瞭にもつことと、変更の際には事前検討を行う必要がある。

また、コロニーアッセイ用の細胞処理等はクリーンベンチ内で無菌操作にて行うため、操作に慣れないとカビのコロニーを形成したり、均等に播種できなかつたりして、結果が出せないことがある。またコロニーの種類や形態を熟知していないと同定できず、カウントにバラツキが生じるので、慣れるまでは経験者との間で目合わせ等の教育を受けて、経験を積み、施設内で統一しておくことが大切である。

適応

- 1) 末梢血幹細胞移植・骨髄移植・臍帯血移植(解凍後)時の輸注移植細胞の評価として
- 2) 細胞処理後の評価として
- 3) 凍結保存サンプルの評価として

必要物品

表 1 必要物品一覧

品 名	個 数
単核球分離 ①骨髄液 ②15mL コニカルチューブ ③比重液(1.077/Ficoll または Lymphoprep) ④ピペット(1mL,2mL,5mL,10mL)およびピペッター ⑤ PBS ⑥血球計算盤(Burker-Türk)、チュルク液またはトリパンブルー液	
<input type="checkbox"/> メチルセルロース培地: MethoCult H4034 (Stemcell Technologies Inc./ベリタス社) 組成: methylcellulose in Iscove's MDM, fetal bovine serum, bovine serum albumin, 2-mercaptoethanol, L-glutamine, rhSCF, rhGM-CSF, rhIL-3, rh-erythropoietin,	必要本数を予め分注して凍結しておく。
<input type="checkbox"/> 滅菌蒸留水	2mL/35mm dish
<input type="checkbox"/> 15mL コニカルチューブ	2-3 本
<input type="checkbox"/> 1mL 注射器	1
<input type="checkbox"/> 18G 注射針(または専用の鈍角針)	1
<input type="checkbox"/> 100mm ペトリディッシュ	1
<input type="checkbox"/> 35mm ペトリディッシュ *tissue culture 用は細胞が底に付着するので不適。	3 dishes
<input type="checkbox"/> プラスチック手袋(検体を取り扱う際には常に着用のこと)	1
<input type="checkbox"/> クリーンベンチ	1
<input type="checkbox"/> CO ₂ インキュベータ	1
<input type="checkbox"/> 倒立顕微鏡	1
<input type="checkbox"/> チップ(P10/P20/P200/P1000)およびピペットマン	1
<input type="checkbox"/> 60mm グリッド付き培養皿(グリッド付きスライドガラス等も可)、必要に応じて	1
<input type="checkbox"/> vortex mixer、必要に応じて	1

手順

(1) 細胞の調製

播種する細胞数の決定は、造血幹細胞の評価系であるコロニーアッセイにおいて、作業者による誤差を最低限にし、正しく計数するために重要である。播種細胞数が極端に多い場合、個々のコロニーが区別しにくく、カウントできないだけでなく、コロニー形成が阻害され、結果としてコロニーサイズ、数が負に影響される。逆に極端に少ないと CFU-Mix コロニー等の少数集団のコロニーが0となったりして、過小評価となる。また、播種する細胞数はどのような状態のときに採取されたか、G-CSF 投与された状態か、その時の CD34 陽性の細胞数等によって調節する必要がある(表1参照)。必要に応じて、骨髓液は比重遠心法により単核球に分離して播種する。血液型異型のための単核球分離後の骨髓または末梢血幹細胞採取後では特に分離は不要であり、細胞濃度のみの調製で播種可能である。

- ① 骨髓は細胞濃度が高いため buffer で 2～3 倍に希釈する。
- ② フィコール(比重 1.077) 4mL を、15mL のコニカルチューブに入れる。①で調製した骨髓液を血液:比重重量比が 1～2:1 になるように静かにフィコール上に重層する(フィコール分離法)(図 1A)。
注)血液を重層する際は、血液層を乱さないように慎重に行う。層が乱れると単核球の回収率は低くなる。
- ③ 室温で 1800rpm, 20 分間遠心分離する(図 1B)。
注)スウィングローターを使用しブレーキは OFF にする。
- ④ 単核球層を採取し、充分量の PBS を加え良く攪拌し 1500rpm, 10 分間遠心後、上清を除く(図 1C)。
- ⑤ この操作を 2 回行う(洗浄)(図 1D)。
- ⑥ 細胞に Medium(α MEM 等)を加えて細胞数を算定する。表1を参考にしながら細胞数を希釈調節する(図 1E,F)。

表2 メチルセルロース培地 1mL 当りの播種細胞数の目安

検体	メチルセルロース培地 1mL 当りの細胞数
骨髓(単核球)	$2 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL
末梢血幹細胞	$2 \sim 20 \times 10^4$ cells/mL (※CD34 ⁺ 値を参考にしながら調製)
CD34 陽性細胞	200～500 cells/mL
臍帯血(単核球として)	$1 \sim 2 \times 10^4$ cells/mL
臍帯血(解凍サンプル)	$2 \sim 5 \mu$ L/mL

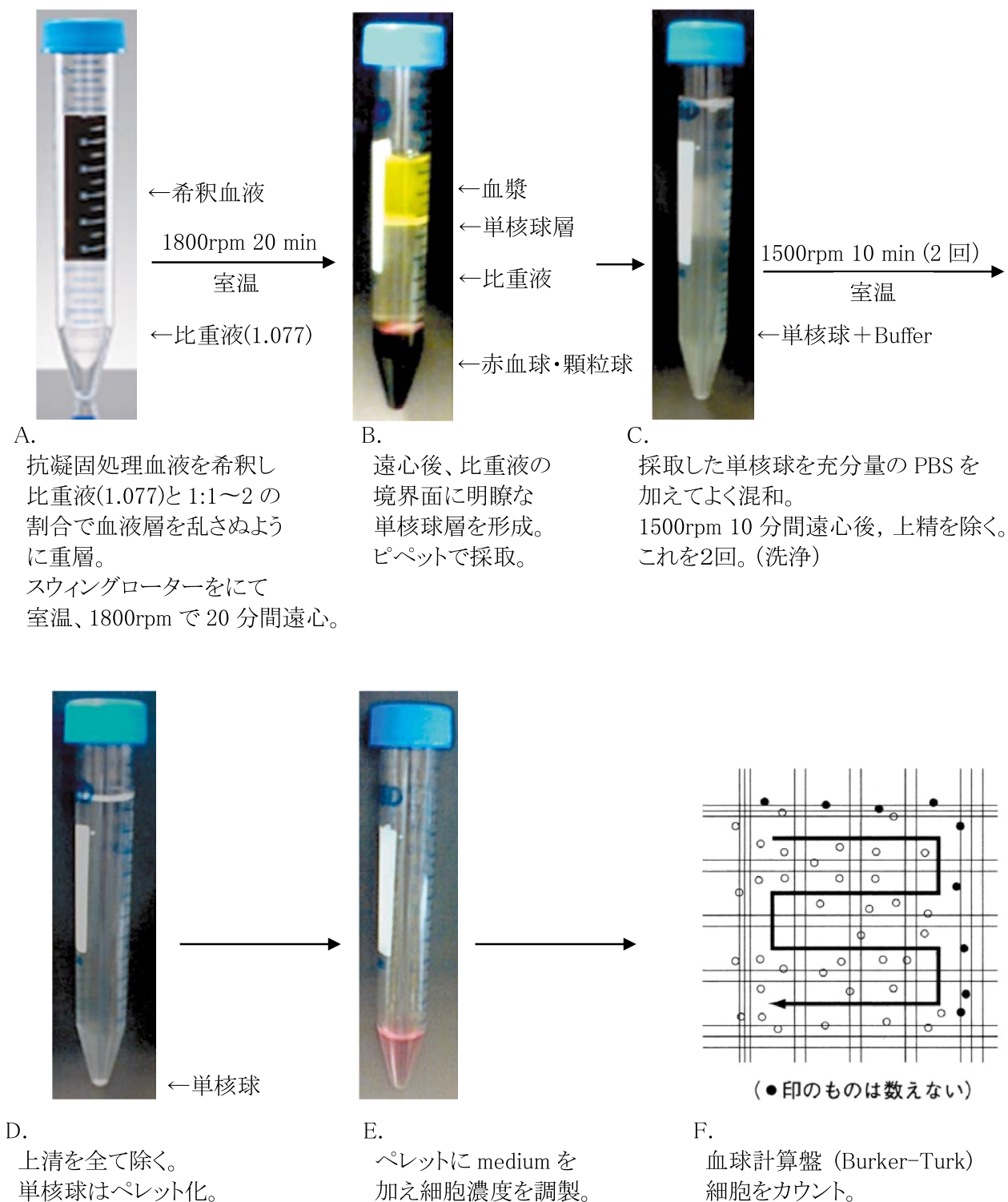


図1 単核球分離

(2) メチルセルロース培地の調製

- ① 構成するメチルセルロース培地には α MEM と IMDM が一般的で、いずれも既製品が市販されている。メチルセルロース培地は -20°C で保管し、凍結解凍の繰り返しは避ける。一回に使用する量(下記のサイトカインも含めて)を、予めチューブに分注して凍結しておくことと便利である。
- ② メチルセルロースを冷蔵または室温で解凍する。
- ③ メチルセルロース(終濃度 0.9~1.2%)に、牛胎児血清 (fetal bovine serum; FBS、終濃度 30%)、牛血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA、終濃度 1%)、2-mercaptoethanol (2-ME、終濃度 $5 \times 10^{-5}\text{M}$)、L-glutamine、IL-3(終濃度 10ng/mL)、EPO(2U/mL)、その他 stem cell factor (SCF、終濃度 10ng/mL)、G-CSF(終濃度 10ng/mL)、GM-CSF(終濃度 10ng/mL)などを加える。どのサイトカインを加えるかは予め検討しておく。なお、多くの臍帯血バンクで使用しているメチルセルロース培地 MethoCult H4034 (Stemcell Technologies Inc. Vancouver, BC, Canada)は、既にサイトカインや試薬等が含まれ FBS のロット評価もされているため細胞浮遊液のみの添加で播種できる。

(3) 播種

- ① メチルセルロース 4mL に、(1)で調製した細胞浮遊液の容量 0.4mL (図2A)を添加する。これにより 3 ディッシュ(半流動培地のため)分の培地が得られる。ただし、添加する容量は市販のメチルセルロース培地の種類によって異なるので添付書を参考にする。
- ② 細胞浮遊液を加えた後、チューブの蓋をしっかりと締めて上下に 30 回位、勢いよく振盪し良く混ぜ、細胞が均等に混じり合うようにする。vortex でも可能(図2B)。
- ③ チューブを立て 5 分間位放置し、脱気する。
- ④ 35mm ペトリディッシュまたは収容する 100mm ディッシュの蓋の上または側面に日付や検体内容を記入する。
- ⑤ 1mL のシリンジに 18G の針(またはコロニー専用針)をつけ、チューブの淵にシリンジが当たらないように中心に針を沈めてメチルセルロースを2~3回シリンジで引きながら、シリンジ内の空気を抜く(図2C)。
- ⑥ 35mm ディッシュ 1 枚に 1.1mL を分注しディッシュを傾けながら回転させ、メチルセルロース培地を均一にのばす。大きな気泡は潰しておく(図2D)。
- ⑦ 100mm ディッシュには、35 mm のメチルセルロース培地入りディッシュ 2 枚に蓋をし、もう 1 枚の 35mm ディッシュには滅菌水 2mL を入れて、蓋はしない(メチルセルロース培地の乾燥を防ぐため)で入れる。そして 100mm ディッシュに蓋をする(図2E)。
- ⑧ 100mm ディッシュごと、 37°C 、5% CO_2 、湿度 100%の安定したインキュベータに入れる。培養は 14 日間であるがこの間あまり出し入れをせず、またインキュベータが揺れないよう注意をする。ひとつのコロニーが崩れて2つに見える。

(4) コロニーカウント

- ① 培養 14 日目、インキュベータからディッシュを取り出し、倒立顕微鏡のグリッド付きスコアリングディッシュ (60mm の格子入り培養ディッシュ) をホルダー上に固定し、メカニカルステージの X 軸ハンドル及び Y 軸ハンドルを操作しながら最初は低倍率 (2.5 倍) でディッシュの全視野を走査し、拡大率 40～50 倍 (接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 4～5 倍) で各コロニー形成細胞を確認しながらコロニーの数をカウントする。必要に応じて、さらに高倍率でコロニーの種類を確認する (図 2F)。

- ② 検査結果を表に記載する (図 3)。

※メチルセルロースは粘度の高い液体のため、培養中およびコロニー観察中は液面を乱さないよう水平を保ちながら丁寧に扱うようにする。培養 14 日目前後でコロニー数の変動がみられない範囲を決定しておく。

表3 各種造血幹細胞移植に必要とする CFU-GM 数(理想的)

検 体	骨髄移植	末梢血幹細胞移植	臍帯血移植
CFU-GM 数	$\geq 1 \sim 2 \times 10^5 / \text{kg}$	$\geq 1 \sim 2 \times 10^5 / \text{kg}$	$\geq 5 \times 10^4 / \text{kg}$

これらの造血幹細胞移植に必要な CFU-GM 数を輸注することで、造血機能の回復が得られているので臨床では前駆細胞レベルの細胞数により左右されていると考えられる。

造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト



A.
細胞濃度を調製。



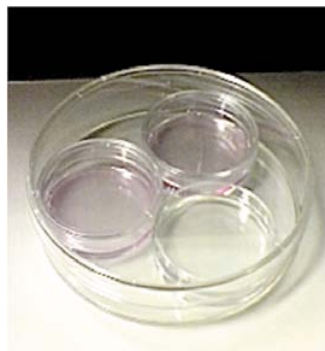
B.
必要細胞数を加え、
蓋をして上下に 30 回位
激しく振る。
静置して脱気する。



C.
管壁に触れ無いうに
2～3 回シリンジを引き
正確に 1.1mL を採取する。



D.
35mm dish に注入する。
dish を傾けながら隅々
まで均一に播く。
(蓋をする)



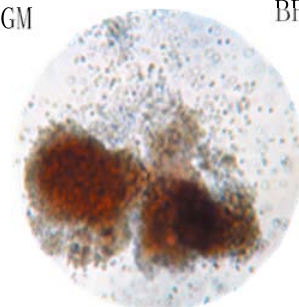
E.
100mm dish にセットし蓋を
する。乾燥防止のため必ず
35mm dish 1個に滅菌水を
2mL 入れる。(蓋はしない)



CFU-GM



BFU-E



CFU-Mix

F.
加湿インキュベータにて
37℃、5% CO₂ 下で 14 日間
インキュベート後、カウントする。

図 2 コロニーアッセイ

コロニーアッセイ申込書(兼報告書)

申込日 ○○○○年 ○○ 月○○日 (採血日 ○○○○年 ○○ 月○○日)

患者名	○○○○ ○○歳	検体名	骨髄・末梢血・末梢血幹細胞
血液型	(A) 型 Rh (+)		その他 (u-BMT)
疾患名	○○○○	連絡事項	Donorの血液型 (B) 型Rh (+) G-CSF 投与 (-)
申込医	○○○○	移植日	○○○○年 ○○ 月○○日
病棟名	○F 病棟	細胞数	2.62×10^9 個

回収細胞数 サンプル 1100 ml より NC (Nucleated cells)
 有核細胞数 $\approx 19.55 \times 10^9$
 MNC (Mononuclear Cells)
 単核球数 $= 2.62 \times 10^9$ 個回収

cell no	dish no	GM	BFU-E	E-Mix	Total
2.0×10^4 /ml	1	67	92	35	199
	2	60	86	32	180
	3	72	95	40	215
	4	63	81	37	186
	mean ± SD	65.50 ± 5.20	88.50 ± 6.24	36.00 ± 3.37	195.00 ± 15.51

※ GM + E-mix = 101.5

$$\frac{101.5 \times 2.62 \times 10^9}{2.0 \times 10^4} = 1.33 \times 10^7$$

※ 各施設でGMコロニーの選択基準を取り決めておく。

例1:GM(必須)のみ

例2:GM(必須) + E-Mix

GM-Containing Progenitor

サンプル 1100mlより 1.33×10^7 個 (total)

BW : 60kg

$$\frac{1.33 \times 10^7}{60} = 2.22 \times 10^5/\text{kg}$$

コメント

報告日 ○○○○年 ○○ 月○○日

 ○○○○大学○○○○附属病院
 ○○○○・輸血部 印

図3 コロニーアッセイ申込書(兼報告書)

参考資料

- 1) Eaves C and Lambie K, Atlas of Human Hematopoietic Colonies. StemCell Technologies Inc., 1995.
- 2) 中畑龍俊、池淵研二. 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
- 3) 小野寺良尚、齋藤英彦監修. 造血細胞移植マニュアル、第3版改訂新版第2刷、医学書院、2005.
- 4) 東大医科研 輸血部手順書

(尾上 和夫、長村 登紀子)

第10章 末梢血幹細胞の処理と凍結保存

はじめに

末梢血幹細胞において同種移植の場合には、ドナーに granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) を投与し連続成分採血装置を用いたアフエレーシスという手法で末梢血から採取される。自家造血幹細胞移植の場合は、患者に化学療法を行った後の骨髄回復期に G-CSF を投与して末梢血幹細胞を採取することが多いが、G-CSF 単独で採取することもある。同種・自家末梢血幹細胞移植共に患者に超大量化学療法を行った後に凍結保存しておいた末梢血幹細胞を輸注し、造血・免疫を再構築する方法である。末梢血幹細胞の保存は、細胞液に凍害防止液を混合した後にプログラムフリーザーを用いて徐々に冷却し、最終的に -196°C の液体窒素内に保管する方法が世界的に行われている。

今回説明する方法は、末梢血幹細胞の濃縮調製後に凍害防止液として CP-1 (dimethylsulfoxide (DMSO))と hydroxyethyl starch (HES)の混合液;極東製薬、研究用試薬として販売)を添加して、 -85°C のディープフリーザー(以下 DF)で凍結する本邦の牧野らが開発した方法である¹⁾。低コストで比較的簡単に操作可能なため本邦では広く利用されている。

必要資材の一例

	名称	製造販売元	必要量
①	25% (または 20%) アルブミン	JB、ニチヤク、化血研	1 本
②	RPMI 1640 (液状) 11875-093	GIBCO BRL	1 本
③	細胞凍害保護液 CP-1 (100mL 用)	極東製薬工業(株)	1 本
④	ヘパリン (5mL) (ノボ・ヘパリン注 1000)	持田製薬(株)	1 本
⑤	50mL シリンジ	テルモ(株)	4 本
⑥	5mL シリンジ	テルモ(株)	1 本
⑦	三方活栓	カワスミ(株)	1 個
⑧	フローズバッグ F-100	ニプロ(株)	2 枚
⑨	サンプルチューブ	ナルジェヌンク(株)	4 本
⑩	紙製キャニスター	特注品	2 枚
⑪	CP-1 専用保冷容器	自家製造	1 コ
⑫	ペアン	一般医療器具	2 本
⑬	綿棒 (メンティップ)	日本綿棒(株)	適量
⑭	消毒用イソジン液	明治製菓(株)	適量
⑮	シャーレ (サニーシャーレ SP)	アズワン(株)	1 枚
⑯	保冷剤	市販品	適量
⑰	アルミキャニスター (AL-100:F-100 用)	ニプロ(株)	2 枚

造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト

⑮	造血細胞処理保存工程記録	自家製	1 枚
⑯	穴あき 2 重ハッポー箱	自家製品	1 組
⑰	オキシドシグナル培地 (細菌検査培地)	関東化学(株)	1 本

使用備品の一例

①	バイオハザード対策用キャビネット (MHE-130AB3)	サンヨー(株)	1 台
②	フリーザー付き薬用保冷庫 (MPR-214F)	サンヨー(株)	1 台
③	超低温フリーザー	サンヨー(株)	1 台
④	シリンジポンプ (SP-500)	JMS(株)	1 台
⑤	シェーカー (SHM-201)	旭テクノグラス(株)	1 台
⑥	チューブシーラー (AC-157)	テルモ(株)	1 台

作業手順

(1) 調製準備

- ① COBE SPECTRA などの血液成分採取装置で末梢血幹細胞液 (以下 PBSC) を採取したものを準備する。
- ② ローラーペンチで PBSC バッグライン内の PBSC 液を十分バッグ内液と混合する。
- ③ ラインを約 20cm のところでシールする。
- ④ ラインを切り離し、処理前サンプルとして細胞検査担当者に引き渡す。

(2) 凍害防止液の準備

- ① 処理開始年月日時間を造血細胞処理工程記録に記録する。
- ② CP-1 のロット番号を記録する。
- ③ 25%アルブミンのロット番号を記録する。(アルブミン製剤は、ロット管理が必要で、20 年間記録の保管が義務付けされている。)



図 1 左から RPMI 1640、CP-1、25%アルブミン。

- ④ CP-1 専用保冷容器に CP-1 (ボトル) を入れ、25%アルブミンを 32mL ゆっくり混和しながら加える (図 2)。

- ⑤ 25%アルブミン注入量を記録する(図 3)。



図2



図3

- ⑥ CP-1+アルブミン=約 100 mL となる。CP-1 は、そのまま専用保冷容器で保管する。

(3) PBSC バッグにフローズバッグを接続

- ① フローズバッグのロット番号を記録する。
- ② フローズバッグ(①)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(予め準備したラベルがある場合は、それを貼る)。
- ③ フローズバッグのプラスチック針を PBSC 液バッグのポートに差し込み、フローズバッグ側ラインはペアンで止める(図 4)。



図4

- ④ 三方活栓のロット番号を記録する。
- ⑤ 他方のラインポートに三方活栓を取り付け、50mL のシリンジを 2 本取り付ける。

(4) 濃縮 PBSC 液の調製

- ① 2 本の 50mL シリンジで PBSC 液の内容量を計量し記録する((a)とする)。(図 5)



図 5

- ② 再度 PBSC 液を PBSC バッグにもどす。
- ③ RPMI1640 のロット番号を記録する。
- ④ $\text{RPMI1640 量}(b) = 100 - (a)$ を計算し、RPMI1640 ボトルより 50mL シリンジで分取する(図 6)。



図 6

- ⑤ RPMI1640 採取量を記録する。
- ⑥ RPMI1640 50mL シリンジをフローズバッグ①の三方活栓に取り付ける。
- ⑦ ヘパリンのロット番号を記録する。
- ⑧ ヘパリンを 5mL シリンジで 2mL 分取する(図 7)。



図 7

- ⑨ ヘパリンの分取量を記録する。
- ⑩ ヘパリンの 5mL シリンジをフローズバッグ①の三方活栓に取り付けつる。
- ⑪ 二つのローラークランプを開けヘパリンを 2mL 注入し、次に RPMI1640(b)を注入する。RPMI1640 注入中にヘパリンシリンジを RPMI1640 で共洗いする(図 8)。

PBSC 液 + RPMI1640 + ヘパリン = 約 102mL となる。

- ⑫ 上記⑪を冷蔵庫内に静置する(図 9)。



図 8



図 9

(5) 濃縮 PBSC 液にアルブミン加 CP-1 を添加

- ① アルブミン加 CP-1 を 50mL シリンジに 2 本採取し、1 本は冷蔵庫で一時保管する。
- ② アルブミン加 CP-1 入り 50mL シリンジを三方活栓に取り付けシリンジポンプにセットする。
- ③ あらかじめ冷蔵庫内で冷却しておいた保冷剤で濃縮 PBSC 液バッグを包み、シェーカーに乗せて振とうする。
- ④ 300mL/hr のスピードで濃縮 PBSC 液バッグに注入する(図 10)。



図 10

- ⑤ シリンジポンプ速度を記録する。
- ⑥ アルブミン加 CP-1 を最初の 50mL 注入後、残りのアルブミン加 CP-1 50mL を続けて注入する。
- ⑦ アルブミン加 CP-1 注入量を記録する。

(6) 保管用・細菌検査用サンプルの分取

- ① 移植前の品質検査のための凍結保存用サンプル(滅菌チューブ)を 2 本準備する。
- ② 凍結用サンプルチューブには、所属・日付・氏名・製剤 No.を記載する。(予め準備したラベルがある場合は、それを貼る)
- ③ 移植後の遡及調査の処理施設保管用サンプル(滅菌チューブ)1 本と細菌検査用(オキシドシグナル)培地を 1 本準備する。
- ④ 処理施設保管用サンプルチューブと細菌検査用培地には、所属・日付・氏名・製剤 No.と製剤

「処理施設用」と記載する。(予め準備したラベルがある場合は、それを貼る)

- ⑤ 三方活栓に附属の 5mL シリンジで凍結用サンプルおよび処理施設保管用サンプルを 2mL 分取する。
- ⑥ 凍結保管用サンプル各 0.5mL を 2 本のサンプルチューブに分取し、量を記録する(図 11)。
- ⑦ 処理施設保管用サンプル各 0.5mL を 1 本のサンプルチューブに分取し、量を記録する。



図 11

- ⑧ 直ちに冷蔵庫で保管する。
- ⑨ 細菌検査用培地のロット番号を記録する。
- ⑩ 5mL シリンジに残った CP-1 混合 PBSC 液 0.5mL を細菌検査用培地に注入し、量を記録する。
凍結保存後に細菌検査室に提出する。

(7) CP-1 混合 PBSC 液をフローズバッグへ充填

- ① 三方活栓に接続している 50mL シリンジを利用し、アルブミン加 CP-1 を添加した濃縮 PBSC バッグから CP-1 混合 PBSC 液を採取し、接続しているフローズバッグ(1)に 100mL 移す(図 12)。最後にエアアーを抜き、チューブシーラーで 3 点シーリングを行い切り離す(図 13)。



図 12

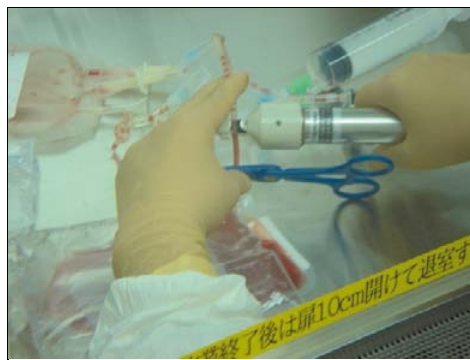


図 13

- ② フローズバッグ(1)のラベルに内容量を記載する。
- ③ 処理工程記録に内容量を記録する。
- ④ 直ちに保冷剤で包む。
- ⑤ アルブミン加 CP-1 を添加した濃縮 PBSC 液バッグの他方ポートにフローズバッグ(2)を接続す

る(図 14)。



図 14

- ⑥ フローズバッグ②に所属、日付、氏名、製剤 No.を記録する(予め準備したラベルがある場合は、それを貼る)。
- ⑦ インジェクションポートに 50mL シリンジを接続する。
- ⑧ 接続 50mL シリンジで残りの CP-I 混合 PBSC 液を計量してフローズバッグ②に注入し、最後にエアーを抜き 3 点シールする。
- ⑨ フローズバッグ②に内容量を記載する。
- ⑩ 内容量を処理工程記録に記録する。
- ⑪ フローズバッグ①②とサンプルチューブ 4 本を保冷剤で包み、搬送用の容器に収納して細胞調製室の外へ搬出する(図 15、16)。



図 15

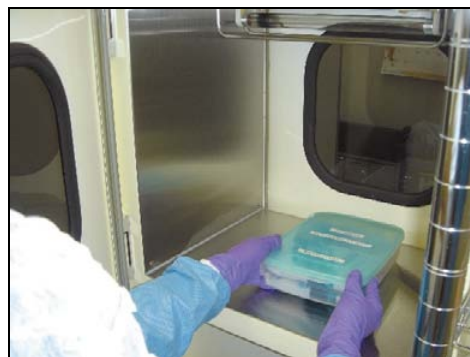


図 16

- ⑫ 調製作業終了年月日時間を処理工程記録に記録する。

(8) 凍結作業

- ① フローズバッグ①②をそれぞれビニールの袋に入れる。
- ② アルミキャニスター(ニプロ)に収納し、蓋をテープにて固定する(図 17)。
- ③ -85°C の DF 内のハッポースチロール板に静置する(図 18)。



図 17



図 18

- ④ 凍結および処理施設用サンプルチューブは穴あき 2 重ハップースチロール箱に収納し、フタをテープで固定する(図 19)。
- ⑤ -85°C の DF に直接静置する(図 20)。



図 19



図 20

- ⑥ 保管用紙製キャニスターに所属、日付、氏名、製剤 No および内容量を記載する。
- ⑦ 処理工程記録に凍結開始年月日時間を記録する。
- ⑧ フローズバッグと処理施設用サンプルチューブは、3 時間以上または一昼夜 -85°C の DF 内に静置する。
- ⑨ 凍結が終了したら、 -85°C の DF 内でフローズバッグ①②を金属製キャニスター(ニプロ)より取り出し、ていねいに保管用紙製キャニスターに移し替える。
- ⑩ 凍結保存用サンプルは、 -85°C の DF 内で穴あき 2 重ハップースチロール箱から取り出しフローズバッグ①②の入っている保管用紙製キャニスターに収納する。
- ⑪ 保管用紙製キャニスター(フローズバッグ・サンプルチューブ含む)は、保管番号付きラックの所定の場所に収納する。
- ⑫ 「末梢血幹細胞保管管理台帳」に製造年月日、製剤番号、製剤名、ドナーID、ドナー名等の必要事項を記録する。

定期的な凍結速度と品質の確認

(1) 凍結速度の調節

凍結速度は、凍結融解後の細胞生存率に大きな影響を与える。凍結速度が速すぎると細胞内氷晶が形成され、細胞内器官に障害を与え細胞壁が破壊されてしまう。一方遅すぎると細胞外溶液の凍結に伴い細胞外高浸透圧化が起こり過冷却状態の細胞内から水分が移動し細胞内脱水が進行する。細胞は萎縮し致命的障害を受ける。²⁾

−85℃の DF を使用する簡易凍結法は、一律な環境であるため凍結速度は凍結容器形状・材質・大きさ等に大きく左右される。一般的なプログラムフリーザーを用いた方法と類似した凍結速度(1-3℃/分)に調節する必要がある。³⁾ フローズバッグとサンプルチューブ内の末梢血幹細胞は、凍結保存容器と量の違いから−85℃DF に静置した場合、同一の速度で凍結は進まない。フローズバッグは遅く、サンプルチューブは早い傾向となる。このような場合、フローズバッグを金属製キャニスターに収納して冷却速度を早くする。また、DF の底に発泡スチロール板を敷き、その上にフローズバッグ入りアルミニウム製キャニスターを静置すると、さらに凍結速度を細かくコントロールすることが出来る。サンプルチューブは断熱材等で包装して冷却速度を遅くし、双方の凍結速度を調節して同じ速度で凍結出来るように工夫する(図 21)。

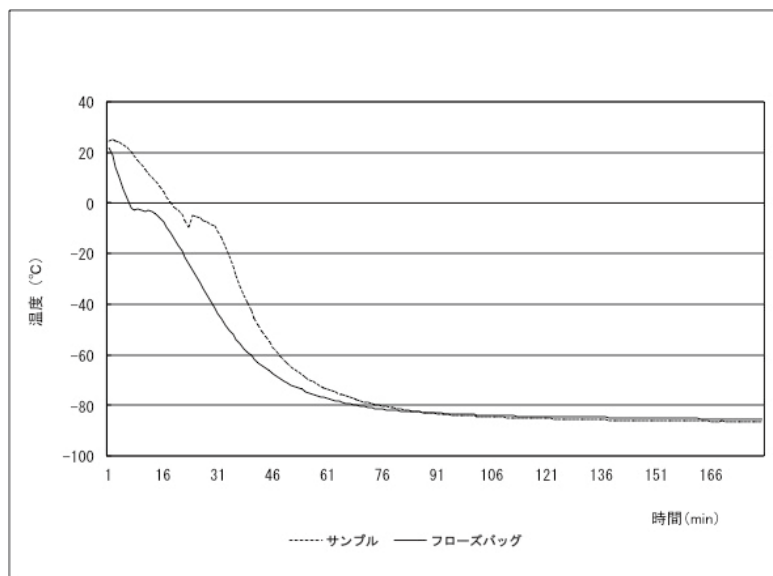


図 21 −85℃の DF を用いた凍結バッグとサンプルチューブの凍結曲線の一例

(2) 解凍後の品質検査による適切な凍結速度の決定

次に、前述の条件で凍結した場合、解凍後の品質が適切かどうかを予め検証する。検査は、一般的に凍結前・解凍後の「有核細胞数」、「細胞生存率」、および「CD34 陽性細胞数」があり、可能であれば「CFU-GM(コロニーアッセイ)」も検討すると良い。これらのデータの記録も保管すること。このような検査結果から末梢血幹細胞が良い品質で凍結される凍結速度を決定することを推奨する。

(3) 定期的な凍結速度と品質の確認

適切な凍結速度(解凍後の品質も良好)が決定され末梢血幹細胞の凍結業務を行う際、凍結速度が恒常的であるかを定期的に検証する必要がある。方法としては、ダミー(前述の「CP-I 混合 PB 液」から細胞成分を除いたもの)をフローズバッグおよびサンプルチューブに充填し温度センサーを取り付けて凍結作業を行い適切な凍結曲線が描けるか確認(あらかじめ検討した条件の凍結曲線と比較)する。記録も保管する。

毎回同じような凍結曲線が描ければ、末梢血幹細胞は良い品質で凍結され保管されることとなる。また、解凍後の品質も良好と言えよう。一連の凍結について描いた凍結曲線は、末梢血幹細胞の保存に関する「品質保証書」となる。

このように -85°C の DF を用いた簡易的な凍結方法でも比較的良好な成績が得られている。(表 1)

表 1 凍結前・解凍後の回収率の一例(n=47)

項目	凍結前	解凍後	回収率(%)
保存期間(日)	—	74	—
生細胞率(%)	98.30	93.20	—
有核細胞数($\times 10^{10}$)	1.40	1.16	85.40
CD34 陽性細胞数($\times 10^6$)	112.00	99.26	88.63
CFU-GM($\times 10^6$)	21.88	19.12	85.59

おわりに

CP-1 と DF を用いた簡易凍結方法は、末梢血幹細胞処理のような日常業務では短時間で低コストであるため普及した。凍結保存期間は、移植時期が比較的近い場合は良いが、長期にわたる場合は液体窒素内での保存が品質的にも安定する。

院内製剤は、手順書を作成し、清潔な環境下で製造し、品質検査を行い、記録を保管することが業務の質の向上に繋がるものと考ええる。

参考資料

- 1) Makino S, Harada M, Akashi K, et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80°C without rate-controlled freezing. Bone Marrow Transplant. 1991;8:239-244.
- 2) 品川克至, 原田実根. 造血幹細胞凍結保存法の現状. 低温医学 1996;22:169-175.
- 3) Clark J, Pati A, McCarthy D. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer. Bone Marrow Transplant. 1991;7:121-125.

(伊藤 経夫)

第11章 骨髄液からの赤血球除去

はじめに

同種骨髄移植において、レシピエントとドナーにABO主不適合(表1)がある場合、ドナーの骨髄液に含まれる赤血球のA抗原またはB抗原の何れかまたは両者にレシピエント血漿中の抗体(抗A, 抗B抗体)が結合し、重篤な即時型の血管内溶血を起こす可能性がある。また、レシピエントにドナーの赤血球抗原に対する不規則抗体が存在する場合、ドナーの骨髄液に含まれる赤血球抗原と反応し、血管外溶血を起こす場合がある。あるいは、レシピエントがRh 陰性で抗D抗体を保有し、ドナーがRh 陽性の場合、ドナーの骨髄液に含まれるRh 陽性赤血球がレシピエントの抗D抗体と反応し、血管外溶血を起こすことが考えられる。同様に、レシピエントがRh 陰性で抗D抗体を保有していない場合においても、骨髄液に含まれるRh 陽性の赤血球によって感作され、抗D抗体が産生される可能性は否定できない。これらの組み合わせの不適合同種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となる。また、最近ではほとんど実施されなくなったが、自家骨髄移植を実施する場合には、予め採取した自家の骨髄液から赤血球と顆粒球を除去し、単核細胞に分離して凍結する必要がある。

骨髄液から赤血球を除去する方法には、大別して機器を用いる方法^{1)~ 4)}と手作業を含む用手法の2つがある。しかし、近年は遠心型血液成分分離装置(以下、血液成分分離装置)が中心で行われている。赤血球除去に用いられる自動機器には、閉鎖回路で最も汎用されている血液成分分離装置のSpectra OptiaTM(図1A)、COBE SpectraTM(TERUMO BCT社)(図1B)やCOM.TECTM(Fresenius社)(図1C)、赤血球の混入が少ないFicoll液を用いたコンパクトな自動細胞分離装置のSEPAXTM(Biosafe社)(図1D)などがある⁵⁾。一方、用手法にはFicoll液を用いた比重遠心法⁶⁾と赤血球沈降促進剤のhydroxyl ethyl starch (HES)⁷⁾を添加し赤血球除去する方法がある。各種の自動成分分離装置を用いて骨髄液から赤血球除去を行う際には、必ず付属している「骨髄液処理手順書」を参照し、実施することが必須である。また、細胞処理においては「作業工程記録書」「結果報告書」に記載することが重要である。

表1 赤血球除去が必要なABO不適合の組み合わせ

	ドナー	レシピエント
ABO 主不適合	A	O
	B	O
	AB	O
	AB	A
	AB	B
ABO 主・副不適合	A	B
	B	A



図1 赤血球除去に用いられる自動機器

(A) Spectra Optia™ (B) COBE Spectra™ (C) COM.TEC™ (D) SEPAX™

血液成分分離装置を用いた赤血球除去

安全に自動化された無菌閉鎖回路にて赤血球、白血球および血漿に分離し、白血球成分の単核細胞層を濃縮採取する汎用機器3機種(Spectra Optia™、COBE Spectra™、COM.TEC™)と、Ficoll液を用いて単核細胞分離する1機種(SEPAX™)を紹介する。なお、いずれの機種でも、まず、ディスプレイザブル・セット等に破損、孔などの不具合などがないことを、所定の手順で確認することが重要である。

(1) Spectra Optia™ (Terumo BCT 社)

1) 骨髓液の BMP バッグへの移し替え(図2)

採取された骨髓液を、骨髓液処理(BMP)セットの BMP バッグに移す。ACD-A 液を採取骨髓液総量に対し約 10:1 の割合で加える。バッグ内赤血球量が 125mL 未満の場合は、適切な血球分離のため、赤血球を骨髓液に追加する必要がある。



図2 骨髓液濃縮専用(BMP)のセットアップ

2) IDL セットと BMP セットの接続(図3)

機台に IDL セットを取り付ける。遠心分離器へのチャネル取り付け時は、適切な向きできちんとロックされているかを確認する。その後、骨髓液を導入した BMP セットを接続する。その際、IDL セットの採血ラインにエアが入らないよう注意する。

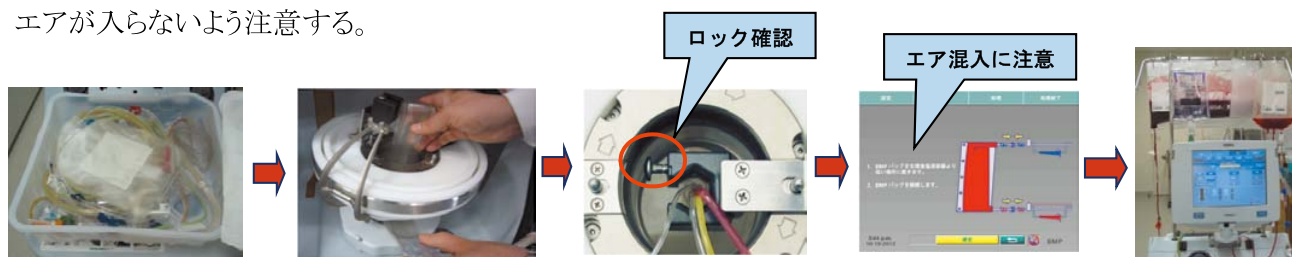


図3 IDL, BMP セット取り付けと処理の開始

3) 骨髓液の処理

インターフェースの形成は自動で行われる(図 4)。形成後は、採取プリファレンス(図 5)を変更して採取成分を調整することができる。採取プリファレンスとは、バフィーコート(血小板と白血球の層)から血球を採取する深さを微調整するためのものである。採取プリファレンスを上げることで採取物には血漿(血小板)が多く混入し薄い赤色となり、下げることで赤血球がより多く混入し濃い赤色となる。システムが採取ポートに血球を検出すると、自動的に採取バルブが採取位置に移動する。手順中は、適宜 BMP バッグ内の成分を静かに混和する。最終の分離細胞採取量は骨髓液の約 1/10 になる。

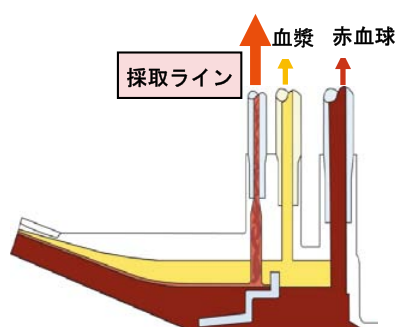


図4 遠心槽内のインターフェース
(文献 8 より引用)

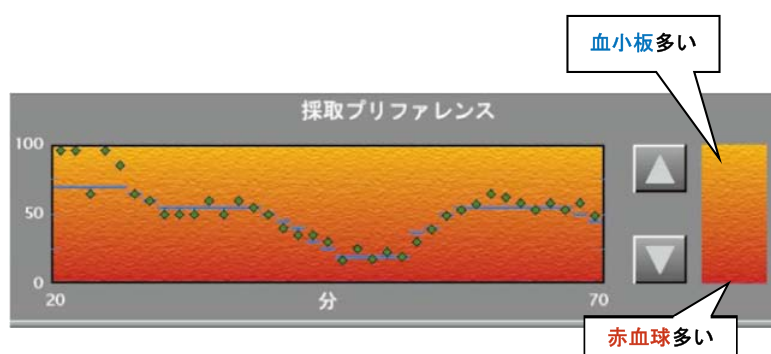


図5 採取プリファレンス

4) 処理の完了

処理目標が達成されると、処理終了画面が表示される。セットの取り外し後、実施した手順の要約が画面に表示される。手順データは終了後も保存されており、最大 100 件までシステムに蓄積される。

(2) COBE Spectra™ (TERUMO BCT 社)

1) 骨髓液の BMP セット(図6)

採取された骨髓液をリークが無いことを確認した骨髓液処理(BMP)セット(A バッグ,B バッグ)の A バッグに移す。ACD-A 液を採取骨髓液総量に対し約 10:1 の割合で加える。



図6 骨髓液濃縮専用(BMP)のセットアップ

2) WBC セットと BMP セットの接続・処理の開始(図7)

機台に白血球採取用(WBC)セットを取り付け、骨髓液を骨髓液処理(BMP)セットに導入後組み合わせ処理を実施する。WBC ディスポーザブルセットをスペクトラに取り付け、BMP セットと血漿バッグに接続

する。骨髓液中の RBC 量が 215mL 以上の場合、プラズマ採取バッグを接続する。クイックスタート機能で血漿ポンプを自動的に制御して、適切なインターフェースを確立する(図8)。

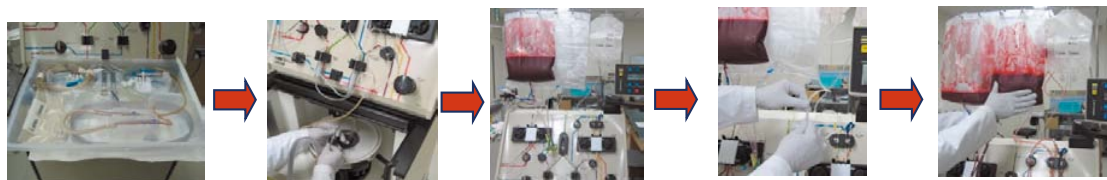


図7 処理の開始とクイックスタート

インターフェースの確認は遠心槽内を目視で確認し(図8)、WBC カラーグラム™(図9)で比色する必要がある。インターフェースはプラズマポンプの流量を変えることにより調整する。インターフェースが高すぎると採取ラインには赤血球がより多く混入し濃い赤色となり低すぎると血漿(血小板)が多く混入し薄い赤色となる。

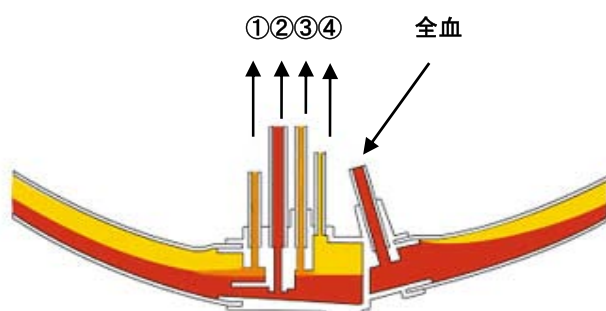


図8 遠心槽内のインターフェース(文献9より引用)

- ①採取ライン
- ②赤血球ライン
- ③コントロールライン
- ④プラズマライン



図9 カラーグラム

カラーグラムにて Hct 値を簡易的に確認することが可能。本手順で推奨される Hct 値は約 3%である

3) 骨髓液の処理

処理中、骨髓液は BMP セットバッグ A から回路内に流入しバッグ B に移行される。バッグ A が空になる前に鉗子にてクランプ部位を切り換え、次に骨髓液がバッグ B から流入してバッグ A に戻される。目標採血量が処理されるまで、この作業を継続し採取する。赤血球成分の沈降を防止し骨髓液を均一にするため処理中は骨髓液の入ったバッグを時々軽く攪拌する。最終の分離細胞採取量は骨髓液の約1/10 になる。

4) 処理の完了

処理終了後、操作マニュアルに従いディスポーザブルを取り外し廃棄する。採取細胞はシステム照合で。

(3) COM.TEC™ (Fresenius 社)

1) 骨髓液の BMSC ツインバッグセット、分離チャンバー部、専用回路 P1Y

無菌的に採取された骨髓液をツインバッグの片方に移す(図10)。血液回路の分離チャンバー(図 11)を専用のチャンバー固定部にセットし、この部分を回転させることにより G フォースを作り出し骨髓液を各成分毎に分離する。本体には専用回路キット P1Y を使用する(図 12)。



図10 BMSC ツインバッグ

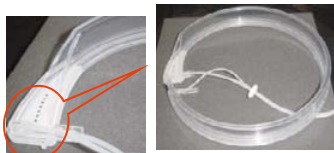


図 11 シングル分離チャンバー



図 12 専用回路 P1Y セット

2) 本体へのセット取り付け・骨髓液の処理開始(図 13)

本体に BMSC ツインバッグを上下フックに吊るし、P1Y セットおよび分離チャンバーを取り付ける。プライミング後、骨髓液を回路内で連続的に循環させる。骨髓液全量を約 4～5 回処理する。

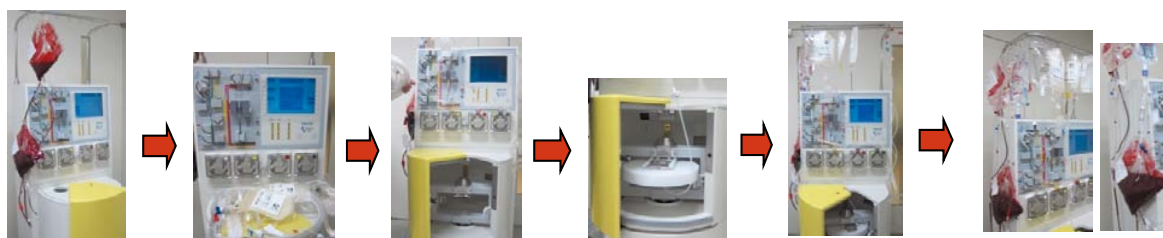


図 13 本体へ各セット取付け・処理開始

3) 遠心チャンバー内成分分離(図 14)

分離チャンバー内に骨髓液が流入すると遠心力で回路の外側に比重の重い成分の赤血球層が形成され、回路の内側には血漿成分が形成しバフィーコート層以外の成分はそれぞれのポートより流出する。

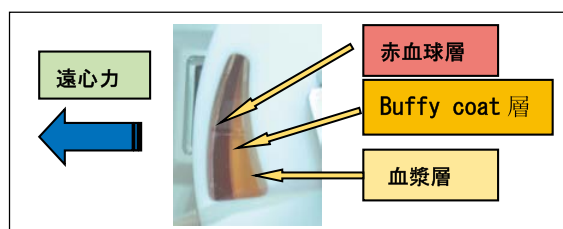
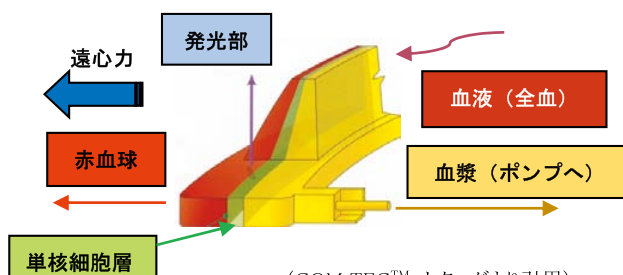


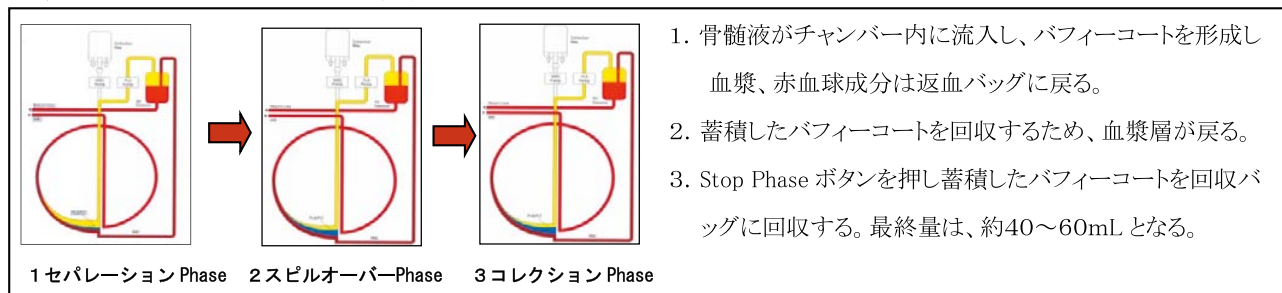
図 14 分離の原理 (文献 10 より引用)



(COM.TEC™ カタログより引用)

赤血球層と血漿層の間に単核細胞層いわゆるバフィーコートが形成され蓄積される。光学的センサーにて随時モニターしており、バフィーコートが流失するのを防ぐ。

4) 骨髓液の処理 (下記1～3の分離プロセスを実施する)



5) 処理完了

処理終了後、操作マニュアルに従いディスプレイを外し廃棄する。

(4) SEPAX™ (Biosfe 社)⁵⁾

1) 骨髓液量の調整 (図 15) (880mL 以上の場合)

1 サイクルの最大量処理が 220mL で処理サイクルは最大 4 回のため、最大処理量は 880mL 以下となる。骨髓液が 880mL を超える場合には、骨髓液の入ったバッグを遠心し上清の血漿を除去し骨髓液を約 700mL～750mL に濃縮する (図15)。



図 15 骨髓液量の調整

2) バフィーコート分離処理 (図 16) (分離用キット CS-490 使用)

分離用キット CS-490 のラインに量を調整した骨髓液を接続 (図2)。SEPAX 本体に円筒形の分離チャンバーを遠心部に装着し、バッグ類を装置側面に吊す。濃縮プロトコール GVR を本体ボタンで選択し、以後ディスプレイ表示に従い操作を実施。プライミングから自動遠心分離が開始される。骨髓液は、分離チャンバー内に 1 回当たり 170～200mL 充填され、自動遠心分離処理が実施される。この工程は、最大 4 サイクル行われ最終的に 100mL のバフィーコートが分離される。



図 16 バフィーコート分離

3) 単核細胞分離処理 (図 17) (分離用キット CS-900 使用)

CS-490 キット装着と同様に、単核細胞分離用キット CS-900 に 500mL の生理食塩水バッグを接続し、100mL の Ficoll 液をバッグに充填する (図3)。次に、最初に分離された Buffy コートをコネクタに接続し、キットを本体に装着する。SEPAX の Ficoll 分離プロトコール DGBS を選択し、チャンバー内で Ficoll 液を用いて Buffy コートから単核細胞を分離。分離された単核細胞をチャンバー内に 2 回引き込み、生理食塩水で 2 回除去洗浄し Ficoll 液を除き、約 50mL の生理食塩水浮遊液として分離される。さらに生理食塩水 (ACD-A 含む) を加え総量 115mL の単核細胞浮遊液とし移植する。

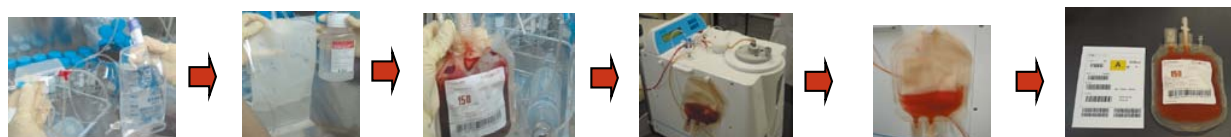


図 17 単核細胞分離

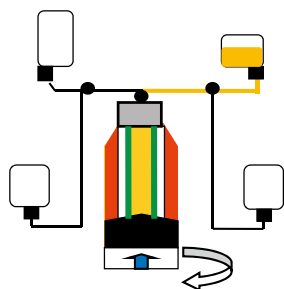


図 18 チャンバーの模式図

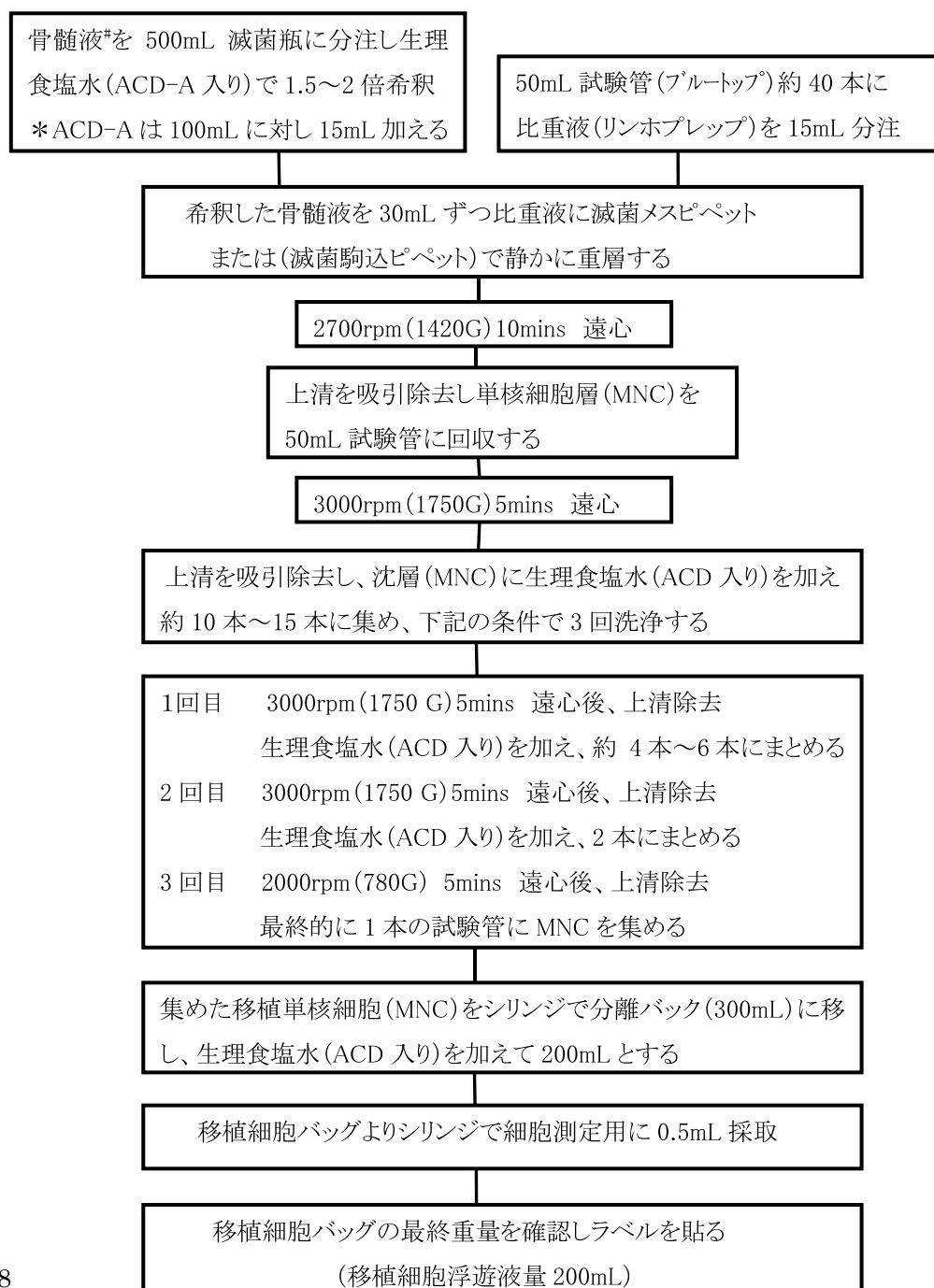
全自動でチャンバー内へ Ficoll 液充填後、Buffy コートが重層され軸に沿って回転を始める。比重によって分離層が形成される。外側から重い赤血球、次に Ficoll 液、単核細胞、軽い血漿の順で分離される。各成分はチャンバー内ピストンが下方から押し、光学センサーを介して各採取バッグへ回収される。

用手法（Ficoll 液）による赤血球除去

Ficoll 液を用いた機器または用手法では、骨髓液から赤血球を 99%以上除去することが可能である⁵⁾。単核細胞の回収率が 15～20%となり、バフィーコートから単核細胞層を分離する機器と比較して低値となる⁵⁾。しかし、我々はドナー骨髓液中の不適合赤血球を Ficoll 液を用いた用手法で除去し、移植後生着が得られキメラズムを経て完全キメラ(ドナー型)となることを確認している^{11)～13)}。尚、用手法は技術面、清浄度の面から、やむを得ない場合に限る。以下に当院(自治医大)の用手法(Ficoll 液)を詳細に記載する。

(1) 単核細胞分離フローチャート

#採取骨髓液量や希釈液の種類・量、抗凝固剤等の情報を記録シートに記入する



(2) 処理工程

1) 事前準備

<必要器具(図1、2)>

- ①シリンジ(2.5mL,10mL,30mL)(各1本)、②針 G18 (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バッグ)、⑥コップェル(1個)、⑦滅菌済みハサミ、
- ⑧滅菌広口ビン(500mL) (各施設にて滅菌したもの 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電動ピペッターまたは滅菌ゴム帽、
- ⑫滅菌ディスポメスピペット(滅菌駒込ピペット)(25mL または 10mL) (約 5 本)

<必要試薬(図3)>

- ①ACD-A 液(250mL)(1バッグ)、②生理食塩水(500mL)(2バッグ)、
- ③比重液(リンホプレップ、250mL)(3本)、④消毒アルコール綿

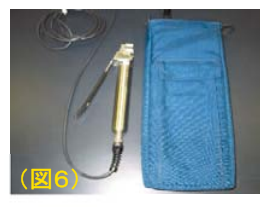


<必要装置(図4, 5, 6)>

① 吸引装置(可能であれば)



②チューブシラー



* 以下の操作は、必ずクリーンベンチや安全キャビネット内で無菌的に行うこと。

2) 操作・工程



- ① クリーンベンチ内で試験管(50mL)約 40 本に比重液(リンホプレップ)を 15mL ずつ分注し、ふたを緩めた状態で室温に戻しておく(図7)。



- ② 採取骨髄バッグをクリーンベンチ内でチューブを酒清綿で拭きコップェルで止めて、はさみで切り滅菌広口瓶(500mL)に約 350~400mL ずつ分注する(図8,9)。





- ③ 滅菌生理食塩水(500mL)バッグに 30mL シリンジで ACD を 75mL 加え骨髄細胞を希釈する液を作成する(図10)。



- ④ ②で滅菌広口瓶(500ml)に約 350mL ずつ分注した骨髄細胞に③の生理食塩水(ACD 入り)を約 100mL 加え希釈する。滅菌メス(滅菌駒込)ピペットで希釈混和した骨髄細胞を①比重液(リンホプレップ)にゆっくり約 30mL 重層する(図11)。

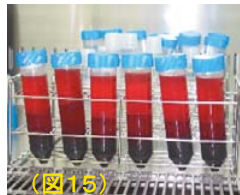


- ⑤ ①で準備した比重液(リンホプレップ)が分注された試験管に希釈した骨髄細胞をすべて重層する(図12,13)。



- ⑥ 重層した試験管すべてを 2700rpm(1420G)10 分間遠心する(図 14)。

* (遠心条件設定:スタート、ストップもゆっくり)



- ⑦ 遠心後、試験管の中間層に白い単核球層(MNC)ができる。骨髄血の場合は、上清が赤色の場合が多い(図15)。

(参考:末梢血での単核球層)



- ⑧ 単核球層(MNC)ができた試験管を試験管ラックに取り出し、単核球層(MNC)の約1cm 上までの上清を吸引除去する(図17)。

* 吸引装置がない場合は、滅菌メス(滅菌駒込)ピペット等で上清を除去する。



- ⑨ 滅菌メス(滅菌駒込)ピペットで中間位の単核球層(MNC)を下位の赤血球層の上まで無駄なく採取し、新しい 50mL 試験管に約 45mL ぐらいまで集めていく(図18)。



- ⑩ 集めた単核球層(MNC) 50mL 試験管すべてを 3000rpm(1750G) 5 分間遠心する(図19)。





- ⑪ 遠心後、沈層(骨髄単核球)の約 5mL を残して上清を吸引除去する(図20)。



- ⑫ 残った沈層(骨髄単核球)に生理食塩水(ACD 入り)を 5mL 加え混和し、試験管を生理食塩水(ACD 入り)で洗いながら約 10~15 本にまとめていく(図21, 22)。



- ⑬ 収集した細胞試験管⑫を 3000rpm(1750G)5分間遠心する(図23)。



- ⑭ 遠心後、沈層(骨髄単核球)の約5mL を残して上清を吸引除去する(図24)。



- ⑮ 再度、滅菌メス(滅菌駒込)ピペットを使用し、沈層(骨髄単核球)に生理食塩水(ACD 入り)を約 10mL 加え混和し洗いながら約 4~6 本の試験管にまとめていく。(図25,26)。



- ⑯ 収集した細胞試験管⑮を 3000rpm(1750G) 5分間遠心する(図27)。



- ⑰ 上清を吸引除去し、沈層(骨髄単核球)に生理食塩水(ACD 入り)を約 10mL 加え混和し、試験管を洗いながら2本(約 50mL×2)にする(図28,29)。



- ⑱ 収集した細胞試験管を 2000rpm(780G)5分間遠心する(図30)。



- ⑲ 分離バック(300mL)の長いチューブをシールし切断して、操作アダプターを付けて準備しておく(図31,32)。



- ⑳ 収集した細胞の上清を吸引除去し、1本の沈層に生理食塩水(ACD 入り)を約 10mL 加え混和し、滅菌メスピペット(滅菌駒込ピペット)を使用して、もう1本の沈層(骨髓単核球)が入った試験管に集める。
数回、生理食塩水(ACD 入り)で試験管内を洗い単核球を1本にする(図33)。



- ㉑ 集めた骨髓単核球液を 10mL シリンジで分離バック(300mL)に移し、生理食塩水(ACD 入り)を加えて 200mL にする(図34,35,36)。採取バックをよく混和し、2.5mL シリンジで約 0.5mL 細胞を採取し細胞数・CD34 陽性細胞を測定する。



- ㉒ 製剤(細胞)ラベルを貼り部門システムにて入庫、払い出し照合を行い、医師とシステムより出力した移植指示書と読み合わせをする。
(ID、患者名、診療科、血液型、製剤名)を診療科で電子システムを用いて患者照合し移植実施を行う。

注釈) 上清や細胞浮遊液の色が赤色系(ピンク)になっているのは、以前の希釈液が培養液 RPMI1640 を用いた時期の写真使用のためである。現在は、生理食塩水(ACD 入り)を使用している。

(3) 機器管理・処理工程

1) 管理

上記の骨髓液からの赤血球除去の工程は、「院内における血液細胞処理のための指針」^{14) 15)}に従った操作、管理が必要である。特に機器を用いた場合においては、「5. 設備・機器」の下記各項目が重要となる。

- 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。
また、用手法においても上記の指針(5.2)に記載されているように、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必要がある。その作業中は、手袋、ヘアーキャップ、マスクおよび専用衣を着用する。

2) 処理工程記録

細胞処理工程に対する標準作業手順書(SOP)を整備し、それに従って実施する。記録においても細胞処理工程ごとに作業者が行うべき内容を明記し、記録する作業工程記録書を作成することが望ましい。

参考文献

- 1) Zingsem J, Zeiler T, Zimmermann R, et al. Automated processing of human bone marrow grafts for transplantation. Vox Sang. 1993;65:293-9.
- 2) Koristek Z, Mayer J. Bone marrow processing for transplantation using the COBE spectra cell separator. J Hematother Stem Cell Res. 1999;8:443-8.
- 3) Larghero J, Rea D, Esperou H, 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.
- 4) Soydan E, Ayyildiz E, Dalva K, et al. Impact of harvest product volume in erythrocyte depletion of allogeneic or autologous bone marrow using COBE spectra. Transfus Sci. 2007;36:269-73.
- 5) 岸野光司, 中木陽子, 小野崎文子, 他. 移植のために採取された骨髄液から自動細胞分離 SEPAX™を用いた単核細胞の分離. 日本輸血細胞治療学会誌 2012;58:456-62.
- 6) Dragani A, Angelini A, Iacone A, et al. Comparison of five methods for concentrating progenitor cells in human marrow transplantation. Blut 1990;60:278-81.
- 7) Warkentin PI, Hilden JM, Kersey JH, et al. Transplantation of major ABO-incompatible bone marrow depleted of red cells by hydroxyethyl starch. Vox Sang. 1985;48:89-104.
- 8) 血液成分分離装置 Spectra Optia™ 取扱説明書. テルモ BCT 株式会社. 東京. 2014.
- 9) 血液成分分離装置 COBE spectra™ 取扱説明書. テルモ BCT 株式会社. 東京. 2012.
- 10) 血液成分分離装置 COM.TEC™ 取扱説明書. 株式会社アムコ. 東京. 2003.
- 11) 岸野光司, 室井一男, 中木陽子, 他. ABO 不適合骨髄移植後の赤血球における ABH 抗原型物質の解析. 日本輸血学会誌 2002;48:335-41.
- 12) Kishino K, Muroi K, Kawano C, et al. Evaluation of engraftment by ABO genotypic analysis of erythroid burst-forming units after bone marrow transplantation. Leuk Res. 2002;26:13-7.
- 13) 岸野光司, 中木陽子, 森政樹, 他. ABO 不適合造血幹細胞移植における ABO 遺伝子型を用いた移植片の生着確認の有用性. 医学検査 2007;56:1551-5.
- 14) 田野崎隆二, 室井一男, 長村登紀子, 他. 院内における血液細胞処理のための指針. 日本輸血細胞治療学会誌 2011;57:184-7.
- 15) 院内における血液細胞処理のための指針. 日本造血移植学会ホームページ (http://www.jshct.com/guideline/allo_pbsct_guide.shtml), 日本輸血・細胞治療学会ホームページ: ガイドライン(<http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Document/Guideline/Ref1-1.pdf>).

(岸野 光司)

第12章 骨髓液の血漿除去

はじめに

骨髓液からの血漿の除去は、血漿中の抗体の除去を主な目的として行なう。遠心分離により、骨髓液の細胞成分と上清を分離して上清(血漿)を除去する。作業は遠心の準備、遠心、上清除去、再浮遊の4ステップに分けられる。技術として習熟に時間がかかるような難しいところはないが、無菌作業を行なうことが求められる。血液バッグの遠心分離を1度も経験したことがない施設で、いきなり骨髓液の遠心するのは避けるべきであろう。譲渡血などを骨髓液の代わりに用いて、作業手順書どおりに予行して手順の確認をしておくことが望まれる。また作業記録を残すこと、患者情報とドナー情報の管理、骨髓細胞用ラベルの貼付なども重要な業務である。

適応

適応となるのは、ABO minor mismatch の同種骨髓移植の症例と、ドナーの血漿中にレシピエントの赤血球抗原に反応する不規則抗体が存在する場合である。

ABO minor mismatch となる組み合わせを表1に示す。ABO major & minor mismatch(A 型と B 型のレシピエントとドナーの組み合わせ)の場合は、赤血球除去を実施した後に血漿除去を行なう。また ABO 同型の同種骨髓移植の場合であっても、骨髓の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に、その症状の軽減を目的として血漿除去を行なうこともある。

表1 Minor mismatch の組み合わせ

Recipient	Donor
A	O
	B (major & minor)
B	O
	A (major & minor)
AB	O, A, B



図1 骨髓液(分離前)

方法

遠心分離により、骨髓液の細胞成分と上清を分離して上清(血漿)を除去する。血液バッグに分取してバッグ用遠心機で遠心し用手法で上清を除去する方法と、自動血漿分離装置(BioSAFE 社の Sepax®など)を使用して閉鎖回路で分離する方法がある。ここでは従来実施されているバッグ遠心法について説明する。

バッグ遠心法において、細胞の回収率と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 回実施するごとに血漿量を 10%程度にまで減量することが可能であり、通常の ABO minor mismatch の同種骨髄移植における血漿除去では、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、輸血でアナフィラキシー反応の既往がある患者など、少量の血漿があっても重篤な副作用を起こす可能性がある場合には、2 回法により副作用が予防または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。

(1) から (3) までは事前に必要な準備について示す。(4) から (7) が作業手順である。

(1) 使用機器、機材

- ① 大容量遠心機、ローター、バケット…400mL の血液バッグが遠心できるもの
- ② 無菌接合機(Sterile Connection Device ;SCD)、専用ウェハー
- ③ チューブシーラー…ハンディタイプのもので使用しやすい
- ④ 秤…2Kg まで秤量できるものと、バケットのバランスをとるための天秤ばかり
- ⑤ 分離スタンド
- ⑥ コッヘル、スライドクランプなどチューブを止めるもの

(2) 滅菌資材ならびに医薬品類（必要個数は骨髄液のバッグ数で変わるので適宜準備）

- ① 分離バッグ…600mL 用(骨髄 300～400mL 当たり 1 個)、1,000mL 用
- ② バッグ用連結管または輸血セット 1 本
- ③ 操作アダプター…細胞数測定用のサンプリングをするため 2 本
- ④ シリンジ…2.5mL (サンプリング用) × 2 本、50mL (ACD-A 液添加用) × 1 本
- ⑤ 18G 注射針…3 本
- ⑥ 生理食塩液…500mL × 1～2 本または 1,000mL × 1 本
- ⑦ ACD-A 液(250mL)またはヘパリンナトリウム液 5,000 単位 1 本
- ⑧ 消毒用のアルコール、アルコール綿など

(3) 情報管理システム（輸血管理システムで管理可能）への登録

骨髄細胞管理用のラベル(ロット番号管理)、患者との適合票の印刷

(4) 遠心の準備

骨髄液を受け取ったら、その重量を測り、無菌的にサンプリングして細胞数を血液細胞数測定装置で測定しておく。通常、骨髄液は専用のバッグに採取されてくる(図 1)。骨髄用バッグの容量は 1,000mL または 2,000mL 用であり、このバッグのままでは遠心できないため、遠心分離機にかけられるバッグに移し替える。このとき使用するバッグの容量は自施設の大容量遠心機のバケットに依存する。当院では 400mL 血液バッグ×1 本用のバケットを使用しており 600mL 用の分離バッグに約 300～400mL を目安に移し替えている。遠心分離用の 1 バッグに入れる量は重要で、バッグの容量に対して少なすぎても多すぎても分離がうまく

いけないことがある。自施設の大容量遠心機、バケット、分離バッグで 1 バッグあたりに入れる適正な量を事前に検証しておく必要がある。骨髓バッグから分離バッグへの移し替えは無菌接合機(SCD)を使用してチューブを接合して行なう。SCD を使わずに骨髓バッグのポートから分離バッグへ移す際には、バイオクリーンベンチまたは安全キャビネット内で行なう(図 2)。

上清を除去するための空バッグを遠心前に SCD にて接合しておくのと遠心後に扱いやすい。接合部分より骨髓液のバッグ側にスライドクランプをつけておく。

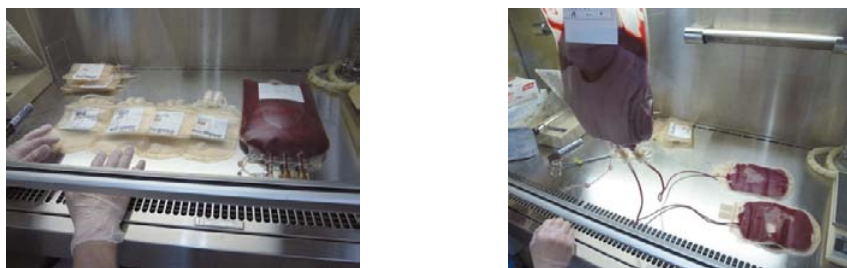


図 2 バイオクリーンベンチ内での移し替え

(5) 遠心分離

血液バッグ専用のバケットに、バッグとバケットの間に隙間ができないように緩衝材などを利用して骨髓液の入った分離バッグを入れる。このとき SCD でつないだチューブが引っ張られないよう注意する。大容量遠心機はローターに掛けるバケットのバランスが悪いと加速中にエラーで止まってしまうので、向かい合わせにローターに掛けるバケットの重量をしっかりと合わせてバランスをとってからローターにセットする(図 3)。遠心条件は 20℃、500g～800g(1,500rpm～2,000rpm)で 10 分間、を目安とする。細胞の舞い上がりを防ぐため、加速、減速の設定は最低のレベル(超 slow などの表示)にしておく。

遠心を正しく行うためには、遠心機の点検を欠かさないようにする。特にローターとバケットの接点部分のグリス切れに注意する。バケットをローターにかけて指で軽く押して滑らかに振り上がるかを確認する。動きが悪い場合はアルコールでローターとバケットの接触面を清拭してから薄くグリスを塗り、振り上がりが改善されたかを確認する。1 年に 1 度はメーカーの定期点検を行うとよい。



図 3 大容量遠心機

バケットの中に白く見えているのが緩衝材。

(6) 上清（血漿）の除去

遠心が終わったらバケツから静かに骨髄液のバッグを取り出し、分離スタンドにかける(図 4)。接合部分より骨髄液バッグ側の位置で、チューブをコッヘルでクランプしておく。SCD 接合部分を開き接合不良がないか確認する。問題がなければコッヘルを少しずつ開いて、空で取り付けてあった分離バッグに上清をゆっくりと移していく(図 5)。細胞成分の上に 5～10mm 位血漿を残すところまで上清の血漿を除去する。除去が終わったらチューブを長めに残してチューブシーラーでシールして、除去した血漿の入ったバッグを切り離しておく。



図 4 遠心分離後の骨髄液



図 5 分離スタンドを使用した上清の除去

(7) 再浮遊

遠心している間に、血漿を除去した後の骨髄濃縮液を再浮遊させるための溶液として、抗凝固剤 (ACD-A 液またはヘパリン Na) 入りの生理食塩液を調製しておく。

再浮遊に要する 10%ACD 加生理食塩液の量は遠心前の骨髄液の量に依存する。目安としては、遠心前 1,000mL の骨髄液であれば、500mL の生理食塩液に ACD-A 液を 50mL 添加したものを 1 本準備する。連結管または輸血セットなど(分離バッグのチューブと SCD で接合できる径のチューブのもの)と、骨髄濃縮液のバッグのチューブを SCD にて接合する。10%ACD 加生理食塩液のボトルにこのセットを差込み、骨髄濃縮液に 10%ACD 加生理食塩液を加える(図 6)。処理前の骨髄液の容量に戻す必要はない。当院では骨髄濃縮液と等量を目安にしている。バッグが複数ある場合はバッグごとに同じ作業を行なうので、10%ACD 加生理食塩液側にチューブを長く残してチューブシーラーでシールする。複数バッグの場合、当院では 1,000mL の分離バッグにまとめて 1 バッグにしてから払い出している。複数バッグのまま払い出す際には各バッグにラベルを添付しなければならない。

図 7 に当院での移植細胞用の製剤ラベルと、患者との適合票の例を示す。当院においては、造血幹細胞移植は輸血製剤と同様に輸血部門から払い出し、電子カルテの輸血システムにて患者認証をしてから投与する手順にしている。これにより投与(移植)記録、副作用記録が電子カルテに残り、会計情報を送ることもできる。



図6 ヘパリン加生理食塩液での再浮遊

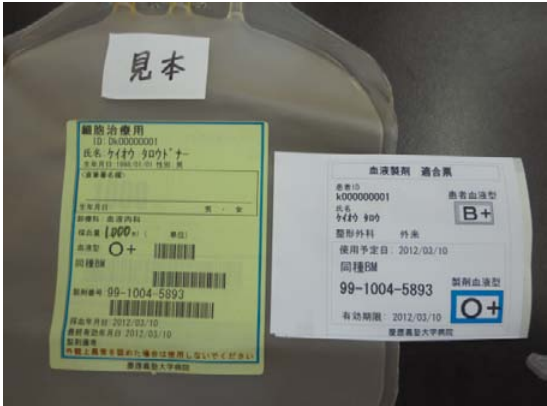
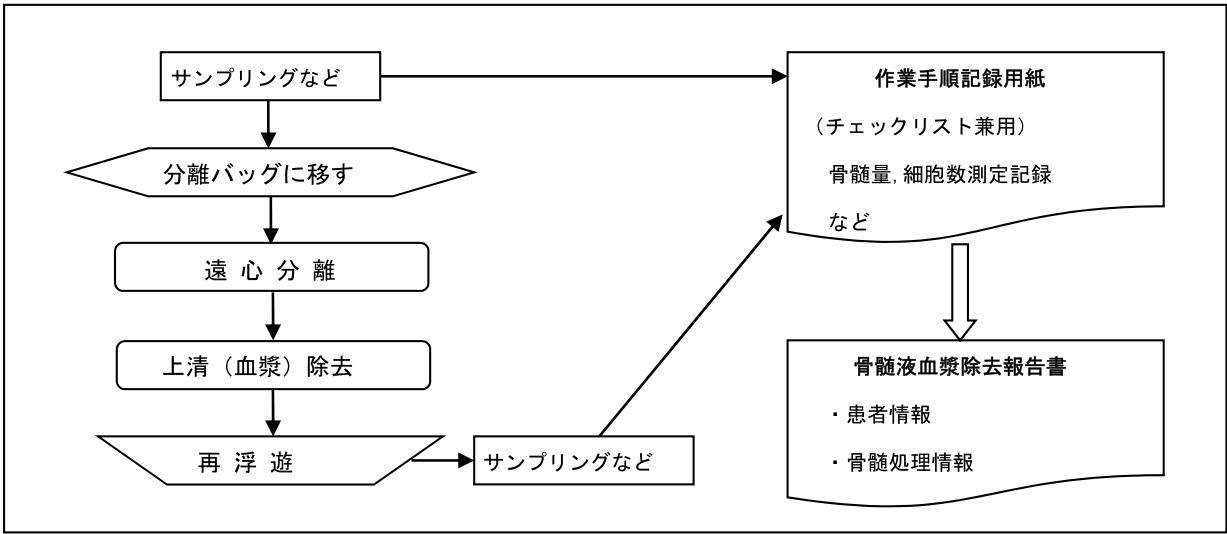


図7 製剤ラベルと適合票

フローチャート



(上村 知恵)

第13章 造血幹細胞の融解と輸注

はじめに

融解時、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融解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。融解後、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、融解後に短時間 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、融解後の洗浄操作は一般的に不要である¹⁾。また、融解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クの中にいれて融解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融解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、凍結融解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 単体としての総量が患者体重当たり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。また、各施設での承認、患者への説明・同意をとることも必要である。

以下、国立がん研究センター中央病院での方法を例に説明する。

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

融解

(1) 融解の実際

1. 恒温槽を洗浄後、安定した台の上に置き、水道水で満たし、37～40℃に設定する(図1)。
必要な物品を用意する(図2)。



図1 恒温槽



図2 必要物品の準備

2. 融解前に、細胞を輸注する患者担当医や病棟看護師と、輸注する患者氏名、患者ID、輸注するバッグ(最終日と個数など)、輸注開始時刻などを、所定の用紙と照合・確認する。この際、各施設の細胞払い出しの適合基準に合っていることを確認すること。
3. 保冷库(液体窒素、超低温保冷库など)からバッグを確認して1つずつ取り出し、ラベルを確認する(図3)。
4. 凍結保存バッグを容器(アルミキャニスター、紙容器など)から注意深く取り出し、清潔な袋に入れて、37～40℃の恒温槽で、完全にお湯につけて手でもみながら、1回1バッグずつ固形物がなくなるまで急速に融解する(図4)。この前後のいずれかで、バーコードリーダーを用いた照合確認をすることが望ましい(図5)。

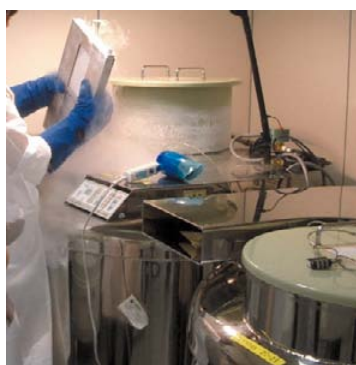


図3 液体窒素タンク



図4 恒温槽で急速融解



図5 融解後の細胞

5. 融解後はなるべく早く患者に輸注する。
6. 融解後に輸注ラインから検体の一部を検査用に提出することが望ましい。

(2) 融解における留意点

1. 再氷晶形成による細胞障害を回避するために、37～40℃の恒温槽でなるべく急速に融解する。恒温槽を用いないと、すぐに湯温が下がってしまうので不適切である。
2. 融解時に凍結バッグの破損（亀裂やピンホールからの液漏れ、バッグの膨張や破裂）が見つかることがあるので、滅菌処理された外装バックの中にいれて液漏れなどがないかを注意深く観察しながら融解することが望ましい。液漏れを見つけたら、すぐにそれ以上漏れて細胞損失をしないようにシーラーで穴をふさぐか、別のバッグに清潔に内容物を移すなどを行う。その時の状況は記録シートに記載し、また患者担当医に必要な応じて伝達する。（表 1）
3. 処理・凍結・融解などの際中に細胞が細菌や真菌で汚染される可能性があることが報告されている。ただし、保冷库やバッグの外側は無菌ではないので、恒温槽をエタノールで殺菌して滅菌水などを満たして使用することの意義は不明である。
4. 輸注の際に患者に有害事象が発生して輸注の時間がずれることがあるので、1 回 1 バッグずつ、進行状況を確認してから融解を開始する。
5. 凍結保護剤であるジメチルスルホキシド（DMSO）は室温では造血幹細胞に毒性があると考えられてきたが、1 時間以内の曝露であれば問題はない^{1,2)}。しかし、融解時にあまり温めすぎないように注意し、融解後はなるべく早く患者に投与する。アイスバッグなどで冷やす場合には凍結させないように留意する。
6. 凍結融解処理により傷害された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り凝固することがある。融解後に時間を長く要したり、安易に洗浄処理などを行うと、さらに凝固物が生成される。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。DMSO 投与による副作用は対応可能な程度であるので、融解後はそのまま輸注するのが一般的である。

表 1 融解時の有害事象

1. バッグの破損：亀裂、ピンホール、膨張、破裂など
2. 凝固、凝血塊

輸注

(1) 輸注の実際

1. アレルギー反応など輸注に伴う副作用予防目的の前投薬（副腎皮質ホルモンや抗ヒスタミン剤）が投与終了していることを確認する。
2. ベッドサイドで、輸注する細胞（バッグ）に間違いがないことを、輸注担当医、看護師、患者（および患者家族）と確認する。血縁者の移植細胞の場合でも苗字が患者とドナーで異なることがあるため、ドナーのフルネームを声に出して本人や家人にも意識をして確認することが望ましい。非血縁者の場合にはバンクの登録番号と血液型等による確認が必要である。取り違えの無いように、輸血管理室システ

ムを利用して造血幹細胞を管理し、ベッドサイドでバーコード照合を行うことが推奨される。これについては、第 14 章を参照のこと。

3. 心電図モニター、非観血的酸素飽和度モニターなどを装着し、血圧測定で問題がないことを確認する。
4. 細胞の入ったバッグに(赤血球あるいは血小板用)輸血セットなどを接続して、中心静脈カテーテルから、副作用に注意しながら比較的早い速度で輸注する。通常、50～100mL を 10～30 分以内で輸注する(あるいは 10～15mL/分) (図 6、7)。



図 6 幹細胞輸注



図 7 必要に応じてポンピング

(2) 輸注における留意点

1. 細胞輸注は前処置の抗がん剤が体内からほぼ消失しているタイミングで行われる。一般的には最終薬物投与から 24～48 時間経過してから行われる。胸水や腹水などがあると薬剤の代謝や排泄が遅延するので注意が必要である。
2. 通常の点滴セットを用いた場合、時に細かな孔のインラインフィルターがラインに組み込まれていて細胞の輸注には適さないことがあるので留意する。この点、輸血セットは径 140～210 μ m の細孔で細胞が通過するには問題ない。ただし、フィルターを使用するかは施設の判断による。
3. 融解したバッグにセットした輸血セットなどは時に接続部がゆるいことがあるので、必ず確実にセットされていることを確認すること。テープなどで補強するとより安全である。

5. 輸注の際には、DMSO によるもの、溶血した赤血球や混在する白血球や血小板によるもの、細胞凝集塊によるもの等の有害事象が起こり得る(表2)。時に重篤例もあるので、患者のバイタルサイン、症状などを注意深く観察しながら行う。異変があれば、注入速度を下げたり、一時中止して様子を見る。紅潮、嘔気、腹痛、下痢、徐脈、血圧上昇、低酸素血症、胸部違和感などは比較的頻繁に見られ、時に酸素投与が必要であるが、一過性のことがほとんどである。赤血球量が多い場合には凍結融解により生ずるヘモグロビンの排泄を促進し腎障害の危険性を下げるために尿をアルカリ化する。一般的には必要ないが、尿潜血陽性(ヘモグロビン尿)が見られる場合にはハプトグロビンの使用も検討する。TRALI や TACO など重症となることあるので、完全に回復するまで慎重にフォローする。
6. 有害事象の種類は、細胞成分(含まれる赤血球や顆粒球などの量)、DMSO の濃度により影響される。CP-1 を用いた凍結の場合には DMSO は 5% であり、通常濃度(10%)よりも低く、有害事象は少ない印象にある。また、単核球に分離して凍結した場合には、通常よりも有害事象は少ないと報告されている。
7. 輸注量が多い(>10mL/kg 患者体重) 場合には午前・午後、あるいは 2 日間に分けて輸注を行うことも検討する。

表2 輸注時の有害事象

1.	アレルギー反応、アナフィラキシーショック
2.	紅潮
3.	DMSO による異臭(ニンニク臭、青のり臭)
4.	嘔気・嘔吐、腹痛
5.	前胸部違和感、呼吸困難、低酸素血症
6.	高血圧、低血圧
7.	TRALI
8.	TACO
9.	凝血塊、凝固、ラインの閉塞
10.	不整脈、VVR、心停止
11.	頭痛、痙攣、脳出血

凍結細胞の融解・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

- ☐ 融解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. 融解処理操作

- ☐ 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、液漏れなどがないことを確認し、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、100 mL 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、担当医が融解している間に、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。

$$\text{生存率 (\%)} = [\text{生細胞数} \div (\text{生細胞数} + \text{死細胞数})] \times 100$$

融解・輸注 結果報告書

- ☐ PBSC 輸注 (自家 ・ 血縁同種 ・ 非血縁同種)
☐ 骨髄輸注 (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 _____ k g 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 _____ k g 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 _____ = _____ $\times 10^9$ = _____ $\times 10^8$ /kg(患者体重)

総 CD34 陽性細胞数 = _____ $\times 10^8$ = _____ $\times 10^6$ /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

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	10mL	5mL
生理食塩水	(全体量に応じて添加)	(全体量に応じて添加)
総量	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。巻末の参考資料4を参照のこと。

参考文献

1. Rowley SD, et al. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. Bone Marrow Transplant. 1993;11:389-93.
2. Branch DR, et al. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. Transfusion. 1994;34:887-90.

(田野崎 隆二)

第14章 輸血管理システムを利用した造血幹細胞の管理と バイオビジュランス

はじめに

造血幹細胞は、赤血球や血小板等と同様に白血球の血液製剤である。血縁者間移植に用いる造血幹細胞は院内採血による製剤であり、骨髄バンクや臍帯血バンクからの造血幹細胞は院外製剤に当たる。すなわち、通常の血液製剤に関連する採取・処理・保存・検査・管理の考え方は、そのまま造血幹細胞に当てはめて考えることができる。

凍結保存した造血幹細胞はラベル表示も様々であったり、輸血部門でなく診療科医師が管理していたりと様々である。多くの移植用細胞が凍結保存してあった場合に、目視などでは他の患者に誤投与することもあり得る。

この予防策としてできることはたくさんある。特に輸血製剤の管理体制を利用すれば、誤投与を未然に防ぎ、有害事象を細かく観察・記録・報告し、素早く対処することは可能である。

輸血管理システムを利用した造血幹細胞の管理

現在多くの施設で通常の輸血管理業務に輸血管理システムが導入されている。それら輸血管理システムの多くは造血幹細胞にも対応できるように開発されてきている。具体的には、院内製剤である自己血と同様の対応となる。すなわち、院内で採取した造血幹細胞や骨髄バンク・さい帯血バンクを介して外部より入手した移植用細胞に新たにロット番号を発行して入庫し、バーコードやラベルを作成する。これにより、バーコードによる照合や製剤管理など、通常の血液製剤と同様のコンピューターによる管理ができる。電子カルテシステムと連携させることにより、ベッドサイドでのバーコード照合も可能になる。造血幹細胞が凍結保存してある場合、超低温冷凍庫や液体窒素から製剤を取り出し素早く解凍して患者に輸注する過程では照合がしにくいために、特に複数の造血幹細胞が凍結保存されている場合の取り扱いリスク軽減に有効である。

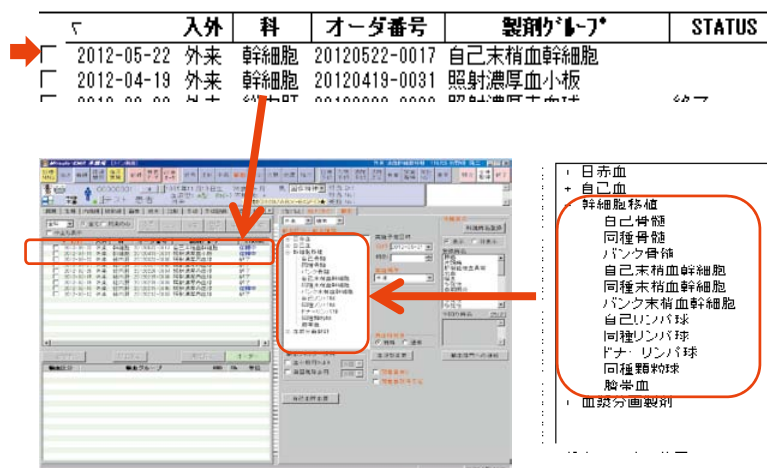


図 1
電子カルテ画面(左下)には「幹細胞移植」として各細胞に対応した製剤名を選択でき(右下図)、実施すると履歴が残る(上図)。



図2 出庫～輸注までの操作例

(左上) 輸血管理システムから輸注すべき製剤の情報を確認する。

(右上) 造血幹細胞を保冷库から取り出し、細胞を急速解凍する過程で、アルミキャニスターに貼付されたラベルのバーコードの照合を行い、間違いがないことを確認する。

(左下) 造血幹細胞を入れた袋にもアルミキャニスターと同じラベルが貼られている。

(右下) ベッドサイドで看護師は患者バーコードと製剤バーコードと電子カルテ間で照合をして間違いがないことを確認し、開始時、5 分後、15 分後、終了時入力を行う。CP1 を用いてアルブミンも使用した場合には、このタイミングでアルブミン使用の入力を行い、ロット番号とともに通常の製剤同様に 20 年間以上にわたり投与履歴が保存される。

バイオビジランス (biovigilance)

(1) 海外のバイオビジランスの状況

バイオビジランスという言葉はわが国ではあまりまだ馴染みがないが、この一部として、ヘモビジランス(血液安全監視体制)という言葉は以前より使われている。すなわち、輸血製剤は、その原料が人由来で、輸血感染症をはじめとする様々な有害事象の発生するリスクがあるため、輸血に関連した有害事象を分析・評価して国および日本赤十字社に報告することが血液法(安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律)等で定められている。このような情報収集・分析・評価・対策の一連の監視体制をヘモビジランスと称している。バイオビジランスとは、対象が血液製剤だけでなく、細胞、組織、臓器を広く包括する監視システムのことを指す。造血幹細胞移植に用いられる骨髄・末梢血幹細胞・臍帯血などは、このバイオビジランスの範疇になる。すなわち、バイオビジランスとは、患者の安全性を確保するための、血液製剤やその関連製剤、細胞、組織、臓器の採取および輸注・移植に関して発生した事象や結果に関する情報を、収集・

解析・報告するための包括的監視体制を意味する。

造血幹細胞だけでなく、角膜、心臓、腎臓など多くの人体由来の細胞、組織、臓器が、現在各国のバンクから、多くの国々に輸送され移植されている。このような状況の中で、その移植片の規格の国際的な統一が世界保健機構(WHO)などを中心に進められている。たとえば、ヨーロッパ(EU)では、EUSTITE プロジェクト(European Union Standards and Training for the Inspection of Tissue Establishments)がイタリアなどの主導で2006年から開始された。これは、治療目的で用いられる角膜、骨髄細胞、精子などの取り扱いに関するガイドラインであり、これには、これらの移植に関連して発生する有害事象を監視することが規定されている。20カ国の施設が参加して2008年から1年間にパイロット的に集積した重篤な有害事象には、DMSOに起因する疑いのある自家PBSC輸注後の遷延性痙攣や、血縁者間同種骨髄移植後の肺出血死亡事例などが挙げられた。そのプロジェクトはSOHO V&S プロジェクト (Vigilance and Surveillance of Substances of Human Origin; <http://www.sohovs.org/soho/>)として引き継がれている。

一方、アメリカ合衆国保健福祉省(U.S. Department of Health & Human Services; HHS)の血液の安全と供給に関する諮問委員会(ACBSA; Advisory Committee on Blood Safety and Availability)でもバイオビジランスを促進するように勧告が出されている

(https://wayback.archive-it.org/3922/20140403203201/http://www.hhs.gov/ash/bloodsafety/biovigilance/ash_to_acbsa_oct_2009.pdf)。

(2) わが国における造血幹細胞に対するビジランス

わが国では現在のところ造血幹細胞の採取・処理・保存・管理・輸注に伴う有害事象を収集・分析・報告する包括的な監視体制はない。日本骨髄バンクは、非血縁者間骨髄・末梢血幹細胞に関して、採取・処理およびドナー安全に関して詳細にデータを収集・解析し、日本骨髄バンクウェブサイト(<http://www.jmdp.or.jp/>)に掲載し、またドナー候補に対する説明パンフレットにもまとめて掲載している。血縁同種移植のドナーに関連した有害事象に関しては、最近、日本造血細胞移植学会がドナー保険と関連付けて収集・分析するようになっている。しかし、自家造血幹細胞移植に関してはそのような監視体制はなく、現状把握もできていない。

これに関連して、現在、日本輸血・細胞治療学会細胞治療委員会では、造血幹細胞移植の輸注時の有害事象の前方視的調査研究を開始している。

(3) 予想される有害事象

造血細胞移植における有害事象は、①移植する細胞に関連するもの(採取・処理・保管・解凍)、②輸注後の患者に発生するもの、に大きく分類できる。

1) 移植細胞に係る事象

これには、採取細胞数不足、破損・汚染・感染、生細胞率低値、保存状態の不良による品質不良疑い(停電や温度上昇など)などがあり得る。

2) 輸注に伴う事象

これには、通常の輸血で知られている事象と、造血幹細胞移植特有の事象がある。

前者としては、非溶血性輸血副作用(蕁麻疹等、アナフィラキシー反応、血圧低下、呼吸困難、発熱反応等)、溶血性副作用、TRALI(輸血関連急性肺障害)、TACO(輸血関連循環過負荷)などが挙げられる。このうち、通常の輸血ではほぼあり得ない状況での細胞輸注がしばしば実施されることに改めて特別の注意を払う必要がある。すなわち、ABO 不一致間の移植では 20mL 程度までの異型輸血(例:B 型ドナー赤血球が A 型患者に輸注)が行われる。また、通常の血液製剤では GVHD や TRALI の原因となりうるために白血球除去や放射線照射がされた血液製剤が輸注されているが、移植製剤では敢えて白血球濃縮液を輸注している。また、通常の骨髄液は生食やヘパリンも加えて成人では 1,000~1,500mL にも及び、特に前処置で身体的にかなり負荷がかかった状態では TACO が出現しやすい状況にある。更に、前述のように、患者誤認も起こりやすい。

一方、造血幹細胞移植特有の事象としては、まず、凍結・解凍した場合には、凍害保護剤であるジメチルスルホキシド(DMSO)や培養液(例:RPMI1640)など、人体への投与が認められていない薬物の輸注が行われる点が挙げられる。DMSO はニンニク臭(青のり臭)があり、嘔気・嘔吐やアレルギー症状が散見される程度であるが、「医師の裁量」で実施される医療行為であるだけに、本来はその際の有害事象を収集・分析・報告することは最低限すべきことだろう。凍結・解凍した細胞を輸注することも通常の輸血では経験しない。この際、凍結・解凍条件に適さない顆粒球などが死んで、粘着性に富む析出 DNA や混入血小板などに関連して目視できるほどの細胞の微小凝集塊がチューブを流れていくこともしばしば観察される。また、このような場合にはフィルターが閉塞したり、低酸素血症が観察されることも多い。処理をしない血液型一致の骨髄液では、時に 3 万単位を超える大量のヘパリンが入って、1,500mL くらいで搬入されることもある。大量輸注に伴い血圧が上昇し、またヘパリンにより凝固異常が誘発され、脳出血などが起こりやすい状況ができていることにも留意する必要がある。また、ABO マイナー不一致では輸注されるドナー B 細胞から産生される患者 ABO 抗原に対する抗体による溶血反応(passenger B lymphocyte syndrome)も造血幹細胞移植特有の有害事象である。さらに、生着不全・拒絶も、移植片の品質不良に起因している可能性もあり、情報の収集・解析は重要である。

わが国の造血幹細胞移植はセンター化されておらず、一施設で実施する移植症例数は比較的少数であることが多い。移植に関連して確認すべきことも多いため、本来は多くのコメディカルとの分業・協力体制の基に実施することが安全である。その一方で、法律の規制がなかったために、遵守すべき規則が少なく、有害事象の報告体制もないために、現状は不明である。このように、バイオビジランスの体制を国主導で確立することは喫緊の課題である。

(田野崎 隆二)

第15章 骨髄バンクを介する骨髄細胞、ドナーリンパ球、末梢血幹細胞の取り扱い

はじめに

骨髄バンクを介した細胞のやり取りでは、自施設で採取をして他施設に提供する場合(図1A)と他施設から提供されて自施設で移植をする場合(図1B)とがある。細胞の取り扱いの基本的考え方に変わりはないが、提供する側と提供してもらう側でそれぞれ少し違いがでてくる。筆者の施設ではいずれの場合でも必ず輸血部門を介することとしている。すなわち、骨髄を他施設に提供する際には手術室から骨髄細胞が輸血部門に届けられ、あらかじめ待機している移植施設の運搬担当者に引き渡す。ドナーリンパ球や末梢血幹細胞は輸血部門で採取をするので、そのまま輸血部門から移植施設の運搬担当者に引き渡すことになる。また他施設から届く場合は、いずれの細胞でも運搬担当者は輸血部門に届けることにしており、そこで必要があれば輸血部門で細胞処理を行い、病棟へ払い出している。

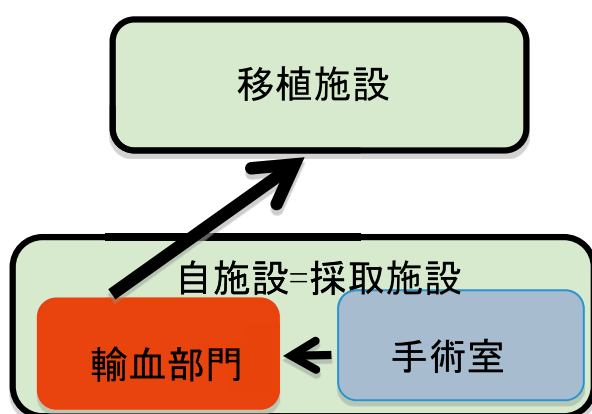


図 1A 自施設で採取をして他施設に提供する場合の細胞の流れ

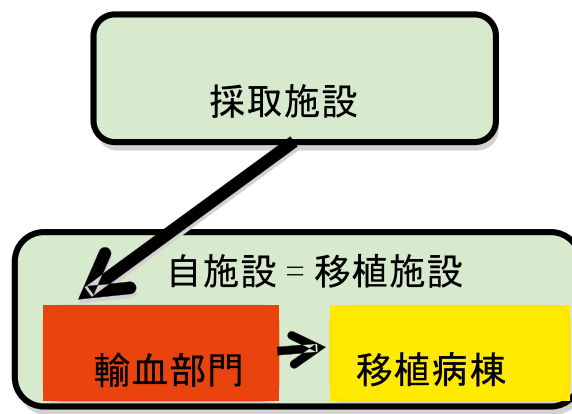


図 1B 他施設から提供されて自施設で移植する場合の細胞の流れ

この項では、以上の流れにそって、輸血部門でのこれらの細胞の取り扱いについて述べる。

骨髄細胞

(1) 他施設へ提供する場合

まず、手術室より骨髄の入ったバッグが輸血部門に届けられる。他施設へ提供する場合においては、輸血部門では基本的には何も操作せず運搬者へ引き渡すだけであるが、この時点で最も気をつけなければならないのはシーリングである。同一施設で採取と移植を行う場合と異なり、時間をかけて市中を公共の交通機関で運搬するので、途中で万が一漏れなどのトラブルが発生しても、その場では何も対処できない。

移植患者の生命にも関わる事態であると同時に、提供者の善意にも反することであり絶対起こしてはならない。実際に運搬中に骨髄バッグのシール部分の破損により、骨髄液が漏出した事例が報告されている。したがって、図2に示すように複数の結び目やクランプ、ヒートシールドを併用して万全を期することが重要である¹⁾。手術室から届いた段階でこれらの処置が十分になされているかどうか良く観察し、不十分な場合は補う必要がある。また骨髄バンクでは、この破損事例をうけ、可能な限り複数のバッグに分けることを推奨している。手術室内で分割されていない場合には、輸血部門において分割することが望ましい。この場合には、骨髄バッグと空バッグを無菌接合器により接合し分割する。最後に再度シーリングとバッグの本体部分も良く観察して、漏れがないことを確認してから運搬者へ引き渡す。

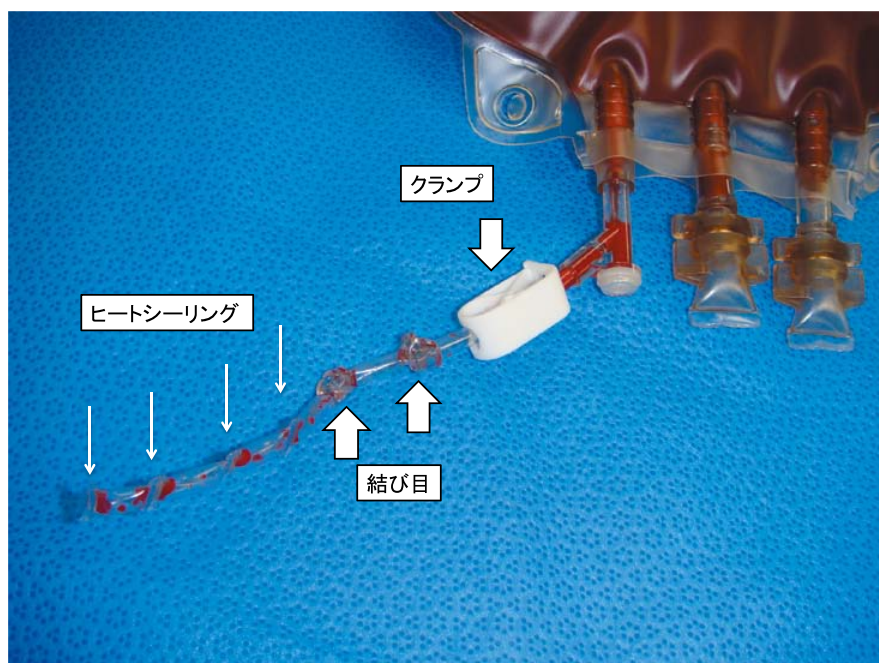


図2 骨髄バッグのシーリング

(2) 他施設から提供される場合

骨髄細胞が輸血部門に届けられたら、まず初めにバッグに破損等の問題がないことを確認するべきであるのは上記同様である。そして次にすべきなのが血液型の再確認である。骨髄バンクを介した移植では、事前に書類のやり取りでドナーの血液型を含むデータ等が伝達されているが、実際の検体を手にするのは移植当日がはじめてとなる。万が一連絡のミスや取り違い等、事前の情報と異なっている場合にチェックできるのは、この時が最初でありかつ最後の砦である。特に事前の情報が ABO 血液型一致の場合には、処理もされずにそのまま投与されることとなるので、最も注意しなければならない。また骨髄バンクでは、異型輸血や検体取り違いを防ぐ手段のひとつとして、輸注前の交差適合試験を推奨している²⁾。

血液型検査や交差適合試験をするために、事前に採取施設に対し検体採取を依頼しておくことが可能なので、あらかじめ主治医に依頼しておくことと良い。またもしその検体がない場合でも、骨髄液から少量サンプリングして、検査を行うことは可能である。その際には、骨髄細胞が汚染されないよう、無菌的に操作を行うことが大切である。具体的には、バッグから十分な長さのセグメントが作れる場合にはセグメントを作って切

り離す。またセグメントが取れない場合には開口部にアダプターを刺入しサンプリングする。この場合は、閉鎖系が破綻するためクリーンベンチ内での操作が必要となる。

血液型を確認した後は、血液型メジャーミスマッチの場合には赤血球除去が、またマイナーミスマッチの場合には血漿除去が必要となるため、それぞれの行程に進めていく。ABO 血液型が一致している場合でも不規則抗体を保有していて、相手方の持つ抗原と反応する場合には、血液型不一致同様の骨髄処理が必要になる。ドナーの ABO 以外の血液型についても、事前に採取施設に対し検査依頼をしておけば、あらかじめ骨髄処理の必要性の有無につき判断することができる。

骨髄細胞運搬者は、細胞と一緒に骨髄採取完了報告書(ハーベストレポート)を採取施設から渡されているが、これには総細胞数や液量、抗凝固剤の量も記載されている。患者の状態などにより、液量や抗凝固剤を減らしたいときには血漿除去が必要となる場合もあるので、主治医と相談することが必要となる。処理の詳細については他項を参照されたい。

またこれら一連の注意点は、海外バンクからの細胞でも同様である。

ドナーリンパ球

(1) 他施設へ提供する場合

ドナーリンパ球は輸血部門で採取が行われることが多いと思われるので、その場合は輸血部門で採取細胞の総細胞数を測定する必要がある。上記の骨髄細胞と同様で、無菌的操作で少量のサンプリングをし、細胞数を測定する。

その他は特に処理等は必要なく運搬者に引き渡すこととなるが、この際ももっとも注意すべき点はシーリングである。骨髄細胞の項で示したように十分にシーリングし、漏れがないことを確認して運搬者に引き渡す。

(2) 他施設から提供される場合

他施設からドナーリンパ球が届いた際には、まず患者への投与量を決定するために CD3 陽性細胞数を測定する必要がある。すでに述べたように無菌的操作で少量サンプリングし、フローサイトメトリー法にて測定を行なうのが一般的である。投与量は患者体重あたり $1 \times 10^7/\text{kg} \sim 7 \times 10^7/\text{kg}$ が適当とされており²⁾、また初回は少ない量を輸注し漸増することが推奨されているので、CD3 陽性細胞数の測定結果を患者主治医に報告し、投与量を決めなければならない。当日全てを使用する際には、そのまま病棟へ払い出せば良いが、一部保存して後に残りを使用する場合にはその分を凍結保存する必要がある。保存の際の手順については、当該項を参照されたい。

末梢血幹細胞

(1) 他施設へ提供する場合

末梢血幹細胞の場合は骨髄やドナーリンパ球と異なり、採った細胞の CD34 陽性細胞数を直ちに測定し、翌日の採取が必要かどうかの判断をしなければならない。したがって採取が終了したら、すぐに採取物の一部を無菌的操作で少量サンプリングし、自施設または外注検査(当日夕刻までに結果が判明する場合)にてフローサイトメトリー法で測定するが、具体的な測定法に関しては当該項を参照されたい。

骨髄バンクの基準では CD34 陽性細胞目標量は、患者体重あたり $2 \times 10^6/\text{kg}$ とされ、これに満たないときは 2 回目の採取を実施することとなっている³⁾。

採取が1日で終了する場合は、CD34陽性細胞数の測定さえ終了すれば、すでに述べたようにバッグのシーリングには注意してそのまま運搬者へ引き渡せば良いが、採取が2日目にも行なわれる可能性がある点が骨髄細胞の場合とは異なる。採取施設から移植施設への引き渡しは、移植施設関係者が2日間それぞれ受け取りに行くか、採取が2日間にわたると想定して2日目にまとめて受け取るかは移植施設側の移植計画や体制によるため、移植施設と採取施設間で協議の上決定することとなっており、事前に打ち合わせておく必要がある。採取施設と移植施設が遠距離の場合には重要なことである。またNMDP のプロトコールでは、2日目にまとめて受け取る場合、1日目に採取した末梢血幹細胞は採取施設において2～8℃で保存し、運搬の温度も2～8℃に保つことになっている。しかしこれには但し書きがあり、移植施設からの要望があれば室温での運搬も可としている。日本の骨髄バンクでもこれに準じ、1日保存する場合は2～8℃で保存静置保存することと規定されている⁴⁾。運搬中は、搬送専門業者でなければ温度管理を徹底して搬送することは、実際にはなかなか困難であるため、現実的には移植施設の判断のもと室温で運搬すれば良いことになる。また、最近骨髄バンクでは、温度管理可能な末梢血幹細胞運搬用BOXの貸し出しを開始したので、必要に応じて利用すると良い⁵⁾。いずれにしても、移植施設が主体となって採取施設間の協議により決定した、受け取り日時や温度管理方法に従い、採取施設は対応することが求められている。

また、1 日目に採取された末梢血幹細胞を翌日まで保存する場合の温度以外の条件として、細胞濃度は $2 \times 10^8/\text{mL}$ 以下が望ましく、それ以上の場合は自己血漿あるいは生理食塩水で希釈することとされている。さらに抗凝固剤である ACD の比率が 1/13 以下で採取した場合や希釈した場合は、最終産物中で最低 1/13 となるように ACD を追加すること、とされている⁴⁾。これらの操作を加える場合も、常に無菌的操作で行なうことはすでに述べた通りである。

(2) 他施設から提供される場合

採取施設から自施設へ運搬された末梢血幹細胞は、基本的にはそのまま処理や操作することなく輸注される。したがって各施設で通常行なわれているラベル発行などの事務的なシステム上の処理が済めば病棟へ細胞の払い出しを行なう。

骨髄バンクの規定上、末梢血幹細胞が必要量以上に採取できた場合には、一部を凍結し、DLI 等にも使用しても良いこととなっているので、運搬された細胞の CD34 陽性細胞数をもとに患者主治医と検討する必要がある。また凍結する際に2日間採取した場合は、1日目の採取分は凍結せず、2日目採取分の一部を凍結すること、とされている。なお、凍結しておいて使用しない場合は廃棄することとされ、細胞を研究目的で使用することや細胞を培養・増幅することは認められていない。凍結することとなったら、使用分と保存分の分配は無菌的操作で行なうことはこれまでに述べたことと同様である。また、保存に関しては当該項を参照されたい。

参考文献

- 1) ドナー安全委員会発行:骨髄採取マニュアル 第4版、財団法人骨髄移植推進財団、東京、2011。
- 2) 骨髄移植推進財団(現日本骨髄バンク):移植認定診療科 連絡責任医師、採取認定施設 採取責任医

師宛通知・骨髄移植・採取行程における運用の変更点について(お願い)、2009.(http://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/notice_f/2009_07_15.pdf)

- 3) Shiobara S, Nakao S, Ueda M, et al. Donor leukocyte infusion for Japanese patients transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improved outcome. Bone marrow Transplant. 2000;26:760-74.
- 4) PBSCTに関する委員会発行:非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル 暫定版、財団法人骨髄移植推進財団、東京、2010.
- 5) 日本骨髄バンク:医師宛通知文-温度管理下での末梢血幹細胞運搬用 BOX の貸出しについて(ご案内)、2014.(http://www.jmdp.or.jp/medical/notice_f/box.html)

(奥山 美樹)

第16章 輸血に用いる顆粒球の取り扱い

はじめに

顆粒球輸血療法 (granulocyte transfusion therapy: GTX) は好中球減少時の難治性感染症の治療法として、1970 年代に盛んに行われたが、輸血副作用と効果が不明確であったため、1980 年代になり、新しい抗生剤の出現と顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF) の登場により急速に行われなくなった。

しかし近年、血液悪性腫瘍や固形腫瘍に対する化学治療法は強化され、造血幹細胞移植も盛んに行われるようになり、好中球減少時の難治性感染症のコントロールは治療の成否を決める重要な要因となっている。この間に血球成分採取の手法は各段に進歩し、G-CSF を用いることによって大量の顆粒球採取が可能となり、これを用いた GTX の有効性の報告が注目を浴びている。

GTX の適応

GTX は、感染症の治療を目的に施行され好中球減少症では数を補うことを目的とし、好中球機能異常症では、好中球機能を補うことを目的として施行される。表 1 に GTX が適応となる基礎疾患を示した。American Association of Blood Banks (AABB) の Circular of information¹⁾ と Council of Europe²⁾ による適応基準を表 2 にまとめた。原則として原因菌が証明されていることが前提であるが、原因菌が証明されていない場合でも、状況から重症感染症が強く疑われる場合は適応と判断される。感染症の種類としては、敗血症が最大の適応であるが、敗血症以外に肺炎、局所の蜂窩織炎、中枢神経感染症などである。

表 1 GTX が適応となる基礎疾患

好中球減少症	好中球機能異常症
がん化学療法後	慢性肉芽腫症
造血幹細胞移植後	Chediak-Higashi 症候群
先天性好中球減少症	Kostmann 症候群 など
再生不良性貧血	

表 2 GTX の適応基準

以下のすべてを満たす場合

- 1 好中球数が 500/ μ L 未満に減少しているが造血回復が見込まれる
- 2 感染症が証明されている
- 3 広域スペクトルの抗生剤、抗真菌剤の使用にもかかわらず感染症が進行する
- 4 G-CSF 投与にもかかわらず好中球回復が認められない

注) 感染症のない患者に対する予防的 GTX は推奨されない。

ドナーの選択

GTX を実行するに際しては各施設の倫理委員会の承認が必要であり、現時点で本邦における顆粒球ドナーは患者の血縁者が望ましい⁵⁾。しかし海外では非血縁ドナーからの顆粒球採取は一般的であり、本邦でも非血縁ドナーからの末梢血幹細胞採取が認められたことから今後、非血縁ドナーからの顆粒球採取も検討すべき課題となりつつある。現時点のドナーの適格性判断は同種末梢血幹細胞ドナー適格性基準に準じて行う⁶⁾。また、一人のドナーからの顆粒球採取回数はアフェレーシスの場合はバンクドナーに準じ原則2回までとすることが推奨される。バッグ法の場合、一回に処理する血液量は最大800mL で、約80%は返血されるので循環動態に与える影響は少ないと判断される。この点を考慮しドナーに過度の負担がかからない範囲とする。

顆粒球製剤には、一定量のドナー由来赤血球、血漿が混入することから、原則として患者と同型の血液型 (ABO 型、Rh 型) とする。やむを得ない場合は ABO 副不適合 (minor incompatibility) 型ドナーからの採取も選択される。その場合血漿除去を行うか、または、混入する血漿の影響が臨床的許容範囲内の場合である。

ドナーのフォローアップに関しては日本輸血・細胞治療学会でも必要性が認識されており、今後フォローアップ体制を構築していく予定である。

顆粒球採取

(1) 顆粒球の動員

顆粒球の動員には、G-CSF (本邦では顆粒球ドナーに対する G-CSF の保険適応はない) は不可欠であり、G-CSF 単独、あるいはこれにデキサメタゾンを用いて行われる。両者を併用することにより、より多くの顆粒球を動員することが可能である。一般に顆粒球採取の 12～18 時間前に G-CSF 5～10 μ g/kg を単回皮下注射する。デキサメタゾンを併用する場合には 8 mg を G-CSF 投与と同時期に服用する。

(2) 顆粒球採取法

顆粒球採取法には血液成分採取装置を用いる“アフェレーシス法”と輸血バッグに採取した全血から遠心分離する“バッグ法”とがある。

1) アフェレーシス法

血球成分採取装置であれば、いずれの機種でも可能である。アフェレーシスドナーを選定する場合には通常のドナー検査 (後述) に加え、心電図、胸部 X 線写真など循環器系のチェックが必要である。一回の採取顆粒球数は成人で 1×10^{10} 個以上を目標とし、血流速度を 50～60ml/分で行い所要時間は 3 時間を超えないことが望ましい。アフェレーシスに伴う副作用として、血管迷走神経反射 (vasovagal reflex: VVR) や抗凝固剤によるクエン酸中毒がある。クエン酸中毒による低カルシウム血症の予防にはグルコン酸カルシウム液 (5～10mL/hr) の持続注入やカルシウムイオン含有スポーツ飲料水の摂取が有効である。

また、顆粒球成分を効率よく分離する目的で HES が用いられている³⁾。HES は分子量の違いにより高分子 HES (本邦では販売されていない) と低分子 HES がある。海外では主に高分子 HES を併用して採取が行われているが、高分子 HES は長期間の体内残留、凝固異常、ショックなどの副作用があり、採取時の使用には注意を要する。低分子 HES は採取効率を上げる効果が低い。

造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト

アフエーシス法(COBE spectra または Optia)による顆粒球採取手順を示す(図 1)。

＜必要物品＞

ディスポーザブル回路, 生食 1L, HESPAN 500mL(国内未承認、使用は施設判断),
46.7% TRISODIUM CITRATE 30mL(院内薬剤部にて調剤),
穿刺針 2 本, 採血用シリンジ駆血帯, テープ, イソジン綿棒, アルコール綿, 鉗子
※46.7% TRISODIUM CITRATE と HESPAN は混合し使用(図 2、3)



図 1 左:COBE spectra
右:Optia



図 2 46.7%
TRISODIUM CTRATE



図 3 HESPAN

＜顆粒球採取手順＞



図 4

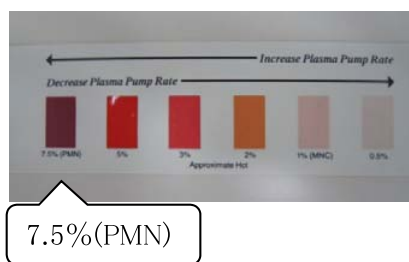


図 5 Spectra カラーグラム

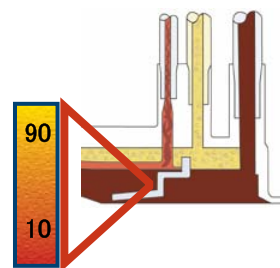


図 6 Optia プリファレンス



図 7 グルコン酸カル
ルシウム持続投与



図 8



図 9

- 1) COBE spectra または Optia の電源を入れる。
- 2) 回路を取り付け、プライミング後、アラームテスト(採血圧センサー、返血圧センサー、リークセンサー)。
- 3) 身長・体重・Hct 値データ・AC 比等、各種設定する。Optia の場合、HES 使用の有無(パッキングファクター)を選択(図 4)。
- 4) 血管確保を行う。血管確保後、採取直前のドナー検査用採血を行い、回路を接続。
- 5) 7,000mL のアフエーシスでは、46.7%TRISODIUM CITRATE 30 mL に対して高分子 HES 500 mL の割合で、抗凝固剤注入ルートから持続投与する。
- 6) 採取中インターフェイスの調整。
 - ① COBE spectra の場合、採取ラインがカラーグラムの 7.5%の Hct 値になるように、プラズマポンプの流量を調整する(図 5)。
 - ② Optia で HES 使用の場合 Optia のカラーグラムで 7.5%の Hct 値になるように設定、HES 不使用の場合は 25～40 にプリファレンスを調整(図 6)。
 - ③ 採取中はグルコン酸カルシウム液を持続投与(図 7)。
- 7) 目標処理 7,000mL に到達後、採取直後のドナー検査用採血を行い、採取バックを取り外す(図 8)。
- 8) 採取バックにラベリングする(図 9)。
- 9) 採取バックから検査用検体をサンプリング後、X 線照射装置で 15～50Gy 照射する。
- 10) 採取依頼伝票と照らし合わせ、交差適合試験結果を確認後、診療科へ出庫する。

2) バッグ法⁴⁾

バッグ法の手順を示す。



図10



図11



図12



図13



図14



図15

- 1) 重力法により 10%CPD 輸血トリプルバッグ (200mL 又は 400mL、カワスミ、テルモ) に全血 200～400mL を採取する (図10)。
- 2) TSCD (テルモ社製無菌接合装置) を用い、採血ルートを生食ラインでつなぎ替え、返血ルートとして確保する (図11)。
- 3) 採取した血液を輸血バッグごと大型遠心分離機 (クボタ、日立) で 1,500rpm、15 分間、20℃ の設定で遠心する (図12)。
- 4) バッグ内の血液は、血漿成分、buffy coat および赤血球層の 3 層に分離した状態になる。
- 5) これを分離スタンドにかけ、血漿成分をサブバッグ 1 へ (図13)、buffy coat と赤血球層上部 1/3 をサブバッグ 2 へ分離する (図14)。
- 6) サブバッグ 2 を顆粒球製剤として使用する。できあがりの容量の目安は 200mL 全血を処理した場合は 30～50mL、400mL 全血の場合は 60～100mL となる (図15)。
- 7) サブバッグ 1 の血漿成分をメインバッグ (残りの赤血球層の 2/3) へ移して、これをドナーへ返血する。
- 8) 返血の際には再度 TSCD を用いて、無菌的にラインの切り替えを行う。
- 9) この操作を必要に応じ、2～3 回繰り返すことにより目標とする顆粒球数を確保する。所要時間は 1 回あたり、30～40 分であり、3 回繰り返しても 2 時間程度で終了する。

(3) 顆粒球製剤の評価 資料1を参照のこと。

顆粒球製剤の投与法

(1) 投与法

好中球減少時の感染症では自力で造血回復が見込まれることが GTX の適応条件の 1 つであるので、造血回復までの期間に集中的に施行する。GTX のスケジュールは連日行うことが原則であるが、G-CSF で動員された顆粒球の寿命は延長しているので、隔日、あるいは、2 投 1 休などの投与法も考えられる。

一般に顆粒球製剤は採取後、速やかに輸血する。AABB および Council of Europe のガイドラインでは保存する場合は室温 (20～24℃) で静置し、24 時間以内の使用を推奨している。製剤に対しては、輸血後 GVHD 予防の目的で必ず 15～50Gy の放射線照射を行う。白血球除去フィルターは使用せず、通常の輸血フィルターを用いる。

（２）受血者の前処置

受血者に対する前処置としてアレルギー反応予防の目的で抗ヒスタミン剤および副腎皮質ステロイド剤（ヒドロコチゾン 5mg/kg）の前投与を行う。輸血は緩徐に行い、輸血中は輸血関連急性肺障害の早期発見のために経皮酸素モニターを装着し、呼吸数、心拍数、SpO₂を観察する。

アムホテリシン B を使用中の患者では、致命的肺障害を引き起す可能性があるため、アムホテリシン B 終了から4～12時間、間隔をあけることが必要である。

輸血顆粒球数

Vamvakas ら⁷⁾によるメタアナリシスでは、 1×10^{10} 個（成人体重 70kg で換算して、 1.4×10^8 /kg に相当）以上の顆粒球輸血を受けた群に有意に多くの生存例を認めている。また Appelbaum ら⁸⁾は、敗血症犬の実験で 1.0×10^8 個/kg 未満の顆粒球を輸血された群はすべて死亡し、 2×10^8 個/kg 以上の顆粒球輸血を受けた群はすべて生存したと報告している。これらの結果から効果を発揮するための顆粒球数の閾値は 2.0×10^8 個/kg（レシピエント体重当り）であると考えられる。

GTX の効果判定と中止基準

臨床効果の判定基準は局所所見の改善、全身状態の改善、解熱、CRP 低下、細菌学的検査所見の改善、画像所見の改善などを指標とする。

一般に GTX 1 時間後のレシピエント末梢血好中球数が GTX 後の好中球増加の指標となる。レシピエント体重 kg 当り 3×10^8 個の顆粒球が輸血されると、500/ μ L 程度の増加が見込まれるが、輸血顆粒球数と GTX 後の好中球数は必ずしも相関はしない。好中球増加が認められなくとも臨床効果が得られることもあるので、過量の顆粒球数を輸血することは不必要である。

GTX を中止する目安として、自己造血回復(ANC ≥ 500 / μ L)、感染症のコントロールが可能と判断される場合、GTX の施行にもかかわらず症状が悪化するなど効果が認められない場合、GTX による副作用が出現した場合、速やかに中止する。

副反応

（１）アレルギー反応

通常の輸血と同様に蕁麻疹、皮膚紅潮、血管性浮腫がみられる。

（２）アナフィラキシー反応

アレルギー反応にとどまらず全身症状として、腹痛、下痢、嘔吐、呼吸困難、喘鳴、頻脈、血圧低下、意識障害に陥る。

（３）発熱、悪寒

顆粒球の輸血により白血球から放出される各種サイトカインにより生じると考えられているが、抗ヒスタミン剤、コルチコステロイド剤の前投で頻度は減少する。

（４）肺障害

輸血された顆粒球は、まず最初は肺にホーミングするので、これに伴い咳嗽、多呼吸、酸素飽和度の低下、肺浸潤を認めることがある。特にアムホテリシン B との同時投与時に肺障害を合併しやすい。予防のためにはアムホテリシン B 終了から 4～12 時間あけて、GTX を施行する。また、輸血関連急性肺障害の頻度は通常の輸血頻度（輸血患者当り 0.16%）より高いと予測され注意を要する。

（５）免疫感作

頻回の GTX により抗 HLA 抗体、抗顆粒球抗体の出現が認められる。原疾患によって出現頻度は異なり、慢性肉芽腫症に対する長期間（6 週間以上）、頻回の GTX で 80% に HLA 抗体の出現がある。

白血病などの悪性腫瘍においては、既治療の影響で抗体の出現頻度は少ないが、成人では 20～25% に認められる。

（６）感染症

通常の輸血に見られる感染症は理論上全て発生しうる。とくに院内採血ではウイルス核酸検査（NAT）をしないことが多いので、ウイルス肝炎の可能性はより高い。その他 GTX 後の感染症として、CMV 感染の報告があり、特に、造血幹細胞移植時に GTX を施行した場合は注意を要する。

ガイドライン（案）⁹⁾

顆粒球輸血研究会から GTX に関するガイドライン（案）が提唱されている。目的はドナーと受血者双方の安全性確保と GTX を効果的に行うことであり、適応や手技的な項目だけでなく、責任体制の整備、倫理委員会の承認など施設としての適格性を強調している。GTX を実施しようとする施設では遵守されることを勧める。

資料 1

顆粒球製剤報告書

使用日 年 月 日 時

■ レシピエント

輸血患者名： ID:

ABO 血液型： Rh 型 不規則抗体：無・有（ ）

疾患名：

適応感染症： 起因菌：

■ ドナー

ドナー名： ID: 性別：男・女

年齢： 歳 体重： kg ABO 血液型： Rh 型：

■ レシピエント/ドナー交差適合試験

生食法[適合・不適合] クームス法[適合・不適合]

■ 顆粒球製剤

WBC / μ L 好中球数 %・/ μ L 重量 g総好中球数 $\times 10^9$ 個 = $\times 10^8$ /kg患者体重

特記事項

X線照射担当者： 照射量： Gy

処理担当者： 処理日： 年 月 日 時

責任者： 確認日： 年 月 日

参考文献

- 1) Circular of Information for the use of human blood and blood components. American association of blood banks. 093011 Revised December 2009.
- 2) Council of Europe. (2003) Council of Europe Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components (9th edn). Council of Europe Publishing, Strasbourg, France.
- 3) Ikemoto J, Yoshihara S, Fujioka T, et al. Impact of the mobilization regimen and the harvesting technique on the granulocyte yield in healthy donors for granulocyte transfusion therapy. Transfusion. 2012;52:2646-52.
- 4) 菊田 敦、大戸 斉:顆粒球輸血. 編者 大戸 斉、遠山 博、小児輸血学、中外医学社、東京、2006、227-238.
- 5) 大坂顯通, 大戸 斉, 菊田 敦, 小原 明、他: 安全な顆粒球輸血を目指したガイドライン案の作成. 日本輸血学会雑誌. 2004;50:739-45.
- 6) 造血細胞移植 同種末梢血幹細胞移植のための健常人から末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン(2010年6月30日改訂第4版、日本造血細胞移植学会/日本輸血学会)
- 7) Vamvakas EC and Pineda AA. Meta-analysis of clinical studies of the efficacy of granulocyte transfusions in the treatment of bacterial sepsis. J Clin Apheresis. 1996;11:1-9.
- 8) Appelbaum FR, Bowles CA, Makuch RW, et al. Granulocyte transfusion therapy of experimental pseudomonas septicemia: Study of cell dose and collection technique. Blood. 1978;52:323-31.
- 9) Ohsaka A, Kikuta A, Ohto H, et al. Guidelines for safety management of granulocyte transfusion in Japan. Int J Haematol. 2010;91:201-8.

(菊田 敦、藤盛 好啓)

第17章 海外における細胞処理ガイドラインおよび規制の現状

国際的な細胞処理指針の現状

細胞処理のガイドラインの目的は細胞製剤の質の向上によって患者の安全性を高めることにある。Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT), American Association of Blood Banks (AABB), Joint Accreditation Committee ISCT (Europe)-EBMT (JACIE), Netcord, The Alliance for Harmonization of Cellular Therapy Accreditation (AHCTA)など、欧米のさまざまな団体がそのガイドラインを公開している。細胞処理には細胞培養や遺伝子導入などを伴う研究的なものから、日常診療として保険診療の範囲で幅広く実施されている造血幹細胞移植まで含まれ、状況により要求度は異なる。「ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」(厚生労働省医薬食品局長:薬食発第0912006号、平成20年9月12日)によれば、造血幹細胞移植に伴う細胞処理でルーチン的に行われる細胞分離や凍結、解凍は加工とはみなされず、“Minimally manipulated cellular therapy products”の扱いとされ、細胞の加工を要する製剤のような高い要求はない。とはいっても、国際的な指針となると、設備などインフラ整備の状況は国によって大きく異なり、欧米先進国型の指針を一律に適応することは難しい。

WBMT による移植細胞プロセッシング部門のガイドライン

造血幹細胞移植は白血病などの血液疾患の標準的治療の一つであるが、その実施には一定の医療レベルとインフラの整備が必要であり、いまだ世界の多くの地域で普及していない¹⁾。2009年、世界中の造血幹細胞移植の学会とドナーバンクが協力し、さらに世界保健機構WHOの支援のもとにWorldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT)が設立された。その目的は、質の高い造血幹細胞移植を世界中に普及させることにある。従って細胞処理の標準化は、WBMTの重要な使命の一つであり、細胞処理委員会が設けられている。この委員会で議論を重ねながら、これから移植実施の体制を整えようとする国をも念頭においた、造血細胞処理のためのガイドラインを公表した²⁾。ここでは、施設や作業員の資格は求めておらず、設備、機器についても「必要な備品」と「望ましい備品」の2段階で表示され、最初は「必要な備品」のみで開始し、インフラ整備が可能な状況になれば「望ましい備品」へとステップアップしていくことが求められている。

わが国の標準との相違

細胞凍結の「必要な備品」には -70°C 以下の冷凍庫が、「望ましい備品」にはプログラムフリーザーを用いた液体窒素タンクが挙げられている。かつて、発展途上国ではこのような設備はなく凍結できないため、自家移植用の末梢血幹細胞(PBSC)や骨髄を採取後、室温で1~2日保管し、その間に患者に大量化学療法による治療を行い、自己幹細胞を移植することが行われていた。わが国はというと、自己PBSCが開発された1990年初頭には高価なプログラムフリーザーは普及しておらず、プログラムフリーザーを使用せずに幹細胞を -80°C で凍結をする簡易凍結法が九州大学の牧野らにより開発された³⁾。わが国ではこの簡易凍結法が一般化したこともあり、その後もプログラムフリーザーは普及しなかった。実際、わが国では

自己、同種含め 2 万例以上の PBSCT が行われ、多くは簡易凍結法による凍結解凍の過程を経ているが大きな問題は生じていないため、簡易凍結法を標準凍結法に変更する必要がなかったからである。

しかし本法では長期保管の幹細胞の質のデータが不十分であるとして、インフラが不十分な場合のみに一時的に許容される方法として記載された。牧野らの論文では 3 か月間の安全性のみしか検証されておらず、その後の片山らの論文⁴⁾では 5 年間保存の検討が行われているが、バック保存でなく、tube 保存のデータであること、凍結細胞濃度が現状より低いこと、5 年の評価はわずか 2 検体でしか検討されていないことからエビデンスとして不十分と判断された。一方、英国からは簡易凍結法では 1 年程度の保存で幹細胞コロニー数が減少するため、長期保存に適さないという論文も発表されている⁵⁾。このエピソードからの教訓は、日常に慣れきってしまうことなく、絶えず科学的に検証する姿勢を忘れないことであろう。

また、同種移植の際に移植片を凍結保存するのは推奨されないとされている。これは、欧米では PBSCT は非血縁が多く、その場合、非血縁骨髄と同様に、そのまま移植に用いていることが反映されている。一方、わが国では同種 PBSCT は血縁者間移植がほとんどで、安全を期して CD34 陽性細胞数を確認してから移植前処置を行うため、いったん凍結されることが多い。

このように海外での基準をみていくことはわが国の基準作りの際にもグローバル化の観点から重要である。しかし、なにも欧米のやり方のみが優れているわけではなく、わが国にも世界に誇れるいい面があることにも気付かされる。これを広げるためには検証と情報発信を怠ってはならない。

参考文献

- 1) Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. JAMA : the Journal of the American Medical Association. 2010;303:1617-24.
- 2) Leemhuis T, Padley D, Keever-Taylor C, et al. Essential requirements for setting up a stem cell processing laboratory. Bone Marrow Transplant. 2014;49:1098-105.
- 3) Makino S, Harada M, Akashi K, et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing. Bone Marrow Transplant. 1991;8:239-44.
- 4) Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant. 1997;19:283-7.
- 5) Watts MJ, Sullivan AM, Ings SJ, et al. Storage of PBSC at -80 degrees C. Bone Marrow Transplant. 1998;21:111-2.

(豊嶋崇徳)

第18章 Q & A

Q1. バンクドナーから採取された骨髓液にヘパリンを用いる場合、採取施設で入れる量の統一がされていないようですが、採取骨髓量に対してどのくらいの単位数を入れるべきでしょうか？

A1. 日本骨髓バンクで発行している「骨髓採取マニュアル 第四版（2011.4.1）」によれば、抗凝固剤として「ヘパリンを使用する。」とあり、さらに「最終ヘパリン濃度は、通常 10 単位/mL 前後で用いることを推奨する。」とある。すなわち、骨髓液が凝固しないような推奨濃度の記載はあるがヘパリン総量は規定されていない。これは、採取する骨髓量が患者あるいはドナーによって様々であり、それに用いる希釈液量も様々になるためと考えられる。しかしながら、濃度を規定しても骨髓液に対する希釈液量が多くなればそれだけヘパリン総量が増えるため、これらが体内に入る患者の凝固能に影響してくる可能性は十分にあり注意する必要がある。

採取骨髓量に対してどの程度の量の希釈液を使用するかについては、各施設の採取手技や手順によっても異なると思われ、詳細の把握は困難である。しかし以前筆者の施設で、他施設から届いた骨髓液を調査したところ、調査期間中届いた骨髓液の総容量は 560～1,750mL の範囲であったところ、Medium 量は 60～700mL の、総ヘパリン量は 1,500～50,000 単位の、それぞれ大きな開きがあった。総容量が最大であった 1,750mL の場合でも、バンクの規定通り最終ヘパリン濃度を 10 単位/mL にすれば、総ヘパリン量は 17,500 単位で済むことになるはずだが、実際にはこれよりかなり多くの量が含まれていたことが分かった。（第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会、パネルディスカッション 造血幹細胞移植におけるクオリティーコントロール 「移植骨髓細胞の品質管理と問題点」にて発表）

このように、規定はあるものの実際に届いた骨髓液内の総ヘパリン量が多いことはしばしば経験されるので、必要に応じて液量（ヘパリン量）を減らすことを考慮すべきだろう。明確な基準はないが、抗凝固の治療に用いるヘパリンの量から考え 20,000 単位以上含まれていれば減量することは必要と思われ、15,000 単位～20,000 単位では患者の状況に応じて検討するのが妥当と考えられる。ちなみに筆者の施設でも、15,000 単位程度まではそのまま慎重に投与し、それ以上の場合は主治医と検討して、必要と判断されれば血液型マイナーミスマッチの場合に準じた血漿除去処理を行っている。

Q2. 末梢血幹細胞を -80°C の冷凍庫で保存していますが、どのくらいの保存期間までであれば移植に使用できますか？また、凍結細胞を移植する際には、解凍してから輸注までの時間はどのくらいまでにするべきでしょうか？

A2. 現在、研究用試薬として市販されている CP-1 が広く一般的に造血幹細胞の凍結保護液として用いられているが、CP-1 の添付文書によれば、短期間(6 ヶ月～1 年半)であれば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と記載されている。したがってこの文面から可能と判断される保存期間は1 年半である。一方、文献的には段階凍結法を用いず -80°C で(いわゆる簡易法)で5 年保存したところ、細胞の生存率は約80%まで低下(有意差あり)したが、BFU-E と CFU-GM の回収率には影響がなかったとする報告がある¹⁾。また、簡易法により数年間保存後でも移植が無事行われたとする症例報告も散見される。簡易法を用い10 年以上バッグ内で -80°C で凍結保存した細胞が、CD34 陽性細胞の回収率や生存率は低下するものの、コロニー形成能は短期保存のものと変わらず、さらにマウスへ異種移植を行って解析した結果、*in vivo*での再構成能や自己複製能も保たれているとする報告もある²⁾。実際筆者の施設では、簡易法で最長7 年保存後に移植に用いた経験があり、問題なく生着した。したがって、1 年半以上保存したもののでも移植に使用できる可能性は十分あるものの、問題なく使用できると明記されているのは1 年半であるため、もしそれ以上長期保存したものを使用する際には、サンプルを用いて生存率やコロニー検査 CD34 測定など十分に検討し、万が一一生着しなかった場合のことまで考慮したうえで実施する必要があると思われる。

凍害保護液に含まれる DMSO は、室温で細胞毒性があることが知られているので、一般的にはできるだけ早く輸注することが望ましいとされる。上述の文献では解凍後の DMSO にさらされたままの時間経過についても検討しており、解凍直後の細胞の生存率が平均75%のものが、そのまま室温で60 分間置くことで63%まで低下した(有意差あり)が、BFU-E と CFU-GM の回収率にはやはり影響がなかったとしている¹⁾。したがって、解凍後ベッドサイドに運んで輸注をするまで位の時間であれば通常は問題ないと考えられる。筆者の施設では、解凍後は念のため on ice でベッドサイドに運搬して輸注を行っている。その後概ね30 分以内には移植が行われ、問題となった経験はない。

1. Katayama Y, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant. 1997;19:283-7.
2. Takahiro Shima, et al: Preserved *in vivo* reconstitution ability of peripheral blood stem cells cryopreserved for a decade at -80°C . Bone Marrow Transplant. 2015 (advance online publication)

Q3. 骨髄移植の血液型メジャーミスマッチの際、自動血球分離装置で赤血球除去を行っていますが、その度ごとに有核細胞数は必ず減少するので、適切に幹細胞が残っているかが不安です。どのように確認すればよいのでしょうか？

A3. 通常の手技により、手順書通りにトラブルなく処理が遂行出来ているのであれば、十分量の幹細胞が回収できているはずである。心配であれば、各サイクル等処理途中で少量サンプリングして、細胞数やCD34 陽性細胞の測定などを行えば、回収率を確認することが可能である。

参考までに、以下に以前筆者の施設で測定したデータを示した。COBE Spectra のMNC モードで5 サイクル処理した骨髄液の処理前後の値で、7 症例の平均値を示してある。

	処理前	処理後
容量 (mL)	1109.57 ± 266.97	125.14 ± 35.94
総細胞数 (×10 ⁸)	166.08 ± 46.24	49.23 ± 28.30
単核球(MNC) (%)	49.14 ± 8.93	90.40 ± 2.35
Hct (%)	25.33 ± 3.45	1.70 ± 1.00
赤血球容量 (mL)	277.99 ± 64.99	2.40 ± 2.35
CD34 陽性細胞 (%)	1.53 ± 2.30	3.26 ± 1.84
CD34 陽性細胞回数率 (%)	100	95.6 ± 20.47

都立駒込病院のデータより(N=7)

これを見ると、5 サイクルの処理を行うことで総容量は 10 分の 1 近くまで減量し、総細胞数としても 3 分の 1 に減るものの、細胞の 90%までが単核球と非常に濃縮された結果、CD34 陽性細胞は 95%回収できていることがわかる。

これらを骨髄処理のたびに毎回確認することは、時間や手間がかかり現実的には不可能と思われるが、同様のデータを各施設で使用の機器、手技手順において確認しておくことは可能である。

Q4. 輸注する細胞が汚染していることが判明した場合はどうしたらよいでしょうか。

A4. 移植に用いる骨髄液、末梢血幹細胞、臍帯血は時に細菌や真菌により汚染されることが報告されている^{1,2)}。このため、採取から輸注までの間に 1 回は細菌培養検査などを行う必要がある。一般的に、細菌が検出される頻度は、末梢血幹細胞は 1%未満で比較的低く、採取時に開放系になる骨髄液ではそれよりやや多く、臍帯血ではさらに頻度が高い。このため、菌種の同定や薬剤感受性を調べることは重要である。また、工程管理のためにも感染源の特定、汚染の程度を明らかにする必要がある。皮膚常在菌が最も多く分離される。代用になるものがないので汚染が判明しても抗菌剤を使用しながら輸注せざるを得ないことが大半であり、輸注されても患者に大きな問題がないことが多い²⁾。したがって、担当医に報告し対応方法を検討してもらうのが实际的であ

る。

1. Hahn S, Sireis W, Hourfar K, et al. Effects of storage temperature on hematopoietic stability and microbial safety of BM aspirates. Bone Marrow Transplant. 2014;49:338-48.
2. Jacobs MR1, Good CE, Fox RM, et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor and other regenerative cells used in transplantation and regenerative medicine. Transfusion. 2013;53:2690-6.

Q5. 解凍した細胞は品質にかかわらず輸注をするわけですが、解凍後の製剤の検査にはどのような意味があるのでしょうか。本当に必要でしょうか？

A5. 解凍後の細胞数、生細胞率、CD34 陽性細胞数の測定は、実際に輸注したものの評価として重要であるだけでなく、細胞処理・保存などの工程過程や品質の管理の観点からも推奨される。ただし、代用になるものがないので、生細胞率が低くても輸注せざるを得ないことが大半である。したがって以上の情報は担当医に伝え、対応方法を検討してもらう必要がある。ただし、解凍から輸注まではなるべく速やかに行う必要があり、また凍結保存バッグによってはルートが一つしかなく輸注ルートの途中に予め三方活栓をいれておき検体を採取するなどの工夫が必要である。また、完全に混和されていない場合、細胞が死んで溶血や萎縮していると、生存率や回収率の計算が不正確になる。トリパンブルー染色による生細胞率は標準化が難しいことも指摘されている。フローサイトメトリー法や様々な測定キットによる方法もあるが、測定法によりある程度の差があるので、その点を考慮して解釈する必要がある。

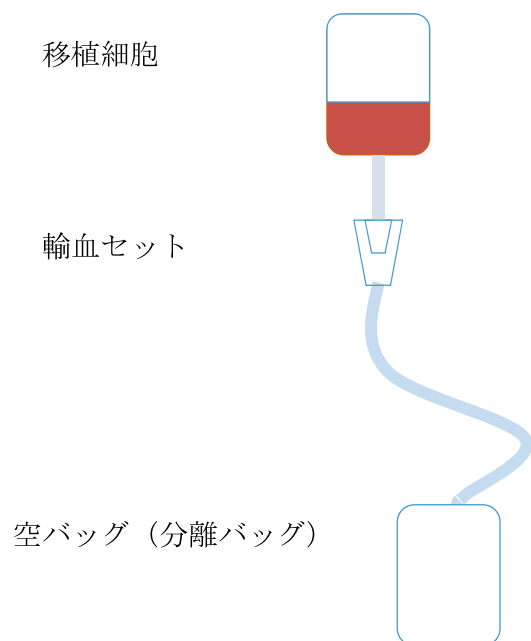
Q6. 解凍時にバッグの破損に気がついた場合にはどうすればよいのでしょうか？

A6. 時に液漏れが解凍時に判明することがある。これは清潔なビニールバッグに入れて解凍すると観察しうる。漏れるバッグの外側は無菌ではないので、漏れた細胞は少量であれば使用せず廃棄する。液漏れに気づいたら、すぐにバッグの破損部を確認して、シーラーなどで補修するか新しいバッグに内容物を移すのが良いだろう。

Q7. 輸注時に細胞凝集塊などでライン閉塞を起こして輸注できなくなっていました。どうしたらよいのでしょうか？

A7. 移植に用いる細胞は基本的に代替品のない貴重なものなので、凝集塊だけを取り除き、それ以外の細胞はできるだけ回収して輸注することを考える。現実的には、まずは閉塞した輸血セットなどを新しいも

のに交換して、輸注を継続してみるのが良いであろう。閉塞が著しく、新しい輸血セットを使用しても継続輸注が困難であれば、いったん細胞液を輸血部門に回収して以下の処理を行う。一つの方法は、まず SCD を用いて無菌的に、空バッグ(分離バッグ)と輸血セットを接続し、次に細胞液の入ったバッグにその輸血セットを接続する。すると移植細胞バッグと空バッグが輸血セットを介してつながることになる(下図参照)。それから、注意深く凝集塊をよけながら残りの細胞を空バッグへ移動させ回収すると、凝集塊は輸血セット内のメッシュで取り除かれる。



また、バッグにアダプターをつけてそこから 50mL シリンジなどに細胞を回収する方法もあるが、メッシュを通っていないので小さな凝集塊も一緒に回収してしまうため、この場合には輸注時に再度別の輸血セットを用いるなど、注意が必要である。

Q8. 輸注時に重篤な有害事象が発生して途中で輸注ができなくなったらどうしたらよいでしょうか？

A8. DMSO によるショック、高度のアレルギーなどで輸注ができない場合には、残った液や残ったバッグの細胞を洗浄処理する必要がある。また、混在する好中球を除くには、比重遠心液に静かに重層・遠心して単核球を分離して輸注する方法がある。

以下に、ニューヨーク血液センター(NYBC)の臍帯血の解凍処理法¹⁾を紹介する。この方法は、解凍後の急激な浸透圧変化による細胞傷害を最小限に抑えるように配慮されたものである。本法を用いると、洗浄しない場合よりも移植後の好中球回復が早いとの報告があったが²⁾、必ずしも支持されていない³⁾。他にもいくつかの洗浄方法が報告されている。

<NYBC の洗浄法>

- ① 臍帯血の入ったバッグは解凍前に液体窒素液相から気相に移動して 15 分間置き、その後 5 分間大気に置きプラスチックバッグを少し柔らかくする。その後、37℃恒温槽につけ、なるべく早く解凍する(通常 2 分以内)。
- ② 解凍後速やかに、同量の 2.5%ヒトアルブミン/5%デキストラン 40/生食からなる溶液で希釈・混和した後に遠心分離(400g、10 分)する。
- ③ 上清を除去し、輸注に適した量(除去した量など)の 2.5%ヒトアルブミン/5%デキストラン 40/生食で再浮遊させる。
- ④ 患者に中心静脈から輸注する。

1. Rubinstein P¹, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:10119-22.
2. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. N Engl J Med. 1996;335:157-66.
3. Nagamura-Inoue T¹, Shioya M, Sugo M, et al. Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank. Transfusion. 2003;43:1285-95.

Q9. コロニー検査はどのような時に必要ですか？移植をするのに、コロニー検査ができるようにしていないといけないのですか？

A9. 稀ではあるが、移植解凍時の細胞数、CD34 陽性細胞数が少なかった場合の参考になり得る。判定に2週間を要するが、仮に生着不全や生着が遅延した場合、CFU-GM 数が参考値になる。ルーチン化していない場合、コロニーの観察、カウントとも経験が必要であり現在は必須な検査とはいえない。現在は CD34 陽性細胞測定が必須の検査であり、コロニー検査は補助的検査の位置づけとなっている。

Q10. 低温凍結されたメチルセルロース培地はどのように解凍するのですか？解凍後はどのように保存するのですか？

A10. 室温または 4℃の冷蔵庫内で overnight し解凍する。37℃での解凍は禁忌である。ボトルであれば、解凍後 1～2 分間激しく振り混和してから静置して、培地が透明になった後、チューブに培養 1 回分ずつ等量に分注し、再度 -20℃で凍結保存しておく。2～8℃であれば約 1 か月の保存が可能である。凍結解凍の繰り返しは避ける。また、既に等分に分配された培地も市販されている。

Q11. コロニーアッセイの方法はどのようにするのでしょうか？

A11.

《細胞調整》

播種する細胞数は正確にする必要がある。作業者によって細胞カウントの誤差がないようにする。また、播種する細胞数が多すぎるとコロニー形成も過多となり、サイズ、区別に影響する。逆に少ないとコロニー数も少なくなり、コロニー種類によって形成が評価できないことがある。細胞数の目安は 1 dish 当たり骨髓 (MNC): $2 \sim 5 \times 10^4$ 個、末梢血: $2 \sim 10 \times 10^4$ 個、臍帯血: $1 \sim 2 \times 10^4$ 個である。骨髓液は比重分離液(比重:1.077)を用いて単核細胞に遠心分離し、調整する。

《播種》(4dish 分として作成)

1. メチルセルロース培地4.0mlに調製後の細胞浮遊液400 μ lを添加する。(実際は粘度があるため3dish 分)
2. チューブの蓋をしめVortexで4秒間攪拌し、細胞が均等になるように混合する。5分間放置し脱気する。
3. 1mlの注射器に18Gの針(コロニー専用針)をつけ、チューブのふちに触れないように針を沈めてリング内の空気を抜き、メチルセルロースをdish 1枚に1.1mLを分注する。dish を傾けながら回転させ、メチルセルロース培地を隙間なく均一にのばす。
4. メチルセルロース培地を収容する100mm(大) dishに、培養メチルセルロース培地dish 3枚と、蓋をしない滅菌水を入れた1枚のdish(メチルセルロース培地の乾燥を防ぐ)を入れる。
5. 100mm(大)の蓋の上に名前、日付を記入し、37℃、5%CO₂、湿度100%のインキュベータに入れ、14日間培養する。

《コロニーカウント》

1. 培養14日後、インキュベータから取り出して倒立顕微鏡のグリッド付きホルダー上に培養したdishを設置し、3枚のdish全視野を走査して各種コロニー数をカウントする。結果を表に記載する。

Q12. コロニーの種類はどのようなものがありますか？ 最終的な CFU-GM 数の計算はどのようにするのでしょうか？

A12. (詳細は第 9 章を参照のこと。)

1. 培地の組成にもよるが、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)、赤芽球バーストコロニー形成細胞 (BFU-E: burst forming unit-erythrocyte)、マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-M: colony forming unit-macrophage)、混合コロニー形成細胞 (CFU-Mix) 等が観察される。

造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト

2. 3枚のdishの各種類コロニー数(CFU-GM、CFU-M、BFU-E、CFU-Mix)の平均値を求める。(培養枚数は施設による)

(例) 末梢血幹細胞採取量:100mL 採取細胞絶対数: 15.5×10^9 個 患者体重:60kg

播種細胞数: 5×10^4 個/dish 3dishのコロニー平均数(GM+Mix) = 47.8個

$$\text{CFU-GM数: } \frac{15.5 \times 10^9 \times 47.8}{5 \times 10^4} = 148.18 \times 10^5 \quad \text{体重当たり: } \frac{148.18 \times 10^5}{60} = 2.47 \times 10^5 / \text{kg}$$

参考資料

1. 院内における血液細胞処理のための指針
(平成 22 年 5 月 27 日第 1 版)
2. 同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの
末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン
(2010 年 6 月 30 日 改訂第 4 版)
3. 非血縁者間末梢血幹細胞採取マニュアル暫 定 版
(2010.10.1)
4. 細胞凍害保護液 CP-1 説明書 (極東製薬工業株式会社)

院内における血液細胞処理のための指針

平成 22 年 5 月 27 日 第1版作成

日本輸血・細胞治療学会
日本造血細胞移植学会

はじめに

医療施設内で加工・製造される洗浄血小板や造血幹細胞等の院内血液細胞製剤は輸血医療や細胞治療にいまや不可欠である。しかしながら、これらの院内血液細胞製剤は、Good Manufacturing Practice (GMP)の下で日本赤十字社等から供給される血液製剤と異なり、その安全性や品質の保証はいまだに担保されていない。従って、院内血液細胞製剤の扱いは、血液法のもと行政に残された喫緊の課題である。そこで、院内血液細胞製剤を扱う国内のあらゆる施設が遵守すべき最小限の基準(施設ならびに製造・品質管理手順)をここに作成し、血液細胞製剤(生物製剤、生物由来製品、臨床研究用細胞・組織製剤等)における院内血液細胞製剤の規制上の位置づけを明確にするとともに、血液法の基本方針に則り、院内血液製剤の安全性の向上、適正使用の推進、そして安定供給の確保への行政ならびに医療機関の取り組みを促すことを目標とする。

本基準の作成は、関連学会(日本輸血・細胞治療学会、日本造血細胞移植学会)の相互連携のもと行われた。さらに引用規格のひとつとして、FACT-JACIE2006年第3版(Part C および D)の細胞治療製剤の採取、細胞処理基準を参考としたが、わが国既存の諸基準に整合する文書体系とした。また 輸血・細胞処理部門のわが国の現状を考慮し、必ずしも現在の大半の施設が満たす基準ではなく「目指すべき基準(理想的な基準)」の内容も含めた。

今後、海外、特に欧米の最新の指針と同等の基準となるべく、適宜内容を見直し、改定を加えることができるようにする。このようなガイドラインを作成することによって、将来的に輸血・細胞処理部門認定や有害事象の監視体制を構築することも可能と考えられる。

目次

はじめに

1. 目的
 2. 対象
 3. 細胞の採取
 4. 責任者と作業員
 5. 設備・機器
 6. 細胞処理(プロセッシング)
 7. 払い出し
 8. 保存と解凍
 9. 検体保存
 10. 投与
 11. 廃棄
 12. 雑則
- 参考資料

付

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
 - 1.2. 細胞総数と生細胞数の算定
 - 1.3. CD34 陽性細胞数測定法
 - 1.4. コロニー形成細胞測定法(コロニーアッセイ検査)
2. 末梢血幹細胞の処理・凍結保存手順
3. 骨髄液からの赤血球除去手順
4. 骨髄液からの上清除去手順
5. 凍結細胞の解凍・輸注の手順
6. 細胞処理に用いる試薬など

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)および「骨髄採取マニュアル」(骨髄移植推進財団)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」(日本造血細胞移植学会、日本輸血・細胞治療学会)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)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、作業者、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、ヘアーキャップ、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で実施すること。

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き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 22 年 5 月 27 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

造血細胞移植

同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの
末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン

(2010 年 6 月 30 日 改訂第 4 版)

日本造血細胞移植学会
日本輸血・細胞治療学会

I. 背景

同種末梢血幹細胞移植 (allo-PBSCT) は、わが国では 1990 年代後半になって積極的な臨床応用が進み、2000 年 4 月の診療報酬改正で同種末梢血幹細胞移植の健康保険適用が承認されたことによって、同種骨髄移植の代替法として普及してきた。

日本造血細胞移植学会は、2000 年 4 月 1 日「同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞の動員・採取に関するガイドライン」を公表し、ドナーの短期・長期の安全性追跡調査のためのドナー登録制度を開始した。一方、2000 年 3 月下旬に血縁ドナーからの末梢血幹細胞 (PBSC) 採取のためのアフエレーシス中に grade 4 (WHO 基準) の有害事象 (心停止) が発生した。日本造血細胞移植学会は、事の重大性を憂慮し、ドナーの安全性を確保するため、日本輸血学会に協力を依頼し、両学会と合同で末梢血幹細胞採取に関するガイドライン委員会を設置し、ガイドラインを改訂した (2000 年 7 月 21 日 第 2 版)。

一方、2000 年 4 月から開始された日本造血細胞移植学会のドナー登録制度では、2005 年 3 月末までに既に 3264 例のドナーが登録され、さまざまな有害事象が報告されている。また、わが国では顆粒球コロニー刺激因子 (以下 G-CSF と記す) の投与を受けた血縁ドナーにおける急性骨髄性白血病 (G-CSF 投与後 14 ヶ月) の発症が報告された。このように、PBSC の動員・採取は全身麻酔下の骨髄採取に比べて簡便ではあるが、決して安全性が高いとはいえないことが示されている。最近、骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の臨床応用に伴って高齢患者の適応拡大に伴う、高齢ドナーの増加のため、ドナーの適格基準を見直し、2003 年 4 月 21 日に改訂を行った (改訂第 3 版)。今回、非血縁者間 allo-PBSCT の実施が認められたため、さらなるドナーの安全性確保のため改訂を行った (改訂第 4 版)。

II. 目的

健常なドナーから、移植後の生着に必要な十分量の PBSC を安全に採取するために、G-CSF 投与による PBSC の動員およびアフエレーシスによる PBSC 採取に関する基準をガイドラインとして示す。このガイドラインは、あくまでも基準を指針として示すもので、規制するものではない。また、G-CSF による PBSC 動員やアフエレーシスによる PBSC 採取の具体的な作業基準 (マニュアル) については各施設で作業基準書を作成することを推奨する。

III. インフォームドコンセント

G-CSF 投与による PBSC の動員及びアフエレーシスによる PBSC 採取を受ける予定のドナーに対して、同種骨髄移植の代替法としての allo-PBSCT の概略を説明した上で、G-CSF 投与およびアフエレーシスの目的、方法、危険性と安全性について詳しく説明し、文書による同意を得る。未成年者をドナーとする場合は保護者からのインフォームドコンセントと本人からのインフォームドコンセントが必要である。

尚、同意書には以下の事項を含むものとする。

- ・ 同種造血幹細胞移植について、PBSCT および骨髄移植の特徴、長所および短所につき、十分な説明を受け理解したこと。
- ・ G-CSF 投与に伴って有害事象が生じうること。
- ・ PBSC 採取および骨髄採取について、十分な説明を受け理解したこと。
- ・ 確実な採血ルートを確保するために、深部静脈へのカテーテル挿入がありうること。
- ・ 十分量の PBSC が採取できない場合、PBSC 採取の中止あるいは、血縁ドナーでは全身麻酔下の骨髄採取が必要となる場合がありうること。

IV. 実施施設の適格性

1. 施設の体制

1) 責任体制の整備

健康人ドナーにおける PBSC の動員・採取に伴う危険性を実施施設として認識し、健康人ドナーからの PBSC の動員・採取に関する責任医師を任命して責任体制を明確にすること。

2) 輸血療法委員会の設置

PBSC 採取は一種の院内採血であることから、厚生労働省「輸血療法の実施に関する指針」に示されている院内輸血療法委員会を設置し、輸血責任医師を置くこと。

3) 採取実施施設の条件

- ① PBSC 採取を少なくとも 30 例以上実行した経験を有する医師が確保されていること。あるいは PBSC 採取を 10 例以上実行した経験を有する医師が確保され、かつ施設として少なくとも PBSC 採取を 30 例以上実行した経験を有すること。非血縁者からの採取施設の認定基準は日本骨髄バンクの規定に従う。
- ② 日本輸血・細胞学会認定医の指導・監督の下にアフエレーシスを実施できる日本輸血・細胞学会認定施設が望ましい。
- ③ 迅速に CD34 陽性細胞数が測定できる体制が確立されていること。

2. 実施体制

1) スタッフ

ドナーの安全性確保の観点から、移植患者の主治医とは別の医師がドナーの主治医を担当し、ドナーの安全性を最優先し、PBSC の動員・採取に当たることを原則とする。アフエレーシスによる末梢血幹細胞採取中は、少なくとも 1 名の医療スタッフ(医師、看護師、臨床工学技士など)による常時監視体制が整っていること。

2) 緊急時の体制

採取中のドナーの容態急変に備えて心電図・酸素飽和度モニター、酸素ボンベ(または配管)、

蘇生セット、救急医療品が整備され、迅速に救急措置ができる医師が常に確保されていること。

3)採取環境

ドナーが数時間に及ぶアフエレーシスの間、快適に過ごせる環境(採取専用スペース、採取専用ベッド、毛布、テレビなど)が確保されていること。

4)作業基準の作成

末梢血幹細胞採取のためのアフエレーシスの作業基準(マニュアル)を、各施設の条件や使用する血球分離装置の機種に合わせて作業手順書として作成しておくこと。

5)採取記録の保存

アフエレーシスの全経過を正確に記録し、採取記録要旨を保存すること。また、末梢血幹細胞を凍結保存する場合は、原則として「院内における血液細胞処理のための指針」に従う。

V. ドナーの安全性確保

1)ドナーの年齢

血縁ドナーの場合は 18 歳～60 歳とする。日本造血細胞移植学会「同種末梢血幹細胞ドナーフォローアップ事業」の調査結果からもこの年齢基準は妥当と考えられる。10 歳以上 18 歳未満および 61 歳以上 65 歳以下のドナー候補者については倫理委員会あるいは IRB での審議を経るなど、各施設の責任により慎重に適格性を判定する。非血縁ドナーの年齢に関しては、日本骨髄バンクの規定に従う。

2)適格性

これまでの知見から、ドナーとして G-CSF 投与を避け、採取を回避するケースとして、以下の場合が考えられる。

- G-CSF に対するアレルギーのある人
- 妊娠あるいは妊娠している可能性のある人
- 血栓症の既往のある人
- 冠動脈疾患または脳血管障害の既往のある人
- 治療を必要とする心疾患、肺疾患、腎疾患、肝疾患を有する人
- 治療または精密検査が必要な臨床検査値異常を有する人
(ただし、軽度で是正可能と考えられる鉄欠乏性貧血は除く)
- 自己免疫疾患を有する人
- 神経疾患を有する人
- コントロール不良の高血圧を有する人
(安静時収縮期 > 160mmHg または拡張期 > 100mmHg)
- コントロール不良の高脂血症を有する人
(総コレステロール > 240mg/dL)

- ・投薬治療が必要な糖尿病
(空腹時血糖 $>125\text{mg/dL}$ または随時血糖 $\geq 200\text{mg/dL}$)を有する人、
- ・脾腫を認める人
- ・白血球増多、血小板増多など骨髓増殖性疾患が疑われる人
- ・間質性肺炎を合併あるいは既往として有する人
- ・悪性腫瘍の既往

3)ドナー候補者の適格性チェック

責任医師がドナー候補者に対して十分な問診と診察(血圧、脈拍、体温呼吸数などのバイタルサインチェック)、さらに同種骨髓移植ドナーに実施されている採取前検査(ECG、胸部 X 線写真、全血球計算値、生化学、感染症検査など)を実施し、日本赤十字社血液センターの血小板アフェレーシスの採取基準などを参考にしてドナーの適格性を慎重に判断する。G-CSF による 脾腫大を考慮して腹部エコーなどによる脾腫のチェックを行う。

4)第三者によるドナー候補者の適格性チェック

ドナー候補者の適格性の判断に際しては、可能な限り適格性の判断ができる各専門領域の医師や麻酔科医など第三者の意見を求める。また、適格基準を外れる血縁ドナー候補者については倫理委員会あるいは IRB の審議を経るなど、各施設の責任でより慎重に PBSC の動員及びアフェレーシスの可否を判定する。

VI. PBSC の動員

健常人ドナーから PBSC を動員する場合、G-CSF 単独投与による方法が最も一般的である。G-CSF の投与は入院、外来は問わない。日本造血細胞移植学会による「同種末梢血幹細胞外来採取血縁ドナー追加調査」(2008 年)では、すでに約 20%の施設で G-CSF の外来投与が安全に行われていた。外来投与の際には、各施設でドナーが確実に担当医師、看護師、コーディネーターなどに連絡がとれる体制をとること。

1)G-CSF 投与に関する注意

G-CSF は皮下注で投与されるが、投与中は G-CSF 投与に伴う有害事象に留意し、発生時には適切に対処し、重篤な場合には中止する。G-CSF 投与後は G-CSF 注射前に全血球計算(complete blood counts, CBC)を行い、白血球 $50,000/\mu\text{L}$ 以上、血小板 10 万以下になった場合は投与量を減量する。白血球数が $75,000/\mu\text{L}$ 、血小板 5 万以下に達した場合は投与を一旦中止する。また、投与中、ドナーに副作用が発生した場合は、状態に応じて中止もしくは減量を検討する。

2)G-CSF の投与量

これまで行われた dose-finding study の成績¹⁻⁶⁾から、G-CSF の投与量が $10\mu\text{g/kg}$ (ドナー体重)/ 日までであれば、PBSC 中の CD34 陽性細胞の動員効果は投与量依存的で、G-CSF 投与に伴う主な副作用も許容範囲であるとされる。 $10\mu\text{g/kg/日}$ 以上の投与では、投与量依存的に動員効率が增大するか否かについては議論の余地が

あり、一方副作用の増加が指摘されている³⁾。EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) や NMDP (National Marrow Donor Program) においても G-CSF の投与量は $10 \mu\text{g/kg/日}$ が推奨されている⁷⁾。G-CSF の投与期間は 4–6 日間とする報告が多い。G-CSF を 4–6 日間投与した場合、末梢血中の CD34 陽性細胞は G-CSF 投与の 5–6 日目にピークに達するという報告が多い^{3, 6, 8, 9)}。一方、7 日目以降は CD34 陽性細胞の減少が観察されており⁷⁾、7 日以上 G-CSF 投与は有効ではない。G-CSF 投与に関して、1 日 1 回投与と 1 日 2 回 (朝、夕) の分割投与を比較した場合、CD34 陽性細胞の動員効率や副作用に差がないとする報告⁹⁾、差があるとする場合⁵⁾があり、一定の成績は得られていない。

以上より、allo-PBSC のための PBSC 動員には $10 \mu\text{g/kg/日}$ あるいは $400 \mu\text{g/m}^2/\text{日}$ (ドナーによってはそれ以下の用量) の G-CSF を皮下投与し、4–6 日目に 1–2 回のアフエレーシスを実施する方法が一般的と考えられる。また、アフエレーシス開始は G-CSF 投与後 4 時間以降が望ましい。保険診療で認められている G-CSF の投与量は lenograstim が $10 \mu\text{g/kg/日}$ 、filgrastim が $400 \mu\text{g/m}^2/\text{日}$ である。

3) G-CSF 投与に関連すると考えられる有害事象 (巻末の資料-1 も参照のこと)

G-CSF 投与に伴う短期的有害事象としては、重大なものとして、ショック、間質性肺炎のほか、腰痛、胸痛、骨痛、背部痛、関節痛、筋肉痛、血圧低下、肝機能異常 (AST, ALT, LDH, ALP 上昇)、発疹、紅斑、悪心、嘔吐、発熱、頭痛、倦怠感、動悸、尿酸値上昇、血清クレアチニン値上昇、CRP 値上昇

などが知られている。

全国集計データでも、高頻度に見られる骨痛 (71%) の他、全身倦怠感 (33%)、頭痛 (28%)、不眠 (14%)、食思不振 (11%)、悪心・嘔吐 (11%)、などが報告されている¹⁰⁾。いずれも G-CSF 投与終了後 2–3 日以内に消失するが、必要に応じて鎮痛剤 (アフエレーシス中の出血傾向を避けるため、アスピリン製剤以外の鎮痛剤が望ましい) などを投与する。G-CSF 投与を中止しなければならないような重篤な有害事象はまれとされるが、これまで心筋梗塞、脳血管障害、脾破裂などの報告例の他、死亡例も報告されている^{11–13)}。また、G-CSF 投与に伴って急性虹彩炎、痛風性関節炎など炎症の増悪も指摘されている^{14, 15)}。一方、血小板減少 ($< 100,000/\mu\text{L}$) も高頻度に見られるが、G-CSF よりアフエレーシスの影響が大きい。以上のように、G-CSF 投与に伴う有害事象は、多くの場合一過性であり、許容範囲内と考えられる。小児においても、成人と同様な短期的有害事象が報告されている¹⁶⁾。最近わが国では G-CSF 投与を受けた血縁ドナーにおける急性骨髄性白血病の発症が報告された。日本造血細胞移植学会は「有害事象特別調査委員会」を設置し、(1) 情報開示のあり方、(2) 事務局の危機管理体制、(3) 善後策について検討が行われた。その結果、今回の事例における G-CSF と白血病発症の因果関係については、「健康者に短期間 G-CSF を投与しただけで白血病が発症する可能性は医学的には考えられないが、完全に否定することはできない」という見解が示された。その後のわが国の調査では、骨髄ドナーでの血液腫瘍発生は 2/5,921 例 (白血病 2 例)、末梢血幹細胞ドナーでは 1/3,262 例 (白血病 1 例) で有意差はないものと考えられる (厚生労働科学研究「血縁者同種末梢血幹細胞ドナーの安全性に関わる 5 年間の調査」)。欧州造血細胞移植グループ (EBMT) の調査では血液腫瘍の発生は骨髄ドナーで 0.40/10,000 人一年、末梢血幹細胞ドナーで 1.20/10,000 人一年であり、一般集団と比較し同等の発生率と考えられる¹¹⁾。米国の NMDP における非血縁末梢血幹細胞ドナー 2,408 例の調査でも血液腫瘍では慢性リンパ性白血病が 1 例、非血液がんが 25 例発生しており、G-CSF 投与で骨髄性白血病のリスクが増大する懸念は否定的である¹²⁾。以上の結果をまとめると、5 年程度の観察では G-CSF 使用ががん発生を助長する可能性は否定的と考えられる。

VII. アフェレーシス

アフェレーシスはリスクを伴う侵襲的手段であり、健常人ドナーの安全性確保のために注意深くアフェレーシスを実施することが要求される。

1. PBSC 採取のためのアフェレーシスに関する認識

Allo-PBSC のためのドナーは、PBSC 動員のために高用量の G-CSF が 4－6 日間投与され、採取のためのアフェレーシスでは、赤十字血液センターで実施されている血小板アフェレーシスに比べて、数倍の処理血液量を要する体外循環が必要とされる。したがって、PBSC 採取には成分献血以上のリスクがあることを認識する必要がある。全身麻酔下の骨髓採取においては、麻酔科医が移植担当医とは異なる第三者の立場で介在しているが、PBSC 採取においても同様に、輸血部医師などの第三者医師の介在が望まれる。さらに、採取担当医がアフェレーシスに習熟していない場合には、アフェレーシスに伴う危険性の増大が危惧される。

2. アフェレーシスに関する注意

アフェレーシス当日、体調について問診するとともにバイタルサインをチェックし、採取困難な体調不良が無いことを確認して採取を開始する。

アフェレーシス前、終了直後、約 1 週間後には CBC、生化学、バイタルサインのチェックを行い、安全性を確認する。異常値があれば、それが正常化するまでフォローする。また、アフェレーシス中はバイタルサインを定期的に監視し、記録を保存する。

アフェレーシス終了後に血小板の異常低下が無いことを確認する。なお、アフェレーシス直後の血小板が $80,000/\mu\text{L}$ よりも減少した場合は、PBSC 採取産物より自己多血小板血漿を作成してドナーに輸注することが望ましい。また、このような場合は、2 回目のアフェレーシスによる PBSC 採取の中止を考慮する。

アフェレーシス施行中に中等度、重度の有害事象が発生した場合は PBSC 採取を中止する。

3. PBSC 採取のためのアフェレーシス

血球分離装置を用いて PBSC を採取するためには採血および返血のための血管ルートを確認する必要がある。可能な限り太い静脈ラインの確保が有利であり、成人の場合両側前肘部の静脈を用いるのが望ましい。採血側の血流が不安定な場合は、マンシエットを利用して更に圧迫を加えると血流の安定化が得られる。ルート確保ができる血管がない場合は大腿静脈あるいは鎖骨下など深部静脈を確保する。鎖骨下など深部静脈の穿刺は合併症のリスクがあるため、十分な注意が必要であり、深部静脈穿刺に習熟した専任医師がいらない場合は避けるべきである。全身麻酔下の骨髓採取よりもアフェレーシスによる PBSC 採取がより適切と判断される場合は、小児特有の配慮が必要である。また、採血および返血ラインの確保に際しては、穿刺部位の消毒を十分に行い、細菌感染などを防止する。

PBSC 採取のための処理血液量は $150\text{--}250\text{mL/kg}$ あるいは循環血液量の 2－3 倍が一般的で、血流速度 50

－80mL/分で体外循環を行うと、アフエレーシスの所要時間は 4 時間前後である。アフエレーシスの上限は 300mL/kg とする。

4. アフエレーシスに関連すると考えられる有害事象（巻末の資料も参照のこと）

アフエレーシスに伴う副作用として全身倦怠感(30%前後)のほか、四肢のしびれ(抗凝固剤として用いる ACD 液によるクエン酸中毒)、めまい、吐き気、嘔吐など血管迷走神経反射(vaso-vagalreflex, VVR)や一過性の hypovolemia による症状がみられる。特に VVR は重篤な場合は高度の「徐脈(脈拍数 29/分以下)」が出現し、意識喪失、失禁がみられることがあり、さらに「心停止」に至る可能性もあることから、ECG モニターの準備が必須であり、硫酸アトロピン、エホチール、エフェドリンなどを直ちに静注するための準備が必要である。クエン酸中毒による低カルシウム血症はカルシウム液の持続注入(グルコン酸カルシウム 5－10mL/hr)によってほとんどの場合予防することができる。しかし、アフエレーシス中は常にクエン酸中毒の危険(10mL/hr のカルシウム液の持続注入でも発生しうる場合がある)がありうるので注意する。また、PBSC 動員からアフエレーシス終了までアスピリン製剤は使用しない。

5. 採取 PBSC の目標

同種末梢血幹細胞移植では、生着に必要な PBSC の移植細胞数は十分明らかにされていないが、移植後速やかな生着を得るためにはわが国では一般に $2 \times 10^6/\text{kg}$ (レシピエント体重)の CD34 陽性細胞数が必要とされている。しかし、CD34 陽性細胞が $1-2 \times 10^6/\text{kg}$ でも生着は可能であると考えられている。

大部分の健常人ドナーでは生着に十分な量の PBSC の動員・採取が可能である。しかし、一部の健常人ドナーでは、PBSC 動員の至適条件でも CD34 陽性細胞 $2 \times 10^6/\text{kg}$ 以上の PBSC が採取できない場合があり、日本造血細胞移植学会「同種末梢血幹細胞ドナーフォローアップ事業」の調査では CD34 陽性細胞 $2 \times 10^6/\text{kg}$ 以上の PBSC が採取できない例が 9.5%、 $1 \times 10^6/\text{kg}$ 以上の PBSC が採取できない例が 2.1%にみられた。現在のところこのような poor mobilization を予測する確実な方法はない。移植後の生着に十分な量の PBSC が採取できなかった場合、末梢血からの PBSC 追加採取、または血縁ドナーでは全身麻酔下の骨髓採取が必要になる可能性について、あらかじめ十分説明を行っておく。

VIII. ドナーの登録と安全性モニター

採取終了後、1 週間から1ヶ月程度を目処に、CBC、生化学、バイタルサインのチェックを行い、安全性を確認する。異常値があれば、それが正常化するまでフォローする。

血縁造血幹細胞ドナーフォローアップ事業は、2005 年 4 月より、血縁者ドナーの安全を担保しつつ、不可避免的に発生するかもしれないドナーの有害事象を骨髓・末梢血ドナー双方について前方視的に把握し、その回避策を検討することにより将来のドナーにおける一層の安全確保を目的に、一ドナーにつき、1)採取事前登録、2)急性期有害事象報告、3)同意を得られたドナーにおける毎年5年間のお見舞い手紙を、当面5年間の新規登録+5年間のフォローアップを目途に実行されている。またこの事業に登録することにより、適格者は血縁造血幹細胞ドナー(骨髓・末梢血)傷害保険に加入することが出来る。別に定められた調査実施要綱にしたがって、ドナーは採取前に必ず日本造

血細胞移植学会の血縁造血幹細胞ドナー登録センターに登録し、移植医および移植施設はドナーの G-CSF 投与後の長期フォローアップ調査を必ず実施する(資料-2)。

【附記】

I. アフェレーシスの作業基準について

各施設で作成される「アフェレーシスの作業基準(マニュアル)」には以下の項目を含むこと。

1. PBSC 採取のアフェレーシスにおける処理血液量は 300mL/kg (ドナー体重)を上限とする。
2. アフェレーシス中に高頻度に発生するクエン酸中毒の対策を具体的にマニュアルに記載しておく。血球分離装置の機種によって、ACD の投与速度のモニター状態が異なるので、それぞれの機種に対応した作業基準が必要である。また、クエン酸中毒の初発症状としてはしびれのみではなく、胸部違和感、寒気、吐き気もあり、さらに嘔吐や不整脈を見るドナーが存在すること、さらに、クエン酸の感受性は個人差が大きいので投与量を調節する必要があることも作業基準に含める。
3. クエン酸中毒や迷走神経反射による気分不良に由来する嘔気、嘔吐が発生した場合は、採血・返血スピードを落とし、適切な処置を行い、症状が改善しない場合は中止する。特に、採血開始後にはドナーの観察を十分に行って初期症状の把握に努め、早めに対処することを心がけることが肝腎である。なお、一旦中止した採取を再開する場合は、責任医師と相談して再開を決定する。また、嘔気、嘔吐に対処するため、嘔吐用ガーグルベースン、ポリ袋、タオル、ティッシュペーパーなどを準備しておくとともに、十分量のグルコン酸カルシウムおよび持続点滴用マイクロインフュージョンポンプや昇圧剤(ドパミン、エホチール、エフェドリン、硫酸アトロピン)なども常備しておくこと。



日本 骨 髄 バ ン ク

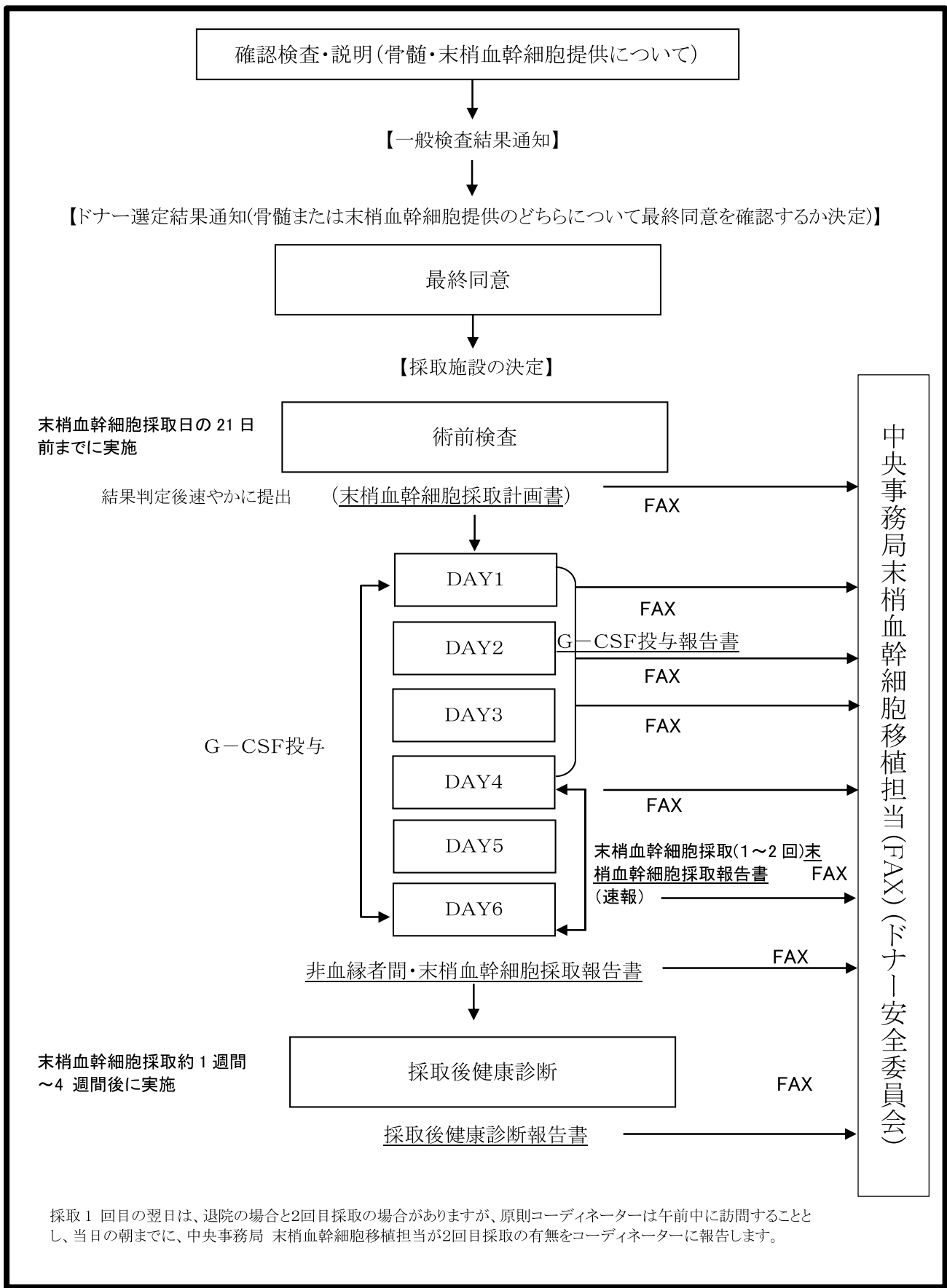
非血縁者間末梢血幹細胞採取 マニュアル 暫 定 版

(2010.10.1)

抜粋

財団法人 骨髓移植推進財団

末梢血幹細胞採取までの行程



2.末梢血幹細胞ドナー適格性判定について

ドナーの安全性を確保するため、末梢血幹細胞ドナーの適格性を慎重に判定する。詳細については別冊「ドナー適格性判定基準」を遵守すること。

2.1 適応基準

2.1.1 採取対象年齢

骨髓採取に準じ 20-55 歳とする。

2.1.2 ドナーの適格性チェック

採取責任医師がドナーに対して十分な問診と診察（血圧、脈拍、体温呼吸数などのバイタルサインチェック）を行うこと。

同種骨髓移植ドナーに実施されている採取前検査（ECG、胸部 X 線写真、全血球計算、生化学、感染症検査など）を実施し、ドナーの適格性を慎重に判断すること。

2.1.3 複数医師によるドナーの適格性チェック

全身麻酔下の骨髓採取においては、麻酔科医など複数の医師が介在しているが、末梢血幹細胞採取においても同様にドナーの適格性の判断に際しては、**適格性の判断ができる各専門領域の医師（採取担当医師以外（採取責任医師）、もしくは輸血部医師など施設で選任した医師）など複数の医師の意見を求める。**

2.1.4 地区代表協力医師のドナー適格性チェック

地区代表協力医師は、採取施設において判断したドナー適格性について、最終確認を行うこと。

3.健康診断

3.1 術前健診

3.1.1 術前健診は、末梢血幹細胞採取施設において実施する。

3.1.2 術前健診において末梢血幹細胞ドナー適格性判定基準を満たさない項目は再検査とする。再検査が必要となる場合も想定し、術前健診は末梢血幹細胞採取日の 21 日前までに実施する。

3.1.3 術前健診確認事項

- ・問診
- ・血液検査
 - 血算 WBC・RBC・Hb・Hct・Plt・白血球分画
 - 生化学 TP・ALB・T-Bil・ALP・GOT・GPT・ γ -GTP・CPK・BUN・CRE・LDH・T-Cho・CRP・UA
 - 電解質 Na・K・Cl・Ca
 - 感染症 梅毒(STS・TPHA)・HBs 抗原・HBc 抗体・HBs 抗体・HCV 抗体・HTLV-I HIV1/2
 - 凝固系 PT・APTT
- ・胸部 X-P 検査
- ・腹部エコーもしくは触診及び Traube 三角の打診
- ・心電図検査
- ・検尿
- ・血圧、脈拍、身長、体重
- ・上肢血管の確認
- ・その他理学的所見
- ・必要時、妊娠検査(妊娠が否定できない場合、ドナーの同意の上実施)

3.1.4 術前健診後(結果判明後)、採取施設は「末梢血幹細胞採取計画書」を中央事務局 末梢血幹細胞移植担当へ FAX すること。中央事務局 末梢血幹細胞移植担当は、地区代表協力医師が「適格」と判定した後、採取施設に対してその結果を FAX にて報告する。採取施設は、中央事務局 末梢血幹細胞移植担当へ適格判定報告後 G-CSF 投与を開始する。

4.末梢血幹細胞の動員

4.1 末梢血幹細胞動員の概要

4.1.1 G-CSF 投与実施施設

末梢血幹細胞動員のための G-CSF 投与は、非血縁者間末梢血幹細胞採取施設において実施する。

4.1.2 G-CSF 投与実施体制

導入時においては、G-CSF 投与を入院とするか通院とするかは、ドナーの都合や施設の事情等を考慮し、個々の状況に応じて採取施設が判断する。

※将来的には G-CSF 外来投与を原則とすることについて、実績を見ながら検討していく。

4.1.3 G-CSF 投与量

G-CSF の投与は 1 日 1 回もしくは 2 回とし、薬剤の添付文書に記載され保険診療で認められている投与量とする。

「グラン」(販売名、以下同) $400 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$ (1 日・体表面積当りの量) 皮下

「ノイトロジン」(販売名、以下同) $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (1 日・体重当りの量) 皮下

4.1.4 G-CSF 投与時間

投与 1～3 日目までは細胞の分化の段階であるため、投与する時間帯は特に問題とはならない。

ただし、4 日目以降は、採取時刻にあわせて投与時間帯を決定すること。

4.1.5 G-CSF 外来投与期間中のドナーのフォローアップ

4.1.5.1

外来投与の場合、G-CSF 投与 1 日目においては、注射後皮膚反応等の異常がないか観察する。

4.1.5.2

異常があった場合は必要に応じて適切に対処し、異常が消失するまで観察を続けること。

4.1.5.3

ドナーの帰宅後に、コーディネーターがチェックシートを用いて電話にて健康状態を確認する。

4.1.5.4

ドナーに副作用が生じた場合などに、ドナーや家族からの連絡に採取施設は確実に対応できる体制を作ること。

4.1.6 G-CSF 投与後「G-CSF 投与報告書」を作成し、速やかに中央事務局 末梢血幹細胞移植担当へ FAX すること。

4.1.7 G-CSF の減量・中止について

G-CSF は皮下注で投与されるが、投与中は G-CSF 投与に伴う健康被害に留意し、発生時には適切に対処し、重篤な場合には中止する。G-CSF 投与開始後は G-CSF 注射前に全血球計算を行い、白血球 $50,000/\mu\text{L}$ 以上、血小板 $10 \text{ 万}/\mu\text{L}$ 以下になった場合は投与量を減量する。白血球数が $75,000/\mu\text{L}$ 、以上、血小板 $5 \text{ 万}/\mu\text{L}$ 以下に達した場合は投与を一旦中止する(以下参照)。

また、投与中、ドナーに副作用が発生した場合は、当財団に報告すると共に、状態に応じて中止もしくは減量が必要と判断した場合は、当財団と協議し決定すること。(参考資料 2)。

G-CSF による脾腫大が疑われる場合には、腹部エコーあるいは診察で脾腫のチェックを行う。

症状	程度	副作用判定基準 (Grade)	G-CSF 投与量調整
白血球	$50,000/\mu\text{L}$ 以上	N/A	50% 減量
	$75,000/\mu\text{L}$ 以上	N/A	投与中止
血小板	$< 100,000/\mu\text{L}$	N/A	50% 減量
	$< 50,000/\mu\text{L}$	N/A	投与中止

(参考資料 2) G-CSF の減量・中止基準について

症状	程度	副作用判定基準 (Grade)	G-CSF 投与量調整
骨痛	自制不能	4	50% 減量 24 時間後改善されなければ、投与中止
頭痛	自制不能	4	50% 減量 24 時間後改善されなければ、投与中止
吐き気	経口による飲食物摂取不可能	≥ 3	投与中止
嘔吐	24 時間で 2-5 回嘔吐	2	50% 減量
	24 時間で 6 回以上嘔吐	≥ 3	投与中止
身体反応	痛みもしくは腫れを伴う炎症・静脈炎		50% 減量 24 時間後改善されなければ、投与中止

(「Peripheral Blood Stem Cell for Allogeneic Transplantation with Unrelated Donors A protocol of NMDP」より改編して引用)

4.1.8 G-CSF 投与中止によるアフエーシス実施について

G-CSF 投与後、投与中止となった場合、ドナーの健康状態を確認後、予定された採取日にアフエーシスを実施すること。なお、G-CSF 投与再開に関しては、採取施設の判断とする。

4.1.9 G-CSF 投与期間中の患者理由終了について

G-CSF 投与開始後、患者理由により終了となった場合、アフエーシスは実施しないこと。

また、アフエーシス終了後に患者理由終了となった場合は、採取した造血幹細胞は廃棄すること。

患者終了タイミング	アフエーシス実施有無	採取した造血幹細胞の扱い
G-CSF 投与中	無 ※但し、1週間～4 週間後に健康診断を実施し健康状態を確認すること。	
アフエーシス実施後		廃棄

4.1.10 G-CSF 投与期間中の患者理由終了後の対応について

G-CSF 投与開始後、患者理由により終了となった場合、ドナーの健康状態確認のため 1 週間～4 週間後に健康診断を実施すること。

5.末梢血幹細胞採取日の決定

5.1 末梢血幹細胞採取日の決定

5.1.1 採取施設によって G-CSF 投与や末梢血幹細胞採取を実施できる曜日等、事情が異なるため、採取 1 回目は G-CSF 投与 4 日目または 5 日目とし、どちらとするかは採取施設判断とする。

採取施設または外注にて CD34 陽性細胞をカウントし、翌日 2 回目採取の有無を決定する。

5.1.2 アフェレーシス開始は G-CSF 投与後 3 時間以降が望ましい。

(参考資料4)末梢血幹細胞採取スケジュール例

スケジュール	木	金	土	日	月	火	水	木	金
I	G-CSF 投与 1日目	G-CSF 投与 2日目	G-CSF 投与 3日目	投与 4日目 採取①	投与 5日目 採取②				
II	G-CSF 投与 1日目	G-CSF 投与 2日目	G-CSF 投与 3日目	G-CSF 投与 4日目	投与 5日目 採取①	投与 6日目 採取②			
III		G-CSF 投与 1日目	G-CSF 投与 2日目	G-CSF 投与 3日目	投与 4日目 採取①	投与 5日目 採取②			
IV		G-CSF 投与 1日目	G-CSF 投与 2日目	G-CSF 投与 3日目	G-CSF 投与 4日目	投与 5日目 採取①	投与 6日目 採取②		
V			G-CSF 投与 1日目	G-CSF 投与 2日目	G-CSF 投与 3日目	投与 4日目 採取①	投与 5日目 採取②		
VI			G-CSF 投与 1日目	G-CSF 投与 2日目	G-CSF 投与 3日目	G-CSF 投与 4日目	投与 5日目 採取①	投与 6日目 採取②	
VII				G-CSF 投与 1日目	G-CSF 投与 2日目	G-CSF 投与 3日目	投与 4日目 採取①	投与 5日目 採取②	
VIII				G-CSF 投与 1日目	G-CSF 投与 2日目	G-CSF 投与 3日目	G-CSF 投与 4日目	投与 5日目 採取①	投与 6日目 採取②

6.末梢血幹細胞の採取

6.1 末梢血幹細胞採取のためのアフェレーシスに関する認識

末梢血幹細胞ドナーは、末梢血幹細胞動員のために高用量の G-CSF が 4～6 日間投与され、採取のためのアフェレーシスでは、赤十字血液センターで実施されている血小板アフェレーシスに比べて、数倍の処理血液量を要する体外循環が必要とされる。

したがって、末梢血幹細胞採取には成分献血以上のリスクがあることを認識する必要がある。

6.2 アフェレーシスに関する注意

6.2.1 アフェレーシス当日、体調について問診するとともにバイタルサインをチェックし、採取困難な体調不良が無いことを確認して採取を開始する。

6.2.2 G-CSF 投与 6 日目における脾臓破裂の危険性があることから、G-CSF 6 日目に採取を行うときは触診及び Traube 三角の打診で確認、もしくは必要に応じてエコーを実施すること。

6.2.3. アフェレーシス前、終了直後、退院時、約 1 週間～4 週間後には全血球計算、生化学、バイタルサインのチェックを行い、安全性を確認する。異常値があれば、それが正常化するまでフォローする。
また、アフェレーシス中はバイタルサインを定期的に監視し、記録を保存する。

6.2.4 アフェレーシス終了後に血小板の異常低下が無いことを確認する。なお、アフェレーシス直後の血小板が $80,000/\mu\text{L}$ よりも減少した場合は、末梢血幹細胞採取産物より自己多血小板血漿を作成してドナーに輸注することが望ましい。(7.3.5 参照)
また、このような場合は、2 回目のアフェレーシスによる末梢血幹細胞採取の中止も考慮する。

6.2.5 アフェレーシス施行中に健康被害が発生した場合は、採取責任医師はドナーの身体状況等を考慮した上で、末梢血幹細胞採取の中止の可能性がある場合は、当財団に報告すると共に、採取可否に関して当財団と協議し決定すること。

6.2.6 アフェレーシスによる末梢血幹細胞採取中は、医師が常時監視する。
血管迷走神経反射、クエン酸中毒、不整脈、心虚血症状、穿刺部位の出血や血腫などの合併症に細心の注意を払うこと。

6.3 末梢血幹細胞採取ルート

6.3.1 血球分離装置を用いて末梢血幹細胞を採取するためには採血および返血のための血管ルートを確認する必要がある。可能な限り太い静脈ラインの確保が有利であり、成人の場合両側前肘部の静脈を用いるのが望ましい。採血側の血流が不安定な場合は、マンシェットを利用して更に圧迫を加えると血流の安定化が得られる。

6.3.2 採血および返血ラインの確保に際しては、ポビドンヨードで穿刺部位の消毒を十分に行い、細菌感染などを防止すること。

6.3.3 ドナー適格性判定基準で上肢の血管から採取可能と判断されていたドナーが、採取当日に血管確保できなかった場合には大腿静脈へのアクセスのみ可能とする（このことについて、あらかじめドナーの了承を得ておく）。

ただし、中心静脈のルート確保に習熟した医師が実施すること。鎖骨下など深部静脈へのカテーテル挿入は合併症のリスクがあるため禁止とする。（9.中心静脈について参照）

6.4 末梢血幹細胞採取のための処理血液量

血縁者間では、提供者からの末梢血幹細胞採取量はドナー体重あたり 150-250mL/Kg で実施される。非血縁者間における処理血液量もこれに準じ、目標処理血液量は、ドナー体重あたり 200mL/kg とし、アフェレーシスの処理血液量の上限は 250ml/kg とする。

目標処理血液量 (liters)	血流速度	処理血液上限量 (liters)
1 回あたりの ドナー体重(kg)×200mL/kg	50-80mL/分	1 回あたり ドナー体重(kg)×250mL/kg ※いかなる場合も上限量を超えないこと。

6.4.1 抗凝固剤は、原則 ACD-A 液を単体で使用する。

6.5 CD34 陽性細胞の目標量

生着に必要な末梢血幹細胞の移植細胞数は十分明らかにされていないが、移植後速やかな生着を得るためにはわが国では一般に 2×10^6 /kg（レシピエント体重）の CD34 陽性細胞数が必要とされている。しかし、CD34 陽性細胞が 1×10^6 /kg 以下の場合において生着しなかったというデータはなかった。

よって、CD34 陽性細胞目標量は、患者体重あたり、 2×10^6 /kg とし、これに満たないときは 2 回目採取を実施する。ただし、採取は 2 回までとする。

6.6 末梢血幹細胞 2 回目採取の有無

採取施設または外注(当日夕刻までに結果が判明する場合)にて CD34 陽性細胞をカウントし、翌日の 2 回目採取の有無を決定する。「末梢血幹細胞採取報告書(速報)」を作成し、速やかに中央事務局 末梢血幹細胞移植担当へ FAX する。

6.6.1 1 日目アフエレーシス実施後、患者体重あたり $2 \times 10^6/\text{kg}$ に満たないときは、2 回目採取を行うこと。

6.6.2 患者体重あたり $2 \times 10^6/\text{kg}$ に満たない場合でも、採取した末梢血幹細胞は、細胞数が少なくとも移植すること。また、細胞数等はドナーに伝えない。

6.7 末梢血幹細胞の骨髓採取への変更

末梢血幹細胞の採取ができない場合の骨髓採取への切り替えは不可。

6.8 末梢血幹細胞採取後の DLI/回数

6.8.1 骨髓バンクにおいて 1 人のドナーの末梢血幹細胞提供回数は、導入当初は G-CSF 投与の長期的な安全性の観点から血縁・非血縁を含めて 1 回のみとし、骨髓・末梢血幹細胞の提供全体については合計 2 回までとする。

なお、血縁者間で骨髓または末梢血幹細胞採取の必要性があった場合においては、この限りではない。

過去の提供回数によるコーディネートの可否

		骨髓の提供回数 (血縁 + 非血縁)		
		0 回	1 回	2 回
末梢血幹細胞	0 回	PB or BMT	PB or BMT	×
提供回数	1 回	BM	×	×
(血縁 + 非血縁)	2 回	×	×	×

6.8.2 末梢血幹細胞提供後は 1 年間提供不可とする。

6.8.3 末梢血幹細胞提供後の DLI は提供後の日数に関係なく各提供 1 回のみ可能とする。

6.9 採取した幹細胞数が過剰な場合等の対応について

末梢血幹細胞が必要量以上に採取できた場合は、一部を凍結保存し、DLI 等に使用することを可能とする。

2 日間採取した場合は、1 日目採取分は凍結せず、2 日目採取分の一部を凍結すること。

移植施設は、凍結する場合は財団に報告する。また、凍結した幹細胞の使用の有無を財団へ報告すること。(第 11 項 凍結について 参照)

なお、使用しない場合は廃棄すること。

また、細胞を研究目的で使用することや細胞を培養・増幅することは認めない。

6.10 1 日目に採取された末梢血幹細胞を 1 日保存する場合の条件について

6.10.1 細胞濃度は $2 \times 10^8/\text{ml}$ 以下が望ましい。

それ以上の場合は、自己血漿あるいは生理食塩水で希釈すること。

6.10.2 ACD 比率が 1/13 以下で採取した場合や希釈した場合は、最終産物中で最低 1/13 となるように ACD を追加すること。

6.10.3 2～8℃で静置保存すること。

7.末梢血幹細胞採取に伴う副作用

7.1 G-CSF 投与に伴う短期的健康被害

7.1.1 軽度な健康被害

腰痛、胸痛、骨痛、背部痛、関節痛、筋肉痛、肝機能異常(GOT, GPT, LDH, ALP 上昇)、発疹、紅斑、悪心、嘔吐、発熱、頭痛、倦怠感、動悸、尿酸値上昇、血清クレアチニン値上昇、CRP 値上昇などが知られている。いずれも G-CSF 投与終了後 2-3 日以内に消失するが、必要に応じて鎮痛剤(アフェレーシス中の出血傾向を避けるため、アセトアミノフェンなどの鎮痛剤が望ましい)などを投与する。

また、末梢血幹細胞動員からアフェレーシス終了までアスピリン製剤は使用しない。また、鎮痛剤の予防投与はしないこと。

7.1.2 重大な健康被害

G-CSF に対するアレルギーによると思われるショック、間質性肺炎、血圧低下などが報告されている。

7.1.3 重篤な健康被害

G-CSF 投与を中止しなければならないような重篤な健康被害はまれとされるが、これまで心筋梗塞、脳血管障害、脾破裂などの報告例の他、死亡例も報告されている。また、G-CSF 投与に伴って急性虹彩炎、痛風性関節炎など炎症の増悪も指摘されている。

7.2 G-CSF 投与後、長期的な副作用

わが国では G-CSF 投与を受けた血縁ドナーにおける急性骨髄性白血病の発症が報告された。日本造血細胞移植学会は「健康被害特別調査委員会」を設置し、情報開示のあり方、事務局の危機管理体制、善後策について検討が行われた。その結果、今回の事例における G-CSF と白血病発症の因果関係については、「健常者に短期間 G-CSF を投与しただけで白血病が発症する可能性は医学的には考えられないが、完全に否定することはできない」という見解が示された。その後のわが国の調査では、骨髄ドナーでの血液腫瘍発生は 2/5921 例(白血病 2 例)、末梢血幹細胞ドナーでは 1/3262 例(白血病 1 例)で有意差はないものと考えられる(厚生労働科学研究「血縁者同種末梢血幹細胞ドナーの安全性に関わる 5 年間の調査」)。欧州造血細胞移植グループ(EBMT)の調査では血液腫瘍の発生は骨髄ドナーで 0.40/10000 人(年間)、末梢血幹細胞ドナーで 1.20/10000 人(年間)であり、一般集団と比較し同等の発生率と考えられる。米国の NMDP における非血縁末梢血幹細胞ドナー 2408 例の調査でも血液腫瘍では慢性リンパ性白血病が 1 例、非血液がんが 25 例発生しており、G-CSF 投与で骨髄性白血病のリスクが増大する懸念は否定的である。以上の結果をまとめると、5 年程度の観察では G-CSF 使用ががん発生を助長する可能性は否定的と考えられる。

7.3 アフェレーシスに伴う副作用

7.3.1 全身倦怠感(30%前後)のほか、四肢のしびれ(抗凝固剤として用いる ACD 液によるクエン酸中毒)、めまい、吐き気、嘔吐など血管迷走神経反射(vaso-vagal reflex, VVR)や一過性の hypovolemia による症状がみられる。

7.3.2 VVR は重篤な場合は高度の「徐脈(脈拍数 29/分以下)」※VVR のⅡ、Ⅲ度の高度の徐脈(<40/分以下)が出現し、意識喪失、失禁がみられることがあり、さらに「心停止」に至る可能性もあることから、ECG モニターの準備が必須であり、硫酸アトロピン、エホチール、エフェドリンなどを直ちに静注するための準備が必要である。

7.3.3 クエン酸中毒の初発症状としてはしびれのみではなく、胸部違和感、寒気、吐き気もあり、さらに嘔吐や不整脈をみるドナーが存在する。また、クエン酸の感受性は個人差が大きいので投与量を調節する必要がある。クエン酸中毒による低カルシウム血症は、カルシウム液の持続注入(グルコン酸カルシウム 5-10mL/hr)によってほとんどの場合予防することができる。しかし、アフェレーシス中は常にクエン酸中毒の危険(10mL/hr のカルシウム液の持続注入でも発生しうる場合がある)がありうるので注意する。

7.3.4 クエン酸中毒や VVR による気分不良に由来する嘔気、嘔吐が発生した場合は、採血・返血スピードを落とし、適切な処置を行い、症状が改善しない場合は中止する。特に、採血開始後にはドナーの観察を十分に行って初期症状の把握に努め、早めに対処することを心がけることが肝心である。なお、一旦中止した採取を再開する場合は、責任医師と相談して再開を決定する。また、嘔気、嘔吐に対処するため、嘔吐用ガーグルベースン、ポリ袋、タオル、ティッシュペーパーなどを準備しておくとともに、十分量のグルコン酸カルシウムおよび持続点滴用マイクロインフュージョンポンプや昇圧剤(ドパミン、エホチール、エフェドリン、硫酸アトロピン)なども常備しておくこと。

7.3.5 アフェレーシスでは血小板も大量に採取されるので、アフェレーシス終了後に血小板の異常低下が無いことを確認する。なお、アフェレーシス直後の血小板が $80,000/\mu\text{L}$ よりも減少した場合は、自己多血小板血漿を作成してドナーに輸注することが望ましい。また、このような場合は、2 回目のアフェレーシスによる PBSC 採取の中止を考慮する。

参考: 自己多血小板血漿分離方法

- ①約 100mL の PBSC がバッグに採取される。
- ②分離用バッグを無菌接合機で PBSC バッグと接続する。
- ③遠心条件: 遠心(軽遠心Ⅲ) 4~5 分(約 300~1100G) 20℃~24℃
- ④多血小板血漿(PRP)とペレット(血小板以外の細胞成分; 幹細胞分画/若干の赤血球)に分離。
- ⑤バッグを分離スタンドにかけ上清(PRP)を分離バッグに移す。

以上の操作は非開放系で行うこと。

- ⑥PBSC のバッグを良くもみ血漿中に細胞を浮遊させ経静脈投与する。 _

8.ドナーフォローアップ

8.1 急性期フォローアップ

8.1.1 採取当日コーディネーターがドナーにアンケートを実施する。

8.1.2 採取終了後および術後健診において全血球計算、生化学・電解質検査を必須とする。
異常値があれば、それが正常化するまでフォローする。

8.1.3 コーディネーターによる電話フォローアップは週1回、採取後4 週間目まで実施(問題があれば継続)する。

8.1.4 術後健診は採取1 週間後～4 週間後に採取施設において実施する。急性期においては、白血球の減少、血小板の増加が報告されている。

8.2 中長期フォローアップ

8.2.1 3 ヶ月、1 年目、2 年目、3 年目、4 年目、5 年目に財団事務局よりアンケート調査を実施する。

Day	アンケート	全血球計算 (CBC)	生化学	バイタルサイン
採取終了後	○	○	○	○
採取 1 週間後 ～ 1 ヶ月後	○ (コーディネーターによる電話フォロー)	○	○	○
採取 3 ヶ月後	○			
採取 1 年後	○			
採取 2 年後	○			
採取 3 年後	○			
採取 4 年後	○			
採取 5 年後	○			

9.中心静脈について

9.1 ガイドライン

上肢である程度太い血管を確保できないドナーは末梢血幹細胞ドナーとして不適格とするが、適格と判断されていたドナーが、採取当日に血管確保できなかった場合には大腿静脈へのアクセスのみ可能とする。

9.1.1 中心静脈のルート確保に習熟した医師が実施すること。

9.1.2 大腿静脈アクセスを実施した場合は、当日退院は認めない。

9.1.3 採取終了後は、後出血、血栓症等に注意すること。

9.1.4 透析用留置針を使用する場合、各日採取終了後抜去し、ヘパリンロックは行わない。

9.1.5 透析用カテーテル(ダブルルーメン)を使用する場合、全ての採取終了決定するまでヘパリンロックする。

9.1.6 採取終了後、抜去時には圧迫止血を行い、止血を確認する。

参考までにガイドラインの一例として「名古屋大学医学部附属病院 中心静脈カテーテル挿入マニュアル」(改訂第2版)を添付する。(別冊)

ホームページアドレス:<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/anesth/cv/CVmanual.pdf>

この使用説明書をよく読んでからご使用下さい。

324042-3

細胞凍害保護液 (cellular cryoprotectant)

研究用試薬

CP-1

— 造血幹細胞の凍害保護液 —

造血幹細胞の凍結保存時には、凍害防止剤としてジメチルスルホキシド (DMSO) が一般的に使用されています。

DMSO単独で凍結保存する場合、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) で保存を行う方法が一般的でしたが、1980年代前半より、骨髓の造血幹細胞に対して、DMSOとヒドロキシエチルデンプン (HES) を用いることによりプログラムフリーザーを使用しない簡易細胞凍結法の研究がおこなわれるようになりました^{1,2)}。

本邦においては、DMSOとHESを用いた簡易細胞凍結法を末梢血幹細胞に適用した応用研究が進み、簡易細胞凍結法におけるHESとDMSOの濃度検討から至適濃度がHES 6%、DMSO 5%と決定されました。この簡易細胞凍結法により、段階凍結法を行わずに -80°C のフリーザーを用い、短期間 (6ヶ月~1年半) での安定した凍結保存が可能となりました³⁻⁹⁾。

本製品「CP-1」は、以上の知見をもとに、造血幹細胞の細胞凍害保護液として製品化したものです。

【注意事項】

1. 本品は研究用試薬であり、医療用としては認可されておられません。
2. 使用に際しては、必ず本使用説明書をお読み下さい。
3. 本品を誤って飲み込んだりしないように十分注意して下さい。万一、飲み込んでしまった場合、すぐに吐き出して下さい。眼、皮膚等に付いた場合、すぐに洗浄して下さい。異常が見られた場合、すぐに医師の診察を受けて下さい。

【組成】

組成 (1 ボトルあたり)	100mL用	50mL用
HES (ヒドロキシエチルデンプン) ¹⁻¹¹⁾	12g	6g
DMSO (ジメチルスルホキシド) ¹⁻¹¹⁾	10mL	5mL
+ 生理食塩水 ³⁾		
Total	68mL	34mL

【使用目的】

造血幹細胞の凍害保護

【操作上の注意】

1. 使用前に濁りや浮遊物がないことを目視で確認してから使用して下さい。
2. すべての操作は無菌的に行ってください。
3. ヒト血清アルブミン (HSA) 添加後、速やかに使用して下さい。
4. CP-1とHSAの混和時および、HSA加CP-1と細胞懸濁液との混和時に発熱を伴う場合があります。これらの混和の際には必ず、氷浴中で行ってください。

【用法・用量 (操作方法)】

1. HSA加CP-1の調製

本品のバイアルのゴム栓を消毒用アルコールなどで殺菌し、シリンジ等でHSAを少量ずつ加え、おだやかに混和します。発熱を伴う場合があります。氷浴中で実施して下さい。

- (1) 100mL用
25%ヒト血清アルブミン (HSA)* 32mLを加え、100mLとします。
- (2) 50mL用
25%ヒト血清アルブミン (HSA)* 16mLを加え、50mLとします。

※25%ヒト血清アルブミンは、20%ヒト血清アルブミンもしくは自己血漿 (凍結する細胞と同一由来の血漿) で代用することが

できます。このとき、いずれの場合であっても添加量は同量として下さい。

2. 細胞懸濁液の調製

すべての操作は無菌的に行ってください。必要に応じて、分離した細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、以下の①、②のいずれかの方法により細胞懸濁液を調製して下さい^{7, 11)}。また、凝固防止剤 (ヘパリン、ACD液など) を適宜加えて下さい。

- ① 細胞懸濁液に生理食塩水を用いる場合
分離した細胞に生理食塩水を加え、細胞密度 2×10^6 個/mL程度に調整します。
- ② 細胞懸濁液にRPMI 1640培地を用いる場合
分離した細胞にRPMI 1640培地を加え、細胞密度 2×10^6 個/mL程度に調整します。

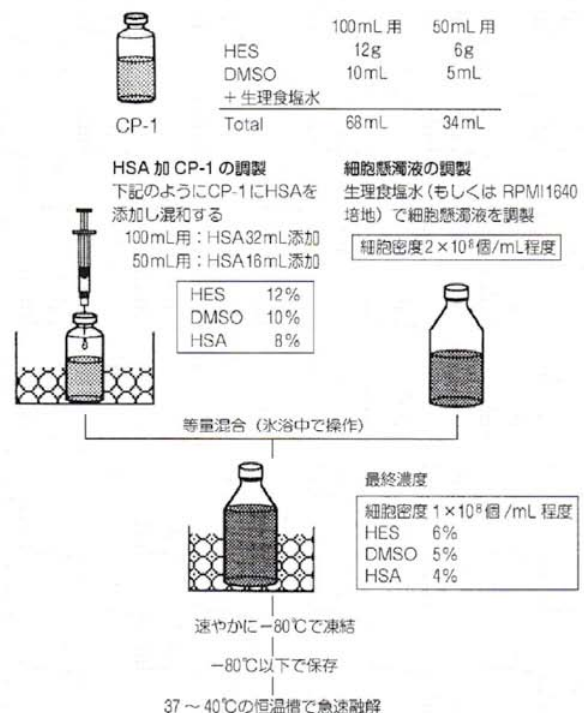
3. 凍結保存操作

すべての操作は無菌的に行ってください。

- 1) 細胞懸濁液に、等量のHSA加CP-1を少量ずつ加え、おだやかに混和します。本操作は氷浴中で行ってください。
(凍結バッグを利用する場合、シリンジでHSA加CP-1をバッグラインから少量ずつバッグ内の細胞懸濁液に注入しながら、おだやかに等量混和します。)
- 2) 速やかに凍結保存容器に注し、 -80°C フリーザーで凍結して下さい。冷却速度は $-2 \sim -3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 程度が目安です。
- 3) 凍結後、そのまま -80°C 以下のフリーザーで保存して下さい (-80°C フリーザーで凍結後、液体窒素中で保存すると、より安定しているとの報告⁸⁾があります)。

4. 解凍操作

細胞使用時は $37 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の恒温槽で急速融解して使用して下さい (2~3分程度で融凍を終了するのが目安となります)。

【フローチャート】⁹⁻¹¹⁾

【取り扱い上または使用上の注意】

1. 取り扱い上の注意

本品中の成分は人体に対して以下のような毒性を示すことがあります。

HESは、生体内に入った時の組織沈着性が指摘されています。腎・肝機能への影響、皮膚のかゆみ、アレルギー反応などが起こることがあると報告されています（また、一部の報告では、腎障害を引き起こす可能性があることも指摘されています）^{12, 13)}。DMSOは眼、皮膚を刺激し、高濃度の場合、意識低下を引き起こすことがあり、吸入すると頭痛、吐き気、経口摂取すると吐き気、嘔吐、嗜眠を引き起こし、眼に入ると発赤、かすみ眼を起こします¹⁴⁾。

DMSO急性毒性¹⁴⁾

動物種	経路	致死量	中毒量等
ヒト	経皮	TDL ₀	1,800 mg/kg
ラット	経口	LD ₅₀	14,500 mg/kg
ラット	経口	LD ₅₀	17,400 mg/kg
マウス	経口	LD ₅₀	7,920 mg/kg
マウス	経口	TDL ₀	10.91 mL/kg
モルモット	経口	LDL ₀	> 11,000 mg/kg
イヌ	経口	LD ₅₀	> 10,000 mg/kg
ラット	吸入	LCL ₀	> 1,400 mg/m ³ (4hr)
ラット	経皮	LD ₅₀	40,000 mg/kg
マウス	経皮	LD ₅₀	50,000 mg/kg

2. 使用上の注意

- (1) 本品の無菌保証は開封前までです。開封後はすみやかに使用して下さい。
- (2) 貯蔵方法を厳守して下さい。
- (3) 容器の破損が認められたもの、または容器内に異物が認められた場合は使用しないで下さい。
- (4) 本品は低温で保存すると成分が析出することがあります。
- (5) 使用後の残余物は、感染性廃棄物として処理した後に廃棄してください。廃棄方法は自治体により異なるため、各自治体の指示に従って廃棄して下さい。

【貯蔵方法・有効期間】

- (1) 貯蔵方法 室温保存
- (2) 有効期間 6ヶ月

【包装】

統一商品コード	品 名	包 装
551-27200-0	細胞凍害保護液 CP-1	100mL用×6
551-27202-4		50mL用×6

【参考文献】

- 1) Stiff PJ. et al. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. Cryobiology. 1983, vol.20, No.1, p. 17-24.
- 2) Stiff PJ. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. Blood. 1987, vol.70, No.4, p. 974-978.
- 3) 牧野茂義, 他. 骨髓および末梢血幹細胞の簡便凍結保存法. 医学のあゆみ. 1989, vol.151, No.1, p. 65-66.
- 4) Makino S. et al. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing. Bone Marrow Transplantation. 1991, vol.8, No.4, p. 239-244.
- 5) Takaue Y. et al. Comparative analysis of engraftment after cryopreservation of peripheral blood stem cell autografts by controlled-versus uncontrolled-rate methods. Bone Marrow Transplantation. 1994, vol.13, No.6, p. 801-804.

- 6) 角南一貴, 原田実根. CP-1による幹細胞保存. 低温医学. 1998, 24巻, 4号, p. 171-174.
- 7) 平松靖史, 他. 末梢血幹細胞採取・保存の効率化の検討. 日本輸血学会雑誌. 2000, 46巻, 1号, p. 1-6.
- 8) 牧野茂義. 末梢血幹細胞の保存方法. 医学のあゆみ. 1996, vol.176, No.9, p. 579-582.
- 9) 岸野光司, 他. アフェレーシス幹細胞の簡易凍結保存法における造血幹細胞機能の保持に関する検討. 自治医科大学臨床検査技師年報. 1992, 16号, p. 123-125.
- 10) Katayama Y. et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplantation. 1997, vol.19, No.3, p. 283-287.
- 11) 牧野茂義, 他. 末梢血幹細胞移植における凍害防止剤CP-1の有効性と安全性に関する検討. 共済医報. 2012, 61巻, 2号, p. 223-226.
- 12) 高折益彦. 代用血漿剤HES. 克誠堂出版. 2010, p. 65-116.
- 13) Perner A. et al. Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis. The New England Journal of Medicine. 2012, vol.367, No.2, p. 124-134.
- 14) 環境省・環境リスク評価室. 化学物質の環境リスク評価 第7巻 第1編Ⅱ (Ⅱ) [12] ジメチルスルホキシド. 環境省. 2009, p. 7-8.

【謝辞】

本品の製品化にあたり、九州大学の牧野茂義先生、原田実根先生、および自治医科大学の岸野光司先生、室井一男先生を始めとする先生方には、多くのご協力をいただきました。ここに深謝いたします。

【問い合わせ先】

極東製薬工業株式会社 営業学術部
〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町7-8
電話 03(5645)5664
FAX 03(5645)5703

造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト（初版）
Textbook of Cell Processing for Hematopoietic Stem Cell
Transplantation
2015 年 3 月 26 日初版発行

発行者 一般社団法人 日本輸血・細胞治療学会
協 賛 一般社団法人 日本造血細胞移植学会
協 力 公益財団法人 日本骨髄バンク
印 刷 三美印刷株式会社
