

症 例

4°C 保存ヒト骨髓細胞の生活活性

昭和43年3月23日 受付

諏訪赤十字病院外科  
島田 寔

信州大学医学部丸田外科教室  
(主任:丸田公雄教授)

宮川 信 土屋 隆 小池 綏 男

The Viability of Human Bone Marrow after Storage at 4°C

Makoto SHIMADA

Surgical Clinic, Suwa Red Cross Hospital

Makoto MIYAKAWA, Takashi TSUCHIYA and Yasuo KOIKE

Professor Maruta's Surgical Clinic, Shinshu University

I 緒 言

種々な原因, ことに放射能大量被曝又は制癌剤大量投与等に由来する骨髓障害に対し, 骨髓移植法による治療効果が注目されて来ている<sup>1)-9)</sup>。しかしながら同種骨髓移植の成立に当っては, 免疫学上尚未解決の点が残されており<sup>7)8)9)</sup>, secondary disease<sup>7)</sup>の問題もあり, その効果は必ずしも安全確実とは言えない。そこで著者は, 最も安全でしかも確実な効果の期待出来る自家骨髓移植の利用を計画した。この場合実際問題として消耗した患者の自家骨髓を採取することは無意味であり, 計画的に健常時採取保存した自家骨髓を移植することになる<sup>7)8)9)10)</sup>。骨髓保存法には長期保存の可能な凍結保存法があるが<sup>11)-14)</sup>, 凍害防止剤の使用などに関する複雑な操作と, 高価な特殊な設備を必要とするので一般病院ではたやすく実施しにくい難点がある。そこで著者等は最も簡便な4°C保存を撰び, 著者等が骨髓の保存 medium として使用しているヘパリン加 Hanks 氏 medium<sup>32)</sup>内で4°Cで保存した場合の骨髓細胞の viability の経時的推移を検索した。

II 実験方法ならびに結果

1. 実験材料: 本実験に用いられた骨髓細胞はすべて健常人の胸骨体部より骨髓穿刺法にて採取されたものである。
2. 骨髓細胞保存用 medium: この目的の為には人体に無害な medium の中で保存組織の脱水素酵素活性を最もよく保持すると言われる Hanks 氏液<sup>32)</sup>を用いた(表1)<sup>15)</sup>。抗凝血剤としてはヘパリンを25iu/ml 添加した。

3. 保存骨髓細胞の生活活性測定に用いた保生用 medium: 本実験は一種の組織培養であり, 又指標として 2, 6-dichlorophenolindophenol-Na (表3) (以下 DPI と略す) を使用する関係上, その還元率の最もすぐれていると言われる<sup>15)</sup>(表1)。YLE medium (表2) を使用した。

表 1 各 medium の DPI-dosis に及ぼす影響<sup>15)</sup>

	DPI dosis (ml)	
	ヒトの乳癌	マウス肝
YLE medium	0.6	1.0
生理的食塩水	0.2	0.3
Ringer 氏液	0.3	0.3
Hanks 氏液	0.3	0.6

表 2 YLE medium 組成

1) 再溜水	700ml
NaCl	7.18g
KCl	0.4g
CaCl <sub>2</sub>	0.2g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2g
Glucose	4.5g
Phenol Red 10mg/ml	0.75ml
Yeast extract (Difco.)	1.0g
Lactalbumin enzymatic hydrolysate	5.0g
Streptomycin	0.5g
Penicillin	20
再溜水を加えて	900ml にする
2) 1.4% NaHCO <sub>3</sub>	50ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.125g
再溜水を加えて	100ml にする

Seitz 濾過滅菌し, (1)は凍結, (2)は氷室保存, 使用直前(1)液9, (2)液1容の割合にまぜる。

表 3 2,6-dichlorophenolindophenol-Na

2,6-dichlorophenolindophenol-Na	0.33 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
再溜水を加えて	1000ml にする

(15p<sup>b</sup> 30分高压滅菌する)

4. 骨髓細胞の保存条件：實際臨床に於て、約50ml～100mlの骨髓血を採取するには、約1時間を必要とする。従つて保存骨髓細胞の生存率を高める為には骨髓を採取すると同時に直ちに4°C前後に急速に冷却することがのぞましい<sup>16)</sup>。この目的の為に著者等は図1のような一定比の水と水の混合液をみたし常に2°C～4°Cに保つように作られたステンレス製の冷却箱を用いて、骨髓吸引採取直後より急速に冷却を行い、採取完了後は4°Cの血液保存用電気冷蔵庫(4°～6°Cの恒温を保つよう鋭敏なサーモスタットで調整された記

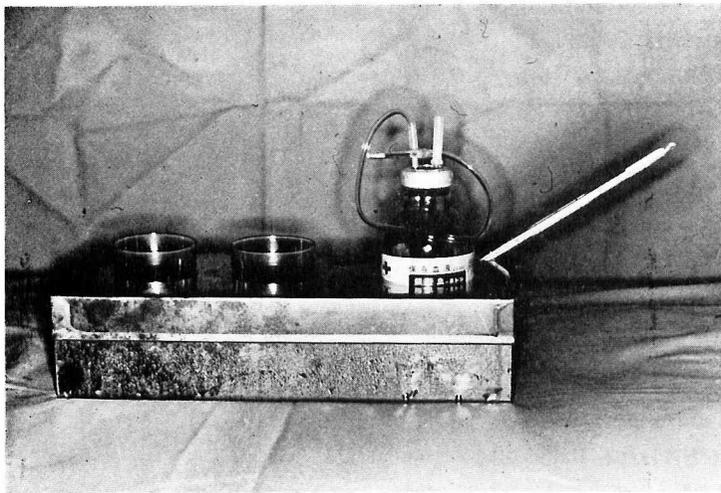
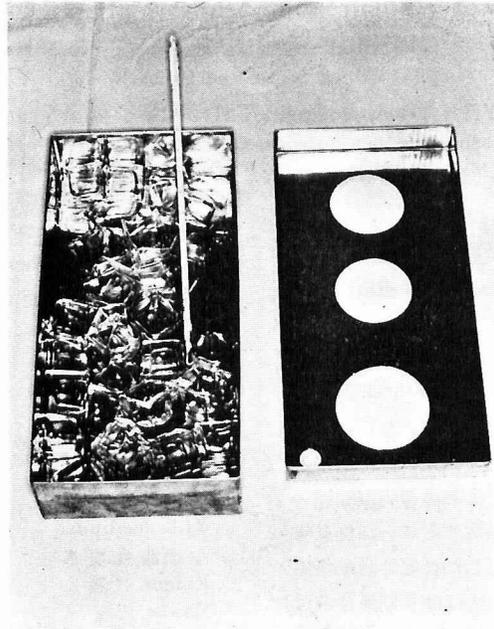


図 1 骨髓採取時冷却箱

録温度計付き)にて保存した。

5. 4°C 保存後の骨髓細胞の生活々性の測定法及びその結果：

a) 組織脱水素酵素活性値による検索

INK 法<sup>15)</sup>に示されているように、組織の DPI (表3)還元能は、その組織の dehydrogenase 活性の総和であり、その表現を骨髓細胞の生活々性の指標とした。

INK 法によれば dehydrogenase 活性の強い腹水癌細胞にあっても DPI 還元能を示す為には  $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$  個の細胞が必要であると言われている<sup>15)17)</sup>。

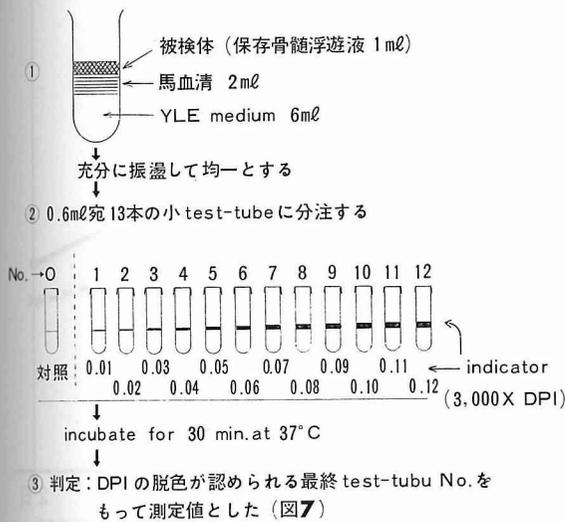


図2 骨髓細胞の dehydrogenase 活性測定手技

この点を考慮し本実験では、各 test-tube には  $5 \times 10^6$  個前後の骨髓細胞が含有されるように被検体の計量を考慮し、又保生 medium による稀釈及び指標とする DPI の濃度は著者等の各種の組合せによる予備実験より、下記に示すような組合せが本検索には最も好都合であることが観察されている。

〔手 技〕

骨髓穿刺にて無菌的に採取された骨髓細胞はへパリン加 Hanks 氏液にて約5倍に稀釈すると 1ml 中に  $20 \times 10^6$  個前後の骨髓細胞を含有する骨髓細胞浮遊液となる。このものを 4°C にて保存し、12時間後、24時間後 (1日後) 及び48時間後 (2日後) にその一定量を取り出し図2及び図7に示すような手順で、組織脱水素酵素活性の総和を測定した。

(同一の保存骨髓細胞浮遊液を十分に攪拌してその一定量をとれば、その中には常に同数の骨髓細胞が含まれることになる。)

本実験の対照実験として図2の①において被検体 (保存骨髓浮遊液 1ml) の代りにへパリン加 Hanks 氏液 1ml を用いて図2と全く同じ操作を行ったが DPI の脱色は認められない。

尚、本実験は一種の組織培養操作であるから全操作は無菌的に行われなければならない。

〔結 果〕

被検者5名 (No. 1 ~ No. 5) より採取した骨髓細胞を夫々上記の条件操作で4°C に保存し採取直後、12時間後、24時間後及び48時間後に夫々図2の手技によって dehydrogenase 活性を DPI 還元能で検索してみると表4及び図3

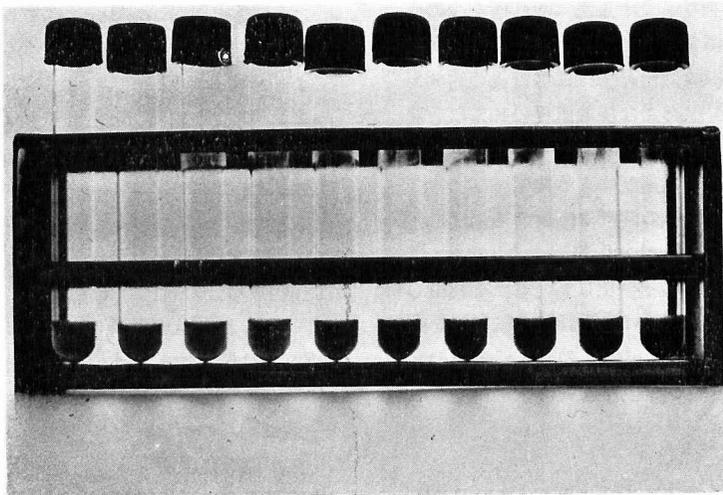


図7 骨髓細胞浮遊液による DPI の脱色

表 4 保存骨髓脱水素酵素活性の経時的推移 (1)

保存時間 (4°C)	採取直後	被 検 者 (5名)					直後値に対する活性率 (平均)
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	
採取直後		11	11	10	9	9	100%
12時間		9	8	7	7	6	74%
24時間 (1日)		8	7	5	5	5	60%
48時間 (2日)		6	5	4	3	4	44%

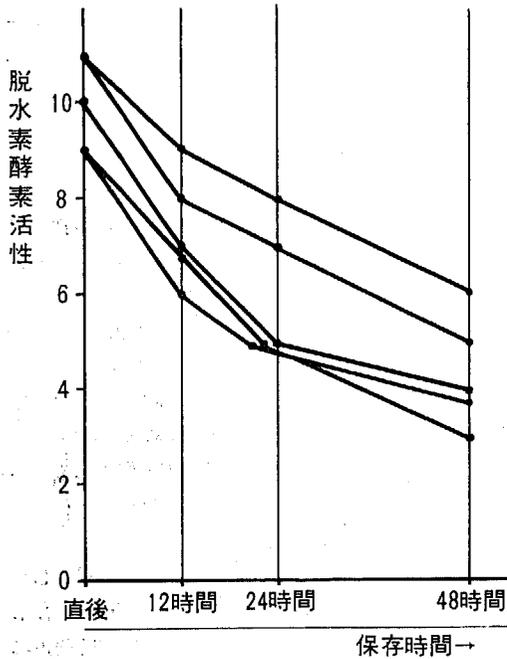


図 3 保存骨髓脱水素酵素活性の経時的推移 (2)

のようであり、更に判り易くする為活性値を採取直後の値に対する百分率で示してみたのが表4、図3及び図6である。即ち24時間保存では採取直後の約60%に、又48時間(2日)保存では採取直後の40%に急速な減衰が認められた。(図6)

b) 細胞膜の色素透過度による検索

生活細胞膜と死細胞膜の間には色素の透過度に差違が存在する<sup>18)-24)</sup>、Kaltenbach等<sup>25)</sup>はNigrosin色素(毒性が少く又色別がはっきりしている点を利用して)を用いてascites cellsの生死細胞の鑑別法を発表した。著者等はこのKaltenbachの原法に多少の変法を加えて、保存骨髓細胞の生死鑑別への応用を試みた。

【手 技】

(1) 被検体としては、前述のa)に於て図2の①の一部をその都度使用する。即ち図2の①の0.5mlを

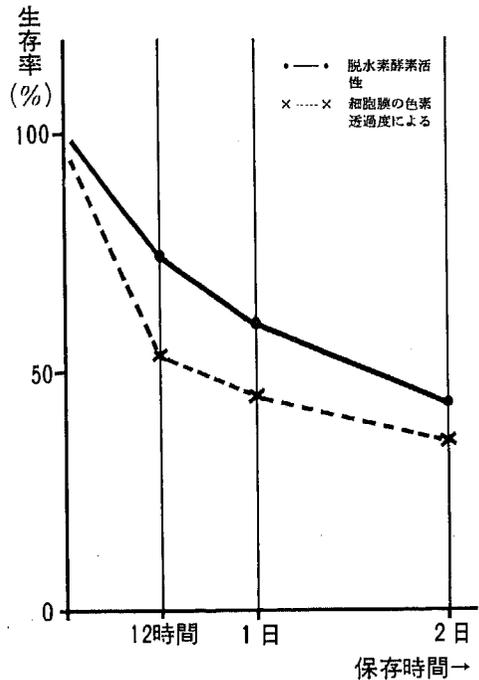


図 6 保存骨髓の生活活性

とり之を更に YLE medium にて3倍に稀釈する(この程度の稀釈が後の計算板上での算定に好都合である)。

(2) 更に等量(1.5ml)の0.4% Nigrosin Hanks 溶液を加えて、数秒間振盪して死細胞膜を Nigrosin で透過さす。

(3) ついで直ちに2% 酢酸溶液3mlを加え(最終的に1%の酢酸溶液となるように)更に数秒振盪して骨髓液中の混入赤血球を破壊する。

(4) これを血球計算板上にて鏡検し(図4)有核細胞200個を数え、この中のNigrosinにstained cellとunstained cellの比を求めてunstained cell(生活細胞)の百分率を算定した。尚この操作過程において酢酸を最終濃度1%となるよう添加することにより、混入赤血球を消却し有核細胞の鏡検算定を容易にした点が著者等の加えた変法である。

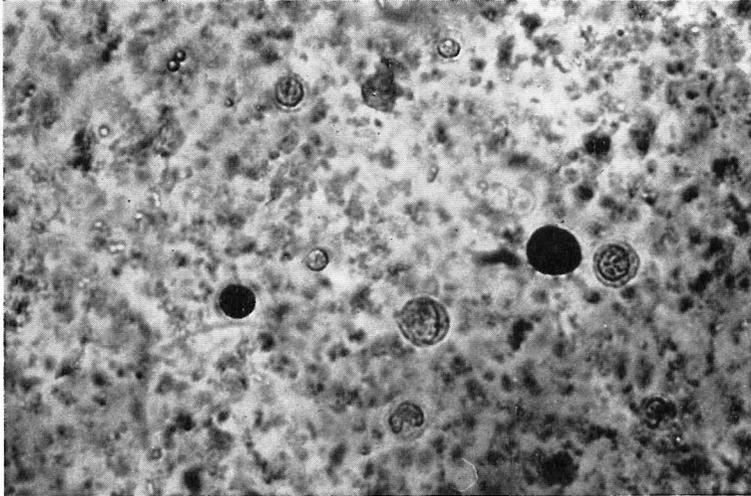


図4 Nigrosin unstained cells 及び stained cells

表5 保存骨髓細胞膜の色素透過度の経時的推移 (1)

		被 検 者 (5名)					残存率 (平均)
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	
保存時間 (4°C)	採取直後	195/200	100/200	193/200	192/200	185/200	95.5%
	12時間	122/200	105/200	98/200	116/200	96/200	53.7%
	24時間 (1日)	82/200	85/200	80/200	81/200	85/200	45.3%
	48時間 (2日)	70/200	73/200	65/200	71/200	70/200	34.9%

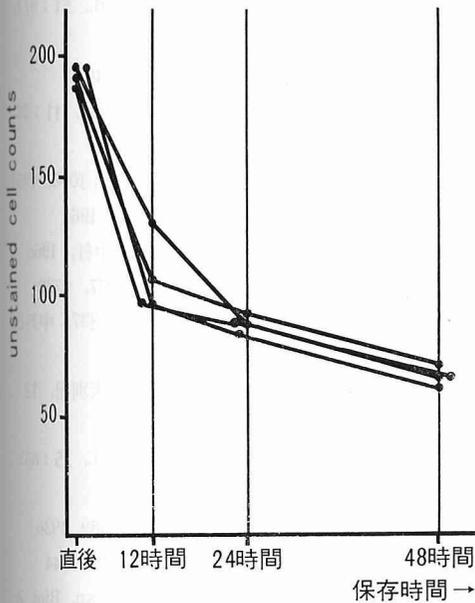


図5 保存骨髓細胞膜の色素透過度の経時的推移 (2)

〔結果〕

実験 a における同一の被検体を用いて、やはり採取直後、12時間保存後、24時間保存後及び48時間保存後に夫々について Nigrosin 色素に染まらない細胞 (生活細胞と推定される) を算定してみると表5、図5及び図6のようである。即ち12時間保存では半数が生存するのみであり1日目では45%の生存をみるのみで之また意外に急速な生活細胞の減少が認められた。

III 考 按

悪性腫瘍の治療に際し制癌剤大量投与による合併療法の影響に伴い、之等に由来する骨髓障害が、この治療法の最大の障壁となって来た。かかる骨髓障害改善対策として著者等は安全で確実な効果の得られる保存自家骨髓移植の利用を計画した。一方移植した骨髓の生着再生が治療の効果発現機序であることが証明されている現在<sup>26)-29)</sup>、保存骨髓移植による治療に際し最も重要な factor は、保存骨髓の viability の存在ということである。この点、凍結保存法を用いれば骨髓細胞の viability は年余にわたって保たれる事実は報告されている。即ち Mannick 等は犬の骨髓を用いて

-79°Cで15% glycerol中に保存した場合17日後においても保存骨髄のDNA合成能は50%以上保有されていると報告し<sup>30)</sup>, Yamada等も10% glycerol中で-79°Cで保存し4ヵ月後に30%のviabilityの存在を報告している<sup>31)</sup>。しかしながら生活細胞を凍結保存する場合、凍害防止剤としてglycerolやDMSO(Dimethyl Sulfoxide)等を使用することは現今常識的な必須操作であり<sup>32)</sup>この場合実際問題として脱凍害防止剤の操作は又実に煩雑であり、その上-80°C前後の低温を得る為には又、高価な、特殊な設備を必要とするので、凍結保存法は第一線の一般病院ではたやすく実施しにくい難点がある。そこで著者等は最も簡便であり、従ってどんな第一線の一般病院でもたやすく行い得る4°C保存法を計画した。しかしながらヒトの骨髄細胞を4°Cで保存した場合の生活々性の推移を検索した文献は見当らない。著者等はINK法をmodifyした手技による組織内脱水素酵素活性の検索法及びKaltenbachによるNigrotin色素の細胞膜透過度による細胞の生死鑑別法を用いて4°C保存骨髄細胞のviabilityの経時的推移を検索したところ、4°C保存骨髄細胞のviabilityの減衰は意外に早く、24時間後即ち1日目には約半数は死滅する事実を観察した(図6)。この点を文献的にみてもヒトの骨髄に関する報告は見当らないが、Mannick等<sup>30)</sup>によれば犬の4°C保存骨髄細胞のDNA合成能は24時間後では、採取直後の値の2,400/7,600又は7,400/11,300であり、著者等の結果とはほぼ同様の傾向がうかがえる。

かくの如く、著者等の観察事実より4°C保存ヒト骨髄を移植に利用する場合には、保存期限は、短かければ短かい程効果的であるが、約半数のviabilityの尚残存する24時間前後が限度であると考えられる。

#### IV 結 論

制癌剤大量療法の最大の障壁である骨髄障害改善対策として、安全で確実な効果の得られる保存自家骨髄移植法による治療を計画した。この場合一般病院でもたやすく行える最も簡便な4°C保存法を撰び、基礎実験として4°Cに骨髄を保存した場合、はたしてどれだけ生存しているかについて経時的推移を検索したところ、(1)組織脱水素酵素活性の総和による検索法においても、又(2)色素の細胞膜透過度による細胞の生死鑑別法による検索法においても4°C保存骨髄の生活々性の減衰は意外に早く、24時間後(1日目)には約半数が死滅する事実を観察した。従って4°C保存骨髄を利用する場合には、保存期間は短かければ短かい程効果的であるが、半数の生活々性の尚残存する24時間

前後が限度であると考えられる。

本論文の要旨は第67回日本外科学会総会に発表した。

稿を終るに当り組織培養について適切な御助言を下された信州大学医学部細菌学教室田崎忠勝教授、田波洋助教授に、又培地調製に御助力下さった同教室山田喜紹講師に心より感謝する。

#### 文 献

- 1) Lorenz, E. et al; J. Nat. Cancer Inst., 12; 209, 1951
- 2) Thomas, E. D. et al; New Engl. J. Med., 257; 491, 1957
- 3) Jammet, H. et al; Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol., 4; 210, 1959
- 4) Mathe, G. et al; Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol., 4; 226, 1959
- 5) Thomas, E. D. et al; J. Clin. Invest., 38; 1709, 1959
- 6) Thomas, E. D. et al; J. Clin. Invest., 38; 1048, 1959
- 7) Kurnick, N. B. et al; Ann. int. Med., 51; 1204, 1959
- 8) Kurnick, N. B. et al; Ann. int. Med., 49; 973, 1958
- 9) Black, M. M. et al; Ann. int. Med., 51; 571, 1959
- 10) Westbury, G. et al; Lancet, 968, 1959
- 11) Schwartz, R. et al; J. Appl. Physiol., 11; 22, 1957
- 12) Ferrebee, J. W. et al; Blood, 12; 1096, 1957
- 13) 三浦 健; 医学のあゆみ, 56; 532, 1966
- 14) 三浦 健; 医学のあゆみ, 61; 7号中付, 1966
- 15) 西岡久寿弥・他; 日本臨床, 15; 1937, 昭32
- 16) 村上省三・他; 輸血の実際, p 59, 昭37, 中外医学社
- 17) 太中 弘・他; 癌化学療法, 癌の臨床別冊, 12; 111, 1966
- 18) Pappenheimer, A. M.; J. Exp. Med., 25; 633, 1917
- 19) Schreck, R.; Am. J. Cancer, 28; 389, 1936
- 20) Schreck, R.; Arch. Pathol., 37; 319, 1944
- 21) Cohen, A. L. et al; Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 60; 440, 1947
- 22) Schreck, R.; Proc. Exp. Biol. & Med., 77; 709, 1951

- 23) Vycital, R. O. et al; *Cancer Research*, **12**; 304, 1952
- 24) Patt, H. M. et al; *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **80**; 92, 1953
- 25) Kaltenbach, J. P. et al; *Exp. cell Research*, **15**; 112, 1958
- 26) Nowell, P. C. et al; *Cancer Res.*, **16**; 258, 1956
- 27) Ford. et al; *Nature*, **177**; 425, 1965
- 28) Congdon, C. C. et al; *Fed. Proc.*, **15**: 129, 1956
- 29) Makinodan, T.; *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **92**; 174, 1956
- 30) Mannick, J. A. et al; *J. Hematol.*, **15**; 517, 1960
- 31) Yamada, M. et al; *Japanese J. Med. Sc. & Biol.*, **14**; 27, 1961
- 32) 中井準之助・他; *組織培養*, p25. 昭39. 朝倉書店