

令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
総括・分担研究報告書

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)拡大による臍帯血移植数増加に対応するための、
移植用臍帯血のコロニーアッセイの自動化に向けた研究

研究代表者 木村 貴文 日本赤十字社近畿ブロック血液センター 製剤部長

研究要旨

臍帯血バンクでは、COVID-19 対策に伴う骨髄移植へのバックアップ体制など臍帯血需要拡大により、業務量の増加に加え、感染防止の観点から実地研修等の機会確保が困難となっている。中でも必須検査項目で実施しているコロニー形成細胞の計測（コロニーアッセイ）は、専門技術者が顕微鏡下において目視にて血液細胞系統の判断を行っているため、技術習熟の訓練、知識と経験の取得に長期間を要する。

本研究では、STEMCELL Technologies 社の造血コロニー判定自動化装置

「STEMvision」を用いた移植用臍帯血自動コロニーアッセイ法の有効性を従来の方法（顕微鏡下における目視判定）と比較し、コロニーアッセイの自動化が可能であるかを検証した。検証の結果、両者間には強い相関が見られた。また、各細胞数（総コロニー、CFU-GM、BFU-E、CFU-Mix）の比較では有意差を認めたと、その差は従来の方法を用いた担当者間でも見られる差と同等であった。以上のことから、造血コロニー判定自動化装置「STEMvision」を用いた移植用臍帯血自動コロニーアッセイ法は、従来の方法と差はなく、自動化が可能であると考えられた。

臍帯血バンク事業においてコロニーアッセイの自動化は、多大な労力を要する目視判定が不要となり、作業時間の短縮及び特殊作業の平準化による業務分散、判定者の育成に必要な時間の大幅な短縮が期待でき、COVID-19 流行下の業務増加への対応も容易になると考えられる。

研究分担者 石井 博之
日本赤十字社近畿ブロック血液センター
製剤三課長

A. 研究目的

COVID-19 の拡大により、国内の非血縁者間骨髄・末梢血幹細胞移植医療においては、提供ドナーとのコーディネートおよび採取時の入院などに際し感染症対策が必要となる。さらに提供直前に骨髄・末梢血幹細胞ドナーや医療機関内で陽性者を認めた場合には、移植を延期、あるいは断念せざるを得なくなるなど、移植を待つ患者には致命的な状況となっている。一方で臍帯血移植では、事前に品質確認と凍結保管された造血幹細胞を準備していることからドナー側に由来する不確実性がなく、患者が必要とするタイミングで確実に移植を実施することが可能である。実際、令和2年4月以降の国内感染拡大状況下において、血縁者や日本骨髄バンクを介したドナーに代わる移植用ソースとして臍帯血が用いられる機会が大きく増

加し、臍帯血による移植実績数が伸びている。造血幹細胞移植に用いる臍帯血は、出産時に出生時から切り離された臍帯および胎盤から採取した血液を調製し、採取後10年間凍結保管される。患者と適合した臍帯血は解凍したのち投与されるが、増殖しうる造血細胞数を確認する目的で、コロニー形成細胞の計測（コロニーアッセイ）が必須項目として凍結保管前、および解凍時に実施されている。現在、コロニーアッセイは専門技術者が顕微鏡下において目視にて血液細胞系統の判断を行っているため、技術習熟の訓練、知識と経験の取得に長期間を要する。またコロニーを保存することはできず、過去を振り返って再計測することも不可能である。COVID-19 対策に伴う臍帯血需要拡大による業務量の増加に加え、感染防止の観点から実地研修等の機会確保が困難となっている中でコロニーアッセイの自動化は、担当者の主観や習熟度による結果のバラつきをなくすことによる品質の向上に加え、業務改善による事業効率化や移植用臍帯血の保存数の向上、および医療現場への安定的供給といった効果が期待される。

本研究では、STEMCELL Technologies 社の造血コロニー判定自動化装置「STEMvision」を用いた移植用臍帯血自動コロニーアッセイ法の有効性検証を行うことを目的とする。本検討による業務の自動化の実現は、COVID-19 影響化での臍帯血需要増加対応するために緊急的な対応が必要である。なお臍帯血の確保等については、すでに他の厚生労働科学研究において検討されているため、本研究では行わない。(資料1)

B. 研究方法

1. 材料

研究同意が得られた臍帯血を対象とし、凍結前濃縮検体および解凍検体を研究試料とした。

2. 方法

凍結前濃縮検体 30 例を MethoCult 培地にそれぞれ播種し、STEMvision 専用のプレート (SmartDish: 1 枚あたり 2 検体検査可能) に 1 検体当たり 3 ウェル分注 (3 重測定)、37°C (5%CO₂) にて 14 日間培養した。14 日後に顕微鏡下にて各コロニー数 (CFU-GM, BFU-E, CFU-mix, 総コロニー) を観察した。観察については、2 名の観察者にて各コロニー数を観察 (目視判定) し、同時に STEMvision においても測定した。(資料2)

また、STEMvision での解析を含む処理時間についても計測した。

評価方法としては、2 名の観察者間及び各観察者と STEMvision の結果について相関は Spearman 's rank correlation coefficient、比較は Wilcoxon signed-ranks test with Bonferroni correction を用いて解析した。

さらに、STEMvision による判定が最適となる播種濃度を検討するために、研究同意が得られた凍結前濃縮検体および解凍検体それぞれ 3 例を資料とし、培養開始 12 日~16 日後に STEMvision を用いて測定・解析を実施した。細胞播種濃度は前者が 10、20、50、100、150、200cells/dish、後者が 10、20、50、100、150cells/dish とした。最適な播種濃度算出の基準としては 2 名の観察者と STEMvision の間でのデータのバラつきが最も小さく、また、STEMvision 判定時にエラー等が発生しない、または、最も発生が少ないポイントを決定した。

(倫理面への配慮)

臍帯血採取時に研究同意の有無を確認し、同意が得られた臍帯血のみ使用しているため、倫理面の問題はなし。

C. 研究結果

1. STEMvision の処理時間

STEMvision によるプレート測定時間は 3 ウェル/3 分、6 ウェル/5.5 分であり、解析は 3 ウェル/3 分、6 ウェル/6 分であった。また、トータルの処理時間としては、プレート 1 枚 (1 サンプル) では 27 分、プレート 1 枚 (2 サンプル) 33 分、プレート 2 枚 (4 サンプル) 39 分、プレート 3 枚 (6 サンプル) 44 分、プレート 4 枚 (8 サンプル) 50 分であった。(資料3)

2. 目視判定と STEMvision 判定結果との比較 (資料4)

(1) 総コロニー数の相関

研究同意が得られた 30 例の凍結前濃縮検体のコロニー形成細胞数を、2 名の習熟した職員 (観察者 A および観察者 B) と STEMvision (観察者 C) が判定した。その結果、総コロニー数については A-B 間の相関係数 (rs) は 0.8182, A-C 間は 0.9482, B-C 間は 0.8385 であり、P 値はそれぞれ 1.04×10^{-41} , 9.54×10^{-59} , 3.17×10^{-39} であった。これにより 3 者間において「有意に強い相関」が認められた。(資料5)

(2) CFU-GM 数の相関

CFU-GM 数については、A-B 間の相関係数は 0.8683, A-C 間は 0.9488, B-C 間は 0.7915 であり、P 値はそれぞれ 1.70×10^{-27} , 3.34×10^{-46} , 1.61×10^{-20} であった。これにより 3 者間において「有意に強い相関」が認められた。(資料6)

(3) BFU-E 数の相関

BFU-E 数については、A-B 間の相関係数は 0.8182, A-C 間は 0.9482, B-C 間は 0.8385 であり、P 値はそれぞれ 7.27×10^{-23} , 1.35×10^{-45} , 6.31×10^{-25} であった。これにより 3 者間において「有意に強い相関」が認められた。(資料7)

(4) CFU-Mix 数の相関

CFU-Mix 数については、A-B 間の相関係数は 0.4251, A-C 間は 0.7896, B-C 間は 0.4595 であり、P 値はそれぞれ 2.97×10^{-5} , 2.30×10^{-20} , 5.21×10^{-6} であった。これにより 3 者間において「有意な相関」が認められた。(資料8)

(5) 総コロニー数の比較

総コロニー数を比較した結果、A-B 間の P 値は 0.0008, A-C 間は 0.2595, B-C 間は 0.0329 であり、A-B 間および B-C 間で有意差が認められた。(資料9)

(6) CFU-GM 数の比較

CFU-GM 数を比較した結果、A-B 間の P 値はそれぞれ 2.77×10^{-7} 、A-C 間は 0.0544、B-C 間は 5.59×10^{-7} であり、A-B 間および B-C 間で有意差が認められた。(資料 10)

(7) BFU-E 数の比較

BFU-E 数を比較した結果、A-B 間の P 値は 1.1074、A-C 間は 3.73×10^{-5} 、B-C 間は 0.1840 であり、A-C 間で有意差が認められた。(資料 11)

(8) CFU-Mix 数の比較

CFU-Mix 数を比較した結果、A-B 間の P 値は 0.0046、A-C 間は 0.0005、B-C 間は 1.83×10^{-6} であり、三者間全てにおいて有意差が認められた。(資料 12)

(9) 各コロニー形成細胞数の CV 値

総コロニー数の CV 値は A-B 間で 7% であり、A-C 間は 4%、B-C 間は 8% であった。また、CFU-GM 数はそれぞれ 10%、6%、13% であり、BFU-E 数は 24%、5%、17%、CFU-Mix 数は 84%、57%、70% であった。

なお、CFU-Mix 数は数値として小さいため、他のコロニーに比べて参考とはならない。(資料 13)

(10) エラーメッセージ

凍結前濃縮検体のコロニー形成細胞数 90 ウェル (30 例の 3 重測定) を STEMvision にて判定した結果、エラーメッセージは発出されなかった。

3. 播種濃度の検討

(1) 凍結前濃縮検体

播種濃度 10, 20, 200cells/dish ではエラーメッセージを認めたが、播種濃度 50, 100, 150cells/dish では認められなかった。(資料 14, 15)

(2) 解凍検体

播種濃度 10, 20, 100, 150, 200cells/dish でエラーメッセージを認めたが、播種濃度 50 cells/dish では認められなかった。

(資料 16, 17)

D. 考察

STEMvision の処理時間は、1 サンプルあたり 27 分要し、従来の顕微鏡下における目視判定に係る時間 (5~10 分) に比べ時間がかかるが、大部分は機器が自動処理をしている時間であり、担当者はその間、別の業務に従事できるため業務効率的に問題はない。

目視判定と STEMvision 判定結果との比較で

は、2 名の習熟した職員と STEMvision 間のコロニー形成細胞数判定結果において有意な相関が認められた。特に提供前確認検査の項目である総コロニー数と CFU-GM 数については、相関係数から「極めて強い相関」あるいは「強い相関」が認められた。また、各コロニー形成細胞数の比較においては観察者と STEMvision 間に有意差を認めた。しかし、この差は目視判定の観察者間にも同様に認められ、許容できる範囲であった。従って、STEMvision の判定結果は目視判定による従来法と同等の結果を得ることが可能であると考えられた。

播種濃度については、凍結前濃縮検体と解凍検体の結果から、エラーメッセージの発出されない 50cells/dish (従来法と同じ) が最適な濃度であった。

E. 結論

今回の検討結果から、コロニー判定自動化装置「STEMvision」は、従来の方法 (顕微鏡下における目視判定) と同等の結果が得られ、臍帯血バンク事業に導入可能と考える。自動化の導入は、目視判定に見られる担当者の主観や習熟度による結果のバラつきをなくすことによる移植用臍帯血の品質向上、作業時間の短縮及び特殊作業の平準化による業務分散、判定者の育成に必要な時間の大幅な短縮等、事業効率化が期待できる。これらのことから臍帯血バンク事業へ本装置による自動測定システムを導入することにより、COVID-19 影響化での臍帯血需要増加に対応することが容易になり、医療現場への移植用臍帯血の安定的供給に寄与できると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

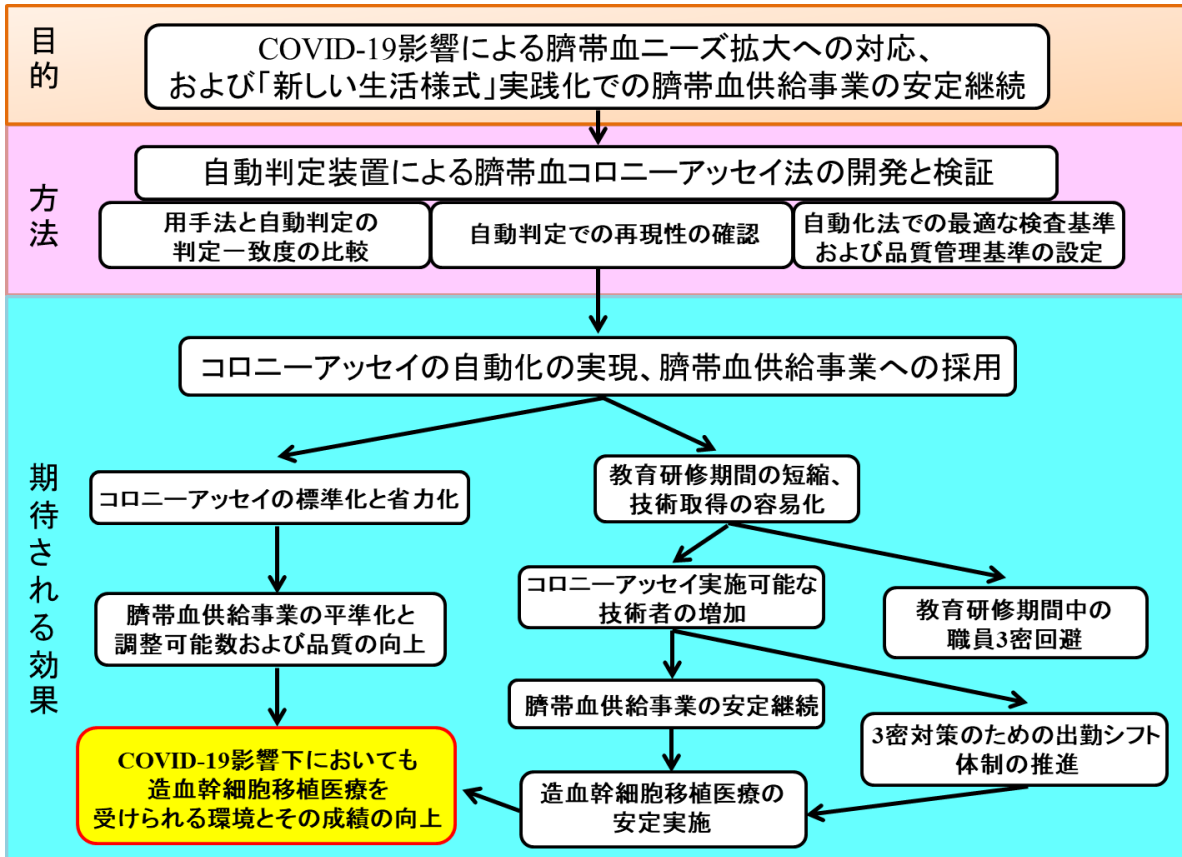
1. 論文発表
なし (時期は未定であるが予定有り)
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

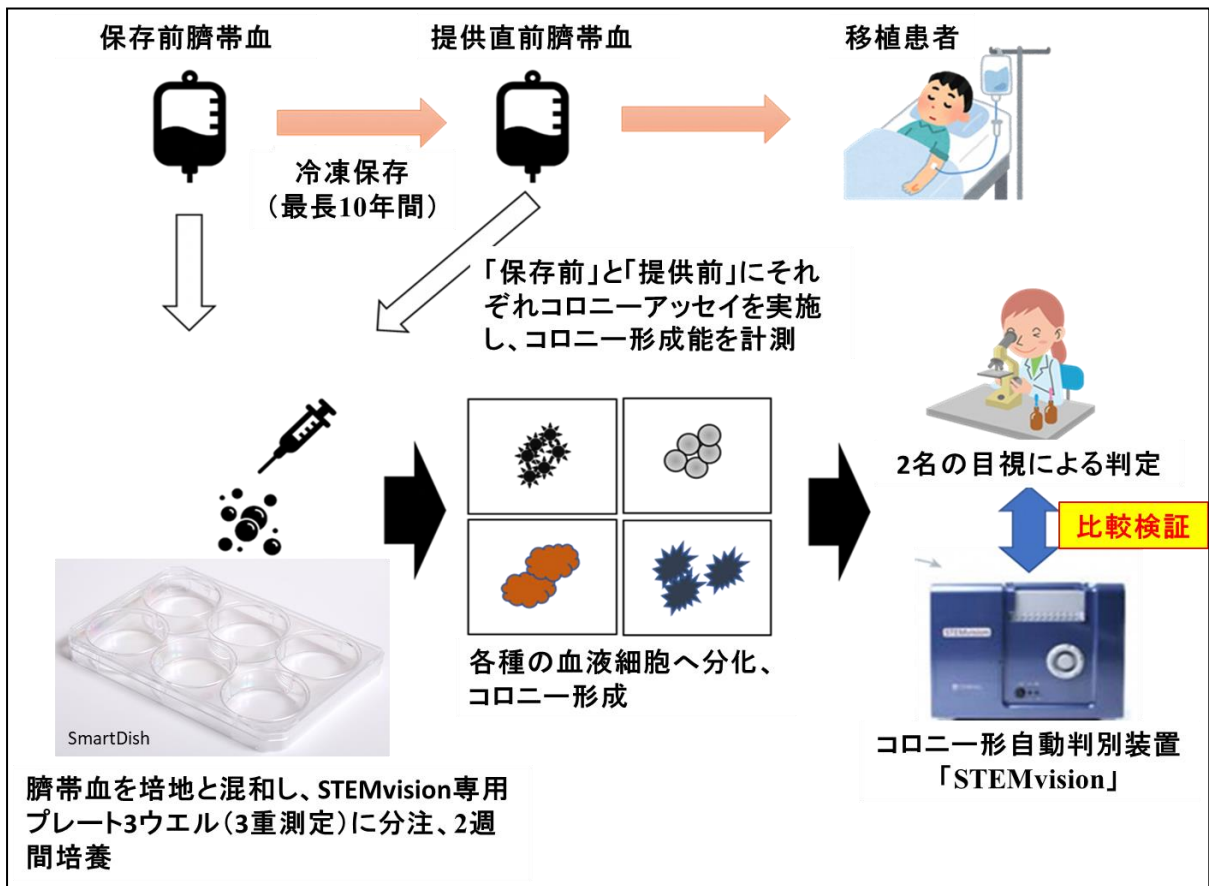
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

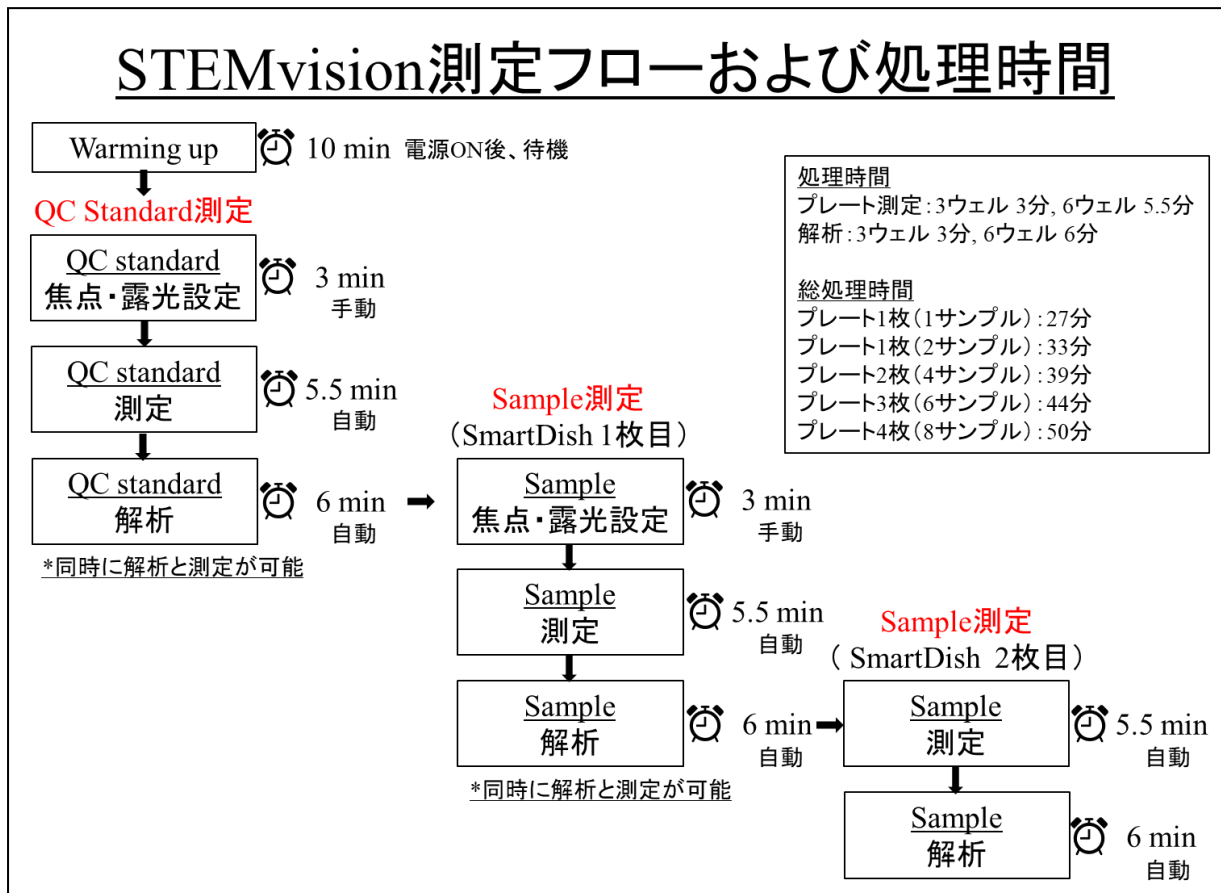
(資料1) 全体の流れ図



(資料2) 臍帯血コロニーアッセイ法の流れ



(資料3) STEMvision測定フロー及び処理時間



(資料4) 2名の職員による目視判定とSTEMvisionの観察結果

2名の職員による目視判定とSTEMvisionの観察結果

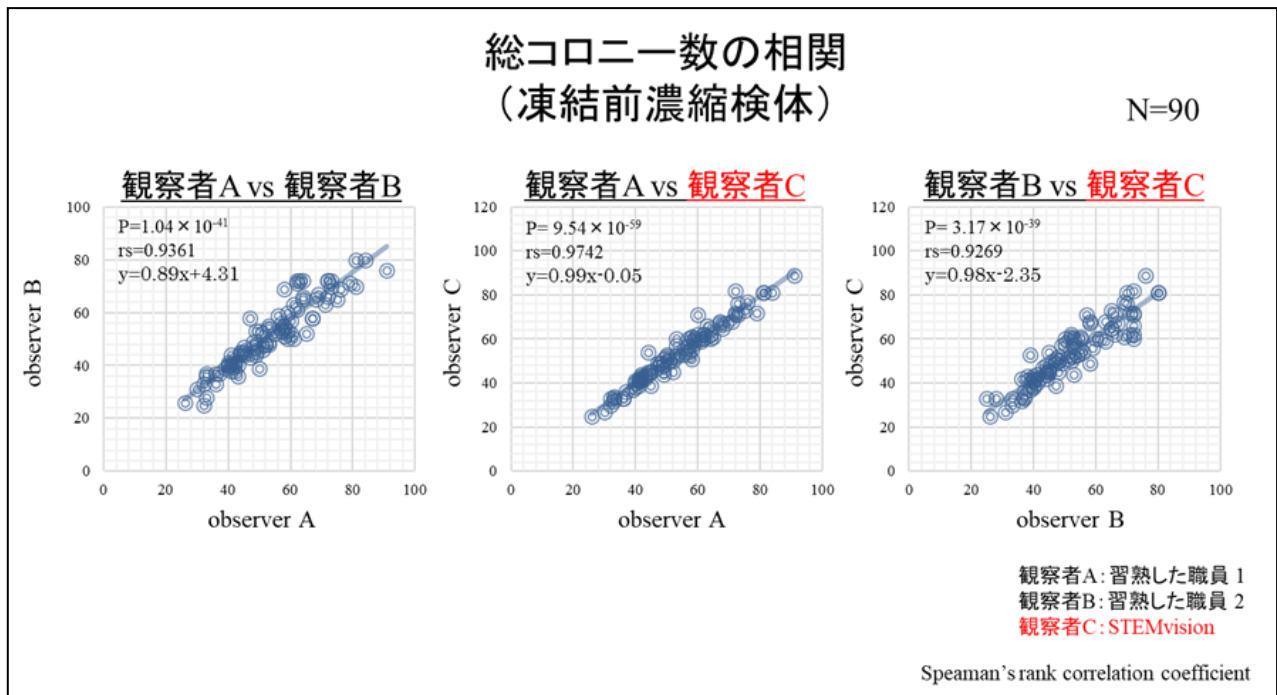
N=90

Total colonies	Average	MAX	MIN	CFU-GM	Average	MAX	MIN
観察者 A	51	91	26	観察者 A	28	48	14
観察者 B	49	80	25	観察者 B	24	35	11
観察者 C	50	89	25	観察者 C	27	47	13

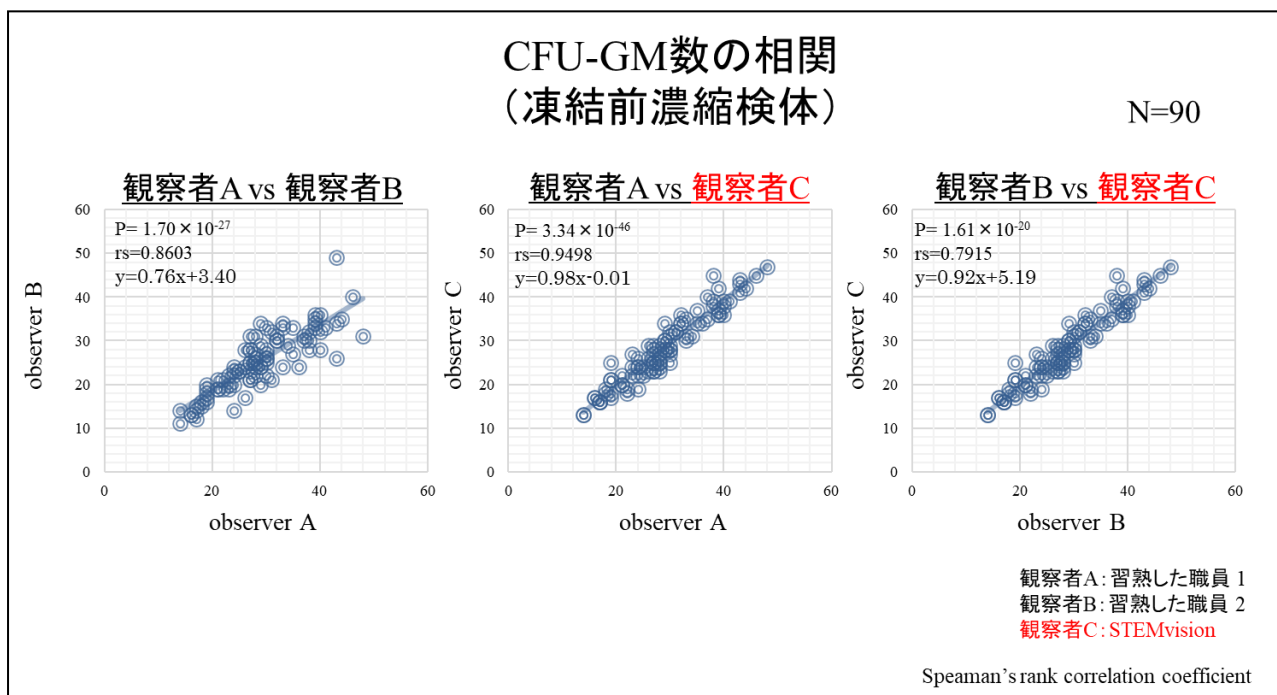
BFU-E	Average	MAX	MIN	CFU-Mix	Average	MAX	MIN
観察者 A	19	38	7	観察者 A	4	10	0
観察者 B	18	39	7	観察者 B	6	19	1
観察者 C	20	41	8	観察者 C	3	11	0

観察者 A: 習熟した職員 1
 観察者 B: 習熟した職員 2
 観察者 C: STEMvision

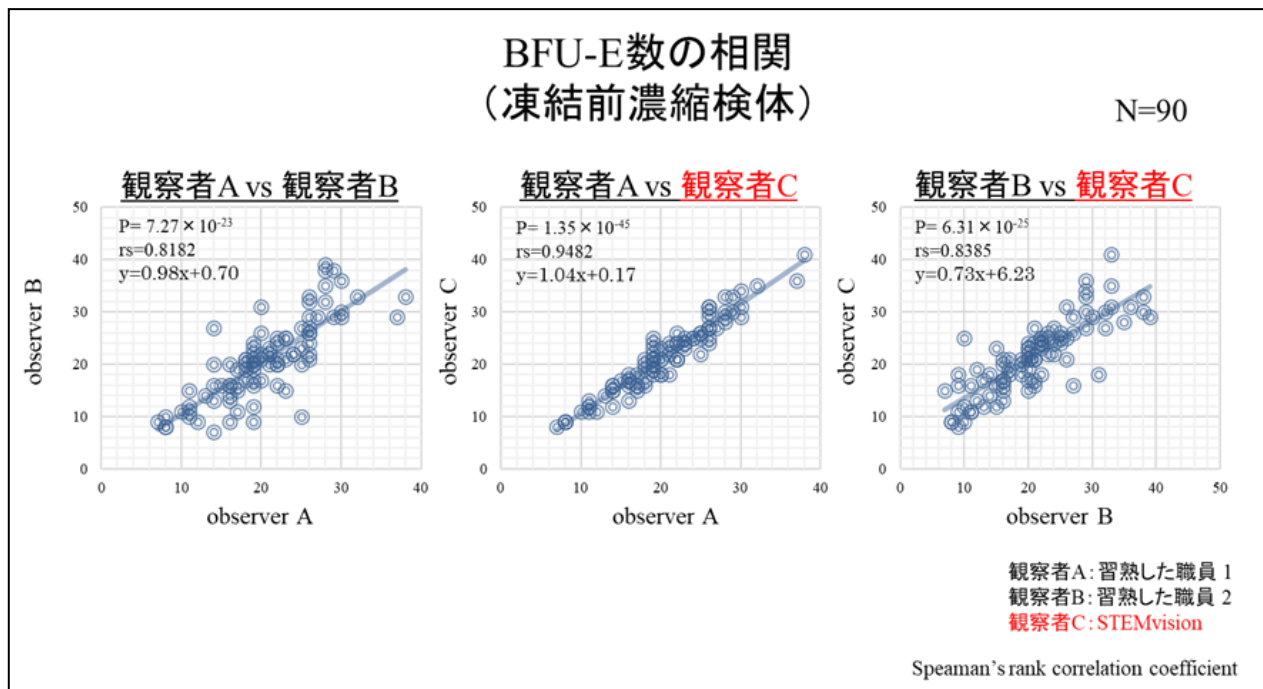
(資料 5) 総コロニー数の相関 (凍結前濃縮検体)



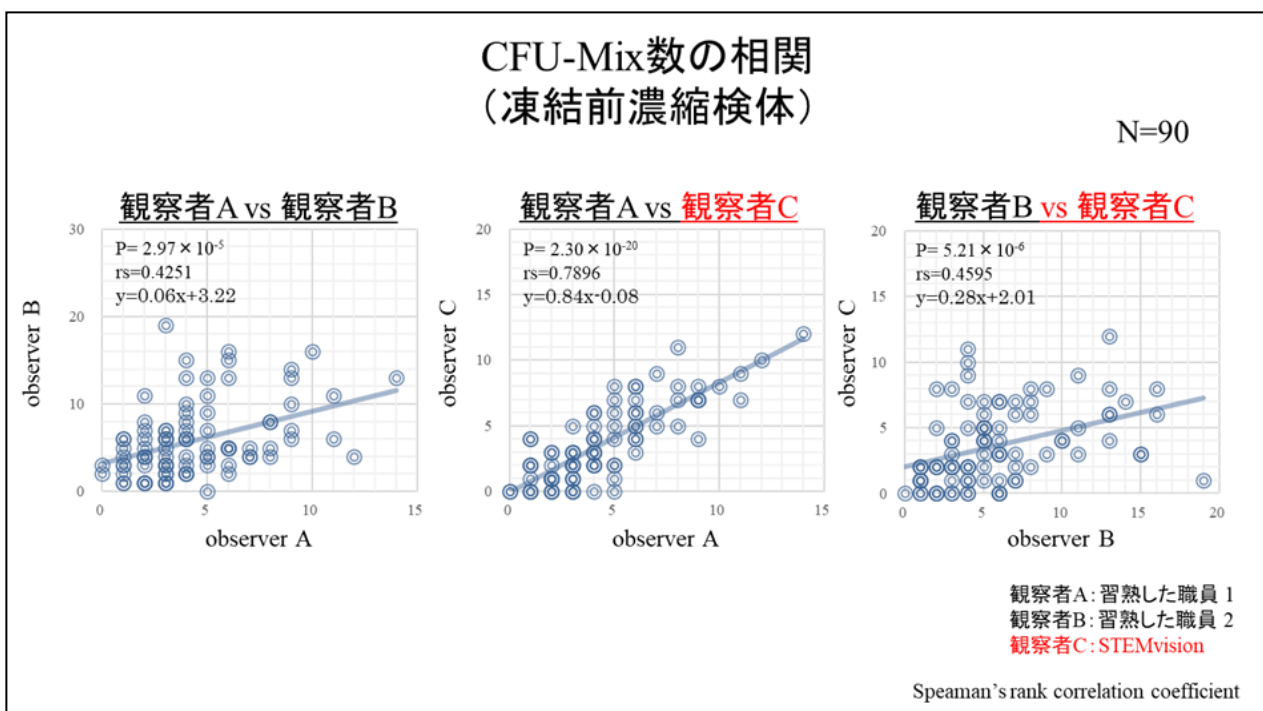
(資料 6) CFU-GM 数の相関 (凍結前濃縮検体)



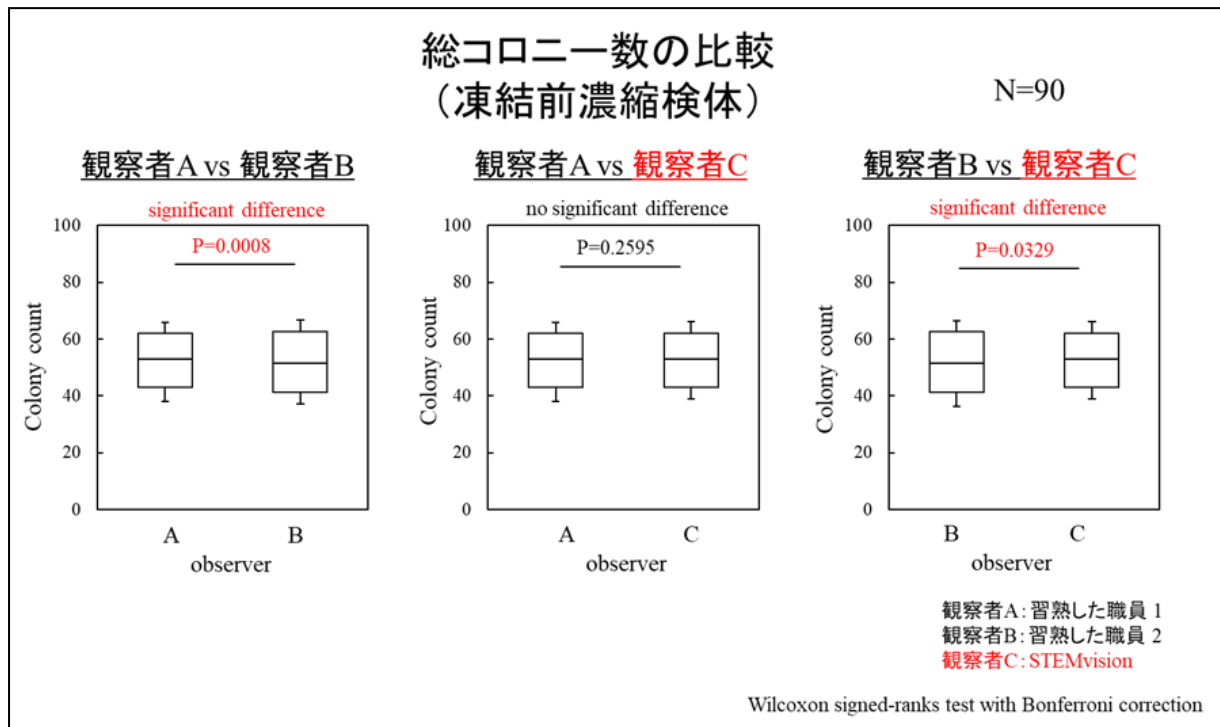
(資料 7) BFU-E 数の相関 (凍結前濃縮検体)



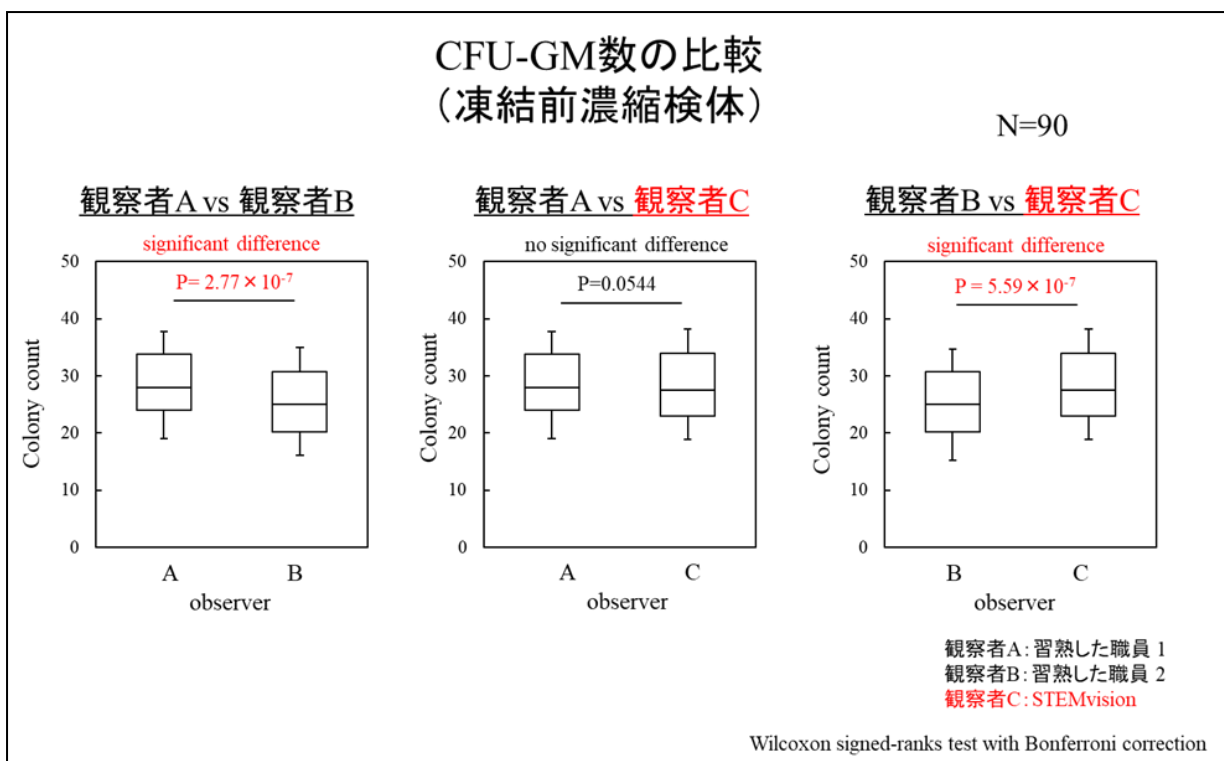
(資料 8) CFU-Mix の相関 (凍結前濃縮検体)



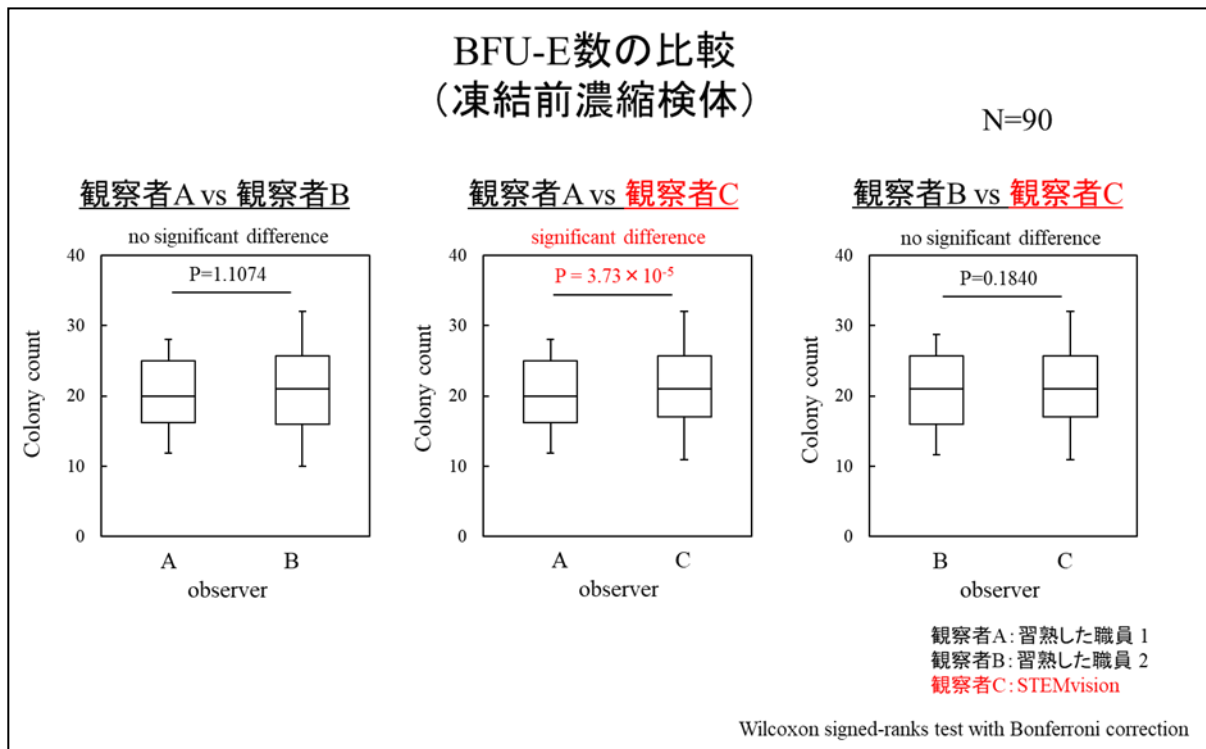
(資料 9) 総コロニー数の比較 (凍結前濃縮検体)



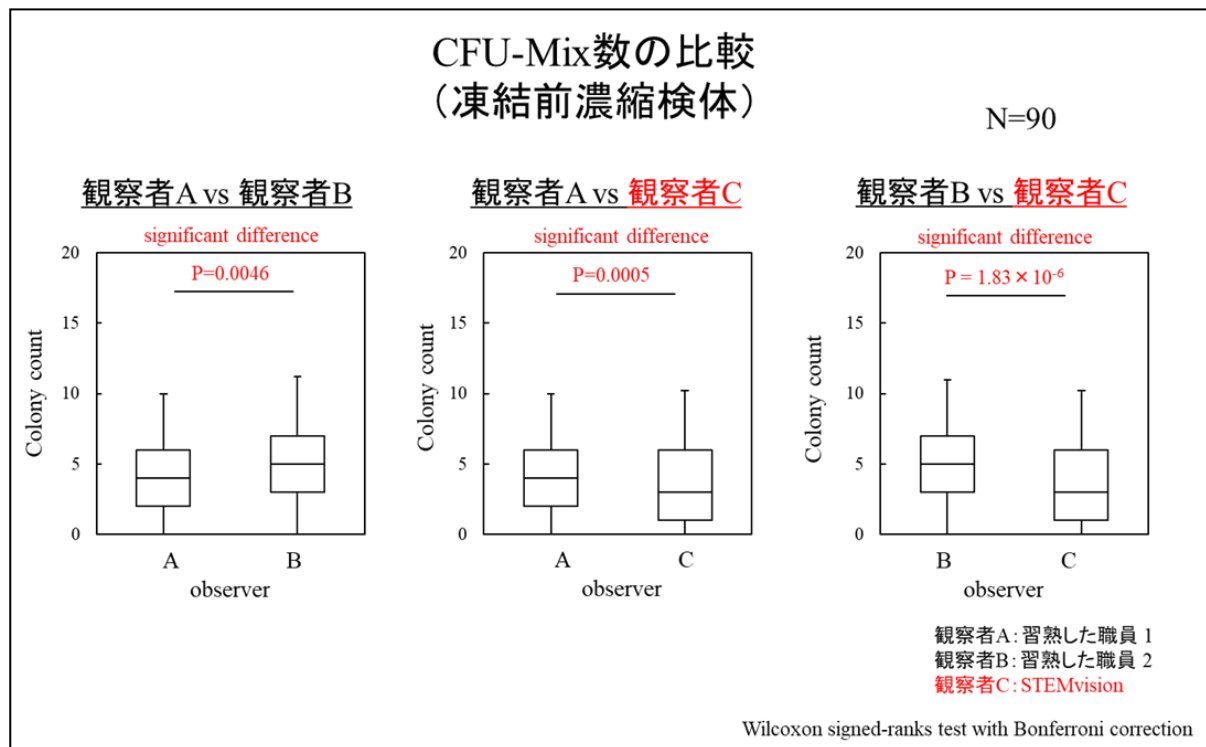
(資料 10) CFU-GM 数の比較 (凍結前濃縮検体)



(資料 11) BFU-E 数の比較 (凍結前濃縮検体)



(資料 12) CFU-GM 数の比較 (凍結前濃縮検体)



(資料13) 各コロニー形成細胞数のCV値

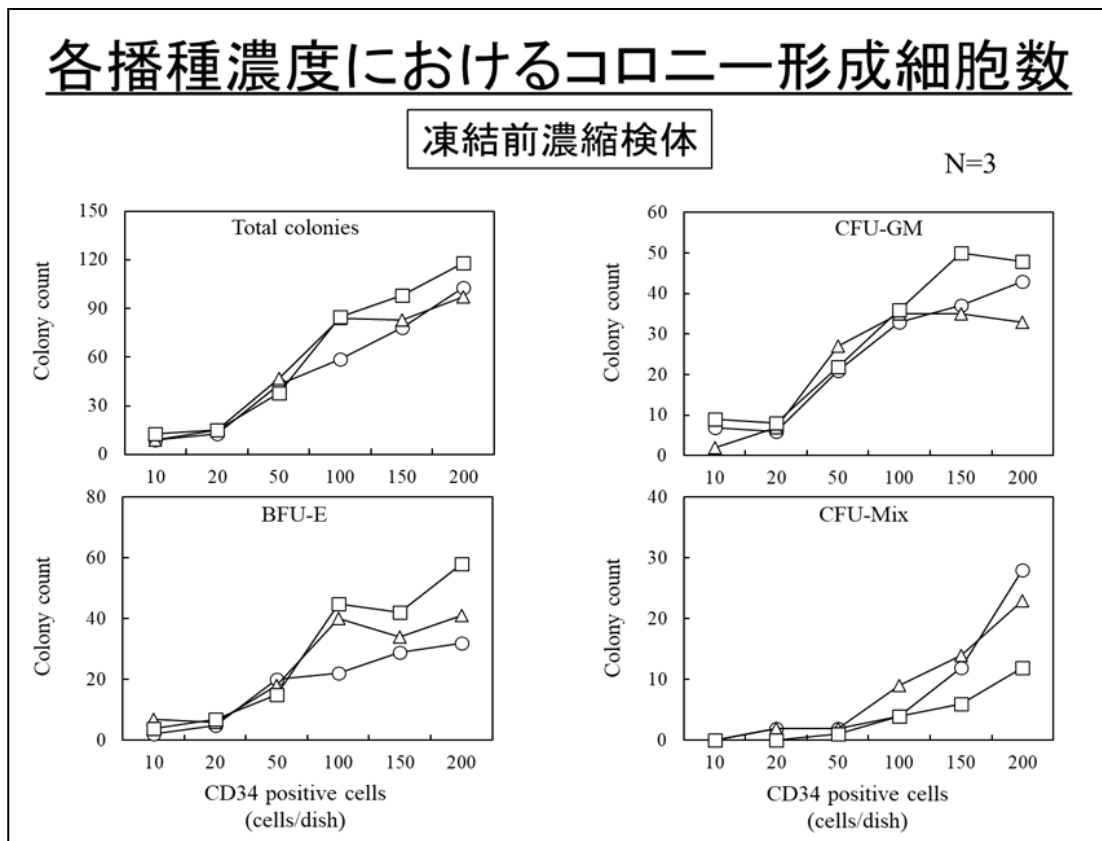
各コロニー形成細胞数のCV値 (average)

N=30

	Total colonies	CFU-GM	BFU-E	CFU-Mix
観察者 A vs B	7%	10%	24%	84%
観察者 A vs C	4%	6%	5%	57%
観察者 B vs C	8%	13%	17%	70%

観察者 A: 習熟した職員 1, 観察者 B: 習熟した職員 2, 観察者 C: STEMvision

(資料14) 各播種濃度におけるコロニー形成細胞数 (凍結前濃縮検体)



(資料15) 各播種濃度におけるエラーメッセージ (凍結前濃縮検体)

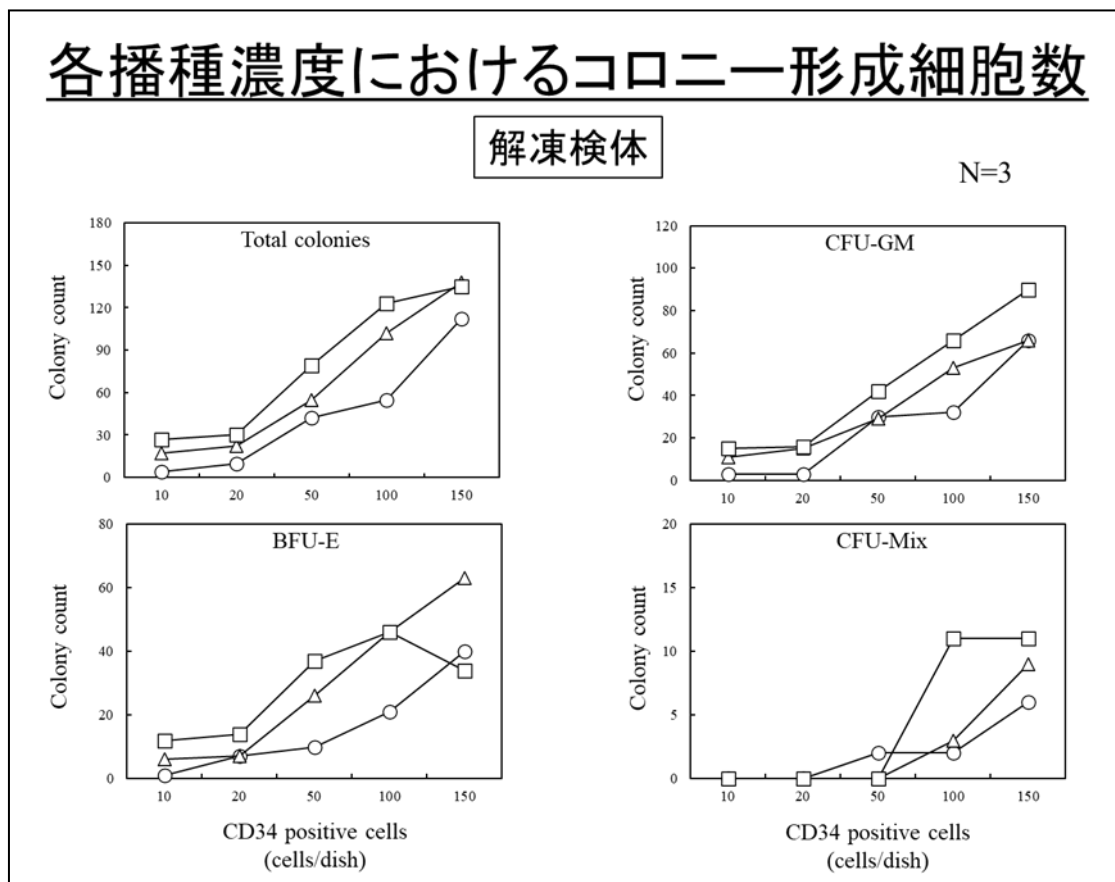
各播種濃度におけるエラーメッセージ

凍結前濃縮検体

cells/dish	#1	#2	#3
10	Colony number below target range	Colony number below target range	Colony number below target range
20	Colony number below target range	Colony number below target range	Colony number below target range
50	None	None	None
100	None	None	None
150	None	None	None
200	Check image quality, Colony number above target range	None	Check image quality, Colony number above target range

Colony number below target range: コロニー数が20未満
 Colony number above target range: コロニー数が100を超えている
 Check image quality: マスク領域が大きい

(資料16) 各播種濃度におけるコロニー形成細胞数 (解凍検体)



(資料17) 各播種濃度におけるエラーメッセージ (解凍検体)

各播種濃度におけるエラーメッセージ

解凍検体

cells/dish	#1	#2	#3
10	Colony number below target range	Colony number below target range	None
20	Colony number below target range	None	None
50	None	None	None
100	None	Check image quality, Colony number above target range	Check image quality, Colony number above target range
150	Check image quality, Colony number above target range	Check image quality, Colony number above target range	Check image quality, Colony number above target range

Colony number below target range: コロニー数が20未満

Colony number above target range: コロニー数が100を超えている

Check image quality: マスク領域が大きい