

ヒト骨髄の冷凍保存に関する研究-1-骨髄冷凍保存条件に関する基礎的検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8874

ヒト骨髄の冷凍保存に関する研究

I. 骨髄冷凍保存条件に関する基礎的検討

金沢大学医学部第3内科

石野 千津子

(昭和55年11月25日受付)

本論文の要旨は第39回日本血液学会総会, 第25回日本輸血学会総会において発表した。

骨髄抑制は悪性疾患の化学療法や放射線治療を継続するさい、必ず遭遇する重大な問題であり、そのためにしばしば治療を中断せざるを得なかったり、あるいは重篤な合併症の発生をみるにいたる。したがってこの骨髄抑制を克服できれば、現在より強力な化学療法が可能となり、しかもより良好な治療効果を期待することも可能である。このような観点から化学療法および放射線治療の結果もたらされる致命的な造血不全に対して、前もって冷凍保存しておいた正常造血能を有する自家骨髄を投与するという治療方法が考えられる¹⁾²⁾。この方法を臨床的に応用するためには、まず冷凍保存された骨髄が解凍後移植される場合に十分な造血機能を維持し得るように、種々の角度から冷凍保存、解凍条件を検討し、至適条件を設定する必要がある。

骨髄は形態的にも機能的にも異なった数種類の細胞群によって構成されている。冷凍保存する骨髄の中で最も重要な細胞は造血幹細胞であり、骨髄の冷凍保存は造血幹細胞の保存に他ならない。造血幹細胞は機能的単位として測定可能であるが、形態学的にはまだ同定されておらず、骨髄細胞 $10^4 \sim 10^5$ 個に1個の割合で存在するといわれる³⁾。このように骨髄には造血幹細胞の他に heterogenous cell populations が存在するために、冷凍保存した骨髄の生存性の判定や至適条件の評価が困難であった。生存性の判定には形態学的変化、色素排泄試験、³H - thymidin のとり込みなどが指標として利用されてきた。しかしながら、これらの方法は必ずしも造血幹細胞としての機能を反映しているとはいえず、このため至適冷凍保存条件は研究者によって異なっているのが実状であった。自家骨髄移植が成功するためには、解凍骨髄細胞中の造血幹細胞が移植後ただちに生着するだけでなく、自己再生、分化、増殖という造血幹細胞としての機能を維持しなけ

ればならない。近年造血幹細胞に関する研究は急速に進歩し、その成果としていくつかの成熟段階の異なる造血幹細胞の存在が明らかにされ、その定量的測定法も確立されている⁴⁾。多能性幹細胞 (colony forming unit in spleen, CFU - S) は赤血球、白血球、血小板に分化する能力を有し、冷凍保存骨髄の生存性の判定には最も望ましい造血幹細胞の定量的測定法である³⁾。しかしこの CFU - S 測定法は致死量照射マウスにおける脾コロニー形成を利用するもので、ヒトではこれに相当する造血幹細胞の測定法はまだ確立されていない。したがって、ヒト骨髄の造血能を評価するには顆粒球系前駆細胞 (colony forming unit in culture, CFU - C) や赤芽球系前駆細胞 (erythropoietin responsive colony forming unit, CFU - E ; erythropoietin responsive burst forming unit, BFU - E) などで測定するのが最も適当と思われる。ここでは CFU - C を指標として、ヒト骨髄冷凍保存の至適条件を決定するための基礎的条件、即ち凍害保護剤の種類と濃度、血清添加の影響、細胞濃度、保存期間等について検討を行い、臨床的にも応用できる至適条件を設定できたので報告する。

材料および方法

1) 骨髄細胞

鉄欠乏性貧血、本態性血小板減少症、寛解期白血病患者、鑑別診断のため骨髄穿刺を受けた非血液疾患の患者のうち正常な骨髄像を示す症例を対象として、胸骨より通常の方法で骨髄穿刺液を吸引し、これを小試験管に移して室温下で約1時間静置後、buffy coatを採取した。つぎに、この buffy coat を McCoy 5A 培養液 (Grand Island Biological Co. GIBCO, New

Study on Cryopreservation of Human Bone Marrow Cell. I. Determination of the Optimal Condition for Hemopoietic Activity. Chizuko Ishino, Department of Internal Medicine (III), Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa, Japan.

York) で2回洗浄し、骨髄細胞浮遊液とした。一部はコントロール(冷凍前)のCFU-C測定に用い、残りを冷凍保存した。

2) CFU-Cの測定

CFU-Cの測定はPike & Robinson⁵⁾の方法に準じて行った。培養液はPikeらの処方に従って、アミノ酸やビタミンを添加したMcCoy 5A培養液に牛胎児血清(FCS, Flow Lab. Stanmore, N. S. W. Australia)を15%加えたものをplating mediumとして用いた。このplating mediumに寒天(Bacto agar, DIFCO Lab. Detroit Michigan)を0.5%加え、さらに正常ヒト末梢血より得た白血球を 1×10^6 /mlとなるように添加調整し、この1mlを35mmの組織培養皿(Falcon # 3001 CA)に分注してfeeder layerを作製した。新鮮骨髄細胞あるいは解凍骨髄細胞は、0.3%寒天を含むplating mediumに 2×10^5 /mlとなるように調整し、その1mlをfeeder layerに重層しover layerとした。培養はtriplicateで37℃, 7.5%CO₂, 100%湿度の条件下で14日間行い、培養終了後倒立顕微鏡下で50個以上の細胞からなるコロニーを算定した。冷凍保存前後の検討は同一のfeeder layerもしくは同一人の末梢白血球にて作成したものをを用いた。

3) 凍害保護液

凍害保護剤はグリセリン(和光純薬, 東京)およびdimethyl sulfoxide(DMSO 和光)を用い、McCoy 5A培養液に種々の濃度のグリセリンまたはDMSOを使用直前に加えて凍害保護液を作製した。

4) 冷凍保存方法

細胞数を 2×10^7 /mlに調整した骨髄細胞浮遊液にグリセリンまたはDMSOをそれぞれ10%, 20%, 30%含む凍害保護液を等量、緩徐に加え凍害保護剤の最終濃度が5%, 10%, 15%となるようにした。これを1mlずつ凍結保存チューブ(Nunc, N-1076-1 Denmark)に分注し、プログラムフリーザー(荏原製作所 PF22, 東京)に静置し-1℃/minの冷却速度で-70℃まで緩速冷凍を行い、ただちに液体窒素中(-196℃)に保存した。

5) 解凍

解凍は40℃の恒温槽で急速解凍によって行った。原則として保存後7日から30日までの間に解凍し、一部は保存期間の影響をみるために、さらに長期間保存した。

6) 洗浄方法

McCoy 5A培養液をできるだけゆっくり加え、10倍以上に希釈し、2回遠心洗浄を行った後細胞数を算定し

細胞回収率を求め、さらにCFU-C測定を行った。同時に0.25% trypan blueを用い、色素排泄試験による生存性、ギムザ染色による形態学的変化も検討した。

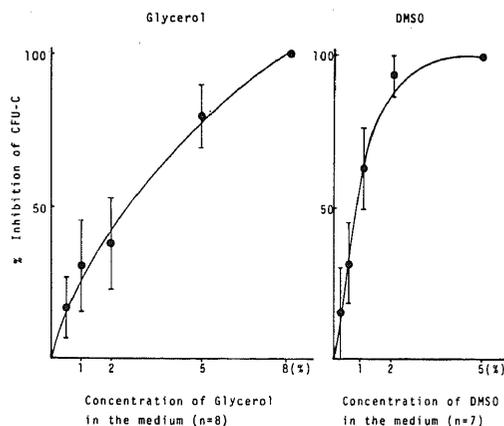
成 績

1) 凍害保護剤の細胞毒性

グリセリン, DMSOなど凍害保護剤は細胞毒性のないことが望ましいので⁶⁾, CFU-Cに対する影響を検討した。Over layer中にグリセリンは0.5, 1.0, 2.0, 8.0%, DMSOは0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0%となるように添加し、グリセリンあるいはDMSOの存在下でCFU-C測定を行った。その成績は図1に示されるように、グリセリン, DMSOはともに濃度依存性にin vitroコロニー形成を抑制した。グリセリンは1%でコロニー形成抑制率は30%, 5%で抑制率は80%となり、グリセリン8%以上の存在下でコロニー形成は全くみられなかった。またDMSOが0.5%存在するとコロニー形成抑制率は30%であり、1%では抑制率63%となり、DMSO 2%以上ではコロニー形成は全く認めなかった。以上の結果より以下の実験では凍害保護剤を除去するために解凍骨髄細胞は洗浄を行うことにした。

2) 形態学的変化

図2は凍結保存前後の骨髄細胞のギムザ染色標本である。解凍骨髄の染色標本で特徴的なことは成熟好中球は著明な減少を示し、形態的に分類不能の細胞が著しく増加した。これらの細胞は変性により細胞質を失



$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{\text{No. of CFU-C (test)}}{\text{No. of CFU-C (control)}} \right) \times 100$$

図1 Cytotoxic effect of cryoprotective agents on granulocyte progenitor cells (CFU-C)

った核幻影と言われるものと考えられる。残存している顆粒球も核および細胞質の膨化、あるいは核濃縮、細胞質の脱顆粒がみられた。好中球に比べて好酸球、好塩基球の顆粒球は比較的良好に保たれていた。一方赤芽球やリンパ球は以上のような変化が少なく、その形態学的特徴をかなり保持していた。表1は冷凍保存前後の骨髄細胞の百分率を10例の平均値で示したものであるが、未熟および成熟顆粒球の著減が認められる

のに対して赤芽球およびリンパ球の比率は変化を示さず、一方形態学的に分類不能と判断される細胞は $42.4 \pm 17.4\%$ と高率にみられた。

3) 凍害保護剤の影響

グリセリンおよびDMSOの各濃度(5~15%)で骨髄細胞を冷凍保存した場合の生存性、細胞回収率、CFU-C回収率を表2に示した。trypan blue色素排泄試験による生存性はグリセリン各濃度、DMSO各濃

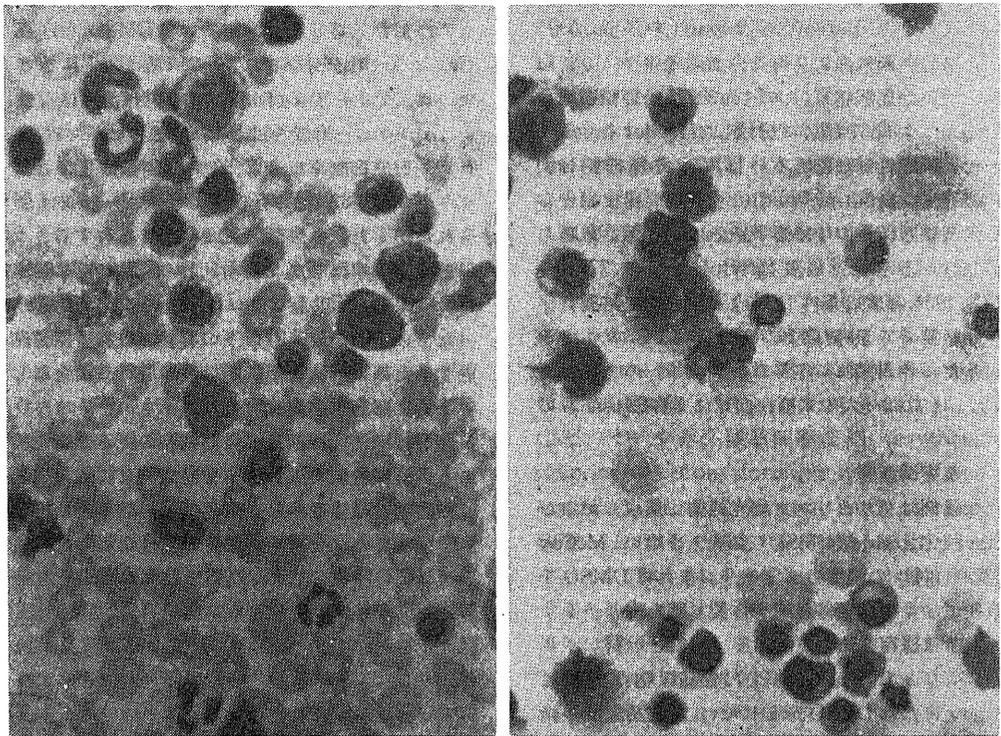


図2 Giemsa-stained smears of bone marrow cells fresh ones in the left and frozen-thawed one's in the right ($\times 400$)

Table 1. Changes in differentials of bone marrow cells before and after freezing

Type of cell	Differentials (%)	
	Before	After
Erythroblasts	24.8 ± 4.3	24.9 ± 14.3
Immature granulocytes	21.3 ± 7.9	4.8 ± 4.9
Mature granulocytes	24.6 ± 4.9	3.1 ± 4.0
Lymphocytes	21.8 ± 11.1	21.4 ± 12.2
Unclassified	0	42.4 ± 17.4

Each value represents the mean \pm standard deviation in 10 experiments.

度間に有意差はなく、またグリセリンと DMSO との比較でも差異はみられなかった。細胞回収率はグリセリン、DMSO とともに 15% の濃度でそれぞれ $32.1 \pm 22.0\%$, $37.4 \pm 15.3\%$ と高くなる傾向がみられ、10%、15% 濃度では DMSO はグリセリンより高い回収率が得られた。最終的な CFU - C の回収率を次式によって CFU - C 総回収率 (%) として計算した。

CFU-C 総回収率 (%)

$$= \frac{\text{No. of CFU-C}/2 \times 10^5 \text{ 解凍骨髄細胞}}{\text{No. of CFU-C}/2 \times 10^5 \text{ 新鮮骨髄細胞}} \times \text{細胞回収率 (\%)}$$

CFU - C 総回収率は 10% DMSO を用いたとき $46.2 \pm 9.5\%$ と最も高値であった。10% DMSO に比べてグリセリンの各濃度、5% DMSO で CFU - C 総回収率は有意に低下していたが、15% DMSO との比較では有意差は得られなかった。また trypan blue 色素排洩試験による生存性と CFU - C 回収率に相関はみられなかつ

た。

4) 血清添加の影響

凍害保護剤として 10% DMSO を用い FCS を 15% 添加した場合の回収率に及ぼす影響を比較検討した。成績は表 3 に示されるように、FCS 非添加群に比べ、FCS を添加した場合に細胞回収率、CFU - C 総回収率ともに有意の増加が認められた。したがって以下の実験は 10% DMSO および 15% FCS を添加した凍害保護液を使用した。

5) 細胞濃度の影響

冷凍保存する際の細胞濃度は臨床応用では大容量の骨髄細胞を保存しなければならないので、全体の容量を左右する要因となり得るが、CFU - C 回収率は $1 \sim 5 \times 10^7 / \text{ml}$ で有意差は認められなかった(表 4)。しかし、これより低い細胞濃度 ($0.5 \times 10^7 / \text{ml}$) では CFU - C 回収率は有意に低下した。

6) 保存期間の影響

つぎに保存期間が CFU - C 総回収率に及ぼす影響

Table 2. Effect of different concentrations of glycerol and DMSO on CFU-C recovery

Cryoprotective Solution	Viability ^a (%)	Cell recovery after freezing (%)	Total CFU-C recovery ^b (%)	P
5% Glycerol	80.7 ± 14.8	22.2 ± 12.3	4.3 ± 2.5	<0.001
10% Glycerol	83.0 ± 7.1	29.8 ± 17.0	23.9 ± 14.7	<0.01
15% Glycerol	80.6 ± 9.1	32.1 ± 22.0	20.0 ± 15.0	<0.01
5% DMSO	85.4 ± 8.8	18.3 ± 10.3	16.0 ± 9.9	<0.001
10% DMSO	87.7 ± 5.5	34.0 ± 11.8	46.2 ± 9.5^c	
15% DMSO	82.3 ± 8.7	37.4 ± 15.3	40.2 ± 11.0	>0.1

Each value represent the mean \pm SD in 10 experiments

a : Viability is referred to % cells unstained with trypan blue dye exclusion

b : $\frac{\text{No. of CFU-C}/2 \times 10^5 \text{ frozen bone marrow cells}}{\text{No. of CFU-C}/2 \times 10^5 \text{ fresh bone marrow cells}} \times \text{cell recovery (\%)}$

c : The highest value for statistical evaluation by Student t test

Table 3. Effect of addition of fetal calf serum (FCS) on cryopreservative effectiveness

Cryoprotective solution	Viability ^a (%)	Cell recovery after freezing (%)	Total CFU-C recovery ^b (%)
10% DMSO	88.5 ± 7.6	37.5 ± 12.5	45.2 ± 17.9
10% DMSO with 15% FCS	85.1 ± 4.8	49.8 ± 6.0	69.3 ± 13.2

$p > 0.1^c$ (between Viability) $p < 0.001^c$ (between Cell recovery) $p < 0.001^c$ (between Total CFU-C recovery)

Each value represents the mean \pm SD in 15 experiments

a, b : See the footnote in Table 2

c : Each value was evaluated statistically by Student t test

Table 4. Effect of cell concentration on CFU-C recovery

Cell concentration	cell recovery (%)	Total CFU-C recovery (%)	Students t-test
0.5×10 ⁷ /ml	65.6±22.5	52.7± 7.2	p < 0.02
1×10 ⁷	63.8±16.2	56.8±12.5	p > 0.1
2×10 ⁷	66.1±17.8	68.3±10.0	
5×10 ⁷	66.3±12.4	66.6± 6.8	p > 0.2

Mean±SD in 6 experiments

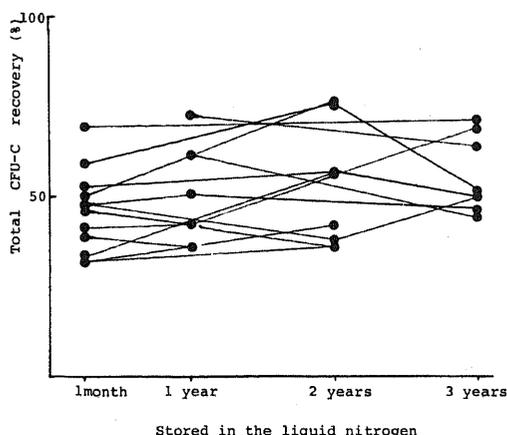


図3 Total CFU-C recovery after various periods of storage in the liquid nitrogen

を検討した。同一サンプルを1カ月-3年間液体窒素中に冷凍保存し、1カ月以内、1年、2年、3年後のCFU-C回収率を図3に示した。図から明らかなように、少なくとも3年間までの長期冷凍保存では保存期間の長短に拘らず、CFU-C回収率に有意差は認められなかった。3年間保存後のCFU-Cの回収率は55.9±10.7%であった。

考 察

臨床応用を目的としてヒト骨髄を冷凍保存するためには、1) 毒性のない、凍害保護効果の高い保護物質の選択、2) 凍害保護剤の至適濃度、3) 凍害保護液の組成、4) 冷凍条件および保存温度、5) 解凍条件、などを造血能を指標として検討する必要がある。

凍害保護物質としては、グリセリンが最初に精子の冷凍保存で凍害防止作用を持つことが偶然見出され⁷⁾以来、多くの動物細胞の保存にグリセリンが賞用されるようになった。その作用機序は膜透過性の高い低

分子物質が細胞の内外に溶存すると、細胞内氷晶形成が減少し細胞膜を保護するためといわれている⁸⁾。同様に低分子で膜透過性が高く、水溶液電解液に高い溶解度を示す物質としてDMSO⁹⁾, ethylenglycol等も用いられるようになり、今回の検討ではDMSOとグリセリンについて比較検討を行った。凍害保護物質の条件として毒性の少ないことが挙げられるが、グリセリンは脳圧亢進の治療剤¹⁰⁾として、またDMSOはpenetrant carrier, 消炎剤などとして臨床的にも使用され¹¹⁾、一般に毒性は少ない¹²⁾といわれる。しかし造血幹細胞に対してグリセリンおよびDMSOはマウスのCFU-S¹³⁾, CFU-C¹⁴⁾を抑制するといわれ、またヒト骨髄細胞に対しても図1に示したように、グリセリンあるいはDMSOが培養液中に存在するとin vitroコロニー形成が抑制される。その抑制効果は濃度に依存し、またDMSOはグリセリンより強い抑制を示していた。またヒト骨髄細胞を培養前にグリセリンおよびDMSOで前処置した場合には、作用時間、処理温度に比例してCFU-Cが抑制されていた¹⁵⁾。その理由として浸透圧と生物学的毒性が挙げられる。細胞は細胞外浸透圧が高くなると容積を減少させることによって対応し、さらに浸透圧が上昇しこの容積減少の限界をこえると、細胞膜障害が生じる¹⁶⁾。グリセリンやDMSOなど低分子凍害保護物質は通常用いられる濃度、例えば10%ではグリセリンは1884mOsm, DMSOは1964mOsm¹³⁾となり、これは等張の6倍以上という高浸透圧に相当する。したがって細胞浮遊液に凍害保護液が加えられるとき、さらに細胞を等張液で洗浄するときには急激な浸透圧変化が生じ、浸透圧ストレスとなって細胞障害が発生すると考えられている¹⁷⁾。これに対して毒性はあまり重要視されていないが、DMSOは0.5%で、グリセリンは1%と低い濃度でin vitroコロニー形成は30%以上抑制され、造血幹細胞に対する毒性は無視できないと思われる。またDMSOは静脈内大量投与で肝障害、腎障害も起るといわれて

おり¹⁸⁾、これらの点を考慮して凍害保護剤除去のために解凍後洗浄操作を行った。

凍害保護物質は組織や、また同じ組織でも動物の種の違いによって保護効果が異なるといわれる¹⁹⁾。マウス骨髄細胞の冷凍保存はCFU - Sを造血能の指標として検討されている。凍害保護剤としてはグリセリン²⁰⁻²⁴⁾、DMSO²⁰⁻²³⁾²⁵⁾、シ ョ 糖²⁴⁾、polyvinylpyrrolidone^{24)~26)}、デキストラン²⁶⁾、hydroxyethyl starch²⁵⁾、ethylenglycol²³⁾など多くの凍害保護物質が用いられ、いずれも保護効果のあることが示されている。しかし最も適した凍害保護物質が何か。またその至適濃度について一致した成績は得られていない。これらのうち、頻用されるのはグリセリンとDMSOであり、両者の保護効果を比較検討した成績では、グリセリンとDMSOに有意差がないとするものや¹⁷⁾²³⁾、グリセリンがDMSOよりすぐれた凍害保護効果を示すという成績^{20)~22)}も報告されている。またその濃度の影響を比較した成績では5%²²⁾から12%¹⁴⁾が至適であるといわれる。一方ヒト骨髄の冷凍保存も古くから試みられており、既に述べたように形態学的変化²⁰⁾²⁷⁾、色素排泄試験²⁰⁾、³H - TdRのとり込み²⁰⁾、蛋白合成²⁸⁾、erythropoietin responsive cell(FRC)²⁴⁾など様々なものが生存性の指標として使用されてきたが、至適条件に関する一致した成績が得られないまま、その後造血幹細胞が骨髄造血能の直接の指標として用いられるようになった。Grayら³⁰⁾は10%グリセリンおよびDMSOを凍害保護剤として用い、解凍後のヒト骨髄が新鮮骨髄とほぼ同数のCFU - Cを形成すること、そしてグリセリンとDMSOの成績に差のないことを報告している。我々の検討でも10% DMSOを用いた場合には解凍骨髄のCFU - Cは新鮮骨髄と同数か、あるいはむしろ増加していた。しかしこれに比べて10%グリセリンを用いた場合には解凍骨髄のCFU - Cは新鮮骨髄より減少していた³¹⁾。また細胞回収率も考慮したCFU - C総回収率を指標として比較した今回の成績でも、グリセリンはいずれの濃度においても細胞回収率、CFU - C回収率ともにDMSOより明らかに低値を示した(表4)。以上の成績からヒト骨髄冷凍保存においてDMSOはグリセリンより有意に高い造血幹細胞に対する保護効果を有することが示され、これはRagabら³²⁾の報告と一致する。一方、ヒト骨髄と異なりマウス骨髄細胞の冷凍保存では、先に述べたようにグリセリンはDMSOと同等、もしくは優れているとの報告^{20)~22)}が多いようであるが、これはいわゆる種特異性によるものか、あるいは生存性の検討方法の違いによるものかは不明である。

表4に示されるように、細胞回収率はCFU - C回収率に比べて低いが、これは表1からも明らかのように、細胞数の減少が主として成熟顆粒球の破壊によるものであり、解凍細胞 2×10^5 個当りのCFU - C数はむしろ増加し、CFU - Cの濃縮が起ったためと考えられる。これは造血幹細胞の方が成熟顆粒球に比べて凍害に対する感受性が低いという可能性を示唆するものと思われる。また顆粒球の破壊産物や遊離DNA、などは細胞のaggregationやclumpingを起し細胞回収率を低下させる大きな要因になると予想され、この点を考慮した冷凍保存解凍方法の検討は今後さらに良好な保存成績を得るために重要であろう。

細胞濃度は、臨床応用を目的として大量の骨髄液を保存する場合、その容量を左右する要素となるが、 $1 \sim 5 \times 10^7$ /mlの濃度では回収率に有意差はみられなかった。したがって通常移植される骨髄有核細胞数($1 \sim 3 \times 10^{10}$ 個)から判断して、その容量を500ml前後にすることは十分可能である。しかし赤血球、成熟顆粒球など本来目的とする造血幹細胞以外の細胞を除去し、できるだけ造血幹細胞に富む骨髄細胞液が分離できれば、容量をさらに減少させることができ、さらに先に述べた細胞破壊物や遊離DNAによる細胞のaggregationやclumpingの低下にもつながり、回収率の向上が期待され³³⁾、今後検討を要するものと思われる。

細胞の冷凍保存には通常血清が添加使用されることが多いがその効果を検討した結果、細胞回収率の改善、CFU - Cの回収率の上昇を示す成績が得られ、血清を含む凍害保護液の使用が骨髄細胞の冷凍保存には適していると考えられる。

長期間の冷凍保存において生存性を左右するのは保存条件、殊に保存温度と予想されるが、Malininら²⁷⁾はドライアイス(-69℃~-79℃)で保存したヒト骨髄が3年後にはほとんど形態学的に破壊されたことを報告している。また、Appelbaumら³⁴⁾は犬の骨髄移植実験で液体窒素の気相(-150℃)中に7カ月以上保存された骨髄は短期間保存の場合に比べて移植成績が低下すると述べている。またLowenthalら³⁵⁾もヒト骨髄を液体窒素中で80週間保存し、CFU - Cの生存性が保存期間の延長とともに低下する傾向があると報告している。今回われわれの検討では10%DMSOと15%FCSを含む凍害保護液を用い、液体窒素中(-196℃)に保存したヒト骨髄は3年間の長期保存後にも、細胞回収率は $50.8 \pm 9.1\%$ 、CFU - C回収率は $55.9 \pm 10.7\%$ と短期間保存と変らない良好な成績であった。したがって、液体窒素中(-196℃)に保存すれ

ば、造血幹細胞はその機能を失うことなく長期間、少なくとも3年間は保存可能と考えられる。

結 論

自家骨髄移植の臨床応用を目的にヒト骨髄冷凍保存の至適条件を、顆粒球系の造血幹細胞である CFU-C を指標として検討した結果、以下のような結論を得た。

1) ヒト骨髄を冷凍保存する場合の凍害防止剤としては、グリセリンより DMSO の方が優れており、最終濃度を 10% としたときに最も高い造血幹細胞の回収率が得られる。

2) 凍害保護液に FCS を添加することにより、回収率がさらに良好となる。

3) 冷凍保存する骨髄細胞の細胞濃度を $1 \sim 5 \times 10^7 / \text{ml}$ の範囲にするかぎり、回収率に有意差はみられない。

4) 液体窒素中 (-196°C) に保存されたヒト骨髄は3年間の長期保存後にも十分な造血能を有し、短期保存と同等の回収成績が得られた。

以上の成績に基づいて、大量の骨髄を冷凍保存して、自家骨髄移植を行った治療成績を続報として報告する予定である。

文 献

- 1) Malinin, T. L. : Storage and transplantation of bone marrow in the treatment of malignant diseases. *J. surg. oncology*, **5**, 45-52, (1973).
- 2) Ragab, A. H. : Autologous bone marrow transplantation. *South. Med. J.*, **68**, 1157-1160, (1975).
- 3) Till, J. E., & McCulloch, E. A. : A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Rad. Res.*, **14**, 213-222, (1961).
- 4) 仁保喜之 : 造血細胞の in vitro コロニー法. *最新医学*, **28**, 1705-1719, (1973).
- 5) Pike, B. L., & Robinson, W. A. : Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J. cell. physiol.*, **76**, 77-84, (1970).
- 6) Lovelock, J. E. : The mechanism of the protective action of glycerol against hemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 414-426, (1953).
- 7) Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. : Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**, 666, (1949).
- 8) Doebbler, G. F. : Cryoprotective compounds, review and discussion of structure and function. *Cryobiology*, **3**, 2-11, (1966).
- 9) Lovelock, J. E., & Bishop M. W. H. : Prevention of freezing damage of living cells by dimethylsulfoxide. *Nature*, **183**, 1394-1395, (1959).
- 10) Gilsanz, V., Rebollar, J. L., Buencuerpo, J. & Chanters, M. T. : Controlled trial of glycerol versus dexamethasone in the acute cerebral infarction. *Lancet*, **1**, 1049-1050, (1975).
- 11) Jacob, S. W., Bischel, M., & Herschler, R. J. : Dimethylsulfoxide : A new concept in pharmacotherapy. *Current Therap. Res.*, **6**, 134-135, (1964).
- 12) Leake, C. D. : Meetings; Dimethylsulfoxide. *Science*, **152**, 1614-1649, (1966).
- 13) Harada, M. & Hattori, K. : Effect of cryoprotective agents on hemopoietic stem cells. *Low Temp. Med.*, **2**, 75-80, (1976).
- 14) Abrahams, S., Till, J. E., McCulloch, E. A. & Siminovitch, L. : Assessment of viability of frozen bone marrow cells using a cell culture method. *Cell tissue Kinet.*, **1**, 255-261, (1968).
- 15) 石野千津子, 服部絢一, 原田実根 : ヒト骨髄の冷凍保存(抄録). *日輪会誌*, **25**, 211-212, (1979).
- 16) Meryman, H. T. : Observations on the present state of blood preservation by freezing. *Cryobiology*, **5**, 144-146, (1968).
- 17) Schaefer, U. W., Schmidt, C. G., Dick, K. A. & Bekkum, D. W. : Konservierung von Hämopoietischen Stammzelle. *Z. Krebsforsch.*, **83**, 285-29, (1975).
- 18) Vogin, E. E., Carson, S., Cannon, G., Linegar, C. R. & Rubin, L. F. : Chronic toxicity of DMSO in primates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **16**, 606-612, (1970).
- 19) Van Putten, L. M. : Quantitative aspects of storage of bone marrow cells for transplantation. *Eur. J. Cancer*, **1**, 15-22, (1965).
- 20) Kurnick, N. B., Nokay, N. & Hampton, B. : Survival of frozen stored human and mouse bone marrow cells. *Rad. Res.*, **32**, 706-722, (1967).

- 21) O'Grady, L. F. & Lewis, J. P. : The long-term preservation of bone marrow. *Transfusion*, **12**, 312-316, (1972).
- 22) Dobry E. Fiala, J. & Livora, J. : A comparison of the cryoprotective effect of glycerol and dimethylsulfoxide in the preservation of murine bone marrow. *Blut*, **23**, 359-362, (1971).
- 23) Harada, M. & Hattori, K. : Viability of long-term freeze preserved bone marrow cells of mouse at a low temperature. *Low Temp. Med.*, **1**, 27-31, (1975).
- 24) Leibo, S. P., Farrant, J., Mazur, P., Hanna, M. G. & Smith, L. H. : Effects of freezing on marrow stem cell suspensions : Interaction of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. *Cryobiology*, **6**, 315-332, (1970).
- 25) Schaefer, V. W., Dick, K. A., van Bekkum, D. W. & Schmidt, C. G. : Cryopreservation of bone marrow. *Z. Immunitätsforschung, Exp. Immun.*, **148**, 399-401, (1975).
- 26) Dobry, E. & Livora, J. : Cryoprotective effects of polyvinylpyrrolidone and dextran in the preservation of murine bone marrow. *Blut*, **28**, 282-287, (1974).
- 27) Malinin, J. I., Pegg, P. E., Perry, V. P. & Broding, C. E. : Long term storage of bone marrow cells at liquid nitrogen and dry ice temperatures. *Cryobiology*, **7**, 65-69, (1970).
- 28) Mosimann, W., Furlan, M., Beck, E. A. & Bucher, V. : Zellkonservierung durch Tiefkühlung. *Schweiz. med. Wschr.*, **102**, 1600-1602, (1972).
- 29) Adamson, J. W. & Storb, R. : The proliferative potential of frozen stored human marrow cells. *Transplantation*, **4**, 490-494, (1972).
- 30) Gray, J. L. & Robinson, W. A. : In vitro colony formation by human bone marrow cells after freezing. *J. Lab. Clin. Med.*, **81**, 317-322, (1973).
- 31) 石野千津子, 原田実根, 服部絢一 : 冷凍保存したヒト骨髄の in vitro colony 形成. *医学のあゆみ*, **102**, 529-530, (1977).
- 32) Ragab, A. H., Gilkerson, E. & Ghoi, S. C. : The cryopreservation of colony-forming cells from the bone marrow of children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res.*, **34**, 942-946, (1974).
- 33) Wells, J. R., Sullivan, A. & Cline, M. J. : A technique for separation and cryopreservation of myeloid stem cells from human bone marrow. *Cryobiology*, **16**, 201-210, (1979).
- 34) Appelbaum, F. R., Herzig, G. P., Graw, R. G., Bull, M. I., Bowles, C., Gorin, N. C. & Deisseroth, A. B. : Study of cell dose and storage time on engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in a canine model. *Transplantation*, **26**, 245-248, (1978).
- 35) Lowenthal, R. M., Park, D. S., Goldman, J. M., Th'ng, K. H., Hill, R. S. & Whyte, G. : The cryopreservation of leukemia cells : Morphological and functional changes. *Br. J. Haematol.*, **34**, 105-117, (1976).

Study on Cryopreservation of Human Bone Marrow Cell I Determination of the Optimal Condition for Hemopoietic Activity Chizuko Ishino, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 816-824 (1980).

Abstract I have determined an optimal condition for cryopreservation of the human marrow by the use of colony forming unit in culture (CFU-C) assay to evaluate hemopoietic activity of the frozen-thawed bone marrow cells. On the basis of CFU-C recovery, the results obtained are as follows:

1. 10% DMSO showed the highest recovery of CFU-C among cryoprotective agents tested including 5-15% DMSO or 5-15% glycerol.
2. Addition of serum such as 15% fetal calf serum significantly increased CFU-C recovery.
3. Cell concentration ranging from 1×10^7 to 5×10^7 /ml gave no effect on CFU-C recovery. CFU-C recovery was decreased when the concentration was lower than 1×10^7 /ml.
4. Long-term up to 3 years storage of the marrow cells in liquied nitrogen maintained hemopoietic activity comparable to short-term (1 month) cryopreservation.

These observations provide a basis for effective storage of hemopoietic stem cells which can be applied for clinical autologous bone marrow transplantation.