

2) 造血幹細胞の凍結・保存

新潟大学医学部附属病院輸血部 品田章二

Program Freeze and Storage of Hematopoietic
Stem Cells from 1979 through 1992 at
Niigata University Medical Hospital

Shoji SHINADA

*Blood Transfusion Division,
Niigata University Medical Hospital*

Our experience of a slow rate freezing of hematopoietic stem cells during 13 years is described. Harvested bone marrows were concentrated in nucleated cell rich fraction using automatic blood separators. Total 182 stem cells including 79 peripheral leukocytes in chronic myelogenous leukemia (CML), 93 bone marrow cells in leukemias/lymphomas, gynecological and urological neoplasmas and brain tumors and 10 peripheral blood stem cells in pediatric diseases were cryopreserved in the presence of 10% dimethyl sulfoxide. Freezing of circulating leukocytes in CML has been discontinued since 1981 because of eventual blastic crisis. All cells were frozen on the same program in which they were cooled at 1°C per minute rate from 20°C to -40°C and then 3°C per minute rate to -80°C. By picking up a critical freezing point of the sample and cooling the chamber, our program freezer (Ebara, RF-22R2) has always produced straight lines in lowering sample temperature. Frozen cells were kept in a liquid nitrogen stocker until their infusion. Controlling sample and chamber temperature profiles is necessary for a good course after transplantation.

Key words: slow rate freezing, hematopoietic stem cell, dimethyl sulfoxide, liquid nitrogen stocker, straight line in lowering

緩徐凍結, 造血幹細胞, ジメチルスルフォキシド, 液体窒素槽, 直線状の温度低下

はじめに

1979年2月, 当輸血部にプログラムフリーザーが設置され, 6月から慢性骨髄性白血病患者の末梢血白血球

の凍結保存を開始した¹⁾. 以来1992年9月末までの13年3ヶ月間に, 骨髄および悪性腫瘍患者の末梢血の凍結を合計182回実施した(表1).

この稿は, 凍結保存の手順につき解説し, 造血幹細胞

Reprint requests to: Shoji SHINADA,
Blood Transfusion Division,
Niigata University Medical Hospital,
Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部附属病院輸血部

品田章二

表1 自己造血幹細胞の凍結回数と種類内訳 (新潟大輸血部 1979/6/30~1992/9/30)

年 度	回数	保存幹細胞の内訳			機 器 備 考
		CML-BCZ	骨髓	PBSC	
1979 (6~3)	16	14	2	0	プログラム・フリーザー (エバラ:PF-22R2) 保存庫 (大阪酸素:FSS 400) 分離装置 (ヘモネ:PEX)
1980 (4~3)	30	25	5	0	
1981 (4~3)	28	17	11	0	
1982 (4~3)	17	7	10	0	分離装置 (ヘモネ:V50)
1983 (4~3)	23	10	13	0	
1984 (4~3)	11	6	5	0	分離装置 (ヘモネ:newV50)
1985 (4~3)	7	0	7	0	
1986 (4~3)	7	0	7	0	
1987 (4~3)	4	0	4	0	保存庫 (エーテック:Model 431)
1988 (4~3)	1	0	1	0	
1989 (4~3)	1	0	1	0	
1990 (4~3)	15	0	14	1	分離装置 (コープ:Spectra 試用)
1991 (4~3)	11	0	7	4	
1992 (4~3)	11	0	6	5	
合 計	182	79	93	10	

の凍結保存と自己移植に関する課題を考察する。

1. 慢性骨髄性白血病の末梢血中の有核細胞の凍結保存

慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia, 以下 CML と略) は、症状の軽い慢性期を経過するものの、早晚、急性転化して、通常量の化学療法に抵抗し、死に至る。慢性期の CML 患者の末梢白血球を培養すると、多数の細胞集塊、コロニーが出現することから、CML は血中に造血幹細胞が循環している疾患とされている。

臨床応用として、慢性期の CML 患者から採血バッグに採血して遠心し、軟層 (buffy coat zone, BCZ) を分離後、凍結保護剤 (dimethylsulfoxide, DMSO) を加え、プログラムフリーザーを用いて凍結しておく。数年後、急性転化した時に、骨髓造血が完全に荒廃する程に強力な化学療法を行った後、凍結保存してあった細胞を輸注し、再び慢性期に戻す方式が考案された²⁾。

しかし慢性期に戻すことが出来ても、最終的には急性転化を防止することにはならなかったため、1984 年以降、CML-BCZ の凍結保存を中断している。

2. 骨髓の凍結保存

1980 年、同種骨髓移植を本格的に開始した。すなわち、急性白血病や悪性リンパ腫患者および婦人科腫瘍、主として絨毛上皮癌患者から骨髓を採取し、血液分離装置を用いて、可及的に赤血球層を除去し、有核細胞層を凍結保存した³⁾。

血液分離装置は年々、モデルの更新がなされたが、原理はディスポーザブル・アフエレーシス・ボール内に骨髓細胞浮遊液を入れ、遠心し、BCZ を採取することにある。血液分離装置は約 1000 ml の、大容量の骨髓を無菌的に処理できるの利点があるものの、BCZ の回収率は高々 30~60% で、一定しないのが難点であり、この点は、バッグを遠心分離する方法と同様である。

1990 年、コープ社製の血液分離装置、スペクトラを試験的に使用し、主として、小児の悪性腫瘍患者の末梢血幹細胞の採取が可能となった。スペクトラで分離される末梢血成分を peripheral blood stem cell (以下、PBSC と略) と呼ぶ。

PBSC 採取は手術室に入る必要が無く、患者への負

表 2 自己造血幹細胞保存の症例数と利用科内訳
(新潟大輸血部 1979/6/30~1992/9/30)

症例数	保存幹細胞			利用科
	CML-BCZ	骨髄	PBSC	
79	35	44	0	造血器内科
25	0	25	0	婦人科
7	0	6	1	泌尿器科
6	0	5	1	脳外科
1	0	0	1	小児科
118	35	80	3	合計

担が少ない、造血幹細胞の濃縮が確実に行われる、等の大きな利点を持つ。

3. 保存造血幹細胞の内訳の変遷

1979年から1984年までの6年間、CML患者からBCZ(表1, CML-BCZ)を盛んに凍結した。

骨髄の保存は1981年から1983年に2桁になったものの、その後1桁となり、1990年再び増加した。

1990年に、スペクトラによるPBSCの採取が開始され、増加しつつある。

過去14年間に凍結した症例数と利用科の内訳を表示した(表2)。

4. 凍結の手技

プログラムフリーザーによる細胞液の温度とチャンバーの温度(冷却槽温度)をプロットした図1は、凍結状況の評価に極めて重要である⁴⁾。

演者は当初から、エバラ社のFC-22Rを使用してい

るが、これまでの凍結は全て、理想的な成績を得ている。すなわち、凍結点での細胞液温の上昇を阻止するために、チャンパー温が急低下し、その結果、細胞液の凍結時点でも細胞液の温度は急上昇は無く、直線上に沿って平坦であった。

チャンパーの温度変化について見ると、同じ骨髄液を凍結する場合でも、骨髄液中の細胞濃度の差により、温度低下の程度が大きいカーブの曲線と小さいカーブの曲線を得る場合など、一定せず様々であった。

一時、チャンパーの温度をプログラムする方式のプログラムフリーザー(FSP210; 大阪酸素およびModel 801; Cryomed)を使用した⁵⁾が、図1のような平坦な細胞液温度の変化は得られなかった⁵⁾。

このことは、チャンパーの温度をプログラムしないで、細胞液の温度をプログラムすることにより、制御する方式が重要であると考えられる。

結 論

これまで、凍結保存しても移植しないまま、死亡してしまった症例も多数経験された。

血液幹細胞の凍結と保存を有効に運用するために、表3課題を解決を急ぐべきであろう。これらを逐一解決し、悪性腫瘍の完全治癒を目標とする高度先進医療の普及することが強く望まれる。

表 3 造血幹細胞の凍結保存に関する課題
(1992年10月現在)

1. 病院内に凍結保存スペースを確保する
2. チーム結成 コントローラーとプロモーターの役割分担
3. 薬剂量と移植の関連を客観的評価する (a) High Dose で根治させ、移植なし (b) Ultra-High Dose 後に、移植する いずれがよいか
4. 造血幹細胞の濃縮法を工夫し、改良する コーブ: スペクトラ テルモ: ステリセット その他: Affinity Separation
5. 造血幹細胞群のモニタリングの基盤を確立すること 有核細胞数 容易であるが不正確 単核球数 時間を要するがやや正確 コロニー数 時間がかかり過ぎる モノクローナル抗体陽性数 迅速かつ正確

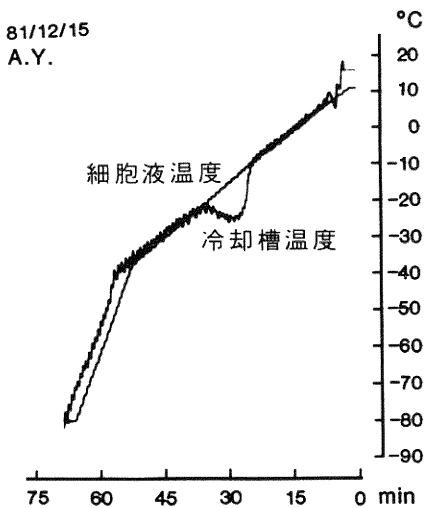


図 1 骨髄の冷却温度曲線

参 考 文 献

- 1) Shinada, S., Takahashi, M., Sakai, C., et al.: Cryopreserved buffy coat cells of chronic myelogenous leukemia patients collected by plasmapheresis blood bag, *Low Temp. Med.*, 5(4): 110~113, 1979.
- 2) Goldman, J.M., Th'ng, K.H., Park, D.S., et al.: Collection, cryopreservation and subsequent viability of haematopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation, *Brit J Haemat*, 40: 185~195, 1978.
- 3) Shinada, S., Sakai, C., Takahashi, M., et al.: Procedure and experience in bone marrow cryopreservation for autologous transplantation, *Low Temp. Med.* 9(1): 47~51, 1983.
- 4) 品田章二: 血液成分の保存, 広田 豊, 堀内 篤編, 成分輸血の進歩と実際. 丸善, 東京, p101~125, 1985.
- 5) 品田章二: 未発表データ

司会 どうもありがとうございました。自家骨髄移植では「細胞保存」は重要な課題ですが品田先生の方から、保存の方法と問題点についても指摘されました。どなたかご質問ございませんか。

手塚 グリセリン液による凍結について教えてください。

品田 それは既に赤血球でよくやられています。グリセリン液を使って電気冷蔵庫に入れている。それが赤血球の凍結保存です。ですから、赤血球の凍結保存用として定着しています。血小板あるいは骨髄の造血幹細胞は解凍してみたら全部細胞が粉々になっていたのでは責任がとれません。その意味で, dimethylsulfoxide, これが一番安定しているようです。DMSO を、血漿を20%ぐらい加えた溶液に等量加えて凍結する。DMSO による凍結方法はかなり一定しています。ただし、ご存知のように、DMSO は臭いといって非常に嫌う人もいます。できたらグリセリンで凍結したいということで赤血球はグリセリンが用いられます。しかもグリセリンでも赤血球は簡単に保存できるのでグリセリンによる凍結保存が行われているのです。

司会 その他、ございませんでしょうか。では第3席「摘出骨髄を利用した自家骨髄移植の試み」、婦人科の高桑先生、お願いいたします。