

原 著

臍帯血凍結保存状態に関する保管検体による評価の有用性の検討

伊藤のぞみ¹⁾ 佐藤 典宏²⁾ 茂木 祐子¹⁾ 荒関 みき¹⁾
山本 定光¹⁾ 東 寛¹⁾ 池田 久實¹⁾ 宮崎 保³⁾

¹⁾北海道赤十字血液センター

²⁾北海道大学病院輸血部

³⁾北海道臍帯血バンク

(平成 16 年 3 月 5 日受付)

(平成 16 年 4 月 7 日受理)

QUALITY ASSURANCE OF CRYOPRESERVED CORD BLOOD UNITS BY EXAMINATION OF TEST SAMPLES

Nozomi Ito¹⁾, Norihiro Sato²⁾, Yuko Mogi¹⁾, Miki Araseki¹⁾, Sadamitsu Yamamoto¹⁾,
Hiroshi Azuma¹⁾, Hisami Ikeda¹⁾ and Tamotsu Miyazaki³⁾

¹⁾Hokkaido Red Cross Blood Center

²⁾Hokkaido University Hospital, Blood Transfusion Service

³⁾Hokkaido Cord Blood Bank

Quality control of cryopreserved cord blood has assumed greater importance as the number of unrelated donor umbilical cord blood transplantations has increased. At present, we examine cryopreserved samples before cord blood transplantations, but it is unknown whether their results adequately reflect the quality of cord blood units. In this study, we tested the viability and recovery of colony forming cells (CFC) of 30 cord blood units (CB) and 2 kinds of samples. As test samples, we used segments (Seg) and tubes (Tube). With regard to viability, there was a high correlation between CB and sample type (CB vs Seg: $r = 0.938$, CB vs Tube: $r = 0.939$). Recovery of CFC of CB also correlated with sample type (CB vs Seg: $r = 0.879$, CB vs Tube: $r = 0.817$). These results suggested that the quality of CB could be determined by the testing of samples. Based on these results, criteria for cord blood transportation can be established.

Key words : cord blood, quality assurance, cryopreservation, viability, colony forming cells

はじめに

近年、非血縁者間臍帯血移植の実施数は急速に増加しており¹⁾⁻⁵⁾、日本国内でも1,000例を超える移植が施行されている⁶⁾。これに伴い、臍帯血の品質管理と安全性の向上は重要な問題となっている。日本さい帯血バンクネットワークでは、臍帯血出庫前に保管検体による移植前検査を義務づけているが⁷⁾、その結果が実際移植に使用される臍

帯血本体の品質を反映しているか否かは明らかではない。そこで我々は、保管検体と臍帯血本体の生細胞率およびコロニー形成細胞回収率を比較し、移植前検査の有用性について検討したので報告する。

材料と方法

1 臍帯血および検査用検体の凍結保存と解凍方法

出産前に同意を得た妊婦から、臍帯血を専用バッグ(ニプロパックC, ニプロ, 大阪)で採取した。臍帯血バンクでは、採取から24時間以内に細胞処理を開始すると規定されているが⁹⁾、今回の検討では種々の生細胞率を得るため、採取から細胞処理までの放置時間に差をつけた(10~140時間)。細胞処理法をFig.1に示した。臍帯血に抗凝固剤(CPD液)を含めた血液量の40%容量の6% hydroxy-ethylstarch(HES40, 菱山製薬, 大阪)を添加し、10, 60Gで5分間遠心後、多白血球血漿を回収し、赤血球の大部分を除去した。10, 400Gで10分間遠心後、上清を除去し、多白血球血漿21.8mlとなるよう調整後、0.2mlを凍結前検体として採取した。凍害保護液5.4mlを最終濃度10% DMSO (Cryoserv, Reseach Industries, Salt

Lake City) 1% dextran (Dextran40, 小林製薬工業, 東京)となるように添加し、細胞浮遊液25.5mlを凍結バック(F-025A, ニプロ, 大阪), 1.0mlを凍結チューブ(Nunc Cryo Tube, Nunc, Denmark)に入れ(Tube), 前者のうち、25.0mlを臍帯血本体(CB)とし、残り0.5mlでセグメントを作成した(Seg)。本体、セグメントは専用の金属製キャニスター(Thermogenesis, CA)に、凍結チューブは簡易凍結容器(バイセル, 日本フリーザー, 東京)に入れ、-80ディープフリーザーで2時間以上静置後、液体窒素中に保存した。解凍は37℃恒温槽内で速やかに行った。洗浄処理は行わず、検査用血液を採取し、細胞評価を行った。

2 検査法

臍帯血本体および検査用検体につき以下の検査を実施した。

①白血球数 凍結前および解凍後の検体を自動血球装置 COULTER AcT diff (ベックマン・コー

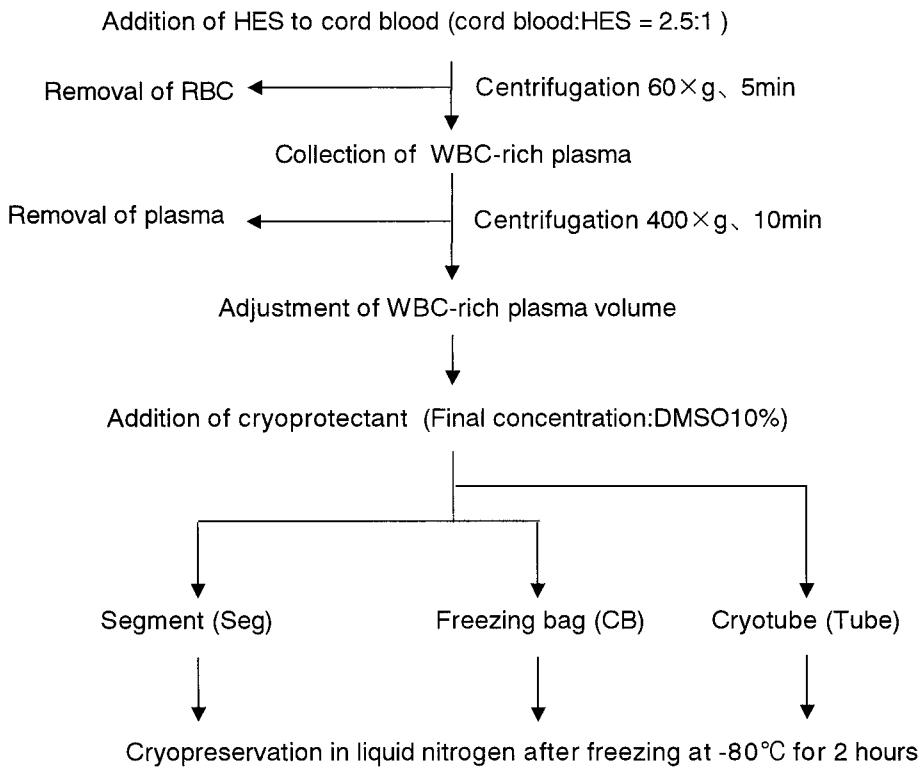


Fig. 1 Method for processing cord blood cells

ルター, 東京)で測定した. 解凍後白血球数/凍結前白血球数 $\times 100$ (%)にて白血球回収率を算出した.

②生細胞率 チュルク試薬(シグマアルドリッチジャパン, 東京)および0.2%トリパンブルー(Gibco BRL, New York)で細胞染色し, 計算板を用いて前者で総有核細胞数, 後者で死細胞数を顕微鏡により計測した. 総有核細胞数から死細胞数を引いた値を生細胞数とし, 生細胞数/総有核細胞数 $\times 100$ (%)にて生細胞率を算出した.

③コロニー形成細胞回収率 凍結前および解凍後の検体をそれぞれ培地(MethoCult GF H4434V, ベリタス, 東京)に加え, 35mm培養皿4枚に播種し, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下で2週間培養後, 顕微鏡でコロニー数を計測した. コロニーとして, 顆粒球マクロファージコロニー(CFU-GM), 赤芽球バースト(BFU-E)および混合コロニー(CFU-Mix)を判定し, その合計をコロニー形成細胞(CFC)とした. コロニー形成細胞回収率は, CFC(解凍後)/CFC(凍結前) $\times 100$ (%)にて算出した.

3 統計学的解析方法

臍帯血本体と保管検体の生細胞率, コロニー回収率はt-testで有意差検定を行い, また相関係数と回帰式を求めた. これらの解析にはStatView 4.0(Abacus concepts, Inc. CA)を用いた.

結 果

1 臍帯血本体と保管検体の生細胞率の比較

臍帯血30件について検討した. 臍帯血本体(CB), セグメント(Seg), チューブ(Tube)の白血球回収率の中央値(範囲)は, CB 99.1%(75.5~130.5), Seg 93.2%(69.9~128.5), Tube 89.7%(65.2~127.3)で, 各群間に有意差はなかった($p > 0.05$). 生細胞率の中央値(範囲)は, CB 70.3%(29.1~87.4), Seg 69.1%(19.6~93.9), Tube 69.6%(25.0~87.9)であった. 臍帯血本体と保管検体の相関係数は, CB vs Seg (Fig. 2A), CB vs Tube (Fig. 2B)でそれぞれ $r = 0.938$, $r = 0.939$ となり, どちらの保管検体も臍帯血本体と非常に良い相関性を示した.

2 臍帯血本体と保管検体のコロニー形成細胞(CFC)回収率の比較

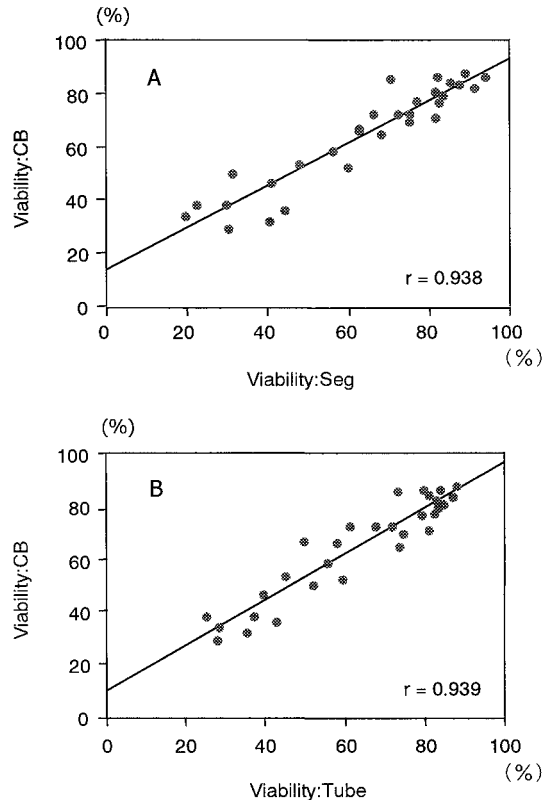


Fig. 2 Comparison of viability between cord blood units and test samples

CFC回収率の中央値(範囲)はCB 89.6%(20.9~146.0), Seg 85.4%(22.9~138.8), Tube 75.2%(9.5~124.4)で, 各群間に有意差はなかった($p > 0.05$). 臍帯血本体と保管検体の相関係数は, CB vs Seg (Fig. 3A), CB vs Tube (Fig. 3B)それぞれ $r = 0.879$, $r = 0.817$ となり, Segの方が若干良い傾向はあるものの, どちらの保管検体も臍帯血本体と良い相関性を示した. また, CFC回収率の回帰式は, CB vs Seg: $Y = 19.635 + 0.845X$, CB vs Tube: $Y = 17.8 + 0.838X$ であった.

3 生細胞率とCFC回収率の関係

生細胞率とコロニー形成細胞回収率の関係を検討した (Fig. 4). CB, Seg, Tubeの生細胞率とCFC回収率の相関係数は, それぞれ $r = 0.782$, $r = 0.808$, $r = 0.688$ となり, いずれも弱いながら正の相関を示した. また, 大部分の例で生細胞率よ

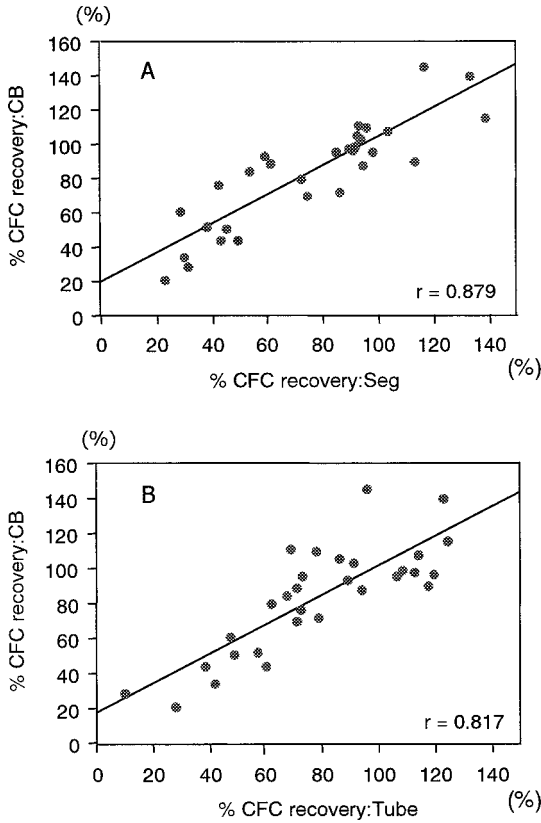


Fig. 3 Comparison of CFC recovery between cord blood units and test samples

り CFC 回収率の方が高い値を示し、特に CB では、生細胞率 60% 以上の領域で検討したすべての臍帯血で、生細胞率より CFC 回収率の方が高い値を示した。

4 保管検体の生細胞率と臍帯血本体のコロニー形成細胞 (CFC) 回収率の比較

次に、保管検体の生細胞率と臍帯血本体の CFC 回収率の相関性を検討した。保管検体 (Seg, Tube) の生細胞率と臍帯血本体 (CB) のコロニー形成細胞回収率の相関係数は、CB vs Seg (Fig. 5A), CB vs Tube (Fig. 5B) それぞれ、 $r = 0.722$, $r = 0.713$ となり、弱いながら正の相関見られた。また、保管検体の生細胞率 (X), 臍帯血本体の CFC 回収率 (Y) の回帰式は、CB vs Seg: $Y = 20.404 + 0.992X$, CB vs Tube: $Y = 14.25 + 1.1X$ であった。

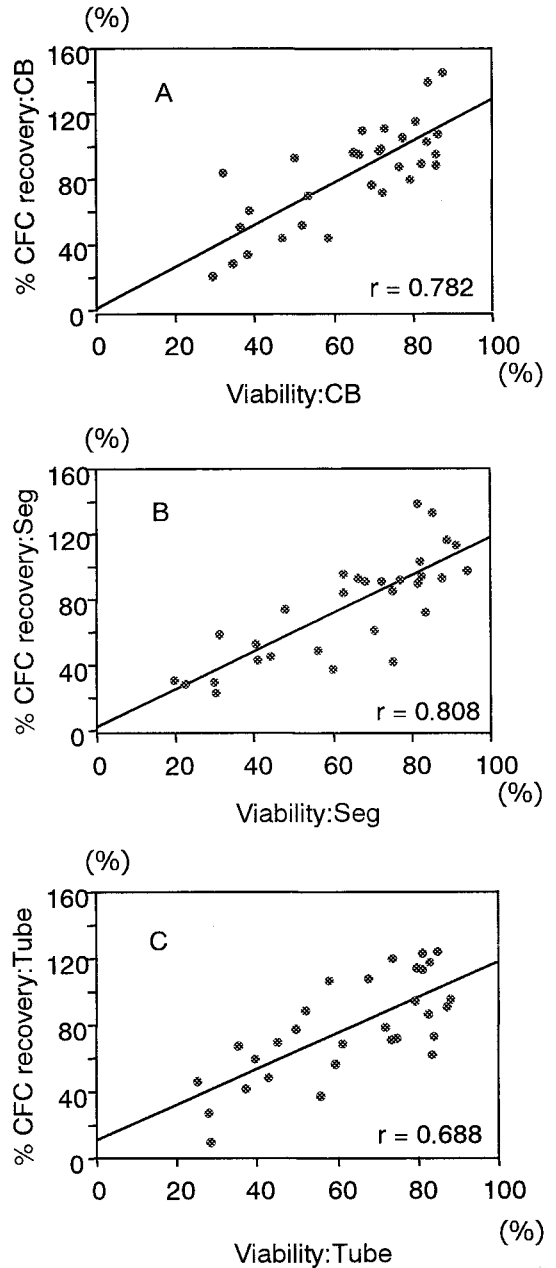


Fig. 4 Comparison of viability with CFC recovery

考 察

保管検体の解凍による移植前検査の結果が、臍帯血本体の凍結保存状態を反映しているか否かを明らかにするため、保管検体と臍帯血本体を解凍し検査結果を比較した。臍帯血バンクでは保管検

体としてセグメントと凍結チューブを保存しているため、保管検体としてその2種類を検討した。30件の臍帯血について検討を行ったが、種々の生細胞率で検討を行う目的で、一部の臍帯血は採取から細胞処理までの室温放置時間を延長し、生細胞率を意図的に低下させてから凍結保存した。Bertolini ら⁸⁾は72時間以上の室温放置でCFCが

15%低下すると報告しており、今回の検討ではさらなる低下を期待し、最大140時間放置した。そのため、生細胞率およびコロニー形成細胞回収率の中央値は、実際移植用に保存している臍帯血より低値となっている。

今回の検討結果では、生細胞率、CFC回収率は臍帯血本体と保管検体とで非常に良く相関した(Fig. 2, Fig. 3)。したがって、保管検体の検査結果は臍帯血本体の凍結保存状態を反映しており、保管検体の検査結果から臍帯血本体の凍結保存状態の評価することは可能であると考えられた。2種の保管検体(Seg, Tube)の間には有意差はなく、いずれの保管検体も同程度の有用性があると考えられた。

実際の臍帯血出庫においては、生着不全等の緊急例でCFC回収率の結果を待てない場合がある。この場合、移植前検査として生細胞率のみが指標とならざるを得ない。今回の結果から、保管検体の生細胞率と臍帯血本体のCFC回収率の間には弱いながらも正の相関が見られた(Fig. 5)。したがって、保管検体の生細胞率から臍帯血本体のCFC回収率を推測することは可能であり、緊急出庫の際、保管検体の生細胞率が出庫可否判定の指標になりうると考えられた。

以上の結果より保管検体の検査結果から臍帯血本体の凍結保存状態の評価は可能と考え、北海道臍帯血バンクでは保管検体の検査結果を基準とした臍帯血出庫基準の設定を試みた(Table 1)。

出庫基準の原則として、「保管検体の結果から推測される臍帯血本体のCFC回収率が70%以上を出庫可」とした。移植後の生着と凍結解凍時の細胞回収率の関係についての明確なデータはない

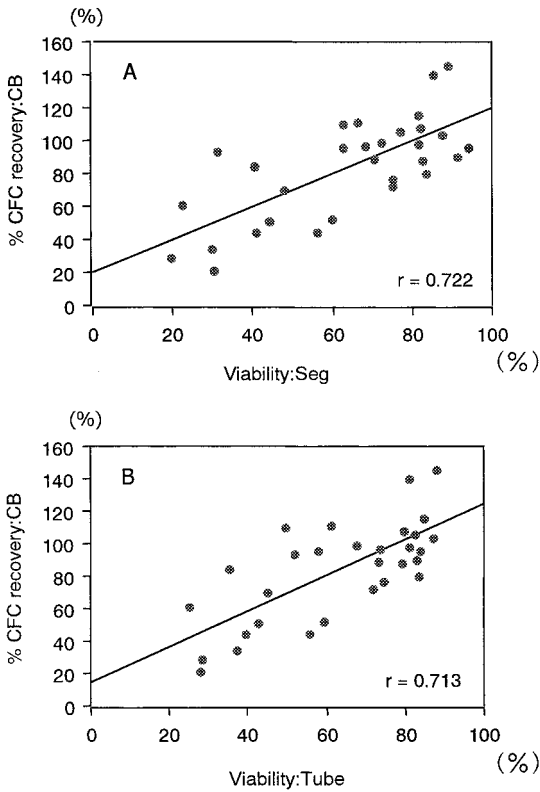


Fig. 5 Comparison of viability of test samples with CFC recovery of cord blood units

Table 1 Criteria for transportation of cord blood units at the Hokkaido Cord Blood Bank

Transportation for standard cases	Recovery of CFC *1	70% 50% , < 70% < 50%	appropriate Consult with a physician inappropriate
Transportation for urgent cases	Viability of ANC *2	60% 40% , < 60% < 40%	appropriate Consult with a physician inappropriate

*1CFC : colony forming cells , *2ANC : all nucleated cells

が、造血幹・前駆細胞の凍結条件検討に関する既報によれば、CFC回収率が70%程度で凍結保存状態が良好とする文献が多い⁹⁾⁻¹¹⁾。よって、70%以上を出庫可とすることとした。一方、出庫不可は50%以下とし、50~70%は主治医との協議により可否を決定することとした。この点に関しては、文献的根拠は乏しいが、他に移植細胞が存在しないなどの場合、一律に70%以下を不可とすれば患者が治療機会を失うことになり、慎重な判断が必要となる。そのための暫定的な基準であり、今後臨床データが蓄積された場合に見直しが必要と考えられる。

臍帯血本体の検査値の推定は、検査検体との回帰式を用いた。通常出庫時は、保管検体のCFC回収率を指標とする。臍帯血本体のCFC回収率 $Y = 70\%$ となる保管検体のCFC回収率は、 $X_{\text{Seg}} = 59.6\%$ 、 $X_{\text{Tube}} = 62.2\%$ (Fig. 3)であり、安全性を考慮して保管検体のCFC回収率70%以上を出庫可とした。一方、緊急出庫時は生細胞率を指標とする。同様に、臍帯血本体のCFC回収率 $Y = 70\%$ となる保管検体の生細胞率は、 $X_{\text{Seg}} = 50.0\%$ 、 $X_{\text{Tube}} = 50.7\%$ となり(Fig. 5)、保管検体の生細胞率60%以上を出庫可とした。生細胞率で判断する点に関しては、Fig. 4の結果からわかるように、生細胞率よりもCFC回収率の方が高い傾向があるため、60%以上を出庫可としても問題ないと考えられた。

一方、出庫可否判定の基準は、CFC回収率や生細胞率ではなく、患者体重あたりの細胞数とする考えもある。実際、現在の臍帯血選択の基準は、患者体重あたりの総白血球数であり、小児など体重の少ない患者の場合、たとえ生細胞率が低くても体重あたりの生細胞数が十分な場合もある。しかし、データでは示さなかったが、生細胞率が低い場合は、個々のコロニーの大きさが小さい傾向があり、また死細胞が多い場合、解凍後に凝集塊を形成しやすい。以上の点から、臍帯血出庫時は患者体重あたりの細胞数ではなく、CFC回収率および生細胞率を出庫可否の判定基準とした。しかし、この点は、上述の出庫時のCFC回収率の数値設定と合わせて、今後臨床データを蓄積して検討

する必要があると考えられる。

まとめ

臍帯血本体と保管検体を解凍し生細胞率、CFC回収率を比較した。両者には良好な相関性が認められ、臍帯血の凍結保存状態の評価に保管検体検査が有用であると考えられた。また、本検討で得られた回帰式をもとに、臍帯血出庫基準を作成した。

文 献

- 1) Grewal, S.S., Barker, J.N., Davies, S.M. et al. : Unrelated donor hematopoietic cell transplantation : marrow or umbilical cord blood?. *Blood*, 101 : 4233-4244, 2003.
- 2) Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammand, A. et al. : Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors : Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.*, 337 : 373-381, 1997.
- 3) 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.
- 4) Rocha, V., Comish, J., Sievers, E.L. et al. : Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*, 97 : 2962-2971, 2001.
- 5) Laughlin, M.J., Barker, J., Bambach, B. et al. : Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.*, 344 : 1815-1822, 2001.
- 6) 日本さい帯血バンクネットワークホームページ : <http://www.j-cord.gr.jp>
- 7) 日本さい帯血バンクネットワーク : 臍帯血移植のための技術指針, 2002.
- 8) Bertolini, F., Gibelli, N., Lanza, A. et al. : Effects of storage temperature and time on cord blood progenitor cells. *Transfusion*, 38 : 615-617, 1998.
- 9) Donaldson, C., Armitage, W.J., Denning-kendall, P.A. et al. : Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplantation*, 18 : 725-731, 1996.
- 10) Valeri, C.R., Pivacek, L.E. : Effects of the temperature, the duration of frozen storage, and freezing container on in vitro measurements in human peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion*, 36 : 303-308, 1996.
- 11) Makino, S., Harada, M., Niho, Y. et al. : A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 without rate-controlled freezing. *Bone Marrow Transplantation*, 8 : 239-244, 1991.