

原 著

自動凍結保存装置 BioArchive を用いた臍帯血凍結保存

笹山 典久¹⁾ 和田 誠一¹⁾ 須郷美智子¹⁾ 斉藤 健一¹⁾
徐 岩文^{1,2)} 浅野 茂隆³⁾ 高橋 恒夫¹⁾

¹⁾東京大学医科学研究所細胞プロセッシング研究部門

²⁾米国赤十字 Holland 研究所

³⁾東京大学医科学研究所病態薬理学研究部

(平成 12 年 3 月 10 日受付)

(平成 12 年 11 月 10 日受理)

CRYOPRESERVATION OF PLACENTAL/UMBILICAL CORD BLOOD IN AN AUTOMATED CONTROLLED-RATE FREEZING AND STORAGE SYSTEM, THE " BIOARCHIVE SYSTEM "

N. Sasayama¹⁾ S. Wada¹⁾, M. Sugoh¹⁾, K. Saitoh¹⁾,
Y. Xu^{1,2)}, S. Asano³⁾ and T. A. Takahashi¹⁾

¹⁾Division of Cell Processing, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

²⁾Blood/Cell Therapy Research and Development Department, Jerome H. Holland Laboratory,
American Red Cross

³⁾Department of Molecular Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Quality control for the cryopreservation of thousands of units of placental/umbilical cord blood (PCB) is a difficult problem in cord blood banking. The BioArchive System (BA) is a liquid nitrogen freezer tank equipped with a computer for controlled-rate freezing and a robotic arm for insertion and retrieval of the units. It is designed for the cryopreservation of up to 3,626 units of PCB. Leukocyte concentrates prepared by the hydroxyethyl starch method were expressed into freezing bags, with large and small compartments, and then frozen and stored in the BA. The recoveries of CD34 positive cells in the large and small compartments were $95.1 \pm 9.6\%$ and $93.5 \pm 1.6\%$, respectively ($n=8$) and the recoveries of colony-forming cell were $99.6 \pm 18.5\%$ and $115.8 \pm 27.8\%$, respectively. The results indicate that the BA is useful for controlled cryopreservation of PCB in cord blood banking.

Key words : Cord blood bank, Hematopoietic stem cell, Barcode, Quality control, Cryopreservation

緒 言

近年、臍帯血移植は骨髄、末梢血幹細胞移植と比較して、①ドナーへの負担が全くない②凍結保存することによりいつでも移植に対応できる③HLA の許容度が高い④移植片対宿主病(GVHD: graft versus host disease) の発症頻度が低い、等の利点から急速な進展を見せている¹⁾⁻³⁾。我が国では 1999 年に日本さい帯血バンクネットワーク

が設立され、各地の臍帯血バンクを結び、HLA 登録、検索システムが整えられようとしている。一方、各臍帯血バンクでの臍帯血分離処理及び凍結保存方法は必ずしも一致しておらず、我が国の目標である 2 万検体を保存していくには、統一した品質管理システム下で多数の臍帯血を凍結保存することが重要となる。そこで我々は、3,626 検体の臍帯血を自動制御にて凍結・液体窒素保存が可

能な凍結保存装置“BioArchive System (BA: ThermoGenesis Co., Cordova, USA)の有用性を検討した。BAは液体窒素保管庫内にプログラムフリーザーが内蔵されていることから、従来の凍結保存法^{4,5)}、即ち低温槽(-80)もしくはプログラムフリーザーで予備凍結後、液体窒素タンク保存する際起こりうる温度変化に伴う細胞損傷の危険性を避けることができる。また、バーコードで検体管理するので人為的ミスを軽減でき、品質管理上有利である。しかしながら、これまでBAを用いた臍帯血の品質については全く議論されていない。我々は、BAを用いて臍帯血を凍結保存し、凍結前後の総有核細胞(TNC: total nucleated cell)数、コロニー形成細胞数(CFC: colony-forming cell)およびCD34陽性細胞数の回収率を求め、その有効性を評価した。BA専用で作製された凍結バッグ(F-025, ニプロ, 大阪)は、大室(20ml)と小室(5ml)に区分されている。小室は検体を培養・増幅してex vivo増幅細胞移植⁶⁾に用いられることを目的としているが、我々は、大室と小室それぞれの総有核細胞、CFC及びCD34陽性細胞の回収率を評価した。

材料および方法

1. 臍帯血採取

母親、および家族又はそれに準ずる者からインフォームド・コンセントが得られた在胎37~42週の正産期における経膈分娩及び帝王切開分娩を採取の対象として、専任スタッフが採取を行った。胎盤娩出後に胎盤及び臍帯を胎盤支持シート(Placenta Hanging Sheet, テルモ, 東京)に装着してスタンドに吊り下げ、臍帯を下方に垂らした。ポピドンヨード含浸綿(CLINISWAB, The Clinipad Co., Guilford, USA)で消毒し、75%イソプロパノール含浸不織布(SWABER, Nipro)で拭き取った。怒張した静脈に穿刺し28ml CPD(citrate-phosphate-dextrose)液入りの採取バッグ(CBC-20, ニプロ)に臍帯血を重力落下により採取した。

2. 臍帯血分離調製

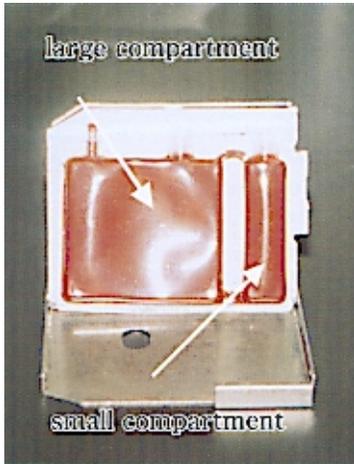
臍帯血の細胞分離・凍結保存はRubinsteinらの方法に従った⁷⁾。採取した臍帯血は24時間以内に細胞分離処理を行った。平均分子量40万kD

の6% HES (HESPANE, Dupont Pharma, Wilmington, USA)を添加し、150G, 10 で5分間遠心後、細長の分離バッグ(CBP-20D, ニプロ)を用いて、分離した上清を回収し、400G, 10 で10分間再遠心した。上清の血漿をAuto Volume Expressor(ThermoGenesis)で除去し、総容積を20mlにして凍害保護液を添加するまでの間、4~6 で保存した。ジメチルスルホキシド(DMSO: dimethylsulfoxide; Cryoserv, Research Industries Co., Salt Lake, USA)と10% Dextran40(デキストラン40注 ヨシトミ, 吉富製薬, 大阪)を同量混合したものを凍害保護液として用いた。20mlの有核細胞分画は、4 に保った冷剤に挟みアジテーター上に固定して、シリンジポンプで凍害保護液5mlを15分かけて添加した(最終濃度DMSO: 10%, Dextran40: 1%)。

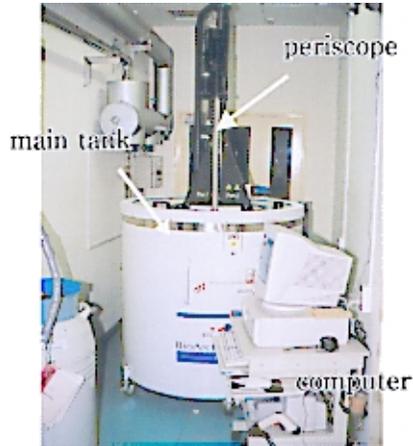
3. 凍結保存

3.1 BA法

凍害保護液添加後、25mlになった有核細胞分画を凍結バッグ(F-025, ニプロ)に移し、さらにウィルス等の伝搬予防を目的としたオーバーラップバッグ(ThermoGenesis)で被い、バーコードラベルを貼ったキャニスターに挿入した。凍結バッグは大室(容量20ml)と小室(容量5ml)に分割されている。小室は、造血系の早期回復を目的とするex vivo増幅細胞移植に対応している(Fig. 1A)。BAによる凍結は、保存容器内の上部に存在する液体窒素の蒸発ガス(-150以下)とcontrolled-rate freezer(CRF)を用いて行う(Fig. 1B, 1C)。コンピューターにバーコードナンバーと凍結条件を入力した後、CRFに内蔵されているファンが凍結条件に従って蒸発ガスを吸引して検体のバッグ表面温度を制御しながら冷却する(Fig. 1D)。検体のバッグ表面温度が凍結終了温度に達すると、ロボットアームはキャニスターをフックして収納個所(液体窒素中のラック)へ自動的に移動し収納する。凍結条件は、冷却速度を+15 から-14まで10 /min, -14以下は2 /minに設定し、-50あるいは-55まで冷却し(凍結終了温度)、それから液体窒素に保存した。



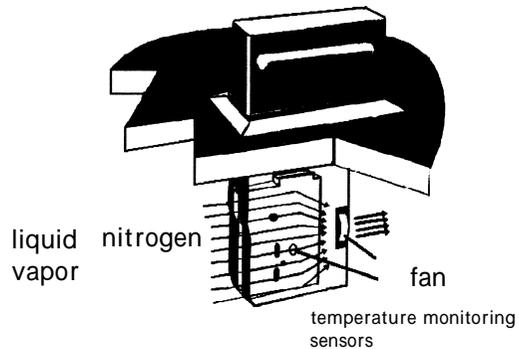
A Freezing bag in a canister



B BioArchive System



C Controlled-rate freezer (CRF) and retrieval module



D Operation of the controlled-rate freezer

Fig. 1

3.2 従来法

BAによる凍結保存法との比較は、従来の凍結保存法⁷⁾¹⁾を用いて行った。即ち、凍害保護液を加えて25mlとした有核細胞分画を凍結バッグ(F-050,ニプロ,大阪)に移し、-80の低温槽(CMR-8030,Forma Scientific, Inc., Marietta, USA)を用いて約2/minの冷却速度で3時間以上静置、-80に達した後、液体窒素タンクに移し凍結保存を行った。

4. 臍帯血解凍及び洗浄

臍帯血の解凍は、凍結保存1週間後、キャニスターから取り出した凍結バッグを37のウォーターバスに浸し急速(5分以内)に行った。解凍した大室、小室の検体は、10% Dextran 40及び5%ヒト血清アルブミン(献血アルブミン20,化学及血清療法研究所,熊本)を最終濃度2.5% Dextran 40及び1.25%ヒト血清アルブミンとなるように添加した。400G,10で10分間遠心し、上清を除去した後、沈降層と同量の10% Dextran 40と5%ヒト血清アルブミン溶液に再懸濁した。

5. 総有核細胞及びコロニー形成細胞数の測定
 総有核細胞 (TNC: total nucleated cell) 数は、自動血球計算機 (MD-18, コールター, 東京) を用いて測定した。コロニーアッセイはメチルセルロース培地 (Methocult GF H4434V, ベリタス, 東京) を用いて、各々から 1ml のサンプルを 2 個作成し、37℃, 5%CO₂, 加湿下で 2 週間培養した。大室, 小室の burst-forming-unit erythroid (BFU-E), colony-forming-unit granulocyte/macrophage (CFU-GM), および colony-forming-unit mix (CFU-MIX) は顕微鏡下で観察計測を行った。コロニー形成細胞の総数を colony-forming cell (CFC) とした。CD34 陽性細胞測定は ProCOUNT (日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) を用いて FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン) で測定した⁸⁾。

6. 細胞生存率の測定

細胞の生存率 (viability) はエチジウムブロマイド (Ethidium Bromide: EtBr) とアクリジンオレンジ (Acridine Orange: AcOr) の混合溶液を検体と等量混合し (最終濃度 EtBr: 0.001%, AcOr: 0.0003%), 血球計算板と蛍光顕微鏡を用いて測定した。

7. 大室及び小室の温度測定法

大室と小室のバッグ内温度は、テフロン被覆極細熱電対 (Fineflex-B, 東京ワイヤー製作所, 東京) を用いて測定した。

8. 統計学的解析

統計学的解析は t 検定を用い、凍結終了温度 -50 と -55 における回収率の比較は unpaired t-test, 大室と小室における回収率の比較は paired t-test で確認し, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1) BA 保存時の TNC, CFC, CD34 陽性細胞の回収率および生存率

凍結終了温度 -50 (冷却速度 +15 から -14 : 10 /min, -14 以下: 2 /min) で液体室素中に保存したときの凍結前後 (凍結前: DMSO/Dextran 添加前, 凍結後: 解凍直後) における TNC 回収率は 98.5 ± 4.7% (大室), 99.4 ± 4.3% (小

Table 1 Comparison of TNC, CFC, CD34⁺ cell recoveries and cell viability at the final freezing temperature settings of -50 and -55

		- 50	- 55
TNC	large compartment	98.5 ± 4.7	98.5 ± 6.0
	small compartment	99.4 ± 4.3	101.4 ± 5.8
CFC	large compartment	87.4 ± 30.3	99.6 ± 18.5
	small compartment	93.3 ± 39.6	115.8 ± 27.8
CD34 ⁺	large compartment	86.1 ± 21.9	95.1 ± 9.6
	small compartment	91.0 ± 20.5	93.5 ± 1.6
Viability	large compartment	53.0 ± 22.5	61.0 ± 10.0
	small compartment	61.7 ± 13.7	69.3 ± 6.4

Statistical significance: -50 vs. -55 (not significant, unpaired t-test), large vs. small compartment (not significant, paired t-test)

室) (n=8), CFC 回収率は, 87.4 ± 30.3% (大室), 93.3 ± 39.6% (小室) (n=6), CD34 陽性細胞の回収率は 86.1 ± 21.9 (大室), 91.0 ± 20.5% (小室) (n=8), 解凍直後の生存率は, 大室 53.0 ± 22.5%, 小室 61.7 ± 13.7% であった (Table 1). 同様に, 凍結終了温度 -55 で液体室素中に保存したときの凍結前後における TNC 回収率は 98.5 ± 6.0% (大室), 101.4 ± 5.8% (小室) (n=8), CFC 回収率は, 99.6 ± 18.5% (大室), 115.8 ± 27.8% (小室), CD34 陽性細胞の回収率は 95.1 ± 9.6 (大室), 93.5 ± 1.6% (小室), 解凍直後の生存率は 61.1 ± 10.0% (大室), 69.3 ± 6.4% (小室) だった。凍結終了温度 -50 と -55 において CFC 回収率を比較したとき, 凍結終了温度 -50 では, CFC 回収率 70% 未満の検体が 大室で 2 検体 (n=6), 小室で 2 検体 (n=6) あるのに対し, 凍結終了温度 -55 におけるそれは大室で 1 検体 (n=6), 小室で 0 検体 (n=6) と減少した。大室と小室の TNC, CFC, CD34 陽性細胞回収率および生存率のそれぞれについて, 凍結終了温度 -50 と -55 で保存した検体間に有意差は確認できなかった。また, 凍結終了温度 -50 と -55 の TNC, CFC, CD34 陽性細胞回収率および生存率のそれぞれについて, 大室と小室の検体間に有意差は確認できなかった。

2) 大室及び小室のバッグ内温度

BA が測定する凍結バッグの表面温度と実際の

凍結バッグ内の温度を測定した。凍結条件は冷却速度 2 /min とし、凍結終了温度を - 50 及び - 55 における大室、小室の温度を測定した (Fig. 2)。凍結終了温度 - 50 における大室、小室のバッグ内温度は、それぞれ - 44.7 ± 2.5 , - 38.3 ± 1.0 であった。凍結終了温度 - 55 における大室、小室のバッグ内温度はそれぞれ - 52.8 ± 0.3 , - 43.6 ± 1.1 であり、凍結終了温度 - 50 設定時の温度と比較すると有意差が認められ、平均では大室が - 8.1 , 小室が - 5.3 と低い温度を示した (Table 2)。

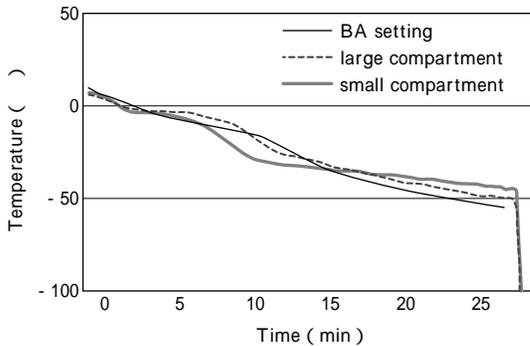


Fig. 2 Cooling rates in the BA at the setting of - 2 / min, final temperature - 55

Table 2 Actual temperatures of large and small compartments at the final freezing temperature settings of - 50 and - 55

BA Temp. Setting (°C)	n	Actual Temperatures	
		large compartment (°C)	small compartment (°C)
- 50	5	- 44.7 ± 2.5	- 38.3 ± 1.0
- 55	5	- 52.8 ± 0.3	- 43.6 ± 1.1

p = 0.002 (large vs small at -50), p = 0.0001 (large vs small at -55)

Table 3 Recoveries of TNC , CFC and CD34+ cells at the final freezing temperature setting of - 55

		TNC % [†]	CFC % [†]	CD34+ (%) [†]
thawed/pre	large compartment	98.5 ± 6.0	99.6 ± 18.5	95.1 ± 9.6
	small compartment	101.4 ± 5.8	115.8 ± 27.8	93.5 ± 1.6
washed/pre	large compartment	98.1 ± 4.7	100.5 ± 22.8	118.8 ± 20.1
	small compartment	100.1 ± 7.9	126.2 ± 15.4	103.1 ± 17.1

* : not significant, mean ± SD

(a : n = 8 , b : n = 6 , c : n = 8 , * : not significant, mean ± SD)

3) 洗浄後/凍結前における TNC , CFC , CD34 陽性細胞回収率

凍結終了温度 - 55 で保存したときの洗浄後と凍結前を比較した。TNC 回収率は 98.1 ± 4.7% (大室), 100.1 ± 7.9% (小室 (n=8)), CFC 回収率は, 100.5 ± 22.8% (大室), 126.2 ± 15.4% (小室) (n=6), CD34 陽性細胞の回収率は 118.8% ± 20.1% (大室), 103.1 ± 17.1% (小室 (n=8)) であり, 大室と小室間に有意差は確認できなかった (Table 3)。

4) BA の作業性

臍帯血の採取・分離を含め BA を用いた凍結・液体窒素投入までの作業性を, 従来法 (低温槽 (- 80) /液体窒素投入) と比較した。凍結時間は低温槽 (- 80) を用いる従来法で 3 時間以上要したのに対し, BA は凍結及び保存を 30 分で終了した。バーコードナンバーと凍結条件 (冷却速度: 2 /min, 凍結終了温度: - 50 もしくは - 55) を入力して自動制御で凍結保存を行う BA は, 専任スタッフが低温槽で凍結した検体を液体窒素下に投入し保存場所を記録する従来法に比べて, 記録の煩雑さや液体窒素タンクへの検体移動の作業を必要とせず, スタッフの負担を軽減した。

考 察

BA の大きな特徴は、①多数の臍帯血の凍結保存ができる、②プログラムフリーズと保管庫の一体化③凍結保存臍帯血のコンピューター管理、④省スペースにあると考えられる。最初に、BA のオリジナルプログラムにおいて決定されていた凍結終了温度 - 50 で検体を保存したが、その CFC 回収率は、 $87.4 \pm 30.3\%$ (大室)、 $93.3 \pm 39.6\%$ (小室)で、CFC 回収率が 70% 未満と低値を示す検体が、大室で 2 検体 ($n=6$)、小室で 2 検体 ($n=6$) あった。大室と小室のバッグ内の温度を測定したところ、 -44.7 ± 2.5 (大室)、 -38.3 ± 1.0 (小室)と、内部は十分に温度が下がらないまま、細胞は液体窒素中へ移行されたことが確認でき、これが細胞内凍結による傷害を引き起こし CFC 回収率に影響したと推定された (Table 2)。我々の示差走査熱量計を用いた解析では、細胞内凍結を回避しながら急速凍結にするには、細胞が -40 以下に達してから急速凍結することが必要であることがわかっている⁹⁾¹⁰⁾。そこで、凍結終了温度を -55 まで設定できるようにプログラム変更して凍結保存を行った。凍結終了温度 -55 の設定では、CFC 回収率は、それぞれ $99.6 \pm 18.5\%$ (大室)、 $115.8 \pm 27.8\%$ (小室)であり、我々が報告した従来法での CFC 回収率 90.4% ¹¹⁾と遜色のない成績が得られ (Table 1)、CFC 回収率が 70% 未満を示す検体は、大室が 1 検体 ($n=6$)、小室で 0 検体 ($n=6$)と、凍結終了温度 -50 設定時のそれと比較すると減少した。細胞の生存率は、凍結終了温度 -50 設定時 (53.0%)と比較して有意差は認められないものの、平均値が 61.1% と高い傾向を示した。また、凍結終了温度 -55 におけるバッグ内核細胞液の温度は -52.8 ± 0.3 (大室)、 -43.6 ± 1.1 (小室)と、凍結終了温度 -50 設定時における大、小室のバッグ内温度よりも冷却されていた。凍結終了温度の差は細胞内凍結の起こり易さ、そして CFC 回収率に影響を及ぼすと推察され、凍結終了温度 -55 が適切であると考えられる。

臍帯血バンクにおける BA 運用の有効性は次の様に考えられる。バーコードリーダーによる自動

入力によりプログラムフリーズと液体窒素保存が自動制御で行える BA は、冷却速度や検体の保存場所をコンピューター管理できるため、従来法のようにスタッフが冷却速度の測定や液体窒素タンクへの保存場所を記録する必要がなく、記録忘れ等の人為的ミスを軽減し、効率よく品質を管理することを可能にした。凍結時間は、従来法が約 3 時間要するのに対し、BA は約 30 分 (+15 から -14 まで $10 / \text{min}$ 、その後 -55 まで $2 / \text{min}$)で終了と、作業時間の短縮が可能となり作業者の負担が軽減される。BA は専用キャニスターの専有面積が 75cm^2 と従来キャニスター (160cm^2) の $1/2$ と小さいため、最大保存検体数も、3,626 検体 (BA) と最大でも 1,200 検体の従来型液体窒素タンクの約 3 倍の収納能力を持ち省スペースでの多数の臍帯血保存を可能にした。BA の液体窒素消費量は、 25L/day と従来タンク (11L/day) に比べ 2 倍量を必要だが、従来タンクが 3,626 検体保存するには 3 台を必要とするため、液体窒素消費量もほぼ同程度だと考えられる。一方、液体窒素保存については、液体窒素下での検体間のウイルス伝搬¹²⁾¹³⁾の懸念から気相保存が勧められているが、これまではウイルス検査を終えた検体のみ最終保存タンクに保存し、検査終了までは一時保存タンクに保存してウイルス伝搬を予防していた。BA は、米国でアメリカ食品衛生局 (FDA: Food and Drug Administration) が認可し、また英国も採用しているオーバーラップバッグを使用している。オーバーラップバッグを被せての保存は、凍結バッグと液体窒素の直接接触が無いので、凍結バッグのみの液体窒素保存に比べてウイルス感染の危険性は多少なりとも軽減されると考えられる。また、一時保存タンクと最終保存タンクの併用は、検体移動時の温度変化が懸念されるので、BA が品質管理面で従来法に比べ有利である。以上のことから、BA は今後、多数の臍帯血を品質管理下に凍結保存しなければならない大規模な臍帯血バンクにとって有用な装置だと考えられる。

結 語

BA と凍結バッグについて、その有用性の評価

を行った。BAは凍結終了温度 -55℃ に設定することにより従来法と同等の結果が得られ、また、作業者個人の技術に関係なく凍結保存を行うことができた。凍結バッグは移植専用の大室と移植及び細胞増幅に使用できる小室の2室に分離されているが、この2室に凍結保存された細胞の回収率に統計学的有意差はみられなかった。以上から、BAは、品質管理が必要な各臍帯血バンクに有用な装置であると考えられる。

文 献

- 1) Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., et al. : Outcomes among 562 recipients of placental blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, 339 : 1565 - 1577, 1998.
- 2) Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M.L., et al. : Placental blood as a source of hematopoietic cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*, 335 : 157 - 166, 1996.
- 3) Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Auerbach, A.D., et al. : Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med*, 321 : 1174 - 1178, 1989.
- 4) 品川克至, 原田実根 : 造血幹細胞凍結保存法の現況. *低温医学*, 22(2) : 169 - 175, 1996.
- 5) 田口 昇, 高橋恒夫, 関口定美 : 末梢血幹細胞凍結保存における冷却速度の影響. *低温医学*, 21(2) : 173, 1995.
- 6) Sui, X., Tsuji, K., et al. : gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 : 2859 - 2863, 1995.
- 7) Rubinstein, P., et al. : Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 : 10119 - 10122, 1995.
- 8) 芹沢 領, 安武幹智, 斉藤健一, 他 : 臍帯血の CD34 陽性細胞数の測定における CD34-SSC 法と Po-COUNT 法の比較. *日本輸血学会誌*, 45(6) : 669 - 676, 1999.
- 9) 緑川三恵, 和田誠一, 安武幹智, 他 : 示差走査熱量計による臍帯血造血幹・前駆細胞の凍結挙動解析. *低温生物工学会誌*, 44(2) : 22 - 24, 1998.
- 10) 高橋恒夫 : Vitriification による細胞・組織・臓器の保存. *凍結及び乾燥研究会会誌*, 34 : 6 - 13, 1988.
- 11) 斉藤健一, 安武幹智, 芹沢 領, 他 : 臍帯血バンクにおける臍帯血処理方法の検討. *日本輸血学会誌*, 44(1) : 12 - 19, 1998.
- 12) Fountain, D., Ralston, M., Higgins, N., et al. : Liquid nitrogen freezer : a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*, 37 : 585 - 591, 1997.
- 13) Tedder, R.S., Zuckerman, M.A., Hawkins, A.E., et al. : Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *The Lancet*, 346 : 137 - 140, 1995.
- 14) 佐藤典宏, 吉川義洋, 茂木祐子, 他 : 凍結臍帯血細胞の洗浄による細胞回収率の検討. *日本輸血学会誌*, 44(6) : 687 - 692, 1998.