原著

血液細胞の凍結保存用バッグの開発と評価

城野 栄次* 薬師寺千明* 高橋 恒夫*²
門脇 絵実*² 瀬川紀美子*² 橋本 浩司*²
千葉 清司*² 関口 定美*²

Development and Evaluation of a Freezing-stable Bag
for Cryopreservation of Blood Cells

Eiji Kino^{*1}, *Chiaki Yakushiji*^{*1}, *Tsuneo A. Takahashi*^{*2},
Emi Kadowaki^{*2}, *Kimiko Segawa*^{*2}, *Hiroshi Hashimoto*^{*2},
Seiji Chiba^{*2} and *Sadayoshi Sekiguchi*^{*2}

^{*1}*Kawasumi Laboratories Inc.,
3-28-15, Minamiohi, Shinagawa-ku, Tokyo 140, Japan*

^{*2}*Hokkaido Red Cross Blood Center,
2-2, Yamanote, Nishi-ku, Sapporo 063, Japan*

Abstract

Cryopreservation is a method used to store blood cells for a long period without loss of viability and functions. However, the method is rather limited because the procedures of freezing and thawing, and removal of cryoprotectants are complicated. In addition, it requires an expensive programming freezer and special freezing bags which do not break at low temperature.

In this study, we developed a new freezing bag (KFB: Kawasumi Freezing Bag) which is made of laminated plastic composed of fluoride and polyolefin.

The tensile strength and elongation percentage at break and gas permeability of laminated plastic sheet were examined in accord with Japan Industrial Standard. The tensile strength at -80°C and the gas permeability of laminated plastic sheet were almost equal to those of a polyvinyl chloride (PVC) sheet. However, the elongation percentage of laminated plastic sheet was twice as much as the PVC sheet at -80°C .

Platelets, red cells and peripheral blood stem cells were frozen in the newly developed freezing bags with their standard procedures. Platelets and peripheral blood stem cells were stored in liquid nitrogen, and red cells were stored at -80°C . There were no significant differences in the numerical recovery and the overall functions between cells frozen in the new freezing bag and the conventional bags (PVC or ethylene vinyl acetate). The freezing bags did not break in liquid nitrogen.

These results suggest that the freezing bag developed in this study is useful for cryopreservation of blood cells in liquid nitrogen.

*川澄化学工業株式会社

*²北海道赤十字血液センター

(原稿受付: 1994年10月17日)

はじめに

血液細胞成分の凍結保存は、液状保存に比較し長期間の保存を可能にするが、凍結・融解操作が繁雑であり、さらに特殊なバッグ、凍害保護液、液体窒素、プログラミングフリーザーなどを必要とするためコスト高となる欠点がある。特に凍結保存用バッグは外国メーカーによるものがほとんどであり、価格が高く、またその形状は通常の血液バッグと異なり取り扱いに難点がある。そこで我々は、 -80°C 以下の低温にも耐性を持つ素材からなる凍結保存専用の血液バッグを開発し、これを用いて血液細胞の凍結保存を行い、その有用性を評価したので報告する。

材料及び方法

1. 素材の物理的性質

フッ素系樹脂とポリオレフィン (PO: polyolefin) 系樹脂のラミネートフィルムを素材とした凍結保存バッグ (KFB: Kawasumi Freezing Bag, 川澄化学工業, 東京) を作成した。

室温及び -80°C におけるラミネートフィルムの強度、伸率は、JIS (日本工業規格) K7127 プラスチックフィルム及びシートの引張試験方法、また室温におけるガス透過率は、JIS K7126 プラスチックフィルム及びシートの気体透過度試験方法に準じて測定した¹⁾。

引張強度試験は、ラミネートフィルムの最小幅 6 mm、標線間 25 mm の 2 号ダンベル試験片を作成し、強度測定試験機 (島津オートグラフ AGS-100B, 島津製作所, 京都) によりクロスヘッドスピード 200 mm/min で試験片を牽引したときの破断強度及び破断時の伸率を室温 (25°C) 及び -80°C にて測定した。

気体透過度試験は、ラミネートフィルムを 10×10 cm の大きさに切り取り、ガス透過率測定装置 (MC-1, 東洋精器製作所, 東京) にて酸素及び炭酸ガスの透過率を測定した。ラミネートフィルムの比較として、従来血液バッグに用いられている PVC (polyvinyl chloride) シートについても同様に室温と -80°C における破断強度、伸率及び室温におけるガス透過率

を測定した。

2. 凍結保存バッグの破損試験

凍結保存バッグの耐低温性を調べる目的で、600 ml 容量の KFB バッグ (KFB-600), PVC バッグ (KBP-600: 川澄化学工業) およびポリオレフィン (PO: polyolefin) バッグ (KBP-600 CP: 川澄化学工業) に水を充填し、 -40°C フリーザー中にて凍結した。次いで液体窒素中へ浸漬して急冷し、液体窒素温度に凍結したバッグを 40°C 水浴中で急速融解した。この急激な温度変化を与えた場合のバッグ破損の有無を確認した。また、液体窒素温度で凍結保存したバッグを液体窒素タンクから取り出し、1 分以内に室温にて落差 1 m でコンクリート床に落下し、その衝撃による破損を調べた。

3. 凍結保存バッグでの細胞保存性の評価

KFB バッグを使用して、血小板、赤血球、末梢血造血幹細胞の凍結保存を行い、PVC バッグまたは凍結保存用に従来使用されている EVA (ethylene vinyl acetate) バッグ (PL-269: Baxter, Deerfield, IL, USA) と細胞の凍結保存性に与える影響を比較検討した。

(1) 血小板凍結保存

成分採血装置 Fenwal CS-3000 Plus (Baxter) により健常人より採取した濃厚血小板 (PC: platelet concentrate) を 60 ml ずつ KFB バッグ (KFB-300), PVC バッグ (KBP-300) に分注し、凍害保護液 (15% DMSO: dimethylsulfoxide/生理食塩液) を各々 40 ml 静かに攪拌しながら注入した後、プログラムフリーザー (Cryo-Med, Mt. Clemens, MI, USA) にて $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -80°C まで凍結し、液体窒素中で 1 週間保存した。融解は 37°C 水浴中で行い、15% ACD (acid citrate dextrose) 添加血漿を融解 PC 100 ml に対し 60 ml 添加した後遠心 ($3,000\text{g} \times 8 \text{ min}$, 10°C) し、上清血漿を除去して DMSO を除いた。回収した血小板ペレットは自己血漿に再浮遊し、 22°C で振盪保存した。

(2) 赤血球凍結保存

200 ml 全血由来の RC-MAP (MAP 加濃厚赤血球, 採血後 3 日目) 2 単位をプールして KFB バッグ (KFB-600), PVC バッグ

(22) 医学 Vol. 65, No. 1 (1995)

(KBW-650: カワシミ洗浄バッグ) 各々に2分割し, 凍害保護液として 60% グリセリン (glycerin) を等容量ゆっくり混和しながら注入した. 次いで, $1,200\text{ g} \times 5\text{ min}$ で遠心し, 上清の余分な凍害保護液を除去した後, -80°C ディープフリーザー中に静置して2週間凍結保存した. 融解は 37°C 水浴中にて急速に行い, 連続遠心法にて脱グリセリン・洗浄を行った²⁾. 最終的に生理食塩液に浮遊して解凍赤血球浮遊液を得た.

(3) 末梢血造幹細胞凍結保存

400 ml ACD 加全血由来のバフィーコート (同じ血液型) 4 バッグをプールし, Ficoll-Paque 比重遠心法にて単核球 (mononuclear cell) を分離し, RPMI 1640 (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) 28 ml に再浮遊した. 凍害保護液 32 ml (DMSO 6 ml, 血漿 6 ml, 6% ヒドロキシエチルスターチ (HES)/生理食塩液 20 ml) を加えて KFB バッグ, EVA バッグに分注してプログラムフリーザーにて -80°C まで冷却速度 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で凍結した後, 液体窒素中で1週間保存した. 40°C 水浴中にて急速に融解した後, 2% HES 生理食塩液を加え遠心 ($400\text{ g} \times 10\text{ min}$, 4°C) により上清を取り除き, 凍害保護液を除去した. 最終的に 2% HES 生理食塩液に再浮遊して細胞を回収した.

4. 凍結保存細胞の評価

(1) 血小板の評価

凍結前後の PC の pH, 血小板回収率, 平均血小板容積 (MPV: mean platelet volume), 形態スコア及び血小板機能を以下の方法で測定した.

pH は, サンプリング直後に pH/血液ガス分析装置 (Model 170, チバ・コーニング・ダイアグノスティックス, 東京) にて測定した. 血小板機能は, PC を自己血漿で血小板濃度 $3.5 \times 10^5/\mu\text{l}$ (pH 7.4) に調製した PRP (platelet rich plasma, 多血小板血漿) を検体として血小板凝集能を血小板凝集能測定装置 (Hema Tracer 801, 二光バイオサイエンス, 東京) にて凝集惹起物質 ADP (adenosine diphosphate) 10, 20 μM (Boehringer, Mannheim, Germany)

またはコラーゲン 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Nycomed Arzneimittel, München, Germany) および ADP とコラーゲン (5 μM +1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 μM +5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の共存刺激による10分間の最大凝集率を測定した. 低浸透圧ショック回復率 (% HSR) は分光光度計にて検体2容に対して1容の蒸留水を加えた時の 610 nm における5分間の透過率の変化を測定し, 同じく生理食塩液を加えた時の透過率から最大透過率比を算出した. また, PRP に 2.5% グルタルアルデヒドを加えて固定した後, 形態スコアを位相差光学顕微鏡にて観察した.

(2) 赤血球の評価

凍結前及び融解直後, 融解24時間後の性状について赤血球回収率, 平均赤血球容積 (MCV: mean cell volume) を自動血球計数装置 (Coulter Counter S-Plus IV, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) にて測定した.

2,3-DPG 及び ATP は, シグマ社製測定キット (Sigma, St. Louis, Mo, USA), 上清ヘモグロビン量は, 遠心上清血漿を3波長吸光分析法により測定した. 赤血球浸透圧抵抗性は CPC (coil planet centrifuge) 法により測定した³⁾.

(3) 末梢血造血幹細胞の評価

凍結融解前後における細胞回収率, 生存率及びコロニー形成細胞回収率を調べた. 細胞回収率は, 凍結前後の細胞数を自動血球計数装置にて測定して求めた. 生存率は, 融解洗浄後の細胞をトリパンブルーにて染色して求めた. コロニー形成細胞回収率は, 凍結前及び融解洗浄後の細胞 (単核球) についてメチルセルロース法にてコロニー形成細胞数を測定して求めた⁴⁾.

5. 統計処理

Student の paired t-test を行い, $p < 0.05$ を有意とした.

結 果

1. 素材の物理的性質

引張強度試験において破断強度は PVC シートとラミネートフィルムともに室温 (25°C) よりも低温 (-80°C) において破断強度の上昇がみられ, -80°C では PVC シートが 981.2,

表 1 凍結保存バッグ素材の物理的性質

	室温 (25℃)		-80℃	
	PVC	KFB	PVC	KFB
破断強度 (kg·f/cm ²)*	214.0	676.5	981.2	1074.0
伸率 (%)*	300.0	86.9	10.4	24.3
O ₂ 透過率 (ml/m ² ·day·atm)**	590	550	—	—
CO ₂ 透過率 (ml/m ² ·day·atm)**	3690	2370	—	—

各値は平均値 (*n=5, **n=2)

表 2 凍結保存バッグの破損試験

試験条件	KFBバッグ	PVCバッグ	POバッグ
液体窒素中への急冷 (-40℃→-196℃)	0/10	5/5	2/5
液体窒素温度からの急速融解 (-196℃→40℃)	0/10	—	3/5
液体窒素温度での落下試験 (落差 1 m)	0/10	7/10 (-40℃)	4/5

A/B: A 破損バッグ数

B 試験バッグ総数

表 3 凍結前後における P C の性状

測定項目	凍結前	融解後PVCバッグ	融解後KFBバッグ
pH	6.85±0.01	6.99±0.03	6.97±0.06
血小板数 (×10 ¹¹ /bag)	1.10±0.16	0.96±0.16	1.02±0.15
回収率 (%)	—	87.4±2.7	92.5±3.0
MPV (fl)	7.34±1.85	8.58±1.91	8.38±1.95
形態スコア	316.8±24.3	210.8±14.1	223.1±5.8
%HSR	75.0±3.7	39.2±5.7	37.4±8.3
凝集能*	89.4±4.7	45.5±3.3	42.9±6.3

Mean±SD (n=5)

*ADP 5μM, collagen 5μg/ml共存刺激による

ラミネートシートが 1,074.0 kg·f/cm² と後者の方が高い値を示した (表 1)。

破断時の伸率は、PVC シートが室温において 300.0% であったが -80℃ では 10.4% と著しく低下した。一方、ラミネートフィルムでは低温下で柔軟性は低下するものの、その低下は PVC シートに比べて少なかった。

ガス透過率において、KFB シートは O₂ 透過率で PVC シートとほぼ同等、CO₂ は PVC シートより低い透過率を示した。

2. 凍結保存バッグの破損試験

各保存バッグの急冷、急速融解、衝撃に対する耐性を調べた (表 2)。

PVC バッグ (KBP-600) は、水を充填して -40℃ フリーザーにて凍結した後、液体窒素中に浸したところ、急激な温度変化に耐えず全バッグ (n=5) 破損した。また、-40℃ に凍結保存したバッグを落下試験したところ、10 例中 7 例に破損がみられた。

POバッグも急激な温度変化により 5 例中 3 例に破損を生じた。落下による衝撃では、5 例中 4 例の POバッグが破損した。

KFB バッグでは、液体窒素による急冷、液体窒素温度からの急速融解において、破損は 1 例もみられなかった (n=10)。落下による衝撃に対しても破損は 1 例もみられなかった。

(24) 医器学 Vol. 65, No. 1 (1995)

表 4 凍結前後における赤血球の性状

	凍結前		融解直後		融解24hr後	
	PVC	KFB	PVC	KFB	PVC	KFB
赤血球数 ($\times 10^{11}/\text{bag}$)	8.60 $\pm$ 0.65	9.03 $\pm$ 1.14	7.29 $\pm$ 0.50	7.79 $\pm$ 0.80	7.04 $\pm$ 0.51	7.52 $\pm$ 0.76
回収率 (%)	—	—	84.9 $\pm$ 2.1	86.5 $\pm$ 2.9	81.9 $\pm$ 2.9	83.5 $\pm$ 3.2
MCV (fl)	86.9 $\pm$ 5.2		90.2 $\pm$ 5.2	90.4 $\pm$ 5.4	91.2 $\pm$ 5.3	91.4 $\pm$ 5.6
2,3-DPG ($\mu\text{mol/gHb}$)	4.94 $\pm$ 1.38		4.81 $\pm$ 1.19	4.66 $\pm$ 1.26	3.43 $\pm$ 1.18	3.20 $\pm$ 1.14
ATP ($\mu\text{mol/gHb}$)	4.32 $\pm$ 0.23		4.80 $\pm$ 0.17	4.76 $\pm$ 0.36	4.66 $\pm$ 0.26	4.41 $\pm$ 0.45
ヘモグロビン含量 (g/dl)	17.8 $\pm$ 1.5		12.9 $\pm$ 0.6	13.9 $\pm$ 1.6	12.8 $\pm$ 0.7	13.9 $\pm$ 1.6
上清ヘモグロビン量 (mg/dl)	13.7 $\pm$ 5.5		54.4 $\pm$ 11.7	38.5 $\pm$ 11.7	161.9 $\pm$ 35.6	172.7 $\pm$ 60.3
赤血球浸透圧抵抗性 (mOsm/kg)						
溶血開始点	110 $\pm$ 0		150 $\pm$ 0	150 $\pm$ 0	150 $\pm$ 0	150 $\pm$ 0
最大溶血点	92 $\pm$ 2		92 $\pm$ 7	95 $\pm$ 4	99 $\pm$ 5	97 $\pm$ 5
溶血終了点	66 $\pm$ 1		73 $\pm$ 4	71 $\pm$ 4	76 $\pm$ 3	75 $\pm$ 5
溶血幅	44 $\pm$ 1		77 $\pm$ 4	79 $\pm$ 4	74 $\pm$ 3	75 $\pm$ 5

Mean $\pm$ SD (n=6)

表 5 凍結前後における末梢血幹細胞の性状

	凍結前	融解後EVAバッグ	融解後KFBバッグ
単核球数 ($\times 10^9$)	1.33 $\pm$ 0.30	1.22 $\pm$ 0.28	1.21 $\pm$ 0.30
単核球回収率 (%)	—	93.5 $\pm$ 16.9	91.0 $\pm$ 13.5
生存率 (%)	—	93.3 $\pm$ 3.5	93.0 $\pm$ 3.7
コロニー形成細胞回収率 (%)	—	63.8 $\pm$ 22.3	64.0 $\pm$ 18.4

Mean $\pm$ SD (n=5)

3. 細胞の凍結保存

血小板の凍結保存において、PVC バッグは凍結中に破損が起こるため、融解時にはバッグを他の容器に入れて水浴中で融解を行った。バッグの破損により外部に漏れた内容液を回収したが、最終的に血小板の回収率は低下した（表3）。しかし、KFB バッグと PVC バッグで凍結融解後の血小板機能に有意差は認められなかった。

赤血球の凍結保存は、日本赤十字血液センターの凍結保存法が現行では PVC バッグにて -80°C のフリーザーで保存することが定められているため²⁾、液体窒素温度ではなく -80°C での比較を行った。凍結融解後の赤血球の性状において、KFB バッグと PVC バッグ保存間で有意差は認められなかった（表4）。

末梢血幹細胞の凍結保存では、凍結融解後の単核球回収率、生存率、総コロニー形成細胞回収率は、各々 EVA バッグで 93.5%、93.3%、

63.8% であるのに対して KFB バッグでは 91.0%、93.0%、64.0% であり、両バッグ間で有意差は認められなかった（表5）。

考 察

凍結保存は凍害保護物質の添加・除去が必要であり、その操作は熟練を要する。また、プログラミングフリーザー、冷凍庫、液体窒素など特殊な装置が必要であり、コストがかかる。特に凍結保存バッグはこれまで入手可能なのは数社（ガンプロ社製等）に限られ、価格も高く、またその形状も取り扱い上で不便な点が多い。実際、血漿の保存にみられるように PVC バッグを凍結保存時（ -80°C ）でも破損の危険性を考慮した上で使用されているのが現状であり、血球成分の凍結保存容器として液体窒素温度にも耐えることを保証する凍結保存バッグの開発が必要である。

我々がバッグ素材として選択したラミネート

フィルムの物理的性質は、表1に示したように室温よりも低温において破断強度が高かった。これは、低温における樹脂の結晶化により分子間力が増したためと考えられる。比較に用いたPVCシートは、樹脂に含まれる可塑剤が室温では液体であるのに対して低温では固体化するため、この傾向が顕著であった。PVCシートで作成したバッグは、液体窒素温度下ではその柔軟性が失われてしまうため内容物の固体化にともなう容積変化や、急激な温度変化によるストレスに耐えることができず破損を招いてしまうが、ラミネートフィルムでは柔軟性が保持されることから液体窒素温度に耐えうるものが破損試験の結果から証明された(表2)。

液体窒素保存において、最も破損が心配されるのはバッグとチューブの接続部分であるが、KFBバッグはチューブの接続部分には比較的低温特性の高いポリオレフィン系樹脂を使用しており、凍結実験では接続部分の破損は全くみられなかった(データ示さず)。

血小板の凍結保存の結果において、PVCバッグとKFBバッグで材質の違いによる血小板機能に与える影響はみられなかった(表3)。KFBバッグに用いた素材は、ガスの透過性はPVCバッグ並(表1)であるが、可塑剤を含まないことから可塑剤溶出の危険性はなく、直接KFBバッグにアフレーシスPCを採取しても凍結操作まで短時間であれば、室温保存することも可能であると考えられる。

赤血球の凍結保存においてもKFBバッグとPVCバッグ保存間で凍結融解後の赤血球の性状に有意差は認められなかった(表4)。赤血球の液状保存では、PVCバッグから溶出してくる可塑剤が赤血球の細胞膜の保持に役立ち溶血の防止に効果があると考えられている⁵⁾。今回の凍結保存においては、触解後の赤血球は全てPVCバッグに移して再浮遊したため、この点の差異をみることは出来なかった。凍結保存時はPVCバッグに含まれる可塑剤自体が固体化するため血液中に溶出することはほとんどない上に、通常の融解・洗浄操作では、融解した赤血球は洗浄用のバッグに移されるか連続遠心洗浄装置にかけられて、再浮遊した赤血球は

PVCバッグに保存される。このことから、凍結保存容器の素材が赤血球に与える影響は実際上ほとんどないものと考えられる。

末梢血幹細胞移植は、近年その適用が広がりつつある⁶⁾。また、臍帯血中の幹細胞も造血幹細胞の供給源として考えられつつある⁷⁾。いずれの移植の場合も細胞を一定期間凍結保存することが必須である。表5に示すように末梢血幹細胞の性状は、KFBバッグ、EVAバッグ保存において両者間で有意な差はみられなかった。

凍結保存において、凍結保存温度は細胞の生存率に大きく影響する⁸⁾。一般に保存温度が低ければ、融解後の細胞生存率は保存期間が長くなる場合でも安定して高いといえる。凍結保存容器の素材は、細胞に対して凍結中にほとんど影響を与えることがないと考えられるが、本研究においても血小板、赤血球、末梢血幹細胞の凍結保存による融解後の性状は各バッグ間で有意差は認められなかった。

結 論

新しく開発した液体窒素温度に耐えうる素材を用いたKFBバッグによる血液細胞の凍結保存において、赤血球、血小板、末梢血幹細胞のいずれも、比較に用いたバッグでの保存成績と有意差は認められなかった。

KFBバッグは液体窒素温度下で破損しないことが、素材の物理的性質及び水を充填しての凍結、急激な温度変化、落下による破損試験から示された。

以上のことから血液細胞の凍結保存用として開発されたKFBバッグは、 -80°C 及び液体窒素温度での血液細胞の凍結保存に有用であることが確認された。

引 用 文 献

- 1) 日本規格協会：JIS ハンドブック11 プラスチック1992, 422-431, 三美印刷㈱, 1992.
- 2) 日本赤十字社：赤十字血液センター業務標準・技術部門・日本赤十字血液事業部, 東京, 1992.
- 3) 高橋恒夫, 細田真理, 関口定美：フィルターによる濃厚赤血球製剤からの白血球除去—Pall RC100, Pall RC50 及び Pall BPF 4 の評価—, 医科器械学, 62 (2): 68-77, 1992.

(26) 医器学 Vol. 65, No. 1 (1995)

- 4) 柴田浩二, 高橋恒夫, 茂木祐子, 細田真理, 門脇絵美, 石田 登, 中瀬俊枝, 関口定美: 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, 医科器械学, 63 (2): 47-53, 1993.
- 5) Timothy N. Estep, Robin A. Pedersen, Theresa J. Miller and Kathleen R. Stupar: Characterization of erythrocyte quality during the refrigerated storage of whole blood containing Di-(2-ethylhexyl) phthalate, Blood, 64: 1270-1276, 1984.
- 6) 関口定美, 高橋恒夫: 末梢血中造血幹細胞採取の効率化の試み, 医学のあゆみ, 167: 682-684, 1993.
- 7) 高橋恒夫, 関口定美: ヒト臍帯血中幹細胞移植の問題点, 医学のあゆみ, 167: 689-691, 1993.
- 8) 高橋恒夫: 動物細胞の凍結傷害と凍害防御剤の作用機序, 凍結保存—動物・植物・微生物—(酒井 昭編), 幹倉書店. 15-23, 1987.