

厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 臍帯血の再生医療への応用：間葉系細胞の分離とその分化能

分担研究者 高橋 恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング研究部門 客員教授
研究協力者 張 曉紅、伊倉 宏一 同上

研究要旨

これまで臍帯血の提供時に得られる胎盤から、胎盤絨毛組織由来間葉系幹細胞を得てその分化能を調べ、*in vitro*、*in vivo*において胎盤由来間葉系細胞の骨、軟骨、脂肪細胞、神経系細胞への分化することを報告してきた。今回、臍帯血中の間葉系細胞を効率に分離するための条件を検討し、間葉系細胞の分化誘導能を調べた。臍帯血由来間葉系細胞は特に軟骨の再生医療においてアロの間葉系細胞ソースとして期待される。

A. 研究目的

ヒト骨髄間葉系細胞では分離後に増殖、目的とする組織細胞に *in vitro* で分化させて移植、再生医療に供する方法が行われており、臍帯血由来間葉系細胞も骨髄と同様な手法が可能と考えられる。臍帯血に多分化能を有する間葉系細胞の存在には相反する報告出されていた。しかし最近では臍帯血の20-40%の確率で得られるという報告が多い。臍帯血由来間葉系細胞の効率的な採取に関する研究は少ない。臍帯血由来の細胞はドナーへの負担や危険性がなく、また間葉系細胞の免疫源性も低いとされる。我々はこれまで臍帯血の提供時に得られる胎盤から、胎盤絨毛組織由来間葉系幹細胞（胎児側）の分離法を確立し、その分化能を調べてきた。また *in vitro*、*in vivo*において胎盤由来間葉系細胞の骨、軟骨、脂肪細胞、神経系細胞への分化誘導能を調べてきた。今回、臍帯血からの間葉系細胞の分離効率に関わる要因を調べるとともに、その分化能を調べ、臍帯血由来間葉系細胞の再生医療におけるアロの細胞ソースとしての可能

性を検討した。

B. 研究方法

臍帯血バンクにて移植に不適合な臍帯血をインフォームドコンセントを得て使用した。臍帯血は採取されてから時間を変えてフィコールに重層、比重遠心後に単核球層を回収した。単核球をシャーレ上でDMEM+20%FBSで接着させ、接着細胞を回収した。DMEM+20%FBSで3-4週間培養後、形成されたコロニーを回収、増幅細胞をFACSで抗原解析した。また、骨、軟骨、脂肪細胞方向へ分化誘導した。骨細胞への誘導は dexamethasone, ascorbic acid-2-phosphate, β -glycerophosphate の存在下で21日間誘導培養し Kossa 染色で確認した。軟骨細胞への分化は BMP2 と TGF β 存在下、ペレット法で3週間培養し Toluidine blue 染色、Type II collagen 免疫染色を行った。また、ヒト骨髄、脂肪由来間葉系細胞と比較した。またソーティングにてシングルセルにて培養し、増殖後に抗原解析と分化能を調べた。

(倫理面への配慮)

倫理面：臍帯血は東京臍帯血バンクに提供されるもので母親からインフォームドコンセントが得られたものであり、また研究所の倫理委員会に承認されており倫理的に問題はない。また動物実については研究所内の動物実験委員会の審査・承認を得ている。

C. 研究結果

培養後コロニーを形成する間葉系細胞の回収率は、採取後の臍帯血をフィコール分離するまでの時間と容量に影響を受けた。得られ細胞の表面マーカーは骨髄間葉系細胞と同じく、また胎盤由来間葉系細胞とも大差がなかった。Kossa 染色からカルシウムの沈殿を確認し骨細胞への分化が確認された。軟骨細胞への分化に関して臍帯血由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞と比較してより大量の軟骨基質を合成していることが示された。

軟骨細胞に関して3週間培養後、ペレットは白くまた大きくなり、透明度を増した。paraffin 切片で toluidine blue 染色と type II collagen 免疫染色が陽性であった。臍帯血由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞と比較して多量の軟骨基質を合成することを示された。脂肪細胞への分化能は骨髄、脂肪細胞由来間葉系細胞より低かった。

D. 考察

臍帯血由来間葉系細胞の最適な採取に関わる要因、時間、容量条件を得た。また骨、軟骨細胞へ分化しうる細胞が存在していること、特に軟骨細胞への分化能が高いことがあきらかであった。今後 *in vivo* での実

験を追加し、臍帯血間葉系細胞をコンスタントに得る方法を確立またその保存法について研究し、臍帯血バンクに保存される臍帯血が再生医療にも有効であるように検討をする必要がある。

E. 結論

再生医療において間葉系細胞はその多分化能から細胞ソースとして研究がすすめられてきた。骨髄では造血幹細胞と血管内皮前駆細胞が使われてきたが、間葉系細胞は骨・軟骨再生の細胞ソースとなる。しかし自己の骨髄採取は患者への負担、年齢が高い場合や遺伝性疾患などからつねに自己の骨髄由来間葉系細胞を用いることは難しい。非自己（アロ）細胞が移植可能になれば適応は飛躍的に拡大すると考えられ、臍帯血から間葉系細胞を回収して分化誘導することで安全性の高い細胞ソースに成りうると考えられる。

F. 健康危険情報

臍帯血は採集医療機関施設において、正常産の妊婦より提供目的と研究内容について説明と同意を得た上で、分娩後に採取する。採取に際して母親と児の安全性は確保されている。また、採取に際しては、臍帯血バンクにおいて母親に対して問診及びドナーの家族歴の調査を行っており、感染症等の既往歴あるドナーから臍帯血の採取を行わない。臍帯血そのものの安全性については、臍帯血バンクにおいてすべて感染症の検査を行っており、安全性の確認された臍帯血の提供を受けている。なお、問診及び家族歴等個人情報情報は臍帯血バンクにおいて管理し、匿名化の処理を講じている。以

上により、提供を受けた材料は個人のプライバシーが完全に保護されていると同時に、研究従事者の安全性も確保されている。

G. 研究発表

論文発表

Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Tsuneo A. Takahashi. Mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun.*340, 944-952, 2006.

Okada H, Nagamura-Inoue T, Mori Y, Takahashi TA. $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT cells expanded from Cord blood mononuclear cells under Interleukin-15, IL-7 and Flt3-L depend on monocytes. *Eur. J. Immunol.*36, 236-244, 2006

Yasurake M, Zheng Y, Nagamura-Inoue T, Akagawa E, Tokushima Y, Terashima S and Takahasi TA. SCID repopulating activity of human umbilical cord blood derived hematopoietic stem and progenitor cells in an nonobese diabetiv/Shi SCID mice serial xenotransplantation model and immune cell activities in vitro: a comparative study of the filter method and the hydroxyethyl starch method. *Transfusion* 45, 1899-1908, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 臍帯血ミニ移植の安全性向上についての研究

分担研究者 谷口 修一 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 血液科部長

研究要旨

移植前処置を軽減したミニ移植の登場は、従来は移植を行うことができなかった高齢者にも同種移植の適応を拡大した。白血病は50歳を超えると急速にその発症頻度が増加し、かつこの世代の予後は極めて不良であった。また臍帯血の場合、成人の移植適応患者の90-95%に同種移植を行うことが可能である。このため、厳正な臨床試験を行い、臍帯血を用いたミニ移植の安全性と有効性の根拠を示すことは、国策医療上も重要な課題となる。臍帯血を用いたミニ移植の問題点はday 100以内の移植関連合併症であった。虎の門病院におけるpilot studyにより移植後の免疫抑制剤の強化により移植後早期死亡率が低下した。これを正確に評価するために、前向き臨床研究によって、前処置関連毒性、感染症、移植片宿主病(GVHD)、その他有害事象を調査し、記述統計的に検討する臨床第I/II相試験を行っている。

A. 研究目的

移植前処置を軽減し、同種免疫反応で造血器悪性腫瘍の治癒を目指すミニ移植の登場は、従来は移植を行うことができなかった高齢者にも同種移植の適応を拡大した。白血病は50歳を超えると急速にその発症頻度が増加するが、化学療法による治療には限界があり、この世代の予後は極めて不良であった。ミニ移植の開発は増加する高齢者世代にとって大きな希望となる可能性がある。しかし、血縁ドナーや適切な非血縁者ドナーが存在する確率は低い。臍帯血の場合、成人の移植適応患者の90-95%に移植を行うことが可能であり、圧倒的多数の症例に同種移植医療を提供できる可能性がある。このため、厳正な臨床試験を行い、臍帯血を用いたミニ移植の安全性と有効性の根拠を示すことは、国策医療上も重要な課題となる。

臍帯血移植に関するこれまでの報告では、移植後早期の高い非再発死亡率が問題であった。この問題を解決するため虎の門病院が行なったpilot studyでは、移植後の免疫抑制を強化することにより移植後早期死亡が減少する傾向にあった。

本研究では、他に有効な治療法を持たない白血病・骨髄異形成症候群(MDS)患者を対象として、GVHD予防薬としてタクロ

リムス単剤を用いて、非血縁臍帯血によるミニ移植を行い、前向き臨床研究によって、前処置関連毒性、感染症、GVHD、その他有害事象を調査し、記述統計的に検討する。

B. 研究方法

目標症例数は10例。対象症例は、年齢が20歳以上かつ60歳以下でHLA適合または1抗原不適合の適切な血縁ドナーが存在せずHLA適合または1~2抗原不適合の非血縁者臍帯血を有する症例。対象疾患は、進行期の急性白血病、慢性骨髄性白血病および骨髄異形成症候群とした。前処置は主としてフルダラビン(25 mg/m² 5日間)+メルファラン(40 mg/m² 2日間)+全身放射線照射4 Gyでおこなった。GVHD予防はタクロリムス0.03mg/kg単独とし、移植初日からG-CSFを併用した。プライマリーエンドポイントはday 60以内のNCI-CTCAE (version 3.0) grade 4の非血液毒性として、生着率、治療関連死亡、生存率等もセカンダリーエンドポイントとして評価する。

倫理上の問題点に対する配慮

本研究は臨床第I/II相試験であり、適格基準と除外基準より適格と判断される症例に対し、本療法の有効性と危険性について十分な説明を行い、同意が得られた者についての

み施行する。

C. 研究の進行状態

現在、5例が登録され、順調に臨床試験が進行している。

D. 考察

一般に臍帯血移植後はGVHDの程度も軽いとされ、移植後の同種免疫反応に抗腫瘍効果を期待するミニ移植は不利に働くと考えられる。我々のミニ移植の系では、この理由から当初GVHD予防を2剤使用せずにシクロスポリン単独で行った。従来型の移植の場合、シクロスポリンとメソトレキセートやミコフェノール酸モフェチル(MMF)の2剤併用療法が一般的である。

このシクロスポリン単独によるGVHD法では、多くの症例で移植後生着前にday 9 feverと呼ばれる39℃をこえる非感染性の発熱、皮疹、下痢、末梢性の浮腫を伴う体重増加が見られた。重篤な場合は多臓器不全に至る症例も見られた。一般的にはステロイド剤に対する反応は良好であるが、それでもステロイドによる感染症の増加に繋がる可能性がある。当院の成績ではシクロスポリン単独でGVHD予防を行った場合、70-80%にday 9 feverが見られたが、タクロリムスに変更したところ20-30%にその発現率が低下した。同時にday 100以内の非再発移植関連死亡も約50%から20-30%に減少した。GVHD予防の強化により、day 9 feverの発症率が低下し、安全性が向上したと考えている。

本臨床研究はより正確に移植後早期の移植関連毒性を評価する目的にて、前向きにタクロリムスによるGVHD予防の安全性を検討するものである。

E. 結論

臍帯血を用いたミニ移植の問題点は移植後早期の移植関連合併症であった。よりGVHD予防を強化することにより、安全性の向上に繋がる可能性があり、より正確にその安全性を評価することを目的に前向き臨床試験を実施している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kusumi E, Kami M, Kanda Y, Murashige N, Kishi Y, Suzuki R, Takeuchi K, Tanimoto TE, Mori T, Muta K, Tamaki T, Tanaka Y, Ogawa H, Yamane T, Taniguchi S, Takaue Y. Reduced-intensity hematopoietic stem-cell transplantation for malignant lymphoma: a retrospective survey of 112 adult patients in Japan. *Bone Marrow Transplant* 36: 205-13, 2005
2. Yuji K, Miyakoshi S, Kato D, Miura Y, Myojo T, Murashige N, Kishi Y, Kobayashi K, Kusumi E, Narimatsu H, Hamaki T, Matsumura T, Kami M, Fukuda T, Masuo S, Masuoka K, Wake A, Ueyama J, Yoneyama A, Miyamoto K, Nagoshi H, Matsuzaki M, Morinaga S, Muto Y, Takeue Y, Taniguchi S. Reduced-intensity unrelated cord blood transplantation for patients with advanced malignant lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:314-318, 2005
3. Hamaki T, Kami M, Kanda Y, Yuji K, Inamoto Y, Kishi Y, Nakai K, Nakayama I, Murashige N, Abe Y, Ueda Y, Hino M, Inoue T, Ago H, Hidaka M, Hayashi T, Yamane T, Uoshima N, Miyakoshi S, Taniguchi S. Reduced-intensity stem-cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of 33 patients. *Bone Marrow Transplant* 35:549-556, 2005
4. Narimatsu H, Matsumura T, Kami M, Miyakoshi S, Kusumi E, Takagi S, Miura Y, Kato D, Inokuchi C, Myojo T, Kishi Y, Murashige N, Yuji K, Masuoka K, Yoneyama A, Wake A, Morinaga S, Kanda Y, Taniguchi S. Bloodstream infection after umbilical cord blood transplantation using reduced-intensity stem cell transplantation for adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:429-36, 2005

5. Kishi Y, Kami M, Miyakoshi S, Kanda Y, Murashige N, Teshima T, Kusumi E, Hara S, Matsumura T, Yuji K, Masuoka K, Wake A, Morinaga S, Kanemaru M, Hayashi T, Tanaka Y, Taniguchi S; Tokyo Stem Cell Transplant Consortium. Early immune reaction after reduced-intensity cord-blood transplantation for adult patients. *Transplantation* 15: 34-40, 2005
6. Narimatsu H, Kami M, Hara S, Matsumura T, Miyakoshi S, Kusumi E, Kakugawa Y, Kishi Y, Murashige N, Yuji K, Masuoka K, Yoneyama A, Wake A, Morinaga S, Kanda Y, Taniguchi S. Intestinal thrombotic microangiopathy following reduced-intensity umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 36: 517-23, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究

研究課題 臍帯血採取方法の検討

分担研究者	中林 正雄	母子愛育会愛育病院 院長
研究協力者	安達 知子 中山 摂子 坂井 昌人 竹田 善治 川名 有紀子 高梨 美乃子 樋口 泰彦 山口 暁	母子愛育会愛育病院産婦人科 部長 母子愛育会愛育病院産婦人科医 医長 母子愛育会愛育病院産婦人科医 医長 母子愛育会愛育病院産婦人科 母子愛育会愛育病院産婦人科 東京都赤十字血液センター 技術部長 東京衛生病院産婦人科 医長 山口病院 院長

A. 研究目的

臍帯血移植の成績向上および臍帯血移植の対象者増加のためには、可及的に多数の幹細胞(有核細胞)を得ることが求められている。

本研究では、全国の臍帯血バンクのもとで、臍帯血採取に協力している産科施設を対象とし、より良い臍帯血採取方法について調査し検討した。

B. 研究方法

1. 2004年4月から2005年7月までに、東京都赤十字血液センター臍帯血バンクに、臍帯血採取施設として登録されている7産科施設(表1)より集められた臍帯血1,009例を対象として調査を行った。調査項目は、分娩週数、児体重、分娩様式(経膈分娩または帝王切開)、臍帯血採取量、細菌検査陽性率、調整前有核細胞数、CD34+細胞数、最終調整検体数などである(表2)。

臍帯血の採取様式別の採取量を検討するため、(A)群:経膈分娩直後に児を母親の腹部に挙上して採取した群(n=560)、(B)

群:帝王切開群(n=45)、(c)群:経膈分娩で児を挙上しなかった群(n=169)の3群について臍帯血採取量を比較した。

2. 2004年4月または2005年1月より1年間に、全国11の臍帯血バンク(表3)における臍帯血採取状況をアンケート調査した。調査項目は年間の臍帯血受入数、保存数、保存率、調整前有核細胞数、細菌検査陽性率などである。さらに各バンクから推薦された16の産科施設を対象としてアンケート調査した。調査項目は年間分娩数、産科常勤医師数、バンクへの臍帯血送付数、バンクでの臍帯血保存数、調整前有核細胞数、細菌検査陽性率などである。

上記調査に基づいて、各産科施設の臍帯血採取責任者によるワークショップを開催し、臍帯血採取方法の改善と工夫について検討した。

C. 研究結果

1. 1) 東京都赤十字血液センター臍帯血バンクに集められた1,009本の臍帯血の

背景と性状を示す(表 4)。分娩週数 36-42 週、児体重 2,140~4,264g、分娩様式は経膈分娩 729 例、帝王切開 45 例、記載なし 235 例であった。最終調整検体 626 例(保存率 62%)、そのうち細菌検査陽性例 30 例、細菌検査陽性率 4.8%(30/626)であった。保存有核細胞数 $9.5 \pm 3.0 \times 10^8$ (平均 \pm SD)、CD34+細胞数 $2.9 \pm 1.9 \times 10^6$ (平均 \pm SD)であった。

- 2) 臍帯血中の有核細胞数は臍帯血の採取量と正の相関を示した($r=0.712$)が、分娩週数、児体重とは相関しなかった。
- 3) 臍帯血の採取様式別の採取量を比較したところ(表 5)、経膈分娩直後に児を母親の腹部に挙上した A 群では 90 ± 24 ml(平均 \pm SD、 $n=560$)と最も多量に採取できた。一方、帝王切開群(B 群)では 82 ± 23 ml(平均 \pm SD、 $n=45$)、経膈分娩で児を挙上しなかった群(C 群)では 66 ± 20 ml(平均 \pm SD、 $n=169$)であった。各群間には各々有意差($p<0.05$)を認めた。
- 4) 臍帯血の採取様式別細菌検査陽性率を比較したところ(表 6)、一回穿刺による採取群($n=450$)では 2.2%(10/450)であったが、複数回数穿刺群($n=176$)では 11.4%(20/176)であり、有意($p<0.001$)に高率であった。

2.

- 1) 全国 11 の臍帯血バンクにおける臍帯血採取状況を示す(図 1、表 7)。臍帯血の年間受入数は多いバンクでは 2,400 本/年、少ないバンクでは 300 本/年で平均 1,050 本/年であった。臍帯

血の年間保存数は多いバンクでは 800 本/年、少ないバンクでは 100 本/年で、平均 400 本/年であった。臍帯血保存率(保存数/受入数)は 30~56%に分布し、平均 39.7%であった。調整前有核細胞数は $10.0 \sim 13.6 \times 10^8$ (平均 12.0×10^8)であり、細菌検査陽性率は 0~5.1%(平均 2.5%)であった。

- 2) 全国 16 の臍帯血採取産科施設における臍帯血採取状況を示す(表 8)。各産科施設における年間分娩数は 500~2,000 件/年(平均 1,050 件/年)であり、産科常勤医師数は 3~6 人/施設(平均 4.0 人/施設)であった。臍帯血バンクへの臍帯血送付数は年間 120~800 本/施設(年間平均 280 本/施設)臍帯血バンクでの保存数は年間 40~280 本/施設(年間平均 130 本/施設)であり、保存率は 30~68%(平均 47.0%)であった。調整前有核細胞数は $10.2 \sim 14.3 \times 10^8$ (平均 12.0×10^8)であり、細菌検査陽性率は 0~7.4%(平均 1.9%)であった。調整前有核細胞数が 13.0×10^8 以上の産科施設は 16 施設中 5 施設であり、そのうち 2 施設が分娩直後に新生児を母親の腹部にのせるいわゆる“カンガルーケア”をルーティンとして施行していた(図 2)。
- 3) 全国の臍帯血バンクから推薦された 16 の産科施設の臍帯血採取責任者によるワークショップを開催し、上記の臍帯血採取の成績に基づいて、臍帯血採取方法の工夫について検討した。その結果、臍帯血採取量増加のため

の工夫として 10 項目が挙げられた(表 9)。基本は新生児を母親の腹部にのせることと、臍帯血採取になれた少数の産科医が、児娩出後可及的速やかに、粘り強く行うことである。

なお、本ワークショップにおいて、臍帯血採取量が多く、カンガルーケアをルーティンとして行っている東京衛生病院の臍帯血採取の実際を撮影し、DVD を作成して、全国の臍帯血採取産科施設に配布することが提案され、樋口泰彦産婦人科医長のご協力により「臍帯血採取方法の検討—改善策とその実際—」と題する DVD が作成された。

本研究に参加・協力していただいた産科施設を表 10 に示す。各施設の先生方のご協力に心から感謝申し上げます。

D. 考察

本邦では、11 の臍帯血バンクが「日本さい帯血バンクネットワーク」として臍帯血の採取・調整・保存を行っており、各バンクの下に全国で 95 の産科施設が臍帯血採取に協力している。全国の臍帯血バンクの年間保存数は臍帯血バンクの規模によりかなりの差があるが、調整前有核細胞数や細菌検査陽性率などはおおむね一定した数値を示していた。

今回の東京都赤十字血液センター臍帯血バンクの成績では、妊娠 36～42 週の分娩例では、有核細胞数は採取量と正の相関を示し、分娩週数、児体重とは相関しなかった。この成績から産科施設としては、臍帯血採取量の増加が重要であることが確認された。臍帯血の採取様式別の比較検討では、経膣分娩直後に

新生児を母親の腹部に挙上する場合に最も多量に採取できた。その理由としては、新生児が胎盤より低い位置におかれた場合は、胎盤から新生児へ一定量の血液が流入するといわれているので、新生児が胎盤より高い母親の腹部にある場合は、胎盤から新生児への血液の流入がおこらないためであろうと推測された。帝王切開においては新生児は胎盤より高い位置におかれることが多いため、経膣分娩で新生児を挙上しなかった群より採取量が多かったものと推測された。複数回穿刺群は 1 回穿刺群に比べて量的には多く採取できる可能性が示されたが、細菌検査陽性率が高率であるので、避けるべきであると考えられた。

東京都赤十字血液センター臍帯血バンクの成績では、臍帯血採取量増加には経膣分娩直後に新生児を母親の腹部におく、いわゆる“カンガルーケア”が良いことが示されたが、全国 16 の臍帯血採取産科施設においても同様のことが示された。すなわち、調整前有核細胞数が多い(平均 13×10^8 以上)施設は 16 施設中 5 施設であったが、一方カンガルーケアをルーティンとしている施設は 16 施設中に 2 施設あり、この 2 施設とも有核細胞数の多い 5 施設に含まれていた。

カンガルーケアは母と児の早期接触によって、母児の愛着形式に有用であるといわれており、最近取り入れている施設が増加している。新生児への副作用もなく、また臍帯血採取量増加に有用であるならば、臍帯血採取産科施設ではカンガルーケアを行い、カンガルーケアを行う前の時期と行った後の時期で臍帯血採取量を比較してみることも良いのではないかと考えられた。次年度以降の課題であろう。

全国の臍帯血バンクから推薦された 16 の産科施設の臍帯血採取責任者によるワークショ

ップにおいて、臍帯血採取量増加のための工夫として、カンガルーケアを行い、臍帯血採取に慣れた少人数の産科医が、児娩出後可及的速やかに、粘り強く行うことが合意されたが、全国から推薦された 16 の産科施設の常勤医師数が 3～6 人(平均 4 人)であり、年間平均分娩数が約 1,000 件であることなどから、臍帯血採取に適した産科施設の規模をうかがい知ることができた。

なお、臍帯血採取産科施設から、臍帯血採取量増加のための工夫が寄せられましたので、本論文の最後に掲載させていただきました。

E. 結論

1. 臍帯血中の有核細胞数は、臍帯血採取量と正の相関を示したので、産科施設としては臍帯血採取量の増加が重要である。
2. 無菌で多量の臍帯血を得るためには、複数回穿刺を避け、新生児を母親の腹部にのせるカンガルーケアを行って採取することが有用である。
3. 臍帯血採取量増加のための工夫としては、臍帯血採取に慣れた少人数の産科医が、児娩出後可及的速やかに、粘り強く行うことである。

表1

東京都赤十字血液センター臍帯血バンクの
臍帯血採取産科施設(7施設)

日赤赤十字医療センター
母子愛育会総合母子保健センター愛育病院
武蔵野赤十字病院
東京厚生年金病院
東京衛生病院
東京都教職員互助会三楽病院
池下レディースチャイルドクリニック

表2

調査項目

分娩週数
児体重
分娩様式(経膣分娩または帝王切開)
臍帯血採取量
細菌検査陽性数
調整前有核細胞数
CD34+細胞数
最終調整検体数

全国11の臍帯血バンク

北海道臍帯血バンク
 宮城さい帯血バンク
 東京臍帯血バンク
 東京都赤十字血液センター臍帯血バンク
 神奈川臍帯血バンク
 東海大学さい帯血バンク
 東海臍帯血バンク
 京阪さい帯血バンク
 兵庫さい帯血バンク
 中国四国臍帯血バンク
 福岡県赤十字血液センター

東京都赤十字血液センター臍帯血バンクにおける 臍帯血の背景と性状

分娩週数	36～42週	
児体重	2,140～4,264g	
分娩様式	経膣分娩 729例	} 合計1009例
	帝王切開 45例	
	記載なし 235例	
最終調整検体	626例(保存率62%)	
細菌検査陽性率	4.8%(30/626)	
保存有核細胞数	$9.5 \pm 3.0 \times 10^8$ (平均 \pm SD)	
CD34+細胞数	$2.9 \pm 1.9 \times 10^6$ (平均 \pm SD)	

2004年4月～2005年7月

表5

臍帯血の採取様式別の採取量

(A)経膈分娩直後に児を母親の腹部に挙上し、
採取した群

(B)帝王切開群

(C)経膈分娩で児を挙上しなかった群

(A)群	90±24ml(n=560)] *
(B)群	82±23ml(n=45)	
(C)群	66±20ml(n=169)] *

* p<0.05

表6

臍帯血の採取様式別細菌検査陽性率

細菌検査陽性率

1回穿刺群 (n= 450)	2.2% (10/450)] P<0.0001
複数回数穿刺群 (n=176)	11.4% (20/176)	

表7

全国さい帯血バンクにおける臍帯血採取状況

		平均
受入数/年	300~2,400	1,050
保存数/年	100~800	400
保存率(%)	30~56	39.7
有核細胞数 (調整前, × 10E8)	10.0~13.6	12.0
細菌検査陽性率(%)	0~5.1	2.5

(2004年4月または2005年1月より1年間, n=11)

表8

産科施設における臍帯血採取状況

		平均
年間分娩数	500~2,000件	1,050件
産科常勤医師数(人)	3~6	4
送付数/年	210~800	280
保存数/年	40~280	130
保存率(%)	30~68	47
有核細胞数 (調整前, × 10E8)	10.2~14.3	12.0
細菌検査陽性率(%)	0~7.4	1.9

(2004年4月または2005年1月より1年間, n=16)

臍帯血採取量増加のための工夫

1. 分娩直後に新生児を母親の腹部にのせる(カンガルーケア).
2. 新生児をおく分娩補助台の高さは, できるだけ母親に近い高さとする.
3. 児娩出後, できるだけ速やかに臍帯クランプを行う.
4. 臍帯穿刺は可及的速やかに行う. そのとき空気の混入を避ける.
5. 臍帯血管が虚脱しないよう連続的にゆるやかに動かしつつ採取する.
6. 穿刺は1回を原則とする.
7. 徐々に胎盤を娩出し, 娩出した胎盤を手で軽く圧迫する.
8. 採血バックは床の高さにおき, 凝血を防ぐため, ゆるやかに動かす.
9. 粘り強く最後の1滴まで採取する.
10. 採取になれた少人数の医師で行うと, 採取量は増加する.

研究協力産科施設

札幌マタニティ・ウイメンズホスピタル	伊勢原協同病院
手稲溪仁会病院	秦野赤十字病院
医療法人社団スズキ病院	茅ヶ崎徳州会総合病院
愛和病院	星が丘マタニティ病院
山口病院	松下記念病院
池下レディースチャイルドクリニック	吉徳会あさぎり病院
東京衛生病院	広島赤十字・原爆病院
医療法人産育会 堀病院	エンゼル病院
横浜南共済病院	

全国臍帯血バンクにおける臍帯血採取状況

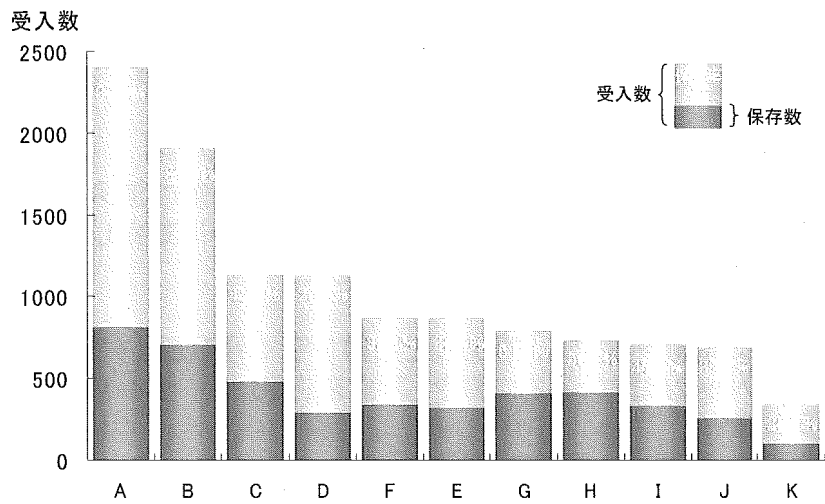


図1

産科施設別の臍帯血採取状況

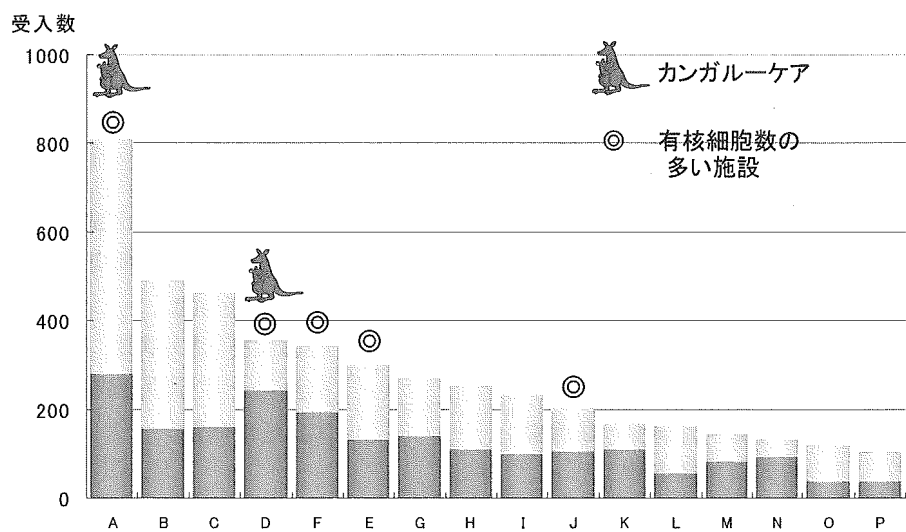


図2

臍帯血採取の工夫について

山口病院
山口 暁

1. 採取にあつては、児の体幹が娩出した後、母体の腹部に児をのせ母子の早期接触を図るとともに、胎盤、臍帯から児への血液の移行を抑制する。
2. 母体腹部に児を密着された後、速やかになるべく児に近い位置で臍帯をクランプし、切断。膣入口に近い部分で、臍帯がなるべく膨隆している部分で穿刺。
3. 徐々に胎盤を娩出し、娩出した胎盤は、手で軽く圧迫し臍帯血の流出が認められなくなった状態で穿刺を修了。
4. 破水後長時間、羊水混濁例などでは、担当者の判断で採取を見合わせる。

スズキ病院
飯田 修一

臍帯血採取に関して、宮城さい帯血バンクの規定では100ml以上となっている。そのため、まず児が娩出された後、すぐに、100ml以上採取できそうか、臍帯の太さおよび長さで確認して採取するか決めることとなります。そして、採取することにした場合はすぐに、臍帯をクランプし、その場で直ぐに産婦に臍帯血採取の承諾をとり、できるだけ早く、臍帯静脈を穿刺するようにしている。一般的に、児の出生体重が重いほうが臍帯が太く、多く臍帯血を採取できるように思われます。また、臍帯静脈の穿刺は児娩出後早いほうが臍帯血を多く採取できるように思われます。これは何秒以内がよいかとか具体的な数字で表すことはできませんが、少し時間が経つと臍帯が虚脱してきて臍帯血を採取できにくくなるようになる気がします。そのため、医師が間に合わない場合は助産師が始めていることもあります。さらに、採取中は臍帯を下にして胎盤と落差をつけるようにして採取すると多く取れるように思われます。また、スズキ病院ではフリースタイル分娩、カンガルーケアを積極的にしており、ほとんどの分娩で出生した児は直ぐに母親の腹部に行くようになり、とくに意識的に腹部へ挙上したことはありませんが結果的にそのようになっていると思われます。

また、帝王切開時にも積極的に臍帯血を採取するようにしています。緊急帝王切開のときは行いませんが、CPD 骨盤位などの定時帝王切開のときは提供基準に適応するケースが多く、CPDのときは児が大きいことも多く、臍帯血を多く採取できると思います。帝王切開のときは児を娩出時できるだけ臍帯を残すように切断し、すぐに胎盤を用手的に剥離娩出し、術者以外の方が術野の外で臍帯血を採取することとなります。採取は胎盤を上を持ち上げて、下で臍帯静脈を穿刺し臍帯血を採取しています。

横浜南共済病院
飛鳥井 邦雄

- ① 児娩出後すぐに臍帯を臍輪に近いところで挟鉗する
- ② 粘り強く採取する（最後の一滴まで）
- ③ 穿刺を失敗しない

当院の採取成功率はやっと 30%位で不採用例の殆どは細胞数不足です。

成功率 70%の堀病院の副院長にそのコツをお聞きしましたがとにかく粘るのみということでした。ただし堀病院では臍帯血採取は副院長のみが行っており他の医師は関わっていません。

神奈川臍帯血バンク 10 周年記念講演会（2005. 10）での調査では成功率は、個人病院 > 中規模総合病院 > 大学病院と多くの医師が関わるほど成功率は低いという結果でした。

愛和病院
竹内 久彌

愛和病院における 2003 年 7 月より 1 年間の採血者個人別臍帯血採取成績(採血総数 915 個)を検討し、採取量増加のために以下のような指針を得ることが出来た。なお、採血法は通常「胎盤娩出前採血」で、これ自体に特別な工夫を加えているわけではない。

1. 児娩出後できるだけ速やかに臍帯クランプと切断を行う。
2. 臍帯穿刺は可及的速やかに胎盤側近くで、空気の混入を避けて行う。
3. 採血は血管の虚脱に注意してできるだけ連続的、スムーズに行うよう心掛ける。
4. 穿刺は 1 回を原則とするが、追加の穿刺でさらに増徴が期待できそうな場合には必ずしも 2 回穿刺を禁ずるものではない。ただし、穿刺部位の消毒に注意すること。
5. 総合的にみて、採取量は採取者の意欲に明らかに左右されるという結果が得られていることを念頭に置くこと。

星が丘マタニティ病院
石丸 忠敬

当院では 1996 年から臍帯血採取を始めましたが、出来るだけ採取量を多くするために、次の 2 点に注意しています。

1. 分娩台の補助台はできるだけ高くして、母体と児の落差を少なくすること。
2. 早期結紮。娩出と同時に臍帯をコッヘルでクランプすること。

あさぎり病院
三村 治

件数を増やすために、臍帯血について知ってもらう機会を出来るだけ作る必要があると思います。自発的な申し出を待つのではなく、妊娠 10 ヶ月になって「臍帯血どうしますが」と健診で聞いています。こちらからの声掛けが希望者を増やす一番の方法だと思っています。経験豊富な常勤の産婦人科医で帝王切開術を行っているために、帝王切開術でも余裕をもって採取しています。

採取量を増やすために、バッグを床に置いて、落差を利用して採っています。同時に足で献血バッグを踏んで固まらないようにしています。帝王切開術の時も同じように落差を利用して、足で踏んでいます。

平成 17 年度厚生労働科学研究 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」
(主任研究者：加藤俊一東海大学医学部教授)

東京衛生病院における臍帯血採取の実際
研究協力報告書

研究協力者：樋口泰彦（東京衛生病院産婦人科医長）

はじめに

日本で臍帯血バンクを介した臍帯血輸血が最初に行われたのは 1997（平成 9）年 2 月であった。その後臍帯血の供給数／移植数は年々右肩上がりに増加し、今では先輩である骨髄バンクと肩を並べるほどに成長した。ちなみに 2003（平成 15）年度と 2004 年度はそれぞれ 734 本と 677 本の臍帯血を供給し、うち 700 本と 667 本が移植に使用された。

しかしながら臍帯血バンクが将来にわたって成長し、移植医療に貢献していくためには、採取／保存される臍帯血の“数、量、質”を、今まで以上に“より数多く、1 本の採取量をより多く、内容をより良質に”することが望まれる。

本稿では、A. B. 東京都赤十字血液センター臍帯血バンクおよび東京衛生病院の採取成績を示しながら、C. 産科外来および病棟における臍帯血献血の啓蒙活動、実際の臍帯血採取における作業手順と注意点、D. “良質な臍帯血”を採取するため当院で行っているテクニックやコツ、E. 現時点での問題点などについて、図を交えて解説する。

A. 東京衛生病院について

東京衛生病院はキリスト教会の一つであるセブンスデー・アドベンチスト教会によって創立された、東京の山の手、杉並区の住宅街にある地域密着型急性期病院である。開設は 1929（昭和 4 年）で、病床数は 188 床、年間の分娩数は 1,500 件前後である。

当院は平成 13 年度（2001 年 4 月）より東京都赤十字血液センター臍帯血バンクに参加している。当バンクには我々を含め計 7 病院／医療センターが臍帯血採取協力病院として参加している。

B. 臍帯血の採取、保存、登録状況

- 1) 東京都赤十字血液センター臍帯血バンク（図 1）

東京都赤十字血液センター臍帯血バンク

全体での臍帯血採取数／登録数はそれぞれ平成 13 年度で 1133／675、14 年度で 1274／808、15 年度で 879／445、16 年度では 764／319 であった。登録率（登録数÷採取数）はそれぞれ 13 年度 60%、14 年度 63%、15 年度 51%、16 年度 42%である。採取された臍帯血が登録されない最大の原因は細胞数不足である。

15 年度以降の採取数がそれ以前に比べ大幅に落ち込んでいるが、その主な理由はさいたい血バンクネットワークが 15 年度から保存細胞数の最低基準を引き上げたことによるものと考えられる（後述）。登録率の低下も同じ理由によるものと推察される。16 年度の登録率は 15 年度にも増して低く