この使用説明書をよく読んでからご使用下さい。

＊2020年10月改訂（第2版）
351159-2　　2019年 1月作成（第1版）

細胞凍害保護液（cellular cryoprotectant）

CP−1® High Grade

研究用試薬

− 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℃）で保存を行う方法が一般的でしたが、1980年代前半より、骨髄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℃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[3-8]。

【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りません。
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）	100 mL 用	50 mL 用
HES（ヒドロキシエチルデンプン）[1-11]	12 g	6 g
DMSO（ジメチルスルホキシド）[1-11]	10 mL	5 mL
＋ 生理食塩水[9]		
Total	68 mL	34 mL

【使用目的】

造血幹細胞、その他細胞の凍害保護

【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下さい。
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® High Grade と HSA の混和時および、HSA 加 CP-1® High Grade 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、氷浴中で行って下さい。

【用法・用量（造血幹細胞の凍害保護方法）】

その他細胞の操作方法につきましては、 本品の技術情報ページ（下記 URL）に公開されておりますプロトコルをご参照下さい。
https://ssl.kyokutoseiyaku.co.jp/cellculture/cellculture_product_list/

1. HSA 加 CP-1® High Grade 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）100 mL 用
　25%ヒト血清アルブミン（HSA）※ 32 mL を加え、100 mL とします。

（2）50 mL 用
　25%ヒト血清アルブミン（HSA）※ 16 mL を加え、50 mL 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下さい。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 2×10^8 個/mL 程度に調整します。

② 細胞懸濁液に RPMI1640 培地を用いる場合
　分離した細胞に RPMI1640 培地を加え、細胞密度 2×10^8 個/mL 程度に調整します。

3. 凍結保存操作

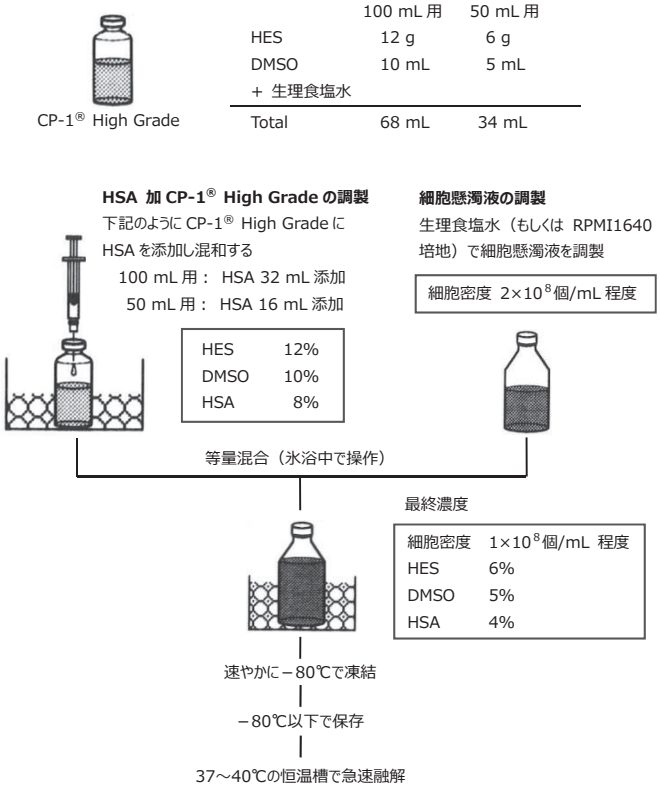
すべての操作は無菌的に行って下さい。

1) 細胞懸濁液に、等量の HSA 加 CP-1® High Grade 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下さい。（凍結バッグを利用する場合、シリンジで HSA 加 CP-1® High Grade 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) 速やかに凍結保存用容器に分注し、−80℃フリーザーで凍結して下さい。冷却速度は−2〜−3℃/分程度が目安です。
3) 凍結後、そのまま−80℃以下のフリーザーで保存して下さい（−80℃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 37〜40℃の恒温槽で急速融解して使用して下さい（2〜3 分程度で解凍を終了するのが目安となります）。

【フローチャート】[9-11]



【取扱い上または使用上の注意】

1．取扱い上の注意

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	TDLo	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	TDLo	10.91	mL/kg
モルモット	経口	LDLo	＞11,000	mg/kg
イヌ	経口	LD_{50}	＞10,000	mg/kg
ラット	吸入	LCLo	＞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　　12ヶ月

【包装】

統一商品コード	品名	包装
551-27206-2 551-27207-9	細胞凍害保護液 CP-1® High Grade	100mL 用×2 50mL 用×2

®：登録商標

【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．骨髄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 13 巻 第 1 編 2（Ⅱ）[6] ジメチルスルホキシド．環境省．2015, p. 9.

【謝辞】

本品の製品化にあたり、虎の門病院の牧野茂義先生、九州大学の原田実根先生、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

製造販売元　極東製薬工業株式会社

茨城県高萩市上手綱朝山3333−26

本社住所　東京都中央区日本橋小舟町7−8