

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
研究分担者報告書

「ボランティアドナーからの末梢血幹細胞採取における安全かつ効率的な採取を目指した採取法の標準化と採取量評価のための CD34 陽性細胞測定方法の標準化」に関する研究

研究分担者 上田恭典  
倉敷中央病院 血液内科 主任部長

研究要旨

CD34 陽性細胞測定については、従来の two color 法に比して、国際標準である single platform 法がばらつきが少なく優れており、早急に標準化すべき方法と思われる。採取前末梢血中 CD34 陽性細胞濃度から血液処理量当たりの CD34 陽性細胞数が推測可能である。また、開始時血小板数より、血液処理量に応じた終了時血小板数も推測可能である。十分な Calcium gluconate 投与下に、血小板低下に留意しつつ  $2 \times 10^6/\text{kg}$  (患者体重) の CD34 陽性細胞数を確保するに十分な血液量を処理することで、大部分の採取が 1 日で終了可能と思われる。

A. 研究目的

我が国で、非血縁者間末梢血幹細胞移植 (以下 URPBSCT) を開始するにあたって、欧米と異なり、治療的ヘムアフェレシスの大半が膜分離法で行われている我が国の現状を考慮すると、ボランティアドナーからの末梢血幹細胞採取法の標準化と、至適方法の確立を行う必要がある。そして、採取施設と移植施設が異なり、最低採取細胞数が定められている CD34 陽性細胞については、基本的にその測定は施設に任されており、施設間での測定結果の差が過大にならないために、その測定法の標準化が必要である。ドナーの安全、移植の質の確保をするために、これらの作業は、URPBSCT のインフラストラクチャーとして重要である。

一方 URPBSCT の最低輸注量として定められた、CD34 陽性細胞数  $2 \times 10^6/\text{kg}$  (患者体重) の採取に関しては、apheresis の標準化と正確な CD34 陽性細胞数測定によって、apheresis 終了までに必要処理血液量をあらかじめ予測して、それに合わせて施行することが可能であると考えられる。現在 2 日間に及ぶことが

しばしばある幹細胞採取が 1 日で終了可能となれば、ドナーはもとより、採取施設と移植施設の負担を軽減し、安定した URPBSCT の実施に貢献するものと思われる。このため、血液処理量の上限の基準の変更も視野に、ドナーの安全を担保しつつ、できるだけ 1 日だけの apheresis で目標細胞数採取が可能な方法について検討する。また URPBSCT が、多数例実施されている米国の実情を視察し、日本の実情に合わせた方法について検討する。

B. 研究方法

I CD34 陽性細胞濃度測定法の標準化についての検討

当院で、Spectra Optia を用いて、同種末梢血幹細胞採取 (ドナーより)、もしくは、自家末梢血幹細胞採取 (患者より) を実施するにあたって、a. 開始直前の末梢血、b. 実施途中の採取バッグ中の血球浮遊液、c. 終了時の採取バッグ中血球浮遊液について、CD34 陽性細胞濃度を測定した。

CD34 陽性細胞濃度検討方法

測定機器:フローサイトメーター

FC500:ベックマン・コールター社

測定方法

従来法・・・CD34FITCとCD45PEの2color解析(Dual platform法)

検討キット Single platform法(7AAD死細胞除去)

- ① Stem Kit (ベックマン・コールター社)---A社
- ② BD Stem Cell Enumeration Kit (ベクトン・ディッキンソン社)---B社
- ③ CD34Count Kit (ダコ・ジャパン社) ③については、測定系の再調整が必要であったため今回は集計せず。

Sampling 採取前PB 途中Bag中(ドナー50ml/kg、患者100ml/kg処理時) 終了時Bag中

## II 末梢血幹細胞採取法の標準化

当院で、新型の遠心分離装置であるSpectra Optiaを用いて、DonationPBSCH(ドナーより)、もしくは、自家PBSCH(患者より)を実施する際に、従来当院で実施している、Calcium gluconate 大量投与下のLarge volume leukapheresis(以下LVL)に準じた方法で実施し、特に採取開始時の末梢血CD34陽性細胞濃度と処理血液量当たりのCD34陽性細胞の収量との関係、処理血液量と末梢血血小板数の低下との関係、Ca<sup>2+</sup>濃度の変化、副作用の出現等を中心に検討した。

PBSCH

High flow Large volume leukapheresis

Cell separator Spectra Optia

Blood access Femoral vein to antecubital vein

	Autologous	Donation
Flow(max)	1.6xBW/min	1-1.2xBW/min
Duration	max300min	variable
ACD-Aratio	12:1-15:1	10:1-12:1
Calcium gluconate	1400-2100mg/hr	900-1100mg/hr

III URPBSCTがURBMTより多数行われている米国の現状を視察した。

NIH(National Institute of Health), MDAnderson Cancer Center, Emory University, Gulf Coast Blood

Center, NMDP(National Marrow Donor Program)を訪問して米国の実情を調査した。

## C. 研究結果

2010年6月から2012年までに当院で、Spectra Optiaを用いてPBSCHを行ったドナー15名、患者18名19apheresisについて検討した。

### CD34陽性細胞測定

うちCD34陽性細胞測定については、ドナー10名、患者13名14apheresisについて検討した。計72組の測定を行った。

Single platform法での測定値とDual platform法での測定値には、末梢血中에서도採取Bag中에서도良い相関があるが、Single2法の測定値の平均を基準とした場合、10%以上ばらつく症例が、Single法では、15/72(20.8%)Dual法では44/72(61.1%)であった。

### Leukapheresis

Spectra Optiaを用いたapheresisを0歳から66歳までの患者と、15歳から60歳までのドナーで行った。

患者1例で2回のapheresisを要したが、ほかは1回のapheresisで必要CD34陽性細胞数を採取可能であった。

開始直前の末梢血中CD34陽性細胞濃度から算出した概算の収率は、Donation 67%,Autologous 85%であった。

開始直前の末梢血中CD34陽性細胞濃度から、処理血液量当たりの採取CD34陽性細胞数を測定可能であった。

ドナー、患者の血小板数の減少は、開始直前の血小板数と処理量で推測可能であった。

Calcium gluconateの大量投与にて、Ca<sup>2+</sup>の低下を、開始時の濃度の30%以内に抑えることが可能であった。

### 米国視察

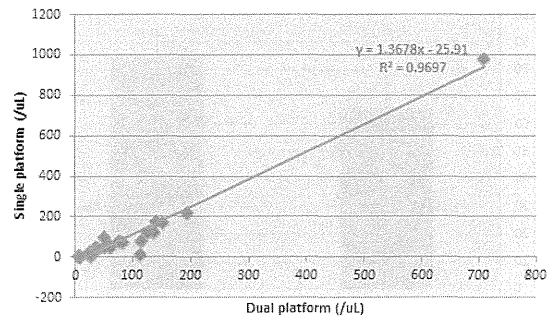
NMDPを通しての年間移植数は6600件(昨年事業年度)。内訳はBM19%、PB62%、CB29%。過去に通算20000件のPBSCのDonationが行われている。各

施設からは、採取後のドナー負担がPBSCHで明らかに少ないことが強調された。1000万人が登録し、US内に95のアフェレシスセンターを持つ。現在G-CSF投与は、初日は医療施設で行われるが、2、3、4日については、医療資格のある人などがドナー宅で投与可。自己注射も許容され、2種類のあらかじめG-CSFが充填されたシリンジを組み合わせることで、間違いなく簡便清潔に自己注射が出来るよう工夫が凝らされている。CBCの検診はなく、身体症状での減量中止規定がある。ドナー居住地から遠方の採取施設も使用可能。採取は5日目、必要な場合は6日目も行われる。採取施設には、医療スタッフがいることが必要条件で、15分程度で救急隊が駆けつけられれば良く、エピペンの常備が必要とのことであった。末梢ルートが確保できなかった場合は、医療設備の充実した採取施設に搬送され、専門医によって中心静脈路(CV)が挿入されアフェレシスが実施される。CV挿入は全体の9%で、男性の3%、女性の19%。血液処理量の上限は患者の体重によって規定され、最大24Lの処理が許容される(ドナー体重80kg程度を想定)。1日での採取も可。規定血液処理量を採取して終了するか、移植施設と相談して目標量を設定し、規定量以内で目標量まで採取も可能。次第にCa<sup>2+</sup>の輸注を行いながら、Large volume Leukapheresisで1日での採取を行う方向に向かっており、現在3分の2の例が1日採取である。NIHは、30L(1日)までの処理を試験的に許容され、CaCl<sub>2</sub>大量投与下、ほぼ全例1日での採取が行われていた。

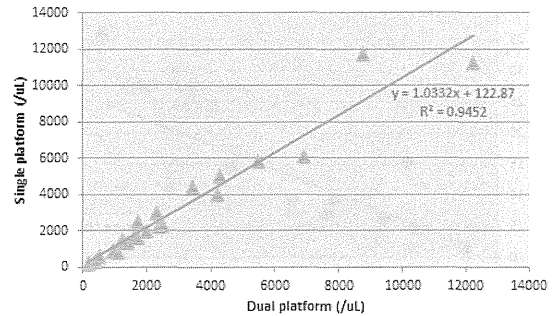
### 対象症例(患者)

症例番号	病名	年齢	性別	採り時バグ内		採り時血球数 (mm <sup>3</sup> )	採り時WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	CD34 (x10 <sup>6</sup> /kg)
				WBC(x10 <sup>9</sup> /L)	MNC(x10 <sup>9</sup> /L)			
1	MM	41	46	153.3	79	253	10.976	1.648
2	MM	34	52	152.6	50	238	6.500	14.773
6	PTCL-NOS	37	64	64.6	97	232	2.129	6.977
7	MM	40	42	145.9	97	239	6.655	6.970
10	小細胞癌	1	3	34.9	62	971	4.195	3.266
11	NHL	50	52	145.6	53.8	359	6.165	6.452
12	MM	64	60	124.6	84	237	9.345	6.456
13	NL	65	59	161	33	423	6.900	0.610
14	NL	65	59	152.7	29	350	7.192	0.663
16	MM	51	43	174.4	96.6	123	7.267	51.012
17	MM	59	45	73.2	82	232	2.425	16.171
21	骨髄性アミロイドーシス	57	62	219.1	59	162	4.634	14.434
22	MM	60	44	159.7	66	176	6.056	6.914
23	多発性アミロイドーシス	49	63	119.2	99	153	2.027	16.456
24	MM	60	63	152.8	84	190	3.440	9.496
25	MM	54	64	155	23	332	6.037	1.622
26	MM	64	45	163.3	62	169	4.208	3.629
30	悪性リンパ腫	66	61	140.9	70	276	6.916	2.041
31	神経管膜腫	0	6	81.2	95	392	6.090	17.417

### 2法間でのCD34陽性細胞濃度の相関 (採取前末梢血中)



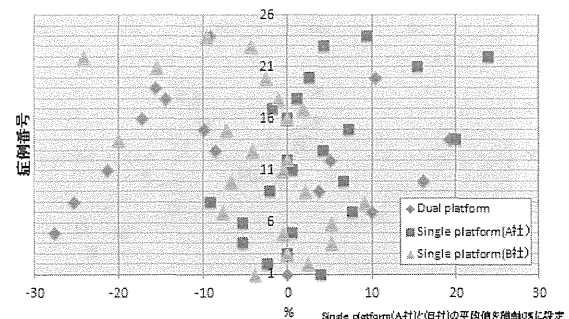
### 2法間でのCD34陽性細胞濃度の相関 (終了時採取Bag中)



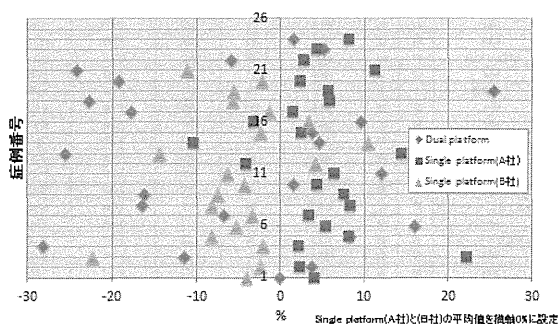
### 対象症例(ドナー)

症例番号	年齢	性別	レシピエント体重	採り時バグ内		単回処理量 (ml/kg)	単回WBC (x10 <sup>9</sup> /L) (x10 <sup>9</sup> /kg)	CD34 (x10 <sup>6</sup> /kg) (x10 <sup>6</sup> /kg)
				WBC(x10 <sup>9</sup> /L)	MNC(x10 <sup>9</sup> /L)			
1	44	75	49.4	183.7	94	123	6.404	12.605
4	26	59	40	130	53	161	7.200	4.464
5	53	61	55	230.1	91	176	6.346	3.047
3	51	56	66.9	169.6	61	221	6.400	2.048
9	44	64	48	197.5	99	205	6.225	1.693
16	60	64	53.7	217.2	58	226	6.059	1.537
13	32	69	45	215.8	64	124	7.673	4.450
19	31	63	46	216.6	91	126	6.592	12.997
20	40	37	56	165.6	95	140	6.921	5.152
24	37	61	47	139.1	96.9	112	6.327	3.676
27	15	41	49.6	231.6	65.5	174	4.667	2.567
23	47	55	34	142.9	96.5	165	6.694	4.648
32	35	61	50	166.6	93.4	102	4.416	4.328
33	41	67	43	182	87	108	6.804	9.321
34	30	68	61	134	93	101	6.430	5.104

### 同一検体での結果の分布 (採取前PB)



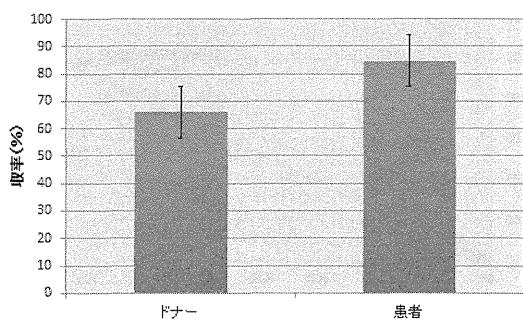
### 同一検体での結果の分布 (終了時バッグ中)



### Apheresis前後での変化率(ドナー)

症例番号	変化率(%)			
	WBC	PLT	Ca++	Ca
1	-16	-34	-25	5
4	0	-23	-	11
5	-18	-40	-23	8
8	-17	-45	-34	12
9	-11	-45	-	7
15	-3	-44	-	12
18	-4	-34	-	5
19	2	-25	-	5
20	-18	-33	-	-1
24	-12	-27	-19	5
27	-9	-17	-	12
29	12	-18	-	10
32	-4	-17	-	7
33	-4	-23	-16	10
34	-8	-29	-19	5
平均±2SD	-7.4 ± 17.0	-30.7 ± 21.0	-24.7 ± 13.3	7.9 ± 6.9

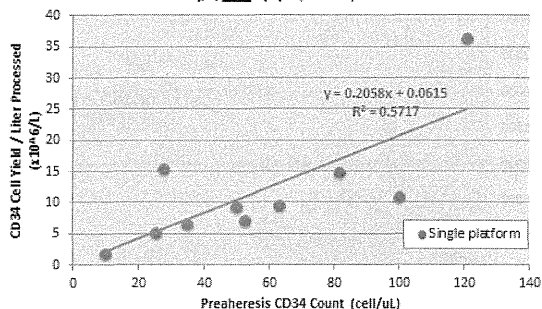
### 開始前CD34陽性細胞濃度より見た収率



### D. 考察

CD34 陽性細胞の測定については、ISCT(International Society for Cellular Therapy)の前身である ISHAGE(The International Society of Hematotherapy and Graft Engineering)によって推奨された、CD34 陽性細胞を内部標準粒子を用いて Flow Cytometer 内で直接測定する Single platform 法(以下 S 法)による測定が国際標準となっている。従来の報告と同様、我々の検討でも、現在我が国の多くの施設で行われている Dual platform 法では、ばらつきが多いことが示された。日本骨髄バンク(JMDP)によって採取 CD34 陽性細胞数の下限が設定されている現状において、採取施設と移植施設での測定値の差を最低限にするためには、S 法に統一することがのぞまれる。

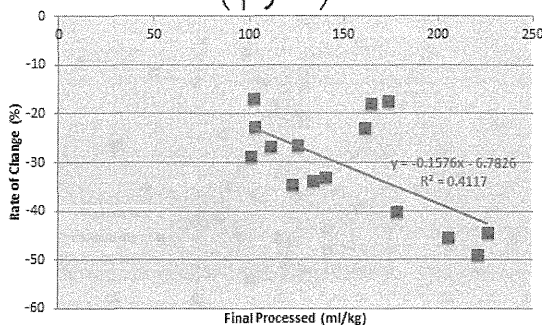
### 採取前末梢血CD34陽性細胞濃度と収量(ドナー)



各施設が安定した apheresis を実施するには、採取 CD34 陽性細胞数を終了前に推測することが重要である。

今回の検討では、S 法を用いた測定で、開始時末梢血 CD34 陽性細胞濃度より血液処理量あたりの収量を推測することが可能であることが示された。従って、採取開始時の末梢血 CD34 陽性細胞濃度を測定することにより、必要血液処理量を概算することが可能である。幹細胞採取が 1 日で終了することは、ドナーはもとよりすべての関係者にとって好ましい。このためには、予測血液処理量が、現在の我が国の規定の上限以上を要する場合も予想される。

### 血液処理量と血小板数の変化(ドナー)



ドナーの安全を担保するためには、apheresis 中の血小板減少のモニターと著しい低 Ca イオン血症の回避が重要である。

今回の検討では、血液処理量あたりの血小板数の減少は予測可能であり、Ca<sup>2+</sup>の大量負荷で、著しい低Ca血症を回避できることが示された。ただし、今回の成績はSpectra Optiaを用いたものであり、各種Cell Separatorの特徴によって、係数等は異なると予想される。

各施設が、自施設のCell Separatorの特性を確認し、CD34陽性細胞測定をS法で行い、開始直前末梢血CD34陽性細胞濃度、血小板数の測定により必要血液処理量を予測し、血小板減少を推測することで1日処理量の上限を決定し、それに向かってCa<sup>2+</sup>の大量負荷を併用したapheresisを行うことで、大部分の症例で1日でのapheresis完了が可能であると推測される。

米国における非血縁ドナーからのPBSCHの状況は、我が国の状況と大きく異なり、ドナーの安全に対する配慮に不十分な面があるようにも思われるが、Donationに対する考え方の差が大きいように思われる。訴訟社会とも言われる米国で、このような方法でURPBSCTがすでに20000件以上行われている点にも、十分に留意する必要がある。

#### E. 結論

CD34陽性細胞測定はSingle platform法に統一する必要がある。その結果をもとに、採取開始直前の末梢血CD34陽性細胞濃度から、処理血液量あたりの収量を推測して、最終処理量を決定することは重要である。1日での目標量達成のためには、処理量による血小板数低下が目標値を超えないように留意しつつ、低カルシウム血症に対しては、Ca<sup>2+</sup> gluconateを大量に用いながら、必要な血液処理量のapheresisを行う必要がある。各施設が、自施設のCell Separatorの特徴を理解しつつ、ドナー、レシピエントの状況に合わせた採取計画を立てることで、大部分の例で、1日での採取完了が可能になるものと思われる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Ueda Y, Mizutani C, Nannya Y, Kurokawa M, Kobayashi S, Takeuchi J, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kanakura

Y, Niimi K, Sasaki K, Watanabe M, Emi N, Teramura M, Motoji T, Kida M, Usuki K, Takada S, Sakura T, Ito Y, Ohyashiki K, Ogawa H, Suzuki T, Ozawa K, Imai K, Kasai M, Hata T, Miyazaki Y, Morita Y, Kanamaru A, Matsuda A, Tohyama K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. Posted 2012 Nov 26.

2. Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, Nagamura-Inoue T, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda Y. Unrelated cord blood transplantation vs related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. *Leukemia*. 2013 Feb;27(2):286-94.

3. Ogata K, Kakumoto K, Matsuda A, Tohyama K, Tamura H, Ueda Y, Kurokawa M, Takeuchi J, Shibayama H, Emi N, Motoji T, Miyazaki Y, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. Differences in blast immunophenotypes among disease types in myelodysplastic syndromes: a multicenter validation study. *Leuk Res*. 2012 Oct;36(10):1229-36.

4. Fuji S, Nakamura F, Hatanaka K, Taniguchi S, Sato M, Mori S, Sakamaki H, Yabe H, Miyamoto T, Kanamori H, Ueda Y, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Atsuta Y, Tamaki T, Kanda Y. Peripheral blood as a preferable source of stem cells for salvage transplantation in patients with graft failure after cord blood transplantation: a retrospective analysis of the registry data of the Japanese Society for Hematopoietic

- Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Sep;18(9):1407-14.
5. Arai Y, Maeda T, Sugiura H, Matsui H, Jo T, Ueda T, Okada K, Kawata T, Onishi T, Mizutani C, Ueda Y. Risk factors for and prognosis of hemorrhagic cystitis after allogeneic stem cell transplantation: retrospective analysis in a single institution. *Hematology*. 2012 Jul;17(4):207-14.
  6. Mizuta S, Matsuo K, Maeda T, Yujiri T, Hatta Y, Kimura Y, Ueda Y, Kanamori H, Usui N, Akiyama H, Takada S, Yokota A, Takatsuka Y, Tamaki S, Imai K, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Ohtake S, Ohnishi K, Naoe T. Prognostic factors influencing clinical outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following imatinib-based therapy in BCR-ABL-positive ALL. *Blood Cancer J*. 2012 May;2(5):e72.
  7. 上田恭典 外来科学療法における副作用対策 (2) 骨髄抑制 コンセンサス 癌治療, 11(4):208-211 2012年
  8. 上田恭典 ドナーアフェレシスにおけるインフラストラクチャーの整備を望む *日本アフェレシス学会雑誌*, 31(3):187-188 2012年
  9. 上田恭典 輸血用血液と血漿分画製剤、V-2 採血 *新版日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム*、日本輸血・細胞治療学会認定医制度審議会カリキュラム委員会編、一般社団法人 日本輸血・細胞治療学会、pp 134-136. 2012年
  10. 上田恭典 治療的プラズマフェレーシスとサイトフェレーシス、IX-1 基本概念 *新版日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム*、日本輸血・細胞治療学会認定医制度審議会カリキュラム委員会編、一般社団法人 日本輸血・細胞治療学会、pp 249-251. 2012年
  11. 上田恭典 血栓性血小板減少性紫斑病に対する血漿交換療法 *日本アフェレシス学会雑誌*, 31(1):14-19 2012年
  12. 上田恭典 血小板減少症とアフェレシス *日本アフェレシス学会雑誌*, 31(1):5-6 2012年
- 学会発表
1. 上田恭典、岡田和也、岡本裕介、塚本拓、山崎尚也、松井宏行、杉浦弘幸、城友泰、上田智朗、大西達人、國富あかね ボランティアドナーからの末梢血幹細胞採取の標準化に向けて— Spectra Optia を用いた末梢血幹細胞採取の検討— 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013 年金沢
  2. 上田恭典 臨床側と血液検査室のよきコラボレーション 第 11 回日本検査血液学会冬季セミナー 2012 年岡山
  3. 上田恭典 骨髄バンクにおける末梢血幹細胞移植の導入 第 19 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム 2012 年岡山
  4. 上田恭典、城友泰、岡本裕介、塚本拓、山崎尚也、杉浦弘幸、松井宏行、上田智朗、岡田和也、水谷知里、國富あかね、清水優、石西綾美、松本雅則、藤村吉博 副腎皮質ホルモン投与のみで寛解を得た、再発 TTP の 1 例 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012 年東京
  5. 上田恭典、岡田和也、上田智朗、城友泰、山崎尚也、村田真由美、大淵貴美子、藪田吉弘、岩崎真子、前田猛 Spectra Optia を用いた末梢血幹細胞採取 第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会 2012 年福島
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

研究項目:「URPBSCT と URBMT の比較研究」の遂行に関する研究  
研究分担者:長藤 宏司先生

研究分担者報告書

「URPBSCTとUBMTの比較研究」の遂行に関する研究

研究分担者 長藤 宏司

久留米大学 医学部 血液・腫瘍内科 准教授

研究要旨

2011年末より、本邦で非血縁同種末梢血幹細胞移植(UPBSCT)が可能となった。従来行われてきた非血縁同種骨髄移植(UBMT)に対するUPBSCTの相対的な位置づけを明らかにする必要がある。日本造血細胞移植学会TRUMPデータを用いた血縁者間PBSCT vs BMの後方視的な比較検討を行い、2000-2010年に行われた患者年齢18歳以上、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病に対するHLA一致血縁ドナーからの初回 骨髄破壊的な前処置によるBMT904例とPBSCT931例を対象として、全生存率、急性GVHD、慢性GVHDについて後方視的に解析した。その結果、第1寛解期および第一慢性期で規定される標準危険群で、3年全生存率BMT70.9% PBSCT61.3%  $p=0.0213$ で、BMT群が有意に良好。急性GVHDII-IV、急性GVHDIII-IV、慢性GVHDはPBSCT群で有意に多いということが明らかとなった。PBSCTにおけるGVHD予防を至適化する必要がある。今後、本邦におけるUPBSCTが至適化された時点で、UPBSCTとUBMTの比較を行う必要がある。

A. 研究目的

2011年末より、本邦で非血縁同種末梢血幹細胞移植(UPBSCT)が可能となった。従来行われてきた非血縁同種骨髄移植(UBMT)に対するUPBSCTの相対的な位置づけを明らかにする。

B. 研究方法

PBSCTとBMTに関する報告の検証を行い、併せて本邦のUPBSCTの現状を評価し、UBMTとの比較方法を検討する。

(倫理面への配慮)

「世界医師会ヘルシンキ宣言」(2004年10月改訂版)及び「臨床研究に関する倫理指針」(平成16年厚生労働省告示第459号)に従う。

C. 研究結果

日本造血細胞移植学会ワーキンググループソース別による研究の一環として、TRUMPデー

タを用いた血縁者間PBSCT vs BMの後方視的な比較検討を行い、第74回日本血液学会 シンポジウムで発表した。2000-2010年に行われた患者年齢18歳以上、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病に対するHLA一致血縁ドナーからの初回 骨髄破壊的な前処置によるBMT904例とPBSCT931例を対象として、全生存率、急性GVHD、慢性GVHDについて後方視的に解析した。その結果、第1寛解期および第一慢性期で規定される標準危険群で、3年全生存率BMT70.9% PBSCT61.3%  $p=0.0213$ で、BMT群が有意に良好。急性GVHDII-IV、急性GVHDIII-IV、慢性GVHDはPBSCT群で有意に多いということが明らかとなった。

D. 考察

血縁者間では、今回の解析によるPBSCTとBMTを比較して、PBSCTで急性GVHDおよび慢性GVHD



の頻度および重症度が増加する、標準危険群の白血病ではPBSCTの全生存率がBMTより有意に劣る、との結果は、海外との報告と必ずしも一致しない。しかし、本邦のPBSCTで、急性および慢性GVHDがBMTより頻度が高くより重症の可能性があり、今後PBSCTにおけるGVHD予防の最適化を検討する必要がある。本邦におけるUPBSCTが最適化された時点で、UPBSCTとUBMTの比較を行う必要がある。UPBSCT開始後2年を経過して、実施症例数が10数名であり、現時点で今後の症例数予測が困難のため、前向きと比較研究を計画することが困難であった。

#### E. 結論

本邦の血縁者間HLA一致ドナーからの移植に於いて、PBSCTはBMTよりGVHDの頻度が高くより重症の可能性もある。PBSCTにおけるGVHD予防について検討する必要がある。UPBSCTの症例数が少なく、現時点でUPBSCTとUBMTの前向き割り付け臨床試験は困難な状況である。UPBSCTの症例数の増加とその症例の適切な評価および改良を行い、その後でUBMTとの比較を行う必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*. 2012;119:2141-2148.

2. Kuwatsuka Y, Kohno A, Terakura S, Saito S, Shimada K, Yasuda T, Inamoto Y, Miyamura K, Sawa M, Murata M, Karasuno T, Taniguchi S, Nagafuji K, Atsuta Y, Suzuki R, Fukumoto M, Naoe T, Morishita Y. Phase II study of dose-modified busulfan by real-time targeting in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancy. *Cancer Sci*. 2012;103:1688-1694.

3. Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Shiratsuchi M, Abe Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Different Risk Factors Related to Adenovirus- or BK Virus-Associated Hemorrhagic Cystitis following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:458-465.

4. Mori Y, Teshima T, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Nagafuji K, Eto T, Akashi K. Validation of pretransplantation assessment of mortality risk score in the outcome of hematopoietic SCT in non-Caucasians. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:1075-1081.

5. Nagafuji K, Miyamoto T, Eto T, Kamimura T, Taniguchi S, Okamura T, Ohtsuka E, Yoshida T, Higuchi M, Yoshimoto G, Fujisaki T, Abe Y, Takamatsu Y, Yokota S, Akashi K, Harada M. Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study). *J Hematol Oncol*. 2013;6:14.

6. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, K

amimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. Quantitation of hematog ones at the time of engraftment is a usef ul prognostic indicator in allogeneic hem atopoietic stem cell transplantation. Blo od. 2013;121:840-848.

## 2. 学会発表

第74回日本血液学会 シンポジウム GVHD対策の最前線～非血縁者間末梢血幹細胞移植導入への対応～ 日本国内の末梢血幹細胞移植と骨髄移植の比較 2012年10月 京都

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究項目:「CD34 陽性細胞数の測定法の至適化」に関する研究  
研究分担者:高橋 聡先生

研究分担者報告書

「CD34 陽性細胞数の測定法の至適化」に関する研究

研究分担者 高橋 聡 (東京大学医科学研究所・先端医療研究センター)

研究協力者 高梨美乃子(日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター)

研究要旨

同種末梢血幹細胞移植においてはCD34陽性細胞数を必要細胞数の指標としている。2011年以降は日本骨髄バンク(JMDP)を介する非血縁者間末梢血幹細胞移植が開始され、採取施設と移植施設が異なる場合に備えて、医療機関検査室間のCD34細胞数の測定結果の相同性が望まれるが、現状では施設間格差は存在し、その至適化が望まれる。

A. 研究目的

同種末梢血幹細胞移植においては細胞採取の指標を CD34 陽性細胞数で患者体重あたり  $2 \times 10^6/\text{kg}$  としている。CD34 陽性細胞数がそれ以下でも生着は可能であると考えられているが、最低必要量は不明である。2011 年以降は日本骨髄バンク(JMDP)を介する非血縁者間末梢血幹細胞移植が開始された。採取施設と移植施設が異なる場合に備えて、医療機関検査室間の CD34 細胞数の測定結果の相同性が望まれるため、測定法の至適化を行うことが本研究の目的である。

B. 研究方法

非血縁者間臍帯血移植では、CD34 陽性細胞数の重要性が明らかになっている。本邦では日本さい帯血バンクネットワークの臍帯血検索システムが非血縁者間臍帯血移植の推進に大きな役割を担ってきたが、臍帯血バンク間での CD34 陽性細胞数の測定法が異なるため、数値の比較が難しいのが現状である。そのため、本邦の臍帯血バンクでは 2003 年より個々の検査室におけるデータの再現性、同一検体の配布による多

施設検定、および技術研修会などを行って自主的に方法の統一を目指してきた。

C. 研究結果

日本さい帯血バンクネットワークでは毎年、多施設検定を行っている。2012 年度は 8 バンク、9 カ所の検査室に同一の調製臍帯血を分注した凍結検体を配布した。各検査室からのデータを集計し、標準偏差を平均値で除した変動計数 (CV) 値が 14.65% であった。過去のデータでは CV 値が、大体 13% から 30% 程度である。機器自体の校正に用いられる標準細胞による測定値に 15% の幅を許容しているだけに、多施設検定で CV 値をそれ以下にする事は困難と考えられる。移植のための細胞採取と細胞数測定にあたっては、常に測定誤差と検査室間差を意識する必要がある。

D. 考察

測定機器の安定性を前提とし、検査系の問題として陽性コントロールがなく、キットによっては陰性コントロールもないことを意識する事が重要である。CD34 陽性細胞数の測定には施設間格差が存在するのが現状であるが、今後は以下のような検定を

通じてこの差を縮小することが望まれる。

- ・各測定者の操作の安定性：同一検体を一定の割合で希釈し、細胞数を測定する。
- ・検査室におけるデータの安定性：同一検体を反復して調製、測定し、データの安定性を確認する。
- ・多施設検定：同一検体を多施設に配布し、各検査室のデータ近似性を検定する。

#### E. 結論

検査室間の CD34 細胞数の測定結果の相同性が望まれるが、現状では施設間格差は存在し、その至適化が望まれる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Eichler H, Schrezenmeier H, Schallmoser K, Strunk D, Nystedt J, Kaartinen T, Korhonen M, Fleury-Cappellesso S, Sensebé L, Bönig H, Rebullà P, Giordano R, Lecchi L, Takanashi M, Watt SM, Austin EB, Guttridge M, McLaughlin LS, Panzer S, Reesink HW. Donor selection and release criteria of cellular therapy products.

Vox Sang. 2013;104(1):67-91.

2). Takanashi M, Odajima T, Aota S, Sudoh M, Yamaga Y, Ono Y, Yoshinaga K, Motoji T, Matsuzaki K, Satake M, Sugimori H, Nakajima K. Risk factor analysis of vasovagal reaction from blood donation. Transfus Apher Sci. 2012 Dec;47(3):319-25

3) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of

graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. Blood. 2012 ;119(9):2141-8.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究項目:「URPBSC を利用した養子免疫療法の検討」に関する研究  
研究分担者:西田 徹也先生

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
研究分担者報告書

「URPBSC を利用した養子免疫療法の検討」に関する研究

研究分担者 西田 徹也  
名古屋大学医学部附属病院 血液内科

研究要旨

同種造血幹細胞移植後の再発やウイルス感染に対する治療法としてドナーリンパ球輸注があるが、骨髄抑制や GVHD などの合併症があり、また、有効性が示されている疾患も慢性骨髄性白血病などに限られている。腫瘍細胞やウイルスを標的とした免疫療法は、有用な治療法として期待される。骨髄バンクドナーの細胞を用いた免疫療法を進めるために、ルールの策定・見直しを行っている。また、血縁ドナーがいないときの代替幹細胞源としての臍帯血の有効性を評価するために「成人難治性血液悪性腫瘍に対する非血縁者間臍帯血移植の有効性に関する研究」を行っている。

A. 研究目的

- ①末梢血幹細胞採取で採取される細胞に豊富に含まれる免疫担当細胞を利用した養子免疫療法実施に向けた研究を進める。骨髄バンクや臍帯血バンクの細胞の二次利用に関する規則策定については、日本骨髄バンク医療委員会、日本さい帯血バンクネットワークと協力して提言を行う。
- ② 成人難治性血液悪性腫瘍に対する非血縁者間臍帯血移植の有効性を評価し、非血縁者間骨髄移植との前方視的な比較を行う。

B. 研究方法

- ①現在、骨髄バンクにおいて「臨床研究を伴うドナーリンパ球輸注(DLI)申請」は承認されているが、実際の申請は僅かであるため、その問題点について検討し、申請条件の見直しを行う。また、今後の末梢血幹細胞

採取で採取された細胞の二次利用へのルール策定における課題を検討する。

- ②再発高リスク血液悪性疾患患者で適切な血縁・非血縁ドナーが得られない患者を対象にした臍帯血移植の多施設共同臨床第Ⅱ相試験「成人難治性血液悪性腫瘍に対する非血縁者間臍帯血移植の有効性に関する研究」を実施している。

C. 研究結果

- ①末梢血幹細胞採取で採取される細胞中の免疫担当細胞を利用した養子免疫療法を行う際の審査基準として、骨髄バンクで承認されている「臨床研究を伴う DLI 申請」条件が基盤となる。2010 年 7 月にその申請条件が定められたが、これまでの申請および実施は 3 例のみである。その条件の中には採取施設内での倫理委員会承認など時間を

要するものが含まれている。養子免疫療法が必要なときに、直ぐに治療（細胞輸注）ができるようにするためには、ドナーからの採血までの時間を短縮する必要がある、申請条件の見直しを日本骨髄移植推進財団に提言し、検討中である。

②臨床試験の参加施設は全国 44 施設で、予定登録症例数 60 例のところ、現在 43 例の登録がある。

この 1 年で仮登録 43 例、本登録 7 例。予定登録期間の平成 24 年 12 月 31 日の時点で目標症例数に達していなかったため、登録期間を 2 年（平成 26 年 12 月 31 日まで）に延長した。

#### D. 考察

①現在、必要以上に末梢血幹細胞が採取できた場合、一部を凍結保存し、DLI 等に使用することは可能（財団に報告）ではあるが、研究目的の使用や細胞培養・増殖は認められていない。「移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の促進に関する法律」第三十五条において、臍帯血バンクは採取した移植に用いる臍帯血を研究のために利用、又は提供することができることとなった。凍結保存された UR-PBSC も同様に、研究および細胞療法などにも利用できるような体制を整えていく必要がある。

また、「臨床研究を伴う DLI 申請」条件の見直しが必要である。

②血縁者にドナーに代わる代替幹細胞源として、非血縁骨髄と臍帯血が選択されることが多いが、どちらがより良い幹細胞源か、また、臍帯血移植を実施する際の最適な時期などは明らかにはなっておらず、今後の移植成績向上のためにも、現在進行中の臨

床試験から得られる結果は重要である。

#### E. 結論

①凍結保存された PBSC だけでなく、骨髄バンクドナーから得られる細胞を用いた細胞療法を行うための規則見直し・策定を進めていく。

②現在進行中の臨床試験の早期完遂のためにさらに参加施設を増やすなどの対策を講じて、臍帯血移植の有効性を明らかにする。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Nishiwaki S, Nakayama T, Saito S, Mizuno H, Ozaki T, Takahashi Y, Maruyama S, Nishida T, Murata M, Kojima S, Naoe T.

Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. *Int J Hematol.* 2012;96:295-300

・ Kato T, Terakura S, Murata M, Sugimoto K, Murase M, Iriyama C, Tomita A, Abe A, Suzuki M, Nishida T, Naoe T. Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation. *Cellular Immunology.* 2012;276:75-82

・ Nishiwaki S, Nakayama T, Murata M, Nishida T, Sugimoto K, Saito S, Kato T, Mizuno H, Imahashi N, Seto A, Ozawa Y, Goto T, Koyama D, Yokohata E, Kubota N, Kamoshita S, Miyamura K, Matsumoto K, Ito M, Naoe T.

Dexamethasone palmitate successfully



attenuates hemophagocytic syndrome  
after allogeneic stem cell transplantation:  
macrophage-targeted steroid therapy.

*Int J Hematol.* 2012;95:428-33

・ 西田徹也. 同種造血幹細胞移植後ウイルス感染に対するドナーリンパ球を用いた養子免疫療法. 日本アフェレーシス学会雑誌 2012;31:223-228

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

研究項目:「ドナー生涯フォローの基盤作り」に関する研究  
研究分担者:飯田 美奈子先生

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
研究分担報告書

「ドナー生涯フォローの基盤作り」に関する研究

研究分担者 飯田 美奈子  
愛知医科大学医学部 造血細胞移植振興講座 助教

研究要旨

血縁ドナーおよび非血縁ボランティアドナーによる同種造血幹細胞採取は、本邦で毎年約 3,000 件が行われている。さらに昨年からは本邦でも非血縁ドナーの末梢血幹細胞採取が開始され、ドナーに対する安全性の確保は一層重要性を増している。その中で採取後のドナーに対するフォローは幹細胞採取の直後のみならず採取後中長期にわたる経過観察が重要であることが認識されるようになった。こうした視点からドナー生涯フォローの基盤作りに関する研究を開始し、特に今回はドナーの安全性とともにドナーに対する利便性を考慮した「末梢血幹細胞採取における G-CSF の外来投与と外来採取のための基盤整備」の基礎研究として、現在までに本邦で行われた血縁ドナーでの外来における一連の末梢血幹細胞採取の経過について全国調査を行った。

A. 研究目的

従来、日本における同種末梢血幹細胞採取は G-CSF 投与開始から採取終了までの約 1 週間ドナーの安全のために入院管理を基本としてきたが、この状況は骨髄提供よりドナーの入院期間が長く時間的負担が大きくなる。海外では外来ベースの G-CSF 投与と採取が一般化しており、我が国でも一連の処置を入院せずに安全に行うシステムを構築することが不可欠であると考えられるため、今回本邦で実際に行われた血縁ドナーでの外来での一連の末梢血幹細胞採取の経過を全国調査することとした。

B. 研究方法

日本造血細胞移植学会「同種末梢血幹細胞

ドナーフォローアップ調査—短期フォローアップ調査票—」のデータでは 233 施設 3264 例中 25 施設 72 例で末梢血幹細胞採取に関するすべての処置を外来で行っていた。今回これらの各症例に対して追加のアンケート調査を行った。アンケートの内容は、1) 末梢血造血幹細胞採取のための入院をしなかった理由 2) G-CSF の投与施設と投与方法 および投与スケジュール 3) G-CSF 投与中の副作用およびその対処法 4) 末梢血幹細胞採取に伴う副作用 5) 外来での一連の処置に対する意見 (ドナー及び医師) について選択肢および自由記載を併用して構成した。一方、外来採取のアンケート結果と比較する目的で通常入院採取を行っている全国の施設に対しても同

様のアンケートを行った。施設の選択は全国均等になるように、日本全国を8地域に分割したうえで、各地域における採取症例数の多い施設合計30施設を選び出し施設単位で、1) 外来でのG-CSF投与や末梢血採取の経験の有無 2) G-CSFの投与スケジュール 3) もしドナーが外来での採取を希望したらどのように対処するか 4) 外来での末梢血幹細胞採取に対する意見を尋ねる内容のアンケートを送付した。

### C. 研究結果

2008年12月末日までに追加調査に回答があった外来採取施設の62症例について解析を行った。ドナーの内訳は男性27例女性35例、年齢中央値35歳であった。採取のための入院をしなかった理由としては本人の希望（特に理由はないが外来でできるなら外来でやりたい、仕事の都合、学業の都合、ドナーの精神疾患のため）が49%、家族の希望（ドナーが小児科患者なので付き添いをしているから）は4%、施設側の事情（病床が満床または予定日に確実に入院できるか不明）によるものが29%であった。その他として施設側の判断で可能な限り全例外来採取としている、また、2回目採取のため対応可能と判断された例があった。G-CSFの外来投与はすべて自施設で処方・投与されており、投与スケジュールは1日1回投与がほとんどで、投与期間は5日間が71%であった。G-CSF投与中の副作用は26%に観察され、その半数は腰痛・背部痛・骨痛などの疼痛で、その他倦怠感・微熱・不眠が各々少数例観察された。脾腫大も1例であったがこれらの副作用はすべて自施設で対応されており多施設に対応を

依頼した症例はなかった。末梢血幹細胞採取は97%が次施設で行い、採取日数は1日間が54%、2日間が34%、3日以上が12%であった。採取に伴う副作用は9例(14.5%)に観察され、手足のしびれが5例、血小板減少が2例、クエン酸中毒・吐気・気分不良が各々1例あった。外来採取ドナーの意見としては外来で採取してよかったというものが54%、入院すればよかったが2%、特になしが42%で、医師側の意見では外来でよかったとするものが66%、入院すればよかったが24%であった。

一方、入院採取施設のアンケートは30施設31診療科から回答があった。これらの施設の中にもG-CSFを外来で行ったことがある施設が19%あったが、採取は全例入院していた。こうした施設でもドナーや家族から外来でのG-CSF投与や幹細胞採取の希望が出ることもあるが、そのほとんどは説得して入院で行うことが多いという結果であった。入院でのG-CSF採取は一日2回投与例が約半数で、投与日数は平均4.5日であった。入院採取施設は経験数の多い施設を選んでおり、アンケートで過去にG-CSF投与中または採取中に入院でしか対応できないような不足の事態を経験したことがあるか尋ねたところ、4例に「あり」という回答を得た。内容は低酸素血症、兎径からの出血、発熱+頭痛+腰痛、著明な除脈と血圧低下が各1例であった。これらの施設の医師に外来でのG-CSF投与および採取についての意見を聞くと、7施設でドナーの安全性のためには入院採取行うべきであるという一方、16施設で外来採取可能、また12施設でG-CSFだけなら外来で可能等の意見があった。（複数回答）