

# 臍帯血前駆細胞の移植による 肝機能補助の基礎的研究

(07807108)



平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 山本 哲  
(旭川医科大学医学部講師)

# I. はしがき

## 1) 研究の目的と意義

近年の臓器移植技術の発達は、臓器不全患者の救命に画期的な治療技術を提供することになった。しかし、これらの臓器移植は、脳死体からの臓器提供を原則としており、移植臓器に限りがあることから、大部分の臓器不全の患者は、その恩恵に浴さず、治療の術のないまま死に至っているのが実情である。肝疾患についていえば、年間約17,000人が肝硬変などの末期肝不全によって死亡しており、肝臓移植によって救命し得る患者は米国の実績からの試算で最大1000~2000人（500人程度ともいわれている）、約5~10%（同3%）にすぎず、公平な治療をめざすには、脳死体からの移植以外の方法を開発することが必要と考えられている。

われわれは、ガラクトサミンを使った肝不全誘発動物実験モデルにおいて、遊離肝細胞の腹腔内移植によって、これを救命しうることを報告してきた。その救命のメカニズムの一つとして、移植細胞による網内系機能の代償が挙げられ、ガラクトサミンによって引き起こされたエンドトキシン血症を治療することによって生存率の向上が得られるものと推定された。一方、造血幹細胞の移植は骨髓機能の代償療法としてすでに臨床で一般的に行われており、臍帯血に豊富に含まれる造血幹細胞の移植もファンコニー症候群の患者の治療としてすでに臨床報告されている。そこでこの臍帯血中に含まれる造血幹

細胞を中心とする未知の前駆細胞(Progenitor cell)の移植による網内系機能の再建あるいは肝臓機能の再建の可能性を考え、これら細胞群を肝不全治療に応用することを考えた。解剖学的に、臍帯血はまず最初に門脈を経て肝臓に広く分布することから、臍帯血の前駆細胞、特に接着能を有する細胞は肝臓機能の一部を持った前駆細胞である可能性がある。

臍帯血の有核細胞のうち、CD34陽性細胞については、骨髄機能の再建を目的にすでに移植医療に用いられており、この臍帯血を保存することで、分娩回数に応じたHLAタイプの細胞群が得られることから、骨髄バンクを凌ぐ移植細胞プールの利用が可能になりつつある。

本研究では、移植医療の恩恵を得られにくい肝不全患者の治療として、脳死体からの臓器獲得とは対照的に、分娩に際して得られる細胞の利用による網内系機能を含む肝臓機能を代償する治療法をめざすもので、特に人臍帯血中の接着能を有する有核細胞をターゲットとして、これら細胞の移植による肝機能補助の可能性を検討する。

## 2) 研究組織

研究代表者:山本 哲 (旭川医科大学医学部講師)

研究分担者:葛西眞一 (旭川医科大学医学部助教授)

研究分担者:澤 雅之 (旭川医科大学医学部助手)

### 3) 研究経費

平成7年度	1,100千円
平成8年度	1,100千円
計	2,200千円

### 4) 研究発表

ア.学会誌等

(1)B. Jiang, M. Sawa, T.Yamamoto and S. Kasai

Enhancement of proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in cirrhotic rats by hepatic stimulatory substance.

Transplantation 63(1); 131-135, 1997

(2)T.Yamamoto, S.Kato, K.Saito and S.Yonemasu

HGF release from progenitor cells in cord blood.

投稿予定

イ.口頭発表

(1)T.Yamamoto,S.Kasai,M.Sawa,I.Tomita,Y.Kino,M.Mito

Encapsulated hyperplastic liver cells for artificial liver support.

第10回国際人工臓器学会（台北） 1995年11月

(2)S.Kato, T.Yamamoto, K.Saito, Y.Yonemasu and S.Kasai

The risk of autologus peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) related to CD34 antigen positive tumor cell contamination.

第24回国際輸血学会（東京） 1996年4月

## Ⅱ.研究成果

### 【1】 CD34陽性細胞の検出

#### 1) 免疫組織化学染色による同定

CD34陽性細胞の形態学的特徴を検出するには、その細胞を含む血液の塗末標本にCD34抗体による免疫組織化学染色を行う必要がある。またCD34抗原を発現している細胞の発現様式を評価するには、他のCD34抗原を発現している各種細胞（腫瘍細胞を含む）における、抗原発現様式と比較する必要がある。

#### A.実験方法

染色法としては、抗CD34抗体(HPCA-1;Becton Dickinson, USA)によるストレプトアビジン-ビオチン法を用いた（表1）。

臍帯血および骨髓液の塗末標本の染色では、プレパラートにひかれた細胞を2.5%パラホルム・アルデヒドで固定した後、表1の手順に従い免疫組織化学染色を行った。比較対象のLymphomaのホルマリン固定標本については、脱パラフィン処理を行った後、塗末標本と同様の手順に従って処理した。

表1

## 抗CD34モノクローナル抗体による免疫組織化学染色の方法

1)マイクロウーブ処理(in 0.01M Citrate Buffer pH6.0; 650-750W)	5分x2
2)PBS Bufferによる洗浄	5分x2
3)3%過酸化水素添加メタノール溶液中に浸す	10分
4)PBS Bufferによる洗浄	5分x2
5)10%ウサギ血清添加 (非特異吸着)	10分
6)50倍希釈HPCA-1抗体(Becton Dickinson)との反応	60分
7)PBS Bufferによる洗浄	5分x2
8)ビオチン標識抗マウスIgGウサギ抗体との反応	10分
9)PBS Bufferによる洗浄	5分x2
10)ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンとの反応	5分
11)PBS Bufferによる洗浄	5分x2
12)DAB染色, 水洗	
13)核染色, 水洗	
14)脱水, 透徹, 封入	

使用した標本は、臍帯血塗末標本(n=4)、骨髓塗末標本(n=2)およびT cell lymphomaのパラフィン包埋標本(n=16)、B cell lymphomaのパラフィン包埋標本(n=20)であり、褐色に染色されるCD34陽性細胞の形態学的特徴について比較した。

### B.結果

塗末標本でのCD34陽性細胞は、直径10~12  $\mu$ mの小型の単核球で、不整形の核を持ち、骨髓中のCD34陽性細胞との形態学的な差を認めなかった。

T cell lymphomaについては16例中2例にCD34陽性の腫瘍細胞を認めた

が、B cell lymphoma 20例についてはCD34陽性の腫瘍は認めなかった。

T cell lymphomaのサブクラスとCD34陽性細胞との関係は

表2

T cell lymphomaの組織分類（LSG）とCD34の発現の相関

サブクラス	症例数	CD34陽性例	CD34陰性例
中細胞型	6	0	6
混合型	1	0	1
大細胞型	3	0	3
多形細胞型	3	0	3
リンパ芽球型	3	2	1
計	16	2	14

T cell lymphomaでCD34陽性の腫瘍細胞はlymphoblastic typeの3例中2例のみであり、この細胞と臍帯血のCD34陽性細胞との形態学的特徴は近似しており、両者を鑑別することは困難であった。

CD34陽性のT cell lymphomaの組織標本では、腫瘍細胞すべてにCD34の発現を認め、腫瘍細胞間でCD34発現レベルの差異を認めなかった。

### C.考察

臍帯血中のCD34陽性細胞が、真の造血幹細胞であるか否かは議論のあるところだが、形態学的には増殖能の旺盛なT cell lymphoma-lymphoblastic typeに類似した形態的特徴を有していた。T cell lymphomaのCD34発現様式は、症例ごとに陽性、非陽性があるものの、陽性例では、腫瘍細胞すべてが陽性であり、もしlymphoblastの腫瘍化がstem cellからの分化途上で起こ

ったとすれば、腫瘍化した細胞ごとにCD34の発現レベルに差異があるはずだが、我々の症例ではこれがないことから、lymphoblastのCD34発現は、この細胞固有のもの可能性が高い。

臍帯血中のCD34陽性細胞は小型の単核球で核の不整はあるがcell sizeはほぼ均一であり、形態学的には高い増殖活性を持つlymphoblastに似た特徴を有し、そのCD34の発現様式も細胞間で差はないと推定され、フローサイトメトリーによる臍帯血のCD34陽性細胞測定でも、false negativeはないと考えられた。

## 2) フローサイトメトリー (FCM) によるCD34陽性細胞の測定

ヘパリン採血による臍帯血10mlを材料として、これに含まれる造血幹細胞数を、フローサイトメーター(コールター；エピックスII)により測定した。

### A. 実験方法

臍帯血（ヘパリン添加）10mlに2倍容のPBS(EDTA添加)を加え、auto cell counterで総白血球数、好中球数、リンパ球数、単核球数を測定した。

造血幹細胞の測定のマーカーとしてはCD34陽性および、より分化度の低いCD33陰性の細胞群を対象とすることにし、CD34、CD33二重染色を行った。

検体50  $\mu$ lにFITCラベルの抗CD33抗体（コールター） 10  $\mu$ lおよびPEラベルの抗CD34抗体（ベクトン・デイッキンソン） 20  $\mu$ lを加え、4°C, 30分

間反応させ、PBSで2回洗浄、300  $\mu$ lに再浮遊し溶血剤を1ml添加、5分間静置して再度PBSで洗浄、全量1mlにてFCMで測定した。

測定ゲートを、リンパ球サイズにあわせ、FITCおよびPEの蛍光強度をサイトグラムで表示し、測定細胞数10,000個以上で、CD34陽性、CD33陰性の細胞比率を求めた。

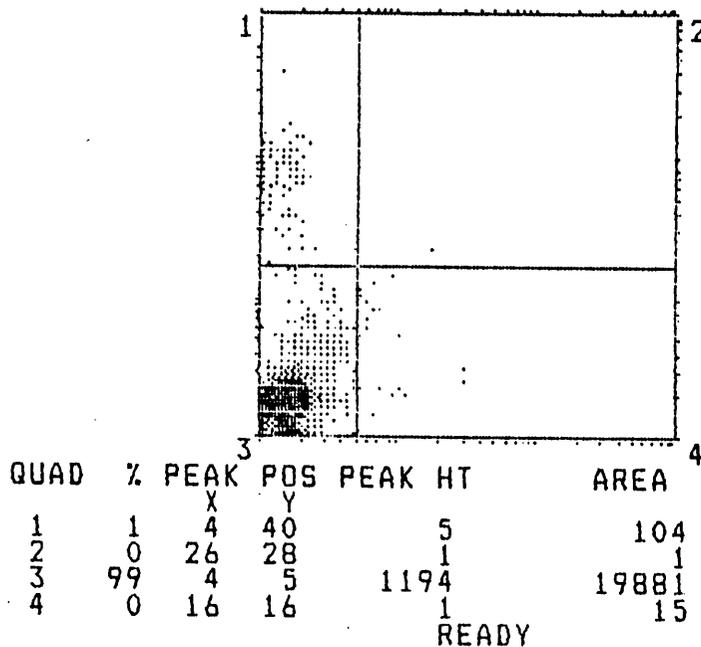
## B.結果

検体1、2は分娩時の検体採取から測定までの保存時間（4℃、冷蔵）は6hr以内であり、検体3は24hr以上、検体4、5は12-24hrであり、この時間の長さに応じて、バイアビリテイの変化、変性、一部凝固の影響が見られた。

図1

### CD34(PE)、CD33(FITC)二重染色によるサイトグラム

11:2P 64-1 LGFL X LRFL



縦方向はCD34に対する蛍光強度分布、横方向はCD33に対する蛍光強度を示し、QUAD1はCD34陽性CD33陰性細胞を、QUAD2はCD34陽性CD33陽性細胞を、QUAD3はCD34陰性CD33陰性細胞を、QUAD4はCD34陰性CD33陽性細胞を示している。

表3

## 臍帯血の検体別細胞数およびCD34陽性細胞比率

	検体1	検体2	検体3	検体4	検体5	平均
採取-測定的时间	6hr以内	6hr以内	24hr以上	12hr以上	12hr以上	
総白血球数( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	10.3	9.51	6.66	13.53	14.19	
好中球( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	5.52	4.99	2.83	8.19	7.22	
リンパ球( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	3.87	3.20	2.92	3.97	5.55	
単核球( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.50	0.76	0.58	0.88	0.62	
CD34+CD33- 細胞比率(%)	0.46	0.52	0.5	0.82	1.19	0.70 $\pm 0.28$
CD34陽性細胞数 ( $\times 10^5$ 個)	1.78	1.33	1.32	2.93	5.95	3.00 $\pm 1.80$

全血の条件下で、臍帯血中に含まれる有核細胞中のCD34陽性細胞の割合は $0.70 \pm 0.28$ であり、検体全量(8-10ml) から回収されるCD34陽性細胞総数は、 $3.00 \pm 1.80 \times 10^5$ 個であった。

## C.考察

サイトグラム上QUAD2に現れるCD34陽性CD33陽性の細胞群は非特異的染色の結果である可能性が高く、CD34陽性細胞としてはCD34陽性CD33陰性細胞のみを取った。CD34陽性と陰性の蛍光強度の境界は、ヒストグラム上、両者のピークの谷になる位置を測定して決定しているが、検体採取から測定までの冷蔵保存時間により、特にCD34陰性細胞の変動が多くなり、見かけ上CD34陽性細胞が多くなる傾向が見られた。これはauto cell counterでは細胞数として計算されるが、細胞形態の変化により、FCMではリンパ球の測定ゲートにかからないため、CD34陰性細胞が少ない条件で細胞比率計

算が行われた結果と考えられた。

### 【CD34陽性細胞の分離・精製】

臍帯血有核細胞の50%以上が好中球であり、これらを除き単核球のみの分画に精製し、細胞培養試験および凍結保存の試料とした。

#### 1) フィコールによる分離法

臍帯血（ヘパリン添加）10mlに2倍容のRPMIを加えた後、フィコールを3：4の比率で加え、400 x g, 30分間遠心し単核球層を回収した。さらにフィコール除去のためRPMIを加え、240 x g, 10分間遠心を2回行い、最終容量を1mlとし、その一部を用いてauto cell counterにより白血球数、好中球数、リンパ・単核球数を測定、各々細胞の回収率を計算した。

またCD34陽性細胞の回収評価のため、分離細胞に全血検体と同様CD34、CD33二重染色を行った。分離検体50  $\mu$ l（単核球 $10^3$ 個/ $\mu$ l）にFITCラベルの抗CD33抗体（コールター）5  $\mu$ lおよびPEラベルの抗CD34抗体（ベクトン・デイッキンソン）10  $\mu$ lを加え（全血検体の半量）、4 $^{\circ}$ C, 30分間反応させ、PBSで2回洗浄、最終容量300  $\mu$ lに再浮遊させFCMでCD34陽性CD33陰性細胞比率を測定した。

## B.結果

フィコール分離前後の白血球、好中球、リンパ球の回収については、表4に示すように、各々 $39.46 \pm 10.7\%$ 、 $34.66 \pm 23.1\%$ 、 $48.56 \pm 12.7\%$ だった。

検体1、2については白血球の回収が30%前後に対し、リンパ球・単球の回収が60%以上と良好な回収が見られる一方、他の検体では回収率の低下が見られた。

表4

フィコール分離による臍帯血有核細胞の回収

		検体1	検体2	検体3	検体4	検体5	平均
全血時 (10ml) x10 <sup>3</sup> /μl	白血球	10.30	7.6	5.99	12.18	12.77	
	好中球	5.52	4.00	2.55	7.37	6.50	
	リンパ球	4.37	3.17	3.13	4.36	5.56	
分離後 (1ml) x10 <sup>3</sup> /μl	白血球	32.63	23.11	21.78	73.05	49.6	
	好中球	5.31	3.27	9.72	49.98	32.26	
	リンパ球	26.80	19.71	11.77	22.36	16.92	
回収率 (%)	白血球	31.7	30.4	36.4	60.0	38.8	39.46
	好中球	9.6	8.2	38.1	67.8	49.6	34.66
	リンパ球	61.3	62.2	37.6	51.3	30.4	48.56

このCD34陽性CD33陰性細胞実数および回収率を表5に示した。CD34陽性CD33陰性細胞のフィコール分離による回収率は平均40.58±18.3% (59.6%-6.1%)であり、リンパ球回収率の高い検体1と2では50-60%の回収率が見られ、このリンパ球回収率の低下と平行してCD34陽性CD33陰性細胞の回収も低下していた。

表5

フィコール分離によるCD34陽性CD33陰性細胞の回収

		検体1	検体2	検体3	検体4	検体5	平均
分離前 x10 <sup>4</sup>	CD34+CD33-細胞数	17.8	13.3	13.2	29.3	59.5	
分離後 x10 <sup>4</sup> (%)	CD34+CD33-細胞数 (リンパ球回収率)	10.6 (61.3)	6.7 (62.2)	5.9 (37.6)	12.4 (51.3)	3.61 (30.4)	
回収率 (%)		59.6	50.4	44.5	42.3	6.1	40.58

## C.考察

臍帯血6-10mlから、造血幹細胞を含むフラクションCD34陽性CD33陰性細胞が、 $10^4$ - $10^5$ 個得られた。フィコールを用いた細胞分離では、最大60%の回収があり、この回収率は検体の保存状況により低下した。すなわち分娩時刻が夜間の時間帯の場合、検体は4℃の冷蔵庫内で長時間保存されることになり、一部凝固などの影響により有核細胞の回収低下およびCD34陽性CD33陰性細胞の回収率の低下が認められた。有核細胞総数の維持では、得られる臍帯血の総量が少ないことから、分離保存より全血保存あるいは赤血球だけを大まかに取り除く保存が有利と考えられた。

### 2)デキストランによるリンパ球の回収

臍帯血の採取から測定までの冷蔵保存時間が造血幹細胞の回収におよぼす影響を調べるために、臍帯血（EDTA添加血）を24時間冷蔵保存し、その前後におけるリンパ球の回収率を比較することにした。

リンパ球分画を採取し細胞数を測定するために、臍帯血をデキストラン溶液（6%高分子デキストラン；MW20万）と混合し、室温で一定時間静置した後に、赤血球沈降層を除く分画を回収し、auto cell counterにてリンパ球数を測定、全血時のリンパ球総数からデキストラン分離後のリンパ球回収率を求めた。

#### a)デキストランの混合比率の検討

デキストランの至適混合比率を求めるために、臍帯血（EDTA添加血）1

に対して、等量、1.5倍容、2倍容のデキストランを加えヘマトクリットを測定（約25%、20%、15%）、その後、室温で30分間、45分間、60分間、90分間静置し、上清部分を回収してリンパ球の回収率を求めた。

—結果—

ヘマトクリット値20%（臍帯血：6%デキストラン溶液＝2：3）の時最も高い回収率が得られた。またデキストランとの親和時間は60分に回収効率のピークが見られた。

表6

デキストラン混合比および静置時間のリンパ球回収におよぼす影響

静置時間 (分)	ヘマトクリット値		
	15%	20%	25%
30	0.33	0.49	0.28
45	0.36	0.48	0.32
60	0.41	0.47	0.41
90	0.28	0.45	0.26

b)臍帯血の24時間冷蔵保存のリンパ球回収率におよぼす影響

臍帯血（EDTA添加血）を、4℃の冷蔵庫内で24時間保存し、この保存前後について、デキストラン混合によるリンパ球回収を行い、1日の冷蔵保存によりリンパ球（造血幹細胞も含まれる）の回収がどのような影響を受けるかを検討した。デキストラン溶液の混合および静置時間については、実験a)で得られた至適混合比（2：3）および至適時間（60分）によった。

—結果—

デキストランによるリンパ球の回収率は当日処理の場合27.4±4.4%に対し、

24時間冷蔵保存後処理では $35.3 \pm 5.1\%$ と回収効率の上昇が見られた。(表7)

表7

24時間冷蔵保存によるリンパ球回収効率への影響

	検体6	検体7	検体8	検体9	検体10
当日の回収率 (%)	22.8	35.2	26.5	24.1	28.5
24時間後の回収率 (%)	30.6	34.9	35.9	30.5	44.6

### C.考察

フィコール分離によるCD34陽性細胞の回収率が臍帯血を採取した後、4℃の冷蔵庫内で長く保存した場合に低下する傾向が見られたので、これに対する対策を検討するための基礎実験を行った。細胞分離は最もシンプルな方法として6%デキストラン溶液と混和後、室温静置した後に有核細胞分画を回収することにした。デキストラン溶液混和の至適条件の検討では、臍帯血(EDTA添加血) 2に対し、デキストラン溶液3の割合で混和後、室温で60分間静置する時に最も高いリンパ球の回収が得られた。しかし24時間冷蔵保存した臍帯血のリンパ球回収率を、前値(冷蔵保存前)と比較した場合、24時間冷蔵保存したものの方がリンパ球の回収効率は高く、長期保存したものでリンパ球回収率が向上するという矛盾する結果となった。この理由としては、有核細胞の赤血球部分との比重比(有核細胞の方が軽い)が大きくなって、上層での回収が増加することが考えられ、冷蔵保存に伴う細胞の膨化あるいは変形が背景にあると推定された。

これらの結果から、フィコール分離における臍帯血CD34陽性細胞の回収

が、臍帯血の採取から分離操作までの冷蔵保存時間に依存して低下する原因として、保存による細胞へのダメージが原因ではなく、抗凝固剤としてヘパリンを用いているため、その効果時間が短く、保存時間の長い検体では血液凝固が起こることが原因と考えられ、臍帯血採取時の抗凝固剤としては、抗凝固活性低下の少ないクエン酸系のACD液を用いる方がよいと思われた。

### 【造血幹細胞の培養】

臍帯血の有核細胞のうち、フィコールによって分離された細胞分画について池淵らの方法に従って培養、コロニーアッセイを行った。

#### A.実験方法

臍帯血のフィコール分離細胞(n=4)を、2%FCS添加Iscove's mediumにより細胞数 $5 \times 10^5$  cell/mlに調整し、その0.3mlをプラスチックディッシュのメチルセルロース培地（\*）3mlに捲き( $5 \times 10^4$  cell/dish)、1検体につき2ディッシュとして、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で最長20日間培養、各コロニーが明らかになる培養10日目以後、14日目、20日目に、実体顕微鏡によりコロニーの成育状況を観察した。

\* METHOCULT GF H4434(STEMCELL TECHNOLOGIES, INC)

0.9%	Iscove's Methylcellulose
30%	FCS
1%	BSA
3U/ml	Erythropoietin
10 <sup>-4</sup> M	Mercaptoethanol
2mM	L-glutamine
50ng/ml	rh Stem Cell Factor
10ng/ml	rh GM-CSF
10ng/ml	rh IL-3

## B.結果

CFU-Eは培養10日目ないし14日目にコロニー数のピークを迎え以後減少、CFU-GM(cluster,G)では培養10日目にピークが、BFU-E, CFU-GM(M), Mixでは14日目にコロニー数のピークを認めた。各検体間のコロニー形成のパターンはよく似ており、総コロニー数は14日目にピークがあった。

表8

### 臍帯血フィコール分離有核細胞のコロニー形成

		培養10日目	培養14日目	培養20日目
CFU-E	検体11	33/28	41/30	20/38
	検体12	28/41	14/20	15/8
	検体13	32/31	20/42	
	検体14	22/34	22/22	
BFU-E	検体11	81/103	304/311	263/233
	検体12	124/120	415/424	348/315
	検体13	124/134	348/352	
	検体14	143/119	419/402	
cluster	検体11	57/59	11/9	9/7
	検体12	42/32	1/2	4/6
	検体13	27/26	5/11	
	検体14	21/16	5/6	
CFU-GM (M)	検体11	58/29	103/94	93/112
	検体12	50/64	98/100	82/87
	検体13	81/97	110/142	
	検体14	66/80	65/78	
(G)	検体11	156/163	5/3	1/3
	検体12	241/253	2/2	0/0
	検体13	137/131	4/7	
	検体14	162/132	2/15	
Mix	検体11	5/7	19/25	24/38
	検体12	14/7	22/25	41/41
	検体13	12/32	27/39	
	検体14	12/7	21/37	

## C.考察

臍帯血フィコール分離細胞の長期培養（最長20日間）による、コロニー形成を観察した。培養14日をすぎると、コロニー数の減少傾向が著明となり、培養液中のサイトカインの効果の低下がうかがわれた。この実験に先立って、SCF, G-CSF, IL-3の添加量を変え、コロニー形成がどのような影響を受けるか検討したが、その結果は再現性に乏しく、結局既製のサイトカイン含有培地を用いる方が簡便かつ安定した結果が得られることがわかった。

### 【臍帯血有核細胞の凍結保存】

臍帯血有核細胞を用いた実験では、検体が分娩に際してしか得られないために、これを一時処理した後、凍結保存する必要がある。造血幹細胞の凍結保存については、すでに $-80^{\circ}\text{C}$ 冷蔵庫内での単純冷却保存で細胞のバイアビリティに支障をきたさないことがわかっており、我々もこの方法によった。

## A.実験方法

臍帯血を各々3mlに分注し、全血、デキストラン分離細胞、フィコール分離細胞の3分画とし、それぞれauto cell counterにてリンパ球数を求め、全血については凍害防止剤; \*\*CP-1（極東製薬, 東京）を半量加え、 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷蔵庫内に保存、デキストラン分離分画はその5分の1量の25%ヒトアルブミン液を加えた後、その半量のCP-1を加え凍結、フィコール分離分画はIMDM約1mlに浮遊させた状態で等量のCP-1と混合し凍結した。

\*\*CP-1 : HES 12g, DMSO 10ml, 生理食塩水を加え 全量68ml

約1ヶ月、 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷蔵庫内で保存した後、 $37^{\circ}\text{C}$  water bath中で解凍、PBSで洗浄した後、auto cell counterにてリンパ球数を測定、凍結による回収率を計算した。さらにこれら3分画について培養を行い、培養1週目あるいは10日目の総コロニー数を求めた。

## B.結果および考察

表9

### 3種類の凍結保存法による解凍後コロニー形成

		凍結前 リンパ球数 ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	解凍後 リンパ球数 ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	培養10日目 コロニー数	培養20日目 コロニー数
全血	検体15	2.97	0.51	246/248	320/244
	検体16	4.17	1.67	105/77	
デキストラン分離	検体15	0.96	0.09	19/22	59/97
	検体16	0.49	0.3	6/2	
フィコール分離	検体15	1.28	0.64	163/158	223/240
	検体16	1.69	0.85	28/21	

解凍後の細胞培養では、全血分画のコロニー形成が最も高い結果となった。この理由として、スタート時点での細胞数（解凍後細胞数）が非常に少なく、培養開始時のstem cell数の差から、培養2週間では全血の方が有利と考えられた。しかしフィコール分離分画の培養20日目のコロニー数は比較的多く、解凍後の検体の凝集変性等を考えると、やはり分離分画保存の方がよいと思われる。

## 【凍結保存臍帯血有核細胞によるHGFの分泌】

臍帯血中の有核細胞の肝臓機能に関連した役割を検討するうえで、これら細胞が産生するサイトカインを測定することとした。HGFは肝実質細胞の増殖を促進する効果が知られている因子であり、臍帯血のフィコール分離有核細胞の培養上清中に分泌されるものを、ヒトHGFに特異的なEIAキットにより測定することにした。

### A. 実験方法

はじめにベースラインとして、臍帯血血清中のHGF濃度 (n=4) 、コントロールとして成人末梢血血清中のHGF濃度 (n=4) をHGF測定キット(特殊免疫研究所, 東京) により測定した。

臍帯血 (ヘパリン採血) 約10mlからフィコールにより分離した有核細胞を、auto cell counterおよびFCMによりCD34陽性CD33陰性細胞数の測定を行った後(n=5) 、等量の10%DMSO,10%FCS添加IMDMと混合して-80℃の冷凍庫内に最長1か月間保存、37℃の温浴により解凍し培養に供した。

容量3mlのプラスティックデイッシュに、IMDMに浮遊させた臍帯血有核細胞 ( $10^5 \sim 10^6$ 個/ml) 2mlを各種サイトカインとともに混和し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で72時間まで培養した。

培養液中のサイトカインとしては各dish、30%FCS、100ngG-CSF(Kirin)、10ngIL-3(Kirin)として用い、コントロールとしてこれを除いた群を設定した。

培養24時間後および72時間後に、培養液上清中のHGF濃度をHGF測定キ

ットにより測定した。

## B.結果

臍帯血血清中のHGF濃度は $0.494 \pm 0.117$ ng/ml、成人末梢血中のHGF濃度は $0.358 \pm 0.047$ ng/mlだった。臍帯血有核細胞の培養によるHGF分泌はサイトカインを加えた群で、24時間後が $0.126 \pm 0.094$ ng/ $10^6$  cell、72時間後が $0.448 \pm 0.424$ ng/ $10^6$  cellで、サイトカインを加えない群では、24時間後が $0.125 \pm 0.080$ ng/ $10^6$  cell、72時間後が $0.152 \pm 0.121$ ng/ $10^6$  cellであった。臍帯血有核細胞中のCD34陽性CD33陰性細胞数に換算したHGF分泌では、サイトカインを加えた群で、培養24時間後が $13.3 \pm 11.3$ ng/ $10^6$  cell、培養72時間後が $41.2 \pm 31.7$ ng/ $10^6$ cellであった（表10）。

表10

### 臍帯血有核細胞の培養におけるHGF分泌

	検体21	検体22	検体23	検体24	検体25
有核細胞数 (x $10^6$ cell/ml)	0.107	0.63	0.73	0.57	0.15
CD34+CD33- (%)	1.6	0.78	0.7	1.4	0.76
24時間培養(*)					
cytok.+	0.215	0.029	0.085	0.040	0.260
cytok.-	0.215	0.040	0.110	0.039	0.220
72時間培養(*)					
cytok.+	1.200	0.137	0.142	0.123	0.640
cytok.-	0.234	0.033	0.108	0.040	0.347
CD34+CD33-換算 (*) 24時間後	13.4	3.7	12.2	3.0	34.2
72時間後	75.0	17.6	20.3	8.8	84.2

(\*);ng/ $10^6$ cell

## C.考察

臍帯血血清中のHGF濃度は末梢血中の濃度に比べ高値であり、臍帯血中の細胞群からのHGF分泌の可能性が示唆されている。この臍帯血有核細胞の培養実験では、サイトカインを含む培地の細胞群でHGF分泌が見られた。培養を行った5検体のうち検体21と検体25については、培養上清中に現れるHGFが経時的に増加しており、バイアブルな細胞が多く、他の3検体についてはバイアビリテイの低下がうかがわれた。

造血幹細胞のバイアビリテイの判定法として、培養14日間のコロニー形成を観察する方法がとられているが、短期間での判定法はない。今回の実験は、目的は肝機能に関連する細胞群の検索であったが、移植後細胞機能の早期判定法として、このHGF分泌能の測定も利用可能かもしれない。

### 【臍帯血有核細胞における接着細胞】

臍帯血中に含まれる有核細胞の特に接着能を有する細胞の形態学的特徴を調べることにした。

## A.実験方法

臍帯血からフィーコール分離により有核細胞を回収し、IMDMにて最終容量1mlに調整した。接着担体としては、non-coatingのラテックス粒子（粒子径約100 $\mu$ m）を、PBSで洗浄、1mlのIMDMにsuspend（10<sup>4</sup>個/ml）して用いた。有核細胞を含む培養液と等量のラテックス粒子液を室温、60分間、120分間（5分ごとに振とう）反応させ、PBSで1回洗浄した後、ギムザ染色、

光学顕微鏡（x 200倍）にて観察した。

## B.結果および考察

接着細胞は極めて少なく、わずかな接着細胞についても強い変形が見られた。この実験系では、接着細胞の形態学的特徴を評価することはできないと思われた。接着細胞を回収する場合、やはり接着の担体に何らかの接着基質をcoatingする必要があるが、この接着基質の親和性（特異性）によっては、目的とする細胞が得られるかどうかの補償がなく、今回の実験ではnon-coatingのものを用いた。しかし結果としては、細胞の回収率があまりに低く、この先の実験に供することができず、この回収率向上のための工夫が必要と考えられた。