

研究用ヒト臍帯血幹細胞（HCB）解凍手順（例）

用意するもの（臍帯血バッグ1個あたり）

- ・洗浄液（1%ヒト血清アルブミン/ PBS（-）また5%ウシ胎児血清/ PBS（-））250ml 以上
- ・培地等（洗浄後の細胞を懸濁するもの）
- ・キャニスタオープナー（初回提供時に添付）
- ・ニプロインジェクションプラグ2個（使用するのが望ましい）
- ・セルストレイナー40 μ mメッシュ（BD Falcon 352340）
- ・チャック付ビニール袋 ・針（18G） ・シリンジ^{注1}（30ml、10ml）
- ・滅菌したハサミ ・アルコール綿

注1 バッグ容量は大室20ml、小室5ml。

手順

1. 洗浄液を50ml チューブ5本に約40ml ずつ入れておく。
2. キャニスタを、オープナーを用いて開き（なければマイナスドライバーでも可）プラスチックバッグを取り出す。
3. バッグをチャック付ビニール袋に入れ、37℃の温浴槽で水平に揺すりながら解かす。（**揉まないこと。**）
4. **全体が解けたら速やかに**ビニール袋から出し、クリーンベンチに移動する。バッグを外袋から出し、バック全体（特に膜チューブ）をアルコール綿等で拭く。
5. バッグの**小室**から臍帯血を抜き出す。
 - (1)バッグの小室の膜チューブ（上部3つの突起のうち、太いもの）の**先端の被覆**を滅菌したハサミで切り（図1）、インジェクションプラグを**奥までしっかり差し込む**（図2）。（まれに、大室・小室間のシールが不完全な場合がある^{注2}。）
 - (2)針付10mlシリンジに空気を3ml程度吸入した後プラグのゴムボタンに刺し（**バッグを針で傷つけないように注意する**）、バック内に空気を1ml程度注入してから臍帯血を抜き出す。このときバッグ内が引圧になったらシリンジを引くのをやめ、再度空気を2ml程度注入してから残りの臍帯血を抜き出す。
 - (3)洗浄液の入った50mlチューブ1本に臍帯血を注入する。
 - (4)洗浄液の一部をバッグに戻し、残った臍帯血を回収する。
6. バッグの**大室**から臍帯血を抜き出す。

大室も5.(1)～(4)の要領で行なう。針付30mlシリンジで、バッグ内に空気を5ml程度注入してから引圧にならないように臍帯血を抜き出すことを数回くり返し、洗浄液の入った50mlチューブ4本に均等に入れる。
7. 1,500rpm（440 \times g）、4、5分間遠心する。
8. 上清を捨て、5本の50mlチューブのペレットを約50ml洗浄液で1本にまとめる。
9. 細胞溶液をセルストレイナーに通し、懸濁後に残った塊を取り除く。
10. 1,500rpm（440 \times g）、4、5分間遠心する。

11. 上清を捨て、ペレットを培地等に懸濁する。
12. 細胞溶液をセルストレイナーに通し、懸濁後に残った塊を取り除く。

注2 大室・小室がつながっている場合は大室の膜チューブから全量取り出す。

