原著

ステリセルプロセッサの末梢血幹 細胞分離及び凍結保存への適用

柴田 浩二* 高橋 恒夫*² 茂木 祐子*²
細田 真理*² 門脇 絵美*² 石田 登*
中瀬 俊枝*² 関口 定美*²

Application of SteriCell Processor for Isolation and Cryopreservation of Peripheral Blood Stem Cells

Koji Shibata, Tsuneo A. Takahashi*², Yuko Mogi*²,
Mari Hosoda*², Emi Kadowaki*², Noboru Ishida*,
Toshie Nakase*² and Sadayoshi Sekiguchi*²*

**Terumo Corporation*

818 Misonodaira, Fujinomiya, Shizuoka, 418 Japan.

**²Hokkaido Red Cross Blood Center*

2-2 Yamanote, Nishi, Sapporo, 063 Japan.

Abstract

Peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation has been widely accepted as a treatment for hematologic and other malignancies. PBSCs are harvested by leukapheresis, but the harvest is usually contaminated with red cells, platelets and granulocytes. Post-leukapheresis processing is required to purify mononuclear cells (MNC) which contain PBSCs from other contaminating cells to cryopreserve stem cells with good recovery. However, the procedure is time-consuming, complex, and has a hazard of contamination.

The SteriCell processor is designed to purify MNC by density gradient separation using Ficoll-Paque and wash them with saline automatically in a closed system. In the automated process, the mean recovery of MNC and hematopoietic progenitor cells from the leukapheresis product was 77 and 75%, respectively. Recoveries of MNC, CFU-GM, and BFU-E after cryopreservation were 89.5%, 73.7%, and 45.4%, respectively. The SteriCell processor should be useful to purify MNC from the leukapheresis product in a short time in a closed system.

1. はじめに

自己末梢血幹細胞移植は末梢血液中の造血幹細胞を骨髓の再構築に利用するガンの化学療法

* テルモ(株)

*²北海道赤十字血液センター

(原稿受付：1992年12月24日)

副作用対策の1つであり、化学療法終了後にアフエレーシスにて造血幹細胞を採取・凍結保存し、大量化学療法施行後に再輸注し、正常な骨髓機能の回復を図るものである¹⁻³⁾。その特徴として、①HLA 適合ドナーを必要とせず、移植片対宿主反応等の合併症がない、②全身麻酔を行う必要がない、③移植後の骨髓機能回復が早い等があげられる^{1,4)}。しかし、アフエレー

(2) 医器学 Vol. 63, No. 2 (1993)

図 1 実験フローチャート

シスにより採取された血液（白血球を多く含む）からの単核球分離や凍結保存等については、無菌室あるいはクリーンベンチ内での作業を必要とし、手順も複雑であり、未だシステム化されていない。

ステリセルプロセッサー (SteriCell Processor, テルモ株式会社, 東京) は、大量の細胞を無菌的に分離・洗浄するために開発された装置であり、これまでリンホカイン活性化キラー細胞、腫瘍浸潤リンパ球等の養子免疫療法に応用されてきた^{5,6)}。この装置の特徴は、①自動作業モードにより複雑な操作を必要とせずに短時間で全血から単核球を分離・洗浄することができること、②本装置の回路と細胞浮遊液、緩衝液、培地とを無菌接合装置 (SCD : Sterile Connecting Device, SCD II B, テルモ) にて無菌的に接合することにより、クローズドシステムにて細胞を処理できること、である。

今回、われわれはステリセルプロセッサーの末梢血幹細胞移植への適用を検討するため、本機を用いてアフレーシス製剤からの単核球の分離・洗浄と凍結保存後の細胞の洗浄を行い、各細胞と血液幹細胞の回収について、図 1 に示したフローチャートに従い検討した。

2. 材料及び方法

2-1. ステリセルプロセッサーの構成

ステリセルプロセッサーは、遠心機・ベリスタポンプ・開閉バブル等より構成される (図 2 a, 図 2 b)。このステリセルプロセッサーにステリセルプロセッサー回路 (遠心ボウル・採集用バッグ・廃液用バッグから構成) を装着し、コントロールパネル上で自動または手動操作す

図 2 a ステリセルプロセッサーの外観

図 2b ステリセルプロセッサの概略

A : コントロールパネル,
B : 遠心器, C : 遠心ボウル,
D : 開閉バルブ, E : ポンプ,
F : 重量計, G : 採集バッグ,
H : 廃液バッグ

ることが可能である (図 2 b)。

2-2. 血液の採取

アフエーシスは、同意を得た22歳から44歳までの健常成人男子 (平均年齢33.8歳) ボランティアより、CS-3000 Plus (Baxter Healthcare, Roundlake, IL, USA) にて実施した。チャンパーは A-35 或いは SVCC (small volume collection chamber) 採取チャンパーを使用し、A-35 チャンパーでは“リンパ球採取”モード# (procedure 3), SVCC チャンパーでは“Stem Cell Collection”モード# ヘット (100 program, インターフェース感度値: 80) にて行った。抗凝固剤は ACD-A 液を使用し、採血速度 50 ml/min, 返血速度 50 ml/min, 回転数 1,600 rpm, 全血処理量 5,000 ml にて実施した。

2-3. 単核球細胞の分離

ステリセルプロセッサの回路にアフエーシスで採取した血液細胞の入ったバッグ, Ficoll-Paque (比重 1.077 g/ml : Pharmacia, Uppsala, Sweden), ハンクス液 (HBSS : Hanks' balanced salt solution, Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含有) を SCD II B にて接続し (図 3), “Gradient Separation” モードで単核球を採取した

図 3 ステリセルプロセッサ回路の配置図

▶◀.....SCDによる接合部位

(図 4)。最初に、3,000 rpm にて回転しているがボウル内を 250 ml の緩衝液で満たした後、血液をボウル内に注入し (図 4-A), 続いて Ficoll-Paque をボウル内に注入した。ボウルの回転数を 5,600 rpm に上げ、Ficoll-Paque で単核球層と赤血球層とを分離した (図 4-B), Ficoll-Paque により比重の軽い血漿, 単核球層はボウルの内側へ移行し、最初に血漿がボウルから流出し、続いて単核球層が流出し始めたとき、この単核球層を採取した (図 4-C)。単核球層を約 100 ml 採取後、採取を終了した (図 4-D)。

次に、採取された単核球細胞から Ficoll-Paque を除去するため、“Wash”モードにて単核球を洗浄した。最初に、採取した単核球を 250 ml の HBSS にて希釈した後、3,000 rpm にて回転しているボウル内に単核球を注入し、ボウルの回転数を 5,400 rpm に上げた。

続いて、RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) をボウル内に注入し同時にボウルの回転数を 4,400 rpm に低下させた。ボウルへの RPMI-1640 の注入停止後、ボウルの回転数を 5,400 rpm に上げた。これを 1 サイクルとして、12 サイクル繰り返して、洗浄した単核球を回収し

図 4 ステリセルプロセッサによる単核球分離

A : 血液注入, B : Ficoll-Paque 注入,
C : 単核球採取, D : 終了

た. 単核球採取及び洗浄に各々約30分を要した.

2-4. 凍結保存

分離した単核球細胞の凍結保存は Takaue 等の方法⁷⁾に準じ, $1-2 \times 10^8/\text{ml}$ に調製した単核球細胞に, 20% 牛胎児血清 (FCS: fetal calf serum, 免疫生物研究所, 群馬), 20% ジメチルスルフォキシド (Me_2SO : dimethyl sulfoxide, Sigma) を含む RPMI-1640 を等量混合した. 凍結用バッグ (Cryocyte Freezing Container, Baxter) に分注し, プログラムフリーザー (Cryo-Med, Mt. Clemens, MI, USA) を用いて $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ にて -80°C まで凍結した. 次に, バッグを凍結保存用ストッカー (Cryo Plus, Cryo-Med) 内で液体窒素に直接浸して -196°C にて 1~2 週間保存した.

解凍は 37°C の恒温水槽にバッグを浸して急速解凍を行い, ステリセルプロセッサを用い, “Wash” モードにて洗浄し, 生理食塩水に単核球細胞を浮遊させた.

2-5. 造血幹細胞数と生存率の測定

造血幹細胞数の測定は, 2×10^5 個の細胞を 30% FCS (免疫生物研究所), 1% 牛血清アルブミン (Sigma), $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2-メルカプトエタノール (半井化学, 京都), 10 ng/ml インターロイキン-3 (キリンビール, 東京), 10 ng/ml 顆粒球コロニー刺激因子 (中外製薬, 東京), 2 U/ml エリスロポエチン (中外製薬), 1.2% メチルセルロース (室町化学工業, 東京) を含

むメチルセルロース半固型培地 1 ml にて 37°C , 5% CO_2 インキュベーター内で14日間培養し, 顆粒球マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM), 赤芽球コロニー群形成細胞 (BFU-E), 混合コロニー形成細胞 (CFU-mix) 数を算定した⁸⁾.

生存率は, トリパンブルー (最終濃度; 0.5%) による色素排泄試験⁹⁾にて測定を行った.

血球数の算定は自動血球計数装置 (Coulter Counter S-plus IV, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) で行った.

3. 結 果

3-1. 採取チャンバーによるアフェレーシス製剤の比較

SVCC では, 採取量 50 ml 中に平均 $7.84 \pm 2.01 \times 10^9$ (Mean ± 1 SD, $n=5$) 個の単核球が採取され, 処理血液 5,000 ml からの回収率は $47.2 \pm 4.2\%$ であった (表 1). A-35 では, 採取量 200 ml に単核球は $7.62 \pm 1.91 \times 10^9$ 個 ($n=3$) 採取され, SVCC と同等であったが, 回収率は $57.4 \pm 1.0\%$ と SVCC に比べ高い値を示した. 顆粒球, 赤血球及び血小板数は SVCC で $3.5 \pm 4.8 \times 10^8$, $3.1 \pm 0.8 \times 10^{10}$ 個, $2.6 \pm 1.1 \times 10^{11}$ 個, A-35 では $4.8 \pm 2.0 \times 10^8$ 個, $23.4 \pm 3.7 \times 10^{10}$ 個, $5.3 \pm 1.1 \times 10^{11}$ 個混入しており, A-35 の方が単核球以外の細胞の混入が多い傾向がみられた.

表 1 2種の採取チャンバーによるアフエーシス製剤の血球組成

Chamber	MNC ($\times 10^9$)	MNC 回収率(%)	Granulocyte ($\times 10^9$)	RBC ($\times 10^{10}$)	PLT ($\times 10^{11}$)
SVCC*	7.84 $\pm$ 2.01	47.2 $\pm$ 4.2	0.4 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 1.1
A-35**	7.62 $\pm$ 1.91	57.4 $\pm$ 1.0	0.5 $\pm$ 0.2	23.9 $\pm$ 3.7	5.3 $\pm$ 1.1

(* : n=5, ** : n=3)

MNC:単核球, Granulocyte:顆粒球, RBC:赤血球, PLT:血小板

表 2 ステリセルプロセッサ処理前後における各細胞の濃度

	MNC ($\times 10^9$)	Granulocyte ($\times 10^9$)	RBC ($\times 10^{11}$)	PLT ($\times 10^{11}$)
処理前	7.71 $\pm$ 1.68	0.54 $\pm$ 0.31	1.07 $\pm$ 1.03	3.13 $\pm$ 1.90
処理後	5.91 $\pm$ 1.31	0.08 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.58
	回収率(%)	除去率(%)	除去率(%)	除去率(%)
	77.3 $\pm$ 10.4	87.9 $\pm$ 7.1	80.0 $\pm$ 14.1	51.1 $\pm$ 13.2

(n=10)

表 3 ステリセルプロセッサ処理前後における血液幹細胞の回収率

	CFU-GM ($\times 10^5$)	BFU-E ($\times 10^5$)	CFU-mix ($\times 10^5$)	CFU-C ($\times 10^5$)
処理前	1.15 $\pm$ 0.72	5.02 $\pm$ 2.81	0.28 $\pm$ 0.13	6.33 $\pm$ 3.07
処理後	0.92 $\pm$ 0.76	3.34 $\pm$ 1.47	0.12 $\pm$ 0.05	4.32 $\pm$ 1.56
回収率(%)	74.4 $\pm$ 37.7	74.0 $\pm$ 24.0	58.9 $\pm$ 50.8	75.4 $\pm$ 20.8

(n=10)

3-2. ステリセルプロセッサ処理前後における各細胞数の変化

ステリセルプロセッサ処理後, 平均 5.91 $\pm$ 1.31 $\times 10^9$ 個 (n=10) の単核球が回収され, 回収率は 77.3 $\pm$ 10.4% であった (表 2). また, 赤血球, 顆粒球の除去率はそれぞれ 80.0 $\pm$ 14.1%, 87.9 $\pm$ 7.1% であったのに比べ, 血

小板除去率は 51.1 $\pm$ 13.2% と低かった. 造血幹細胞の回収率は CFU-GM, BFU-E においてそれぞれ 74.4 $\pm$ 37.7%, 74.0 $\pm$ 24.0% であり, 単核球の回収率と同等な値を示しており (表 3), ほぼ全ての造血幹細胞が回収された.

3-3. 凍結保存後の幹細胞の回収率

プログラムフリーザーにより 5°C から -74

表 4 凍結保存前後における各細胞の回収率

	MNC ($\times 10^9$)	生存率 (%)	CFU-GM ($\times 10^5$)	BFU-E ($\times 10^5$)	CFU-C ($\times 10^5$)
処理前	3.09 $\pm$ 2.03	97.9 $\pm$ 0.9	0.92 $\pm$ 0.56	2.16 $\pm$ 1.91	3.10 $\pm$ 2.45
処理後	2.76 $\pm$ 1.77	79.1 $\pm$ 10.9	0.66 $\pm$ 0.37	0.93 $\pm$ 0.78	1.60 $\pm$ 1.09
回収率(%)	89.5 $\pm$ 10.9		73.7 $\pm$ 12.3	45.4 $\pm$ 4.8	55.4 $\pm$ 8.0

(n=3)

℃ まで $-0.9^\circ\text{C}/\text{min}$ で冷却した。37℃恒温水槽にて解凍に要した時間（最後の氷塊が溶けるまでの時間）は約 1.5 分であった。

凍結保存後の単核球の回収率は 89.5 $\pm$ 10.9%，生存率は 79.1 $\pm$ 10.9% であった（表 4）。CFU-GM の回収率は 73.7 $\pm$ 12.3% であったのに比べ、BFU-E 及び全コロニー形成細胞（CFU-C）では 45.4 $\pm$ 4.8, 55.4 $\pm$ 8.0% と回収率は低かった。

4. 考 察

アフエレーシスに SVCC, A-35 の 2 つのチャンパーを使用した結果、A-35 に比べ SVCC ではアフエレーシス製剤への顆粒球、赤血球、血小板の混入が少なかった（表 1）。しかし、SVCC では処理血液からの単核球の回収率も A-35 と比較すると低下しており、単核球の回収率を向上させるためには採血・返血速度及び採取範囲（インターフェース感度値）等のより詳細な調整が必要であり、現在検討をすすめている。

ステリセルプロセッサの末梢血幹細胞移植への適用について検討した結果、ステリセルプロセッサはクローズドシステムにて単核球を分離することができ、従来の用手法に比べ操作が簡便で、分離・洗浄時間が約 1 時間と用手法が約 2 時間かかるのに比べ短時間に単核球を回収することが可能であった。単核球の回収率は 77%（表 2）と Hillyer 等¹⁰⁾ の報告とほぼ同様な結果が得られた。顆粒球・赤血球の除去率は 80% 以上と高かったが、血小板の除去率は

平均 51% と低かった。血小板の混入は凍結融解操作における血小板凝集による幹細胞の回収率の低下を招く可能性がある。血小板の混入を抑える方法としては、①アフエレーシス時の血小板の混入を少なくする、②ステリセルプロセッサにて単核球分離時に血小板を除去する、2 つの方法が考えられる。患者への負担をできるだけ少なくすることを考慮すると、血小板混入をできるだけ少なくするアフエレーシスプログラムにて採取することが必要であるし、一方で、単核球分離において血小板を回収し、それを患者へ戻すことも考えられる。したがって、ステリセルプロセッサ及びアフエレーシスの操作法の両面から血小板の混入をできるだけ少なくする方法を検討していく必要がある。

凍結保存後のステリセルシステムの適用については、単核球及び CFU-GM の回収率は 70% 以上の値を示していたのに対し（表 4）、CFU-C の回収率は 55%、BFU-E は 45% とその回収率は低かった。CFU-C のうち、約 7 割を BFU-E が占めており、CFU-C の回収率の低下は BFU-E の回収率の低下に起因しているものと考えられる。BFU-E の回収率の低下は、阿部等¹¹⁾ が凍結融解操作により赤芽球系の幹細胞が破壊されやすいことを報告しており、今回の BFU-E の回収率の低下はステリセルプロセッサによる処理に起因しているものではなく、BFU-E の凍結融解に対する感受性が CFU-GM より高いことに起因するのではないかと考えられる。

現在行われている末梢血幹細胞移植では、移

植に必要な数の造血幹細胞を採取するためには1～2週間にわたり頻回のアフエーシスを必要とする^{4,12)}。G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) の投与により末梢血中の造血幹細胞が増加することが報告されており¹³⁾、化学療法後の白血球の立ち上がり時期 (nadir) に G-CSF を投与しようとする試み¹⁴⁾ もなされてきている。G-CSF による幹細胞の末梢血中への動員が可能となれば、より少ないアフエーシス採取量で末梢血幹細胞移植が可能であろう。一方, in vitro において単核球中の CD34⁺ 細胞を精製・培養し、造血幹細胞を増幅させる研究¹⁵⁾ が近年行われており、十分な増幅が可能であれば、他家末梢血幹細胞移植への道が開かれるであろう。ステリセルプロセッサーはクローズドシステムで造血幹細胞の精製、培養法を組み合わせていくことを可能にし、末梢血幹細胞移植において将来いろいろな展開が可能な機器と考える。

5. 結 論

アフエーシスからの血液幹細胞移植におけるステリセルプロセッサーの適用について検討を行い、以下の結果を得た。

(1) アフエーシス採取白血球からのステリセルプロセッサー処理による単核球及び造血幹細胞の回収率は約 75% であった。

(2) 凍結融解後、ステリセルプロセッサーにて洗浄した後の BFU-E の回収率は 45% であったが、CFU-GM の回収率は 75% であった。

(3) ステリセルプロセッサーは、造血幹細胞の採取から保存・移植までをクローズド化することができ、より安全な末梢血幹細胞移植を可能にすると考える。

文 献

- 1) 二宮恒夫, 他: 自家末梢血幹細胞移植術, 日本臨床, 48: 2951-2960, 1990.
- 2) McCarthy, D. M., et al.: Transfusion of circulating stem cells, CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 20: 1-24, 1984.
- 3) Bell, A. J., et al.: Circulating stem cell autografts, Bone Marrow Transplant, 1: 103-110, 1986.

- 4) 権藤久司, 他: 骨髓採取術と細胞選別の目的と方法, 臨床免疫, 20: 551-560, 1988.
- 5) Ryan, T., et al.: Lymphokine-activated killer cell generation and recovery, Comparison of an automated cell processing device and a manual procedure, Transfusion, 29: 491-495, 1989.
- 6) Toparian, S. L., et al.: Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: A pilot study, J. Clin. Oncol., 6: 839-853, 1988.
- 7) Takaue, Y., et al.: Isolation and storage of peripheral blood hematopoietic stem cells for autotransplantation into children with cancer, Blood, 74: 1245-1251, 1989.
- 8) Fauser, A. A., et al.: Granulo-erythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and cord blood, Blood, 52: 1243-1248, 1978.
- 9) 中井準之助, 他: 組織培養, 58 朝倉書店, 1973.
- 10) Hillyer, C. D., et al.: Density gradient separation of peripheral blood stem cells: comparison of an automated cell processing device and manual methods, Transfusion, 30: 824-827, 1990.
- 11) 阿部孝典, 他: 末梢血幹細胞凍結保存法の検討, 医学のあゆみ, 162: 235-236, 1992.
- 12) Lasky, L. C., et al.: Peripheral blood stem cell collection and use in Hodgkin's disease. Comparison with marrow in autologous transplantation, Transfusion, 29: 323-327, 1989.
- 13) Fukuda, M., et al.: Recombinant human granulocyte colony stimulating factor enhances the release of peripheral blood stem cells following chemotherapy in childhood malignancies, Acta Haematol. Jpn., 53: 916-922, 1990.
- 14) 葛山由布子, 他: PB SCT を目的とした末梢血幹細胞の大量採取法, 臨床血液, 33: 1443, 1992.
- 15) Saeland, S., et al.: Combined and sequential effects of human IL-3 and GM-CSF on the proliferation of CD 34⁺ hematopoietic cells from cord blood, Blood, 73: 1195-1201, 1989.