

『適切な末梢血幹細胞採取法の確立及びその効率的な普及による非血縁者間末梢血幹細胞移植の適切な提供体制構築と、それに伴う移植成績向上に資する研究』

分担課題名：非血縁末梢血幹細胞採取の効率化

研究分担者 上田恭典

公益財団法人 大原記念倉敷中央医療機構 倉敷中央病院 副院長 血液内科主任部長

研究要旨

ドナーからの末梢血幹細胞採取の効率化にとって重要な点は、1日で目標CD34陽性細胞数を確保可能なドナーの採取を安全かつ確実に完遂させることである。我々は採取開始時の末梢血CD34陽性細胞濃度と血液処理量50ml/kg（ドナー体重）の実際の回収CD34陽性細胞数をアフェレシス実施中に測定し最終血液処理量を決定している。Spectra OptiaのCMNCモード20例、MNCモード33例での採取の経験では、Optiaを通過したCD34陽性細胞の70-80%が回収可能であった。採取にあたってCD34陽性細胞数を測定することで、適切な処理血液量を設定し、ドナー、患者、採取施設、移植施設にとって、最も負担の少ない効率的なアフェレシスが可能である。

A. 研究目的

ドナーからの末梢血幹細胞採取(以下 PBSCH)の効率化のためには、採取中に採取 CD34 陽性細胞数を確認し、できる限り1日で採取を終了できる体制を整える必要がある。このためには、G-CSF 大量投与による幹細胞動員の理解、遠心式血液成分分離装置を用いたアフェレシスによる PBSCH の理解、採取 CD34 陽性細胞数のアフェレシス中の確認と目標血液処理量の設定、血小板数の低下、イオン化カルシウムの低下を中心とするドナーのリスクの理解とリスク回避方法の確立が重要である。現在 PBSCH の多くは Terumo BCT 社の Spectra Optia(以下 Optia)の CMNC モードもしくは MNC モードで行われており、自験例より効率化に向けて意識すべき点を検討した。

B. 研究方法

倉敷中央病院でOptia導入以降にPBSCHを行った血縁、非血縁ドナーの採取状況について、すべて後ろ向きに実臨床で検討に用いている項目について調査し集計した。MNCモードでの採取は2011年6月～2016年10月の間に、CMNCモードでの採取は2016年6月～2021年4月の間に実施した。今回の解析ではCMNC20

症例20回、MNC30症例33回であった。なお、今回は検討の対象としないが、この間に患者からの採取は、CMNC49症例53回、MNCは56症例59回であった。

採取条件

G-CSF投与：G-CSFは、Lenograstim 10 μ g/kg(ドナー体重)もしくはFilgrastim400 μ g/m²(ドナー体表面積)を1日1回4日目まで皮下注射を行い、最終投与後2時間以上開けて、非血縁ドナーの場合は肘静脈より脱血し肘静脈より返血、血縁ドナーについては、ほとんどの場合大腿静脈直接穿刺で脱血し、肘静脈より返血した。

脱血流量：脱血流量は、1.2ml \times ドナー体重/kgを上限とした。

低カルシウム血症の予防：低Ca血症予防のため、生理食塩液500mlに、ドナーの場合8.5%カルチコール $\text{\textcircled{R}}$ 75mlを加え80ml/h \sim 120ml/hの流速で、輸液ポンプを使用し返血ラインの側管より注入した。ドナーの低カルシウム症状に合わせ、脱血流量の低下、カルチコール $\text{\textcircled{R}}$ 溶液輸注の増量を行った。

CD34陽性細胞数と血小板数の測定：開始時末梢血中と、ドナーの場合血液処理量50ml/kgの時点で、採取バッグ中のCD34陽性細胞数をsingle platform法

で測定し、非血縁ドナー250ml/kg、血縁ドナー300ml/kgを血液処理量の上限として、処理が順調に進行している場合には、予想CD34陽性細胞数が 4×10^6 /kg(患者体重)以上となるよう最終血液処理量を決定し、同時に開始時とバッグ中CD34陽性細胞測定時の末梢血血小板数測定結果から、ドナーの場合には予定最終血液処理量到達時の血小板数が、比例計算で $5 \text{万}/\mu\text{l}$ を維持できることを確認して処理量を最終決定した。

見かけのCD34陽性細胞回収率：採取開始時のCD34陽性細胞濃度が採取終了まで変化しないと仮定した場合に、Optiaを通過したと想定される見かけのCD34陽性細胞数に対する回収されたCD34陽性細胞数の割合を、見かけの回収率(以後回収率と表記)として検討した。

見かけの回収率：CD34陽性細胞採取数/見かけのOptiaを通過したCD34陽性細胞数

<倫理面への配慮>

これらの検討はすべて後ろ向きに、実臨床で実際にアフェレシス実施時に検討に用いている項目についてのみ調査し、個人が特定されることなく集計のみ行ったもので、倫理面での問題は生じない。

C. 研究結果

ドナー症例 53 例、53 回のアフェレシスの結果を示す。表 1 に各モードでの採取結果の集計を示した。採取開始時末梢血 CD34 陽性細胞数は、CMNC モード実施ドナーで 28 細胞/ml、MNC モード実施ドナーで 44 細胞/ml であった。患者体重当たりの採取 CD34 陽性細胞数の中央値は、CMNC モードで 3.44×10^6 /kg、MNC モードで 4.42×10^6 /kg であった。処理血液量、採取時間の中央値はそれぞれ CMNC モードで、160.4ml/kg、216 分、MNC モードで 140.5ml/kg、172 分であった。

表 1

中央値(四分位25%-75%)	ドナー(CMNC)	ドナー(MNC)
症例数	20	33
年齢	40(32.3-51)	40(30-49)
体重(kg)	60.5(54.0-69.9)	63.9(58.0-72.0)
総処理量(ml)	9873(8431-14147)	8982(7065-10796)
総処理量/体重(ml/kg)	160.4(135.7-210.6)	140.5(109.7-178.2)
採取時間(min)	216(165-262)	172(140-205)
ACD Volume (ml)	914(760-1255)	844(649-988)
CD34/uI(採取前、末梢血)	28(19-39)	44(30-68)
CD34/uI(バッグ内サンプリング)	991(598-1654)	1410(994-2321)
CD34/uI(終了時バッグ内)	956(640-1642)	1261(960-1823)
回収率(バッグ内サンプリング)	65.11(59.99-71.11)	52.17(46.02-63.75)
回収率(終了時バッグ内)	79.23(73.18-82.85)	67.92(61.88-81.94)
CD34x10 ⁶ /kg(終了時バッグ内)	3.44(2.64-4.32)	4.42(2.60-5.44)

図 1 に、各モードでの回収率の 50ml/kg 処理時と終了時の比較を示した。自験例では、最終的な回収率の中央値が CMNC モードで 81%、MNC モードで 69%、最終的な回収率は CMNC モードで 50ml/kg 処理時の回収率の 1.26 倍、MNC モードで 50ml/kg 処理時の回収率の 1.27 倍であった。血小板数は、採取前と採取終了時で、平均して 33% の低下を呈した。また図 2 に CMNC モードでの終了時の血小板数の推移を示したが、処理量が多い例では開始時の約 50% まで低下していた。

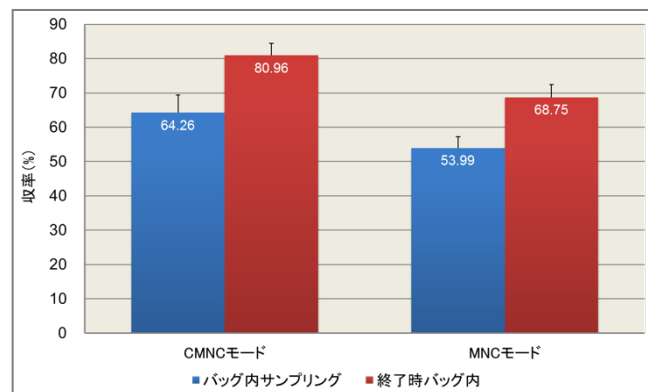


図 1

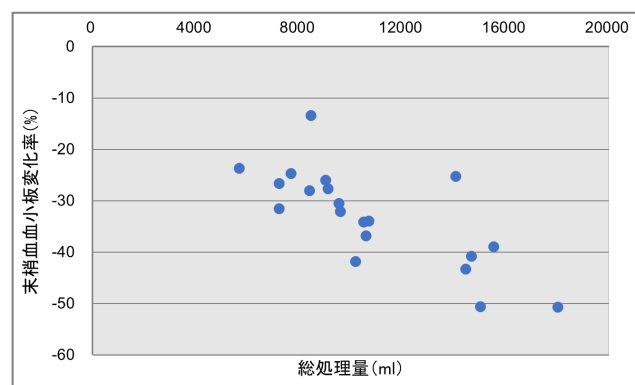


図 2 採取前後の血小板数の変化 (CMNC)

D. 考察

我々は以前より、採取開始時末梢血、採取中のバッグ中 CD34 陽性細胞を測定し、最終処理血液量を決定することで、ドナー、患者での PBSCH が、ドナー、患者、施行者にとって最も負担が少なく安全に実施できることを示してきたが、今回は、わが国で最も多数例で用いられている、Spectra Optia の MNC モードそしてその後新たに加わった CMNC モードを用いた自験例の成績を後方視に解析した。最も重要視している点は、安全に 1 日で必要量の採取を終了することである。現在、日本骨髄バンクでの CD34 陽性細胞採取目標は 2×10^6 /kg であるが、我々は CD34 陽性細胞数測定の国際標準である Single

platform 法であっても測定に誤差の生じる可能性のあること、末梢血中 CD34 陽性細胞濃度が処理量や時間とともに変化する可能性があること等を念頭に、開始時の採取目標を $4 \times 10^6/\text{kg}$ として、採取中の結果で目標量を補正しつつ最終処理血液量を決定している。以前に報告したように、2019 年 11 月 28 日までに採取が終了し、1 日で採取を終了した骨髄バンクドナーの患者体重当たりの CD34 陽性細胞収量の中央値は $4.58 \times 10^6/\text{kg}$ であり、妥当な設定と考えている。また機器とドナー血液の状態により、常に一定の効率で採取が行われるとは言えないので、採取開始時末梢血中と採取中のバッグ中の 2 点で確認して最終血液処理量を決定している。採取中のサンプリングは、体外循環が安定し、かつ 1 時間強かかる CD34 陽性細胞濃度測定の結果判明時から、最終血液処理量の変更が可能なタイミングとして、ドナー体重 (kg) $\times 50\text{ml}$ 前後の時点とした。採取効率は、CMNC モードで約 81%、MNC モードで 68%であったが、両モードの差については、小数例の比較であり評価は困難であるが、採取効率については 70-80% として計算することが可能と考えられた。今回の自験例では、MNC モード採取ドナーの開始時 CD34 陽性細胞濃度が CMNC 採取ドナーよりかなり多かったため、採取量、採取時間に偏りが生じたと思われる。途中サンプリング時の効率に比して、終了時の効率は約 5/4 倍に増加するが、これは採取産物が採取バッグに届くまでに、数分間血液の処理のみが行われること、検体採取のタイミングでプリファレンスの微調整が行われる点が関係していることが推測される。また、骨髄バンクドナーでは、バンクでの標準的な血液処理量と記載されている $200\text{ml}/\text{kg}$ 前後の処理が行われていることが多いが、適切な採取量を計算することで、それより少ない処理量で採取を終了することが可能であった。採取終了時の血小板数の下限について定まったものはないが、我々は、特に健常ドナーについては通常の手術時の目標血小板数である $5 \times 10^4/\text{kg}$ を目安としている。図 2 に示すように血液処理量が多い場合には、終了時には約 50%程度まで低下するため、十分に血液処理を行うためには採取当日に $10 \text{万}/\mu\text{l}$ の血小板数が望ましい。G-CSF 大量投与により、血小板数は低下することにも留意が必要であり、自験例では採取翌日にさらに低下を呈した例もあった。採取検体サンプリング時に採血して血小板数も同時に確認することは重

要であると思われる。

E. 結論

Optia を用いた採取では、ドナーからの PBSCH にあたって、採取開始時末梢血中と $50\text{ml}/\text{kg}$ 処理時の採取 CD34 陽性細胞数を測定し、終了時採取効率を 70-80% と設定し、目標 CD34 陽性細胞数を $4 \times 10^6/\text{kg}$ (患者体重) とすることで、必要十分な採取のための血液処理量を設定することが可能であった。血小板数は終了時 $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ 未満にならないことを目標にする場合、開始時 $10 \times 10^4/\mu\text{l}$ 以上あることが望ましく、サンプリング時に採血して極端な低下が生じていないことを確認することが望ましい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

【1】論文発表

1. Watanabe M, Kanda J, Arai Y, Hishizawa M, Nishikori M, Ishikawa T, Imada K, Ueda Y, Akasaka T, Yonezawa A, Nohgawa M, Kitano T, Itoh M, Takeoka T, Moriguchi T, Yago K, Arima N, Anzai N, Watanabe M, Kondo T, Takaori-Kondo A; Kyoto Stem Cell Transplantation Group (KSCTG). Impact of Donor Source on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Mature T Cell and Natural Killer Cell Neoplasms in the Kyoto Stem Cell Transplantation Group. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2020 Dec; 26(12): 2346-2358.
2. Morita-Fujita M, Arai Y, Yoshioka S, Ishikawa T, Kanda J, Kondo T, Akasaka T, Ueda Y, Imada K, Moriguchi T, Yago K, Kitano T, Yonezawa A, Nohgawa M, Takaori-Kondo A; Kyoto Stem Cell Transplantation Group (KSCTG). Indication and benefit of upfront hematopoietic stem cell transplantation for T-cell lymphoblastic lymphoma in the era of ALL-type induction therapies. *Sci Rep.* 2020 Dec 8;10(1):21418.
3. Konuma T, Ishiyama K, Igarashi A, Uchida N, Ozawa Y, Fukuda T, Ueda Y, Matsuoka KI, Mori T, Katayama Y, Onizuka M, Ichinohe T,

Atsuta Y; Adult Myelodysplastic Syndrome Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Effects of Acute and Chronic Graft-versus-myelodysplastic Syndrome on Long-term Outcomes Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. Clin Cancer Res. 2020 Dec 15;26(24):6483-6493.

4. Minamiguchi H, Fujita H, Atsuta Y, Asou N, Sakura T, Ueda Y, Sawa M, Dobashi N, Taniguchi Y, Suzuki R, Uchino Y, Tomita A, Tamaki S, Hagihara M, Fujimaki K, Yanada M, Maeda Y, Iwanaga M, Usui N, Kobayashi Y, Ohtake S, Kiyoi H, Matsumura I, Miyazaki Y, Naoe T, Takeshita A; Japan Adult Leukemia Study Group. Predictors of early death, serious hemorrhage, and differentiation syndrome in Japanese patients with acute promyelocytic leukemia. Ann Hematol. 2020 Dec;99(12):2787-2800.

5. Yokohama A, Okuyama Y, Ueda Y, Itoh M, Fujiwara SI, Hasegawa Y, Nagai K, Arakawa K, Miyazaki K, Makita M, Watanabe M, Ikeda K, Tanaka A, Fujino K, Matsumoto M, Makino S, Kino S, Takeshita A, Muroi K. Differences among hemoglobin thresholds for red blood cell transfusions in patients with hematological diseases in teaching hospitals: a real world data in Japan. Int J Hematol. 2020 Oct;112(4):535-543.

6. Kaji D, Ota Y, Sato Y, Nagafuji K, Ueda Y, Okamoto M, Terasaki Y, Tsuyama N, Matsue K, Kinoshita T, Yamamoto G, Taniguchi S, Chiba S, Ohshima K, Izutsu K. Primary human herpesvirus 8-negative effusion-based lymphoma: a large B-cell lymphoma with favorable prognosis. Blood Adv. 2020 Sep 22;4(18):4442-4450.

7. Matsui H, Arai Y, Imoto H, Mitsuyoshi T, Tamura N, Kondo T, Kanda J, Ishikawa T, Imada K, Ueda Y, Toda Y, Anzai N, Yago K, Nohgawa M, Yonezawa A, Tsunemine H, Itoh M, Yamamoto

K, Tsuji M, Moriguchi T, Takaori-Kondo A; Kyoto Stem Cell Transplantation Group (KSCTG). Risk factors and appropriate therapeutic strategies for thrombotic microangiopathy after allogeneic HSCT. Blood Adv. 2020 Jul 14;4(13):3169-3179.

8. Sakai K, Kuwana M, Tanaka H, Hosomichi K, Hasegawa A, Uyama H, Nishio K, Omae T, Hishizawa M, Matsui M, Iwato K, Okamoto A, Okuhiro K, Yamashita Y, Itoh M, Kumekawa H, Takezako N, Kawano N, Matsukawa T, Sano H, Ohshiro K, Hayashi K, Ueda Y, Mushino T, Ogawa Y, Yamada Y, Murata M, Matsumoto M. HLA loci predisposing to immune TTP in Japanese: potential role of the shared ADAMTS13 peptide bound to different HLA-DR. Blood. 2020 Jun 25;135(26):2413-2419.

9. Takeshita A, Asou N, Atsuta Y, Furumaki H, Sakura T, Ueda Y, Sawa M, Dobashi N, Taniguchi Y, Suzuki R, Nakagawa M, Tamaki S, Hagihara M, Fujimaki K, Minamiguchi H, Fujita H, Yanada M, Maeda Y, Usui N, Kobayashi Y, Kiyoi H, Ohtake S, Matsumura I, Naoe T, Miyazaki Y, Group TJALS. Impact of CD56 Continuously Recognizable as Prognostic Value of Acute Promyelocytic Leukemia: Results of Multivariate Analyses in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG)-APL204 Study and a Review of the Literature. Cancers (Basel). 2020 Jun 1;12(6):1444.

【2】学会発表

1. 上田恭典. 後天性血栓性血小板減少性紫斑病の治療(教育講演). 第42回日本血栓止血学会学術集会, オンライン. 2020年6月18-20日
2. 上田恭典. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)との付き合い方-TTPは裏切らない(スポンサーセミナー). 第64回日本細胞治療学会近畿支部総会, 奈良. 2020年11月21日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
なし