

＜参考資料＞ 骨髄液の凍結保存・解凍・輸注 【暫定版】

はじめに

本参考資料は、2020年に流行した新型コロナウイルス感染の拡大及び防止の観点から、特に同種骨髄移植ドナーから採取した骨髄を凍結する需要が高まったことを受け、急遽骨髄液の凍結保存・解凍・輸注方法をまとめたものである。本資料は、骨髄液を凍結保存するための手順について、日本輸血・細胞治療学会及び日本造血細胞移植学会が共同で作成した「造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト」を補完するものであり、詳細は、下記のサイトから手順をダウンロードして、確認すること。

http://yuketsu.jstmct.or.jp/medical/medicine_and_medical_information/reference/

「骨髄液からの赤血球除去(テキスト第11章)」は、同種骨髄移植において、レシピエントとドナーがABO主不適合、レシピエントがRhD陰性でドナーのRhDが陽性の場合やレシピエントにドナーの赤血球抗原に対する不規則抗体を保有する場合など、またはこれらの組み合わせの場合に必須となる。また、近年ではほとんど実施されないが、自家骨髄移植を実施する場合には、予め採取した自家の骨髄液から赤血球を除去し、単核細胞に分離し凍結する。一方、ドナーの状況や都合等で同種骨髄移植ドナーの骨髄液を凍結保存する場合は、レシピエントとドナーのABO、RhD血液型などの適合・不適合に関わらず、凍結前に骨髄液から赤血球除去を行うことが重要である。レシピエントとドナーの血液型が同型であっても、骨髄液中に赤血球の混入が多い状態で凍結し解凍すると、溶血等によって移植後に臨床的影響を与える。骨髄液から赤血球を除去する方法には、第11章で示したように機器を用いる方法^{1)~4)}と手作業を含む手法の2つがある。汎用されている血液成分分離装置には、Spectra Optia™(TERUMO BCT社)やCOM.TEC™(Fresenius社)、比重液のFicoll液を用いるコンパクトなSEPAX™(Biosafe社)などがある³⁾。一方、手法の分離操作は、熟練と労力を要するため基本的には推奨しない。

次に赤血球除去した骨髄液の凍結保存法であるが、従来から DMSO (Dimethyl sulfoxide)を凍害保護液として終濃度 10%になるように混合し、プログラムフリーザーを用いて緩速凍結を行い、最終的に-196℃の液体窒素内で保存する方法が一般的である。しかし、5%DMSO、6%HES (Hydroxyethyl starch)、4%アルブミンを用いてプログラムフリーザーを用いない-80℃の簡易凍結法で骨髄細胞を保存し、造血の再構築が可能であると報告されている^{5) 6)}。また、我々も骨髄液の CD34 陽性細胞を濃縮し、同様に 5% DMSO、6%HES、4%アルブミンを用い-80℃の簡易凍結法で、コロニー形成能と表面抗原の経時的変化を検討し、骨髄再構成を報告している⁷⁾。第10章「末梢血幹細胞の処理と凍結保存」で示したように、末梢血幹細胞の凍結法も簡便さと経費の軽減から、近年はプログラムフリーザーによる緩速凍結法にかわって簡易凍結法が広く用いられている。

凍結された骨髄液の解凍法は、第13章「造血幹細胞の融解と輸注」の項で示したように、骨髄細胞の解凍は細胞内外の浸透圧や細胞障害の影響を最小限にするために、37℃に保った恒温槽で急速に解凍することが重要である。

骨髄分離や凍結保存は、細胞調製に熟練した作業員または熟練した作業員の指導の下に行うこと。細胞処理中に問題が発生した場合には、速やかに上長および移植担当医と連携すること。また、これらの骨髄液の処理においては「作業工程記録書」「結果報告書」に記載することが重要である。

(1) 骨髓液の凍結法フローチャート

<赤血球除去処理: 第 11 章に準ずる>

骨髓液中の赤血球を閉鎖回路の血液成分分離装置を用いて除去する
(CD34陽性細胞数は可能であれば参考として測定)

<赤血球残量、細胞数測定>

(CD34 陽性細胞数: 可能であれば参考として測定)

赤血球除去後の骨髓液のヘマトクリット値 (Ht%) を測定し、赤血球の残量を計算する*
有核細胞数を測定する。(CD34陽性細胞数は可能であれば参考として測定)

<凍結処理: 第 10 章に準ずる>

赤血球除去された骨髓細胞を末梢血幹細胞の凍結方法に従い、簡易凍結法またはプログラムフリーザーで凍結し、 -80°C 冷凍庫または -196°C の液体窒素タンクで保存する。検査用サンプルの凍結保存とそれを用いた手技の検証(生細胞数や CD34 数測定)が望ましい。

<解凍操作: 第 13 章, 生細胞数測定: 第 7 章に準ずる>

凍結細胞バッグを滅菌袋に入れ、 37°C の恒温槽で急速に解凍する
解凍後の洗浄は行なわない。生細胞率、有核細胞数を測定する
(CD34陽性細胞数は可能であれば参考として測定)

* 日本骨髓バンクの**血液型主不適合**の末梢血幹細胞移植時の赤血球除去の量に準ずる赤血球残量が多い場合には、移植担当医とも相談し、必要に応じて再度赤血球除去を試みる。

(2) 血液成分分離装置を用いた赤血球除去

骨髓液を凍結する場合は、前述したように凍結操作前に赤血球除去を必ずおこなう必要がある。無菌閉鎖回路にて赤血球、白血球および血漿に分離し、白血球成分の単核細胞層を濃縮採取をおこなう(図1)。血液成分分離装置は Spectra Optia™ と COM.TEC™、Ficoll 液を用いて単核細胞分離する SEPAX™ が用いられている。現在、COBE Spectra™ は、本体・キット共に販売終了しており、後続機種は、Spectra Optia™ となっている。処理後は骨髓液のヘマトクリット値を測定し赤血球の残量を計算する。また、有核細胞数を測定する。CD34 陽性細胞数は、可能であれば測定し、血球分離から凍結保存・解凍において損失の評価に用いる。

1) 骨髓液からの赤血球除去 (第11章「骨髓液からの赤血球除去」参照)

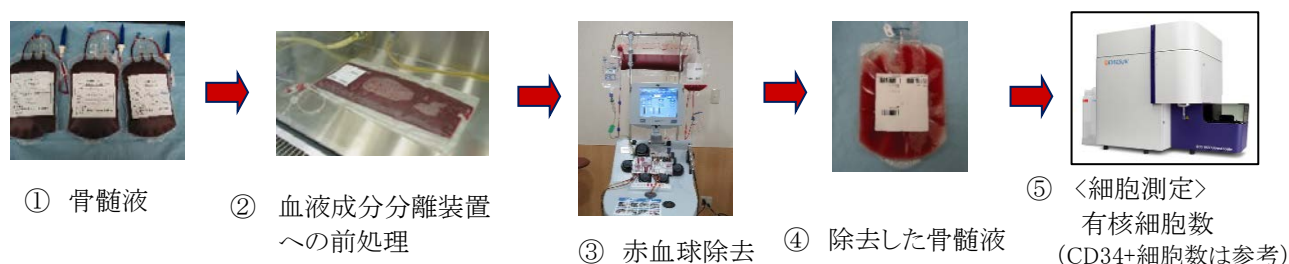


図1 自動血液成分分離装置を用いた赤血球除去 (Spectra Optia™)

赤血球除去の処理方法は第11章「骨髓液からの赤血球除去」を参照し、自施設で使用している血液成分分離装置を用いて、単核細胞層を濃縮する取扱い説明書に従い実施する。

代表的な血液成分分離装置(3機種)を用いた赤血球除去の成績を表にまとめたので下記に示す。

表1 血液成分分離装置による骨髓液の処理^{1)~3)}

	Initial BM		Final product		Recovery (%)	
	Volume (ml)	RBCs (ml)	RBCs (ml)	RBC depletion (%)	NCs	CD34+ cells
SEPAX (n=13) ³⁾	1,083±264 (650-1700)	305.7±67.5 (150.2-433.5)	1.3±0.6 (0.7-2.8)	99.6±0.2 (99.0-99.8)	16.0±15.0# (8.0-28.8)	49.1±22.8 (12.6-90.0)
COBE Spectra (n=114) ¹⁾	1,099±385 (390-2,450)	309.9±117.7 (107.3-647.2)	4.0±1.8 (0-10.99)	98.6±0.6 (95.1-100)	33.66±12.2 (10.3-76.3)	82.2±21.1 (26.7-159.8)
COBE Spectra (n=52) ²⁾	1,300 (957-1,791)	366.6 (99-574.9)	9.8 (2.3-26.1)	97.5 (68.3-99.3)	36.8 (17.7-24)	84.5 (45.1-363.8)
Spectra Optia (n=28) ²⁾	1,373 (703-1,792)	432.4 (208.8-647.1)	5.2 (1.3-9.9)	98.7 (97.4-99.6)	61.6 (29-100)	97.7 (52.9-198.3)

BM, bone marrow; RBCs, red blood cells; NCs, nucleated cells; #MNCs, mononuclear cells.

血液成分分離装置(3機種)による処理後の赤血球の除去率はすべて97%以上を示し、赤血球残量の平均値は10mL以下と低値を示している(表1)。特に比重液のFicoll液を用いるSEPAXは1.3±0.6(mean±SD)とほとんど赤血球は除去される³⁾。近年、各移植施設で汎用されているSpectra Optia™の報告をみても赤血球残量は、平均5.2mL(1.3-9.9)と低値を示している²⁾。また、骨髓細胞として重要なCD34陽性細胞の回収率も平均97.7%と高値を示している。

(3) 赤血球除去した骨髓液(骨髓細胞)の凍結

前述したが骨髓液の凍結保存には、大きく分けて二つある。①終濃度 10%DMSO でプログラムフリーザーを用いて液体窒素中で保存する方法と②凍害保護液の終濃度 5%DMSO、6%HES、4%アルブミンとして、-80℃低温冷凍庫や液体窒素内で保存する簡易凍結法がある^{5)~7)}。ここでは、本邦で汎用されている簡易凍結法を示す。骨髓液の具体的な凍結法は、赤血球除去した骨髓細胞を第10章「末梢血幹細胞の処理と凍結保存」で示した末梢血幹細胞の簡易凍結法に準じておこなう(図2)。

1) 骨髓液の簡易凍結保存 (第10章「末梢血幹細胞の処理と凍結保存」参照)

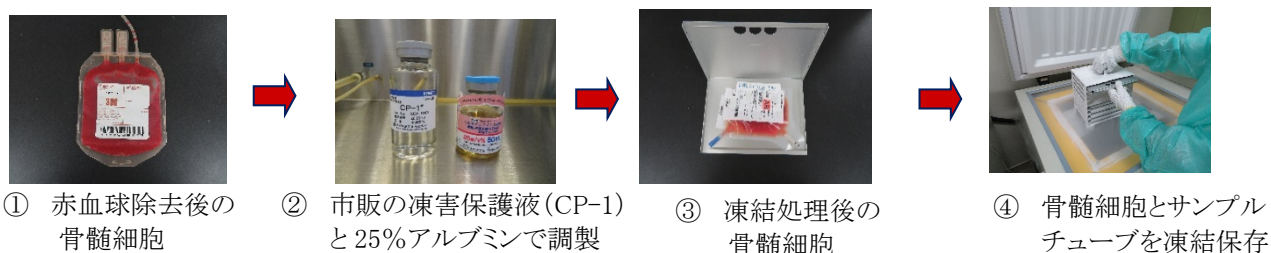


図2 赤血球除去後の骨髓細胞 簡易凍結保存

(4) 赤血球除去した骨髓液(骨髓細胞)の解凍と輸注

低温で凍結された細胞の解凍は、細胞外の水成分が細胞内より先に解けはじめ、浸透圧が低値を示し水成分が細胞内へ潜入するため、細胞が膨張して細胞障害を与える。また、凍結された固相から液相に移行する時間をかけてしまうと、再氷晶形成が生じ細胞に障害が起きる。解凍過程の再結晶化による細胞内氷晶形成を避けるためには、急速に 37℃で解凍することが重要である(図3)。また、通常は細胞と混合された凍害保護液の DMSO や HES の副作用は軽微であり、解凍後の DMSO は短時間であれば細胞障害も少ないため、洗浄操作は必要ないとされている⁸⁾。解凍後は、有核細胞数、生細胞率の測定をおこなう必要がある。CD34 陽性細胞は、可能であれば測定し参考とする。また、解凍後の移植細胞は、室温では保護液に含まれる DMSO によって傷害されるため、迅速に投与しなければならない。

1) 骨髓液(骨髓細胞)の解凍と輸注 (第13章「造血幹細胞の融解と輸注」参照)

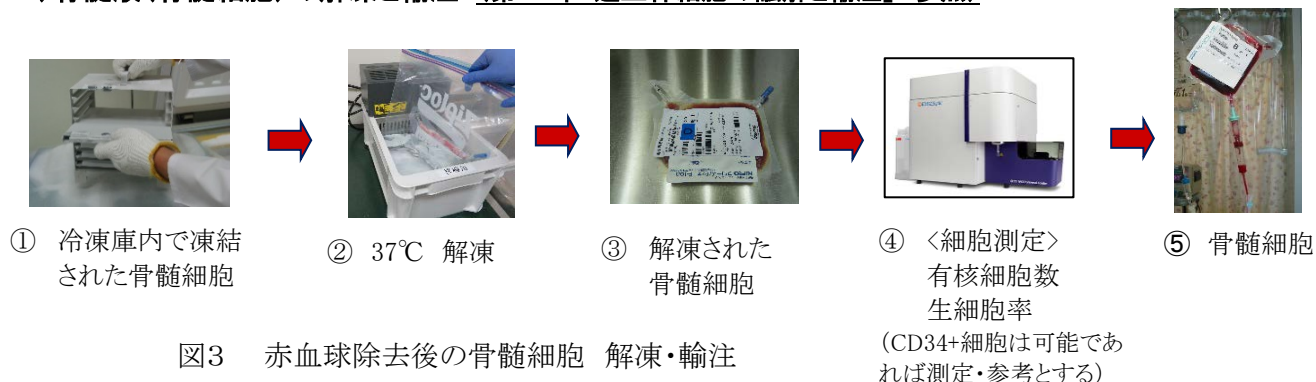


図3 赤血球除去後の骨髓細胞 解凍・輸注

(5) 機器管理・処理工程

1) 管理

骨髓液の赤血球除去から凍結・解凍の工程は、「院内における血液細胞処理のための指針」⁹⁾に従った操作、管理が必要である。

2) 処理工程記録

細胞処理工程に対する標準作業手順書(SOP)を整備し、それに従って実施する。記録においても細胞処理工程ごとに作業者が行うべき内容を明記し、記録する「作業工程記録書」を作成する。

参考文献

- 1) Larghero J, Rea D, Esperou H, et al. ABO-mismatched marrow processing for transplantation: results of 114 procedures and analysis of immediate adverse events and hematopoietic recovery. *Transfusion*. 2006; 46:398-402.
- 2) Méndez GA, Arroyo JL, Amunárriz C, et al. ABO-mismatched Marrow Processing for Transplantation: Comparative Results of 80 Procedures Performed With Cobe Spectra and Spectra Optia. *Transfus Apher Sci*. 2019; 58:326-331.
- 3) 岸野光司, 中木陽子, 小野崎文子, 他. 移植のために採取された骨髓液から自動細胞分離 SEPAX™ を用いた単核細胞の分離. *日本輸血細胞治療学会誌*. 2012;58:456-462.
- 4) Soydan E, Ayyildiz E, Dalva K, et al. Impact of harvest product volume in erythrocyte depletion of allogeneic or autologous bone marrow using COBE spectra. *Transfus Sci*. 2007; 36:269-273.
- 5) Stiff PJ, Murgo AJ, Zaroulis CG, et al. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. *Cryobiology*. 1983; 20:17-24.
- 6) Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood*. 1987; 70:974-978.
- 7) 岸野光司, 鈴木俊之, 室井一男, 他. 自家骨髓移植術における簡易凍結法下の造血幹細胞の経時的変化. *今日の移植*. 1994 ;7:381-383.
- 8) Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO Exposure Without Cryopreservation on Hematopoietic Progenitor Cells. *Bone Marrow Transplant*. 1993 ;11 :389-393.
- 9) 田野崎隆二, 室井一男, 長村登紀子, 他: 院内における血液細胞処理のための指針. *日本輸血細胞治療学会誌*. 2011 ;57:184-187.

(自治医科大学附属病院 輸血・細胞移植部 岸野 光司)