

## 臍帯血保存のための凍害保護液：DMSO 及び glucose を用いた新しい凍害保護液の検討

伊藤みゆき<sup>1)</sup> 小川 篤子<sup>1)</sup> 峯元 睦子<sup>1)</sup> 大河内直子<sup>1)</sup> 永井 正<sup>1)2)</sup>  
中島 一格<sup>1)</sup> 高梨美乃子<sup>2)</sup>

本邦では1997年に非血縁者間臍帯血移植が実施されてから臍帯血移植数は年々増加し、移植医療における臍帯血の重要性は増している。日本赤十字社関東甲信越さい帯血バンクは臍帯血を凍結保存するため0.8% dextranを含む8% DMSOを使用している。移植時に臍帯血は洗浄しないためDMSOも患者に輸注されるが、DMSOには毒性があるため濃度は低いほうが望ましい。多糖のdextranは輸注時のアナフィラキシーショックの報告もある。

本研究では、dextranに代わり単糖のglucoseをDMSOに混合した新しい凍害保護液5% DMSO-1.5% glucose (5D1.5G)と8% DMSO-1.5% glucose (8D1.5G)について、現行の8% DMSO-0.8% dextran (8D0.8D)との比較検討を行った。5D1.5GはCD34+細胞回収率、CD34+生細胞率において8D0.8Dに比べ有意に高かった。また、有核細胞回収率、CD34陽性細胞数回収率において5D1.5Gが8D1.5Gより有意に高かった。これらの結果から、5D1.5Gは8D0.8Dに変わらうる凍害保護剤と考える。

キーワード：非血縁者間臍帯血移植、凍害保護液、DMSO、dextran、glucose

### はじめに

本邦において1997年に初の非血縁者間臍帯血移植が実施されてから、年を追うごとに臍帯血移植数は増加してきた。2016年の年間臍帯血移植数は1,300例を超え、日本骨髓バンクを介した非血縁者間骨髓/末梢血幹細胞移植数を上回り、移植医療における重要性を増している<sup>1)2)</sup>。

動物細胞の凍結保存方法としては、1951年に15% glycerolを含むリングル液が用いられた。この方法で精子を凍結保存すれば、解凍後に受精も可能であることが報告された<sup>3)</sup>。続いてDimethyl sulfoxide (DMSO)を用いてマウス骨髓細胞を凍結保存できることが報告された<sup>4)</sup>。さらに牧野らは、hydroxyethyl starch (HES)をDMSOと併用することで冷却スピードによる細胞障害を減らし、プログラムフリーザーを使用しないで一般病院でも簡便に末梢血幹細胞を凍結保存する方法を開発した<sup>5)</sup>。後にCP-1として発売され、現在は末梢血幹細胞の凍結保存用として国内で広く使用されている<sup>6)</sup>。CP-1は等量混和して終濃度5% DMSO、6% HES、4% アルブミンとなるように調製されている。Rubinsteinらは、臍帯血バンクのストック数を増やすために、効率よく赤血球を除き、保存量を減少させることで貯蔵

スペースを確保し、かつ幹細胞の解凍後生存率を上げる方法を開発した<sup>7)</sup>。

日本赤十字社関東甲信越さい帯血バンクでは臍帯血保存を開始した1995年から臍帯血を凍結保存するための凍害保護液としてHydroxyethyl starch (HES)とヒトアルブミン(HSA)を含む終濃度5% DMSO<sup>5)6)</sup>を用いていたが、1998年にヒト由来成分を含まない、デキストラン40 (dextran) 1%を含む10% DMSO<sup>7)</sup>に凍害保護液を変更し、2013年4月からは終濃度を0.8% dextranを含む8% DMSOとなる様に調製している。これは日本赤十字社が臍帯血バンクを血液事業の関連事業としたのに伴い手順を統一したものである。本邦の他バンクでは2014年10月より同様に1% dextranを含む10% DMSOから0.8% dextranを含む8% DMSOとし、もうひとつのバンクではCP-1から1% dextranを含む10% DMSOに変更している。北米においては1% dextranを含む10% DMSOが多く使われている<sup>8)</sup>。

凍害保護液は臍帯血の凍結保存状態に影響するため、細胞がより安定に保たれ、また調製保存時に使用しやすい細胞凍害保護液が望ましい。また本邦では臍帯血移植時に融解臍帯血中の造血幹細胞の損失を避けるため洗浄しないことが多く、臍帯血とともにDMSOが患

1) 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

2) 日本赤十字社血液事業本部

[受付日：2017年10月27日、受理日：2018年1月10日]

者に輸注されるが、DMSO には毒性があるため、DMSO 濃度は低いほうが望ましい。さらに、多糖の dextran は輸注時のアナフィラキシーショックの可能性があるので、dextran に変わりうる物質が望まれる<sup>9)10)</sup>。この度、dextran に代わり単糖の glucose を DMSO に混合した新しい組成の凍害保護液について、DMSO 濃度の減量の影響も含めて検討を行った。

**対象及び方法**

**1. 対象**

臍帯血バンクの臍帯血採取協力施設にて、あらかじめ提供に同意した健康で自主的な女性の出産時に採取された臍帯血のうち、臍帯血バンクの定める調製保存基準を満たさず、移植用に保存されなかったもので、研究利用に関しての同意を得たうえで採取された臍帯血を使用した。2014年1月から2015年3月までに採取された臍帯血を使用した。

**2. 方法**

**1) 臍帯血調製保存**

臍帯血は HES 遠心法で赤血球除去、濃縮処理を行った。採取臍帯血量にその 1/5 量の HES (HES40, 分子量 40 万, ニプロ社) を添加, 混和後 60 分から 90 分静置し, 上層の白血球を含む血漿部分とバフィコート 3~6g を分取した。大容量遠心機 (High Capacity Refrigerated Centrifuge Model8730; KUBOTA, Tokyo) を用い 400G, 10 分間遠心し, 遠心後上層の血漿を抜き濃縮臍帯血を得た。

臍帯血バンクで通常使用している凍害保護液は 50% DMSO-5% dextran (CryoSure-DEX40<sup>®</sup> USP grade, WAK-Chemie Medical GmbH, Germany) であり, 臍帯

血から赤血球および血漿を除去し濃縮臍帯血 23.2ml としたものに 50% DMSO-5% dextran を 4.4ml 加えて, 終濃度を 8% DMSO-0.8% dextran としている。この調製方法による凍結保存臍帯血をコントロールとし, 新たに開発された凍害保護液と比較検討した。10% DMSO-3% glucose 及び 16% DMSO-3% glucose (ゼノアックリソース社, 福島, より供与) を, 赤血球および血漿を除去した濃縮臍帯血 13ml と等量混和して, それぞれ終濃度 5% DMSO-1.5% glucose および 8% DMSO-1.5% glucose とした。図 1 に臍帯血調製方法の概略を示す。

凍害保護液の注入は, 50% DMSO-5% dextran を用いる場合はシリンジポンプで 20ml/hr の速度で, 10% DMSO-3% glucose 及び 16% DMSO-3% glucose を用いる場合は 120ml/hr で行った。

凍害保護剤注入後の臍帯血は速やかに凍結バッグ(フローズバッグ F-025A, ニプロ(株), 大阪)に入れ, Computer Controlled Rate Freezer (14S IceCube; SY-LAB, AUSTRIA) で凍結し, 液体窒素タンク(気層, -180℃ 以下) 中で 2 カ月以上保存した。

**2) 臍帯血凍結前及び解凍時検査**

濃縮臍帯血から 0.5ml を採取し凍結前検体とした。解凍時検体は凍結バッグを 37℃ 温浴中にて解凍後に採取した。

有核細胞数は多項目自動血球分析装置 (XE-2100; Sysmex 社) で測定した。CD34 陽性細胞数は CD34 陽性細胞測定試薬 (Stem-Kit; Beckman Coulter), 全自動細胞解析装置 (FCM) (Cytomics FC 500; Beckman Coulter 社) で測定した。同時に, 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) 陰性細胞の割合より FCM-CD45 陽性領域

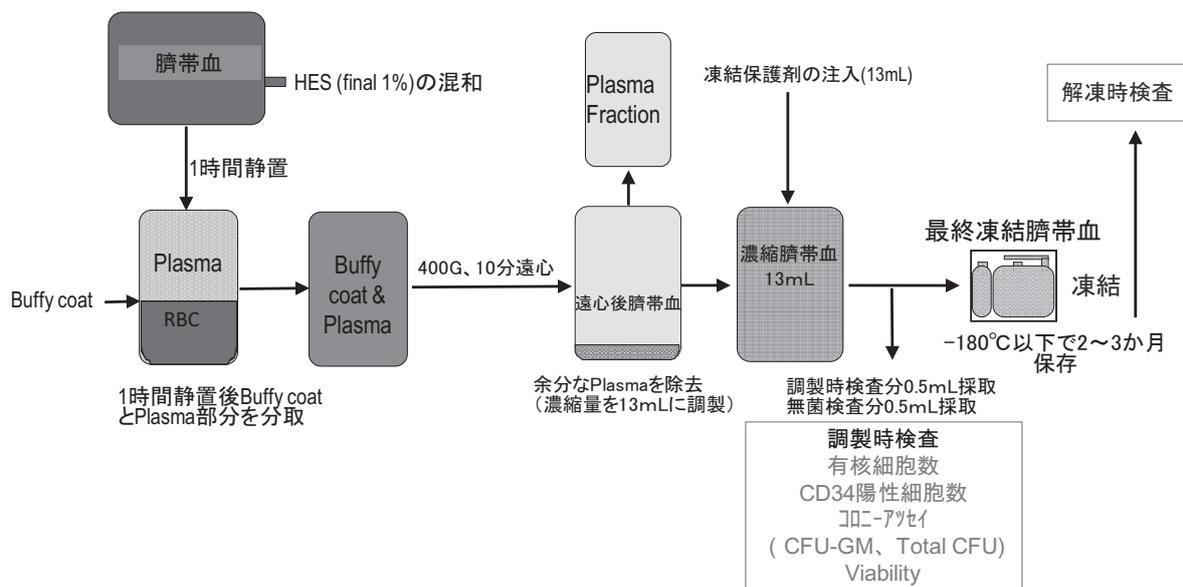


図1 臍帯血調製方法

表1 現行の凍害保護液と新規凍害保護液との比較

	5% DMSO- 1.5% glucose (N=11)	8% DMSO- 0.8% dextran (N=21) Control	8% DMSO- 1.5% glucose (N=15)
有核細胞回収率 (%)	101.2±7.1	100.0±7.1	99.0±4.1
CD34+細胞回収率 (%)	96.5±13.1* <sup>1</sup>	83.0±9.1	86.9±9.2
Total-CFU 回収率 (%)	98.3±19.1	95.6±19.5	94.3±18.0
CFU-GM 回収率 (%)	92.5±23.7	99.7±23.9	97.0±22.3
生細胞生存率 (%) AO/EB (蛍光顕微鏡)	86.8±2.9	85.7±7.6	85.2±2.8
生細胞生存率 (%) CD45 領域 (FACS)	74.0±6.1	75.2±9.7	84.2±2.6* <sup>2</sup>
生細胞生存率 (%) CD34/CD45 領域 (FACS)	99.4±0.7* <sup>1</sup>	98.1±1.7	98.8±1.1

\*<sup>1</sup> コントロール群に対して有意に高い (p<0.01)\*<sup>2</sup> コントロール群に対して有意に高い (p<0.001)

AO/EB=acridine orange/ethidium bromide

表2 新規凍害保護液の DMSO 濃度の検討, 凍結融解後の回収率

	5% DMSO- 1.5% glucose	8% DMSO- 1.5% glucose
有核細胞回収率 (%)	100.9±8.3* <sup>1</sup>	97.6±5.9
CD34+細胞回収率 (%)	92.9±11.1* <sup>1</sup>	83.2±15.4
Total-CFU 回収率 (%)	87.5±25.2	82.0±20.4
CFU-GM 回収率 (%)	88.0±27.1	76.8±25.0
生細胞生存率 (%) AO/EB (蛍光顕微鏡)	88.2±4.9	86.1±5.0
生細胞生存率 (%) CD45 領域 (FACS)	75.9±5.8	82.8±5.2* <sup>2</sup>
生細胞生存率 (%) CD34/CD45 領域 (FACS)	98.3±3.7	98.5±1.0

(n=10)

\*<sup>1</sup> 8% DMSO 群に対して有意に高い (p<0.05)\*<sup>2</sup> 5% DMSO 群に対して有意に高い (p<0.05)

AO/EB=acridine orange/ethidium bromide

と FCM-CD34/CD45 陽性領域の生細胞率を算定した。生細胞率は、蛍光顕微鏡下で細胞を acridine orange/ethidium bromide で染色後速やかに計数する目視法によっても測定した。コロニー形成試験では有核細胞を 40,000/dish (径 30mm) となるように、コロニー培地 (MethoCult™ H4034 Optimum; STEMCELL TECHNOLOGIES) に播種し、5%CO<sub>2</sub>, 37°C で 2 週間培養後コロニー数を顕微鏡下で計数した。

### 3) 凍害保護液比較検討

有核細胞数, CD34 陽性細胞数, CD34/CD45 陽性領域の生細胞率, コロニー形成試験について, 各凍結保護液の凍結前検査結果を元に解凍時検査結果の回収率を算出した。

5% DMSO-1.5% glucose (n=11) および 8% DMSO-1.5% glucose (n=15) の条件で凍結保存した臍帯血と, 同時期に現行の凍害保護液 8% DMSO-0.8% dextran で凍結保存した臍帯血 (n=21) について解凍検査を行い, 細胞の回収率を比較した。

また新規凍害保護液の DMSO 濃度の検討については, 同一の臍帯血を濃縮してから 2 分割し, それぞれを 5% DMSO-1.5% glucose および 8% DMSO-1.5% glucose で保存し, 解凍後の検査値を比較した (n=10)。

### 4) 統計

Microsoft Office Excel を用いて t 検定を行い, p<0.05 を有意とした。

## 結 果

### 1) 現行の凍害保護液 (8% DMSO-0.8% dextran) と新規開発凍害保護液 (5% DMSO-1.5% glucose および 8% DMSO-1.5% glucose) との比較

5% DMSO-1.5% glucose で凍結された臍帯血は, 8% DMSO-0.8% dextran のものに比べ CD34 陽性細胞数の平均回収率及び, FCM-CD34 領域の生細胞率が有意に高かった (表 1)。8% DMSO-1.5% glucose で保存された臍帯血については 8% DMSO-0.8% dextran のものに比べ, 全ての平均回収率に有意差は見られなかったが, FCM-CD45 領域の生細胞率が有意に高かった。

### 2) 新規開発凍害保護液の DMSO 濃度の検討

濃縮臍帯血を 2 等分し, 5% DMSO-1.5% glucose と 8% DMSO-1.5% glucose で凍結保存した臍帯血の解凍後の生細胞率と細胞回収率を比較したところ, 有核細胞数回収率, CD34 陽性細胞数回収率で 5% DMSO-1.5% glucose の方が高かった (表 2)。FCM-CD45 領域の生細胞率は 5% DMSO-1.5% glucose の方が有意に低かったが, FCM-CD34/CD45 領域の生細胞率及びコロニー産生細胞数回収率には差が無かった。

## 考 察

凍害保護液の代表的なものが DMSO である。分子量が小さく, その優れた膜浸透性によって細胞内に移行し, 水分子と強力な水素結合を形成し, 水分子同士の

結合を阻害する。この性質によって細胞内での氷晶形成を防ぎ、溶質の濃縮を防ぎ、細胞内浸透圧の上昇を抑制し、脱水による障害を防ぐ。Dextran は分子量が大きい細胞外にとどまり細胞外に粘性の高いガラス状態を作ることにより細胞内脱水を予防すると考えられている<sup>8)11)12)</sup>。本研究では、凍害保護液中の多糖の dextran (分子量 4 万) を単糖の glucose に代えた新しい組成の凍害保護液の検討を行った。Glucose は細胞膜を通過するのに膜輸送タンパクを必要とすることから、低温で混和、凍結される場合にはほとんどが細胞外にとどまり、Dextran 等の多糖類と同様の作用を持つと推測される。

Dextran に代わり glucose を用いた凍害保護液は、臍帯血バンクで現在使用している 8% DMSO-0.8% dextran と遜色ない良い結果をえた。臍帯血移植時に解凍した臍帯血の細胞を洗浄することについては、その利点とリスクを考慮し<sup>13)</sup>、多くの施設において洗浄を行わず、凍害保護液を含むまま輸注している。臍帯血輸注時の副作用については 2014 年度からの 3 年間に報告された副作用について造血幹細胞移植支援機関が集計、情報公開している<sup>14)</sup>。輸注時副作用のうち重篤なアナフィラキシーショック、アナフィラキシー、ショック、血圧低下と報告されているものが 3 年間に 10 件あった。臍帯血輸注時には凍結融解を経た赤血球、顆粒球等も同時に輸注されるため、これらによっても血圧低下等を含む輸注時の反応が誘引されると考えられるが、現在では DMSO と dextran を原因のひとつとして考慮する必要がある。凍害保護液に dextran が含まれない場合であれば dextran による副作用でのアレルギー反応は否定することができる。また DMSO による反応には悪心嘔吐や心血管系の反応等が報告されており<sup>15)~17)</sup>、上記集計では、血圧上昇 (発生率 0.47%)、血圧低下 (発生率 0.34%)、吐き気・悪心 (発生率 0.29%)、嘔吐 (発生率 0.16%)、除脈 (発生率 0.13%)、また一過性心房粗動、一過性洞停止、心拍数低下などは DMSO による副作用を疑うことができる。DMSO による副作用は投与量に依存するといわれており、自己造血細胞保存においてはしばしば凍結容量が大きいことから、凍害保護液の DMSO 量を減少させる手段がとられている<sup>16)</sup>。臍帯血移植においては約 25ml のユニット中、8% DMSO 量は 2ml である。体重当りの DMSO 投与量は小さいが、輸注時副作用の可能性が残されている。

本研究では、新規開発凍害保護液として適切な DMSO 濃度を設定するに当たり、8% と 5% の比較を行った。8% と 5% DMSO の比較についてはこれまでに報告はなく、dextran の代わりに glucose を用いた凍害保護液の検討は本論文が初めてである。5% DMSO-1.5% glucose と 8% DMSO-1.5% glucose の比較では細胞の回収率で

は 5% の方が良い傾向がみられた。白血球 (CD45+細胞) 領域の生細胞率は 8% に比べ低かったが、造血前駆細胞の指標 (CD34+細胞数及び CD34/CD45 領域生細胞率、コロニー産生細胞数) には影響しなかった。DMSO 濃度を下げようという試みはすでいくつか報告されている<sup>16)18)~21)</sup>。5% DMSO+6% pentastarch を用いた臍帯血凍結保存では、10% DMSO での凍結保存後と比較してコロニー形成細胞数には差を認めなかったが、融解後の時間経過では 5% DMSO+6% pentastarch の方が細胞生存率が高く保たれた<sup>18)</sup>。現在、日本赤十字社臍帯血バンクでは凍害保護液として 8% DMSO-0.8% dextran を使用しているが、移植時に解凍臍帯血が細胞の洗浄なく患者に輸注されることを考慮すると、生体にとっては DMSO 濃度の低減化は望ましいであろう。さらに輸注時副作用のリスクの少ないものを使用できることは患者にとって有益と考える。また検討した凍害保護液は国内で開発され生産される試薬であり、輸入される試薬に比べ、安定供給、搬送中の管理についても有利である。

凍害保護剤と濃縮臍帯血の混和については、濃縮臍帯血と等量の 2 倍濃度の DMSO-glucose を加える仕様となっているが、原液の DMSO 濃度が低いので注入速度が速く、短時間で注入が終了し、速やかに凍結を開始する事が出来た。しかしセグメント内の濃度の均一化には気を配る必要がある。

今後、解凍後の細胞の安定性、より長期保存での評価を加え、良好な結果が得られれば、5% DMSO-1.5% glucose は現行の 8% DMSO-0.8% dextran に代わりうる凍害保護液と考えられる。

著者の COI 開示：10% DMSO-3% glucose 及び 16% DMSO-3% glucose については、ゼノアックリソース社 (福島) より供与された。

## 文 献

- 1) 日本造血細胞移植データセンター/日本造血細胞移植学会. 日本における造血細胞移植. 平成 28 年度全国調査報告書. 2017.
- 2) 造血幹細胞移植情報サービス <http://www.bmdc.jrc.or.jp/>
- 3) C.POLGE C: Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79 degrees. Nature, 167: 949-950, 1951.
- 4) ASHWOOD-SMITH MJ: Preservation of mouse bone marrow at -79 degrees C. with dimethyl sulphoxide. Nature, 190: 1204-1205, 1961.

- 5) Makino S, Harada M, Akashi K, et al: A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing. *Bone Marrow Transplant*, 8: 239—244, 1991.
- 6) 牧野茂義：凍害防止剤 CP-1 の功績. *医学のあゆみ*, 250 : 596—597, 2014.
- 7) Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al: Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstruction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 10119—10122, 1995.
- 8) Nicoud IB, Clarke DM, Taber G, et al: Cryopreservation of umbilical cord blood with a novel freezing solution that mimics intracellular ionic composition. *Transfusion*, 52: 2055—2062, 2012.
- 9) Hedin H, Ljungström KG: Prevention of dextran anaphylaxis. Ten years experience with hapten dextran. *Int Arch Allergy Immunol*, 113: 358—359, 1997.
- 10) 河野弘明, 野村佳世, 川人伸次, 他：低分子デキストラン製剤によると思われるアナフィラキシーショックの1症例. *麻酔*, 61 : 1265—1268, 2012.
- 11) 前川 平：造血幹細胞の凍結保存と輸注. 編者 神田善伸, みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床, 改訂3版, 医薬ジャーナル社, 2016, 284—291.
- 12) Pegg DE: Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*, 368: 39—57, 2007.
- 13) Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, et al: Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank. *Transfusion*, 43: 1285—1295, 2003.
- 14) 臍帯血移植情報 <http://www.bmdc.jrc.or.jp/images/saitaiisyoku2017.pdf>
- 15) Shu Z, Heimfeld S, Gao D: Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant*, 49: 469—476, 2014.
- 16) Morris C, de Wreede L, Scholten M, et al: Should the standard dimethyl sulfoxide concentration be reduced? Results of a European Group for Blood and Marrow Transplantation prospective noninterventional study on usage and side effects of dimethyl sulfoxide. *Transfusion*, 54: 2514—2522, 2014.
- 17) Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Tamez-Gómez EL, et al: Dimethyl sulfoxide-induced toxicity in cord blood stem cell transplantation: report of three cases and review of the literature. *Acta Haematol*, 122: 1—5, 2009.
- 18) Hayakawa J, Joyal EG, Gildner JF, et al: 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and pentastarch improves cryopreservation of cord blood cells over 10% DMSO. *Transfusion*, 50: 2158—2166, 2010.
- 19) Veeraputhiran M, Theus JW, Pesek G, et al: Viability and engraftment of hematopoietic progenitor cells after long-term cryopreservation: effect of diagnosis and percentage dimethyl sulfoxide concentration. *Cytotherapy*, 12: 764—766, 2010.
- 20) Akkök CA, Liseth K, Nesthus I, et al: Autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved with 5 and 10 percent dimethyl sulfoxide alone give comparable hematopoietic reconstitution after transplantation. *Transfusion*, 48: 877—883, 2008.
- 21) Bakken AM, Bruserud O, Abrahamsen JF: No Differences in Colony Formation of Peripheral Blood Stem Cells Frozen with 5% or 10% Dimethyl Sulfoxide. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 12: 351—358, 2004.

## A NEW CRYOPROTECTANT CONTAINING DIMETHYL SULFOXIDE AND GLUCOSE FOR CORD BLOOD

Miyuki Ito<sup>1)</sup>, Atsuko Ogawa<sup>1)</sup>, Mutsuko Minemoto<sup>1)</sup>, Naoko Watanabe-Okochi<sup>1)</sup>, Tadashi Nagai<sup>1)2)</sup>, Kazunori Nakajima<sup>1)</sup> and Minoko Takanashi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center

<sup>2)</sup>Japanese Red Cross Blood Service Headquarters

### **Abstract:**

In Japan, the use of cord blood as a source of stem cells for transplantation has increased every year since the first unrelated cord blood transplantation was carried out in 1997. At the Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Cord Blood Bank, we use a cryoprotective agent comprising 8% dimethyl sulfoxide (DMSO) containing 0.8% dextran (8D0.8D) to cryopreserve umbilical cord blood. Given that cord blood is usually transplanted to a recipient without washing, DMSO is also infused with cord blood intended for the recipient. Because DMSO has toxic effects on the human body, it is used at as low a concentration as possible. Polysaccharide dextran is also a reported anaphylactic factor in clinical cases.

In this study, we examined new cryoprotectant formulations comprising a mixture of monosaccharide glucose in DMSO instead of dextran: 5% DMSO-1.5% glucose (5D1.5G) and 8% DMSO-1.5% glucose (8D1.5G). Cryoprotection with 5D1.5G produced significantly higher recovery and viability rates of CD34+ cells compared to that with 8D0.8D. In addition, cryoprotection with 5D1.5G showed significantly higher recovery rates of nucleated cells and CD34+ cells than that with 8D1.5G. Our results suggest that the new cryoprotectant 5D1.5G may effectively replace 8D0.8D for cryoprotection of cord blood.

### **Keywords:**

unrelated cord blood transplantation, cryoprotectant, DMSO, dextran, glucose