

原 著

血液型不適合移植での COBE Spectra を用いた骨髓濃縮法の検討

平安山知子¹⁾ 宮本 敏浩¹⁾²⁾ 和泉 賢一¹⁾²⁾ 沼田 晃彦¹⁾²⁾
亀崎健次郎¹⁾²⁾ 山崎 聡¹⁾²⁾ 清島 久美¹⁾ 宮本 京子¹⁾
橋本 大吾¹⁾ 岩崎 潤子¹⁾ 岩崎 浩己¹⁾ 長藤 宏司²⁾
原田 実根²⁾ 稲葉 頌一³⁾ 豊嶋 崇徳¹⁾ 赤司 浩一¹⁾

¹⁾九州大学病院・遺伝子細胞療法部

²⁾九州大学大学院・医学研究院・病態修復内科学

³⁾神奈川県赤十字血液センター

(平成 18 年 2 月 13 日受付)

(平成 18 年 7 月 18 日受理)

血液型不適合骨髓移植を行う際は、輸注に伴う有害事象を避けるため、骨髓液中の赤血球・血漿除去が必要である。今回われわれは、血液成分分離装置 COBE Spectra により、骨髓液から単核球を分離することで、骨髓細胞濃縮を行った血液型不適合骨髓移植 20 例において、その有用性について検討した。COBE Spectra を用いた骨髓濃縮により、赤血球量は 98.4% 除去され、最終赤血球量は 4.2 ± 2.4 ml であった。有核細胞回収率は $34.0 \pm 8.38\%$ 、CD34 陽性細胞回収率は $112.3 \pm 36.3\%$ であった。20 症例全例で、移植後の溶血反応および生着不全は認めず、移植後造血回復は速やかであった。COBE Spectra を用いることで、清潔な無菌閉鎖回路内において骨髓濃縮が可能となり、処理時間も短縮された。種々の細胞免疫療法の用途で広く普及している COBE Spectra を用いた骨髓濃縮法は、血液型不適合骨髓移植における骨髓濃縮の標準的方法として有用であると考えられた。

キーワード：骨髓移植，血液型不一致，骨髓濃縮，COBE Spectra

はじめに

同種造血幹細胞移植において、患者と移植細胞提供者間での ABO 血液型不適合は移植片拒絶に影響を及ぼさないために移植の禁忌とはならず、通常の造血幹細胞移植療法と同様に実施されている¹⁾²⁾。但し、溶血副作用を避けるため、血液型不適合同種骨髓移植の場合には骨髓液から赤血球や血漿を除去するために骨髓濃縮による細胞操作が必要とされる。

近年、細胞治療や再生医療の臨床応用が進められ、細胞の調整や加工を行う細胞プロセッシングの工程には医薬品の製造と同等の高い安全性と品質管理が必要とされ、Good manufacturing Practice (GMP) 基準に準拠した細胞プロセッシングセンターの存在が必要とされている。GMP の規制を

受ける細胞操作の基準は明らかではないが、今後は骨髓濃縮法も規制の対象となり得ることが想定される。血液型副不適合 (minor incompatibility) 同種骨髓移植の場合は、提供者血漿中に存在する患者血液型に対する抗体を除去する必要があるため、移植骨髓液を閉鎖系血液バックに分割し、大容量遠心機での比重遠心により上層の血漿成分を除去すれば移植可能である。一方、血液型主不適合 (major incompatibility) では移植骨髓液中から赤血球を、主副不適合 (major/minor incompatibility) では赤血球と血漿の両者を除去する必要があるため、骨髓液から有核細胞を単離する必要があるため、従来方法として、hydroxy-ethyl starch (HES) による静置法^{3)~6)}や、Ficoll を用いた比重遠心法^{7)~9)}が利用されてきたが、処理が煩雑で、ク

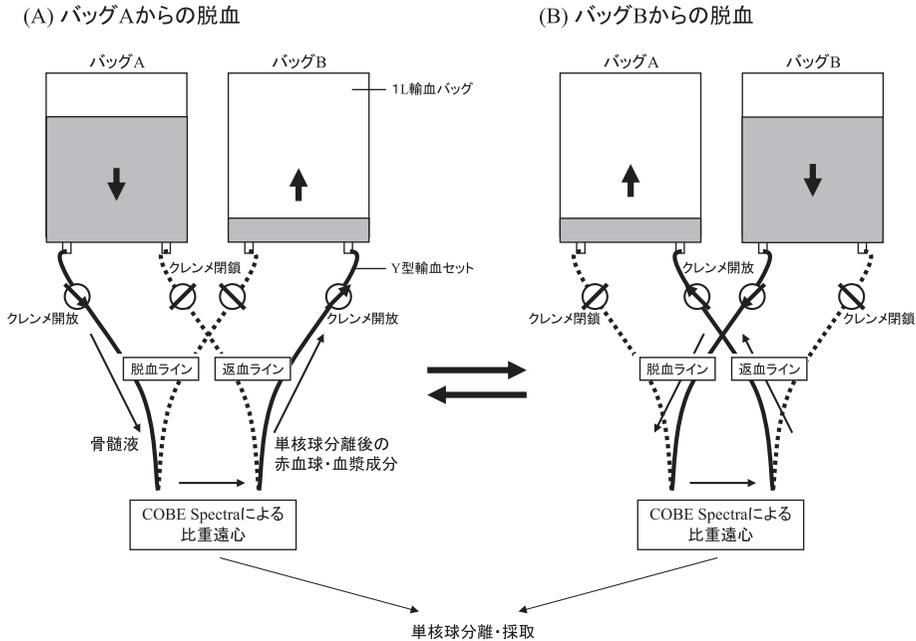


Fig. 1 Schematic representation of machine set-up for concentration of bone marrow fluid using the COBE Spectra cell separator.

リンベンチ内での無菌的な操作を要求されるなどの難点がある。従って、骨髓濃縮法も GMP 基準に準拠し、細胞操作に熟練した細胞プロセッシング・チームにおいて、より汚染の可能性が少なく、より効率よく細胞を回収できる方法で施行されるべきである。

今回我々は、連続式血液成分分離装置 COBE Spectra を用いて、血液型不適合同種骨髓移植における骨髓濃縮を施行し、その有効性を検討した。COBE Spectra を用いることにより、清潔な無菌閉鎖ディスプレイ回路内において単核球分離が効率よく採取可能であり、処理時間も短縮された。COBE Spectra は血漿交換、末梢血造血幹細胞やドナーリンパ球採取など免疫細胞治療に汎用されている機器で、既に多くの施設に普及しており、COBE Spectra を用いた骨髓濃縮法は標準的方法として有用であると考えられたので報告する。

対象と方法

当院で 2002 年から 2005 年までに実施された

ABO 血液型不適合同種骨髓移植、主不適合および主副不適合 20 例において、提供された骨髓液から単核球分離を COBE Spectra を用いて行った。骨髓提供者は 19 例が骨髓バンク由来の非血縁ドナーであり、1 例は血縁ドナーであった。副不適合は従来通りに骨髓液の洗浄による血漿除去のみを施行した。

COBE Spectra は無菌閉鎖ディスプレイセット (auto PBSC セット) を用いて、mononuclear cell モードでプライミングした。採取された骨髓液を生理食塩水で希釈し、フィルターを通して凝結塊や骨片を除去した後に、1L 輸血バッグに移行させた (バッグ A) (Fig. 1)。同型の空の輸血バッグ (バッグ B) とともに、二股の Y 型輸血セットを用いて、バッグ A・B とともに 2 カ所あるスパイクの一方は COBE Spectra の脱血ラインに、他方のスパイクは返血ラインに接続した (Fig. 1)。バッグ A 脱血ライン側とバッグ B 返血ライン側のクレンメを開放、バッグ A 返血ライン側とバッグ B 脱血ライン側のクレンメを閉鎖したままで、

Table 1 Results for red blood cells and volume depletion

	Initial marrow (mean ± SD)	Final product (mean ± SD)	depletion (%)
Weight (g)	1,108 ± 261 (690-1,900)	210 ± 73 (102-475)	81.0
Red blood cells (ml)	272 ± 91 (162-503)	4.2 ± 2.4 (2.1-13.0)	98.4 (96.6-98.9)

COBE Spectra による単核球分離を始動させた (Fig. 1A). 脱血流量 90ml/min, ACD 比 30, 採血ポンプ流量 3ml/min で単核球分離を行い, 分離後の赤血球・血漿成分はバッグ B 内に返血させた. 骨髓液 1,000ml で開始した場合, 開始後約 12 分でバッグ A が空に, バッグ B が充満されると, 脱血・返血のバッグの切り替えを二股 Y 型輸血セットのクレンメの開放と閉鎖を瞬時に行った. バッグ A 脱血ライン側とバッグ B 返血ライン側のクレンメを閉鎖し, 次にバッグ A 返血ライン側とバッグ B 脱血ライン側のクレンメを開放し, バッグ B から再び単核球分離を開始し, このクレンメを複数回繰り返すことで, 可能な限り単核球回収を施行した (Fig. 1B). 単核球分離中に, 均一な濃度の骨髓液を維持し, 遠心機の単核球層を安定させるため, 常にバッグ内骨髓液を手動的に攪拌し続ける必要があった. 処理回数は 6 サイクル以上を目標とした.

骨髓濃縮の前後で骨髓重量, 血算, および CD34 陽性細胞を測定した. 骨髓液の重量とヘマトクリット値の積から赤血球量を求め, 平均赤血球除去率を算出した. また, 白血球数および CD34 陽性細胞数に関しても同様に回収率を算出した.

結 果

骨髓液受け取りから骨髓濃縮作業終了までに要した時間は約 100 分程度であった. 骨髓濃縮操作前後で, 骨髓液の重量は平均 1,108 ± 261 (690 ~ 1,900) g から 210 ± 73 (102 ~ 475) g, 赤血球量は 272 ± 91 (162 ~ 503) ml から 4.2 ± 2.4 (2.1 ~ 13.0) ml に減少した. 赤血球除去率は 98.4 ± 0.67 (96.6 ~ 98.9) % であった (Table 1). 有核細胞回収率は 34.0 ± 8.38 (21.2 ~ 47.8) %, CD34 陽性細胞回収率は 112.3 ± 36.3 (50.4 ~ 163) % であった (Table 2).

Table 2 Results for mononuclear cell and CD34+ cell recovery

	Initial marrow (mean ± SD)	Final product (mean ± SD)	Recovery (%)
Mononuclear cells (× 10 ⁹)	145.2 ± 51.8 (47.6-248.6)	46.6 ± 21.1 (21.0-81.4)	34.0 ± 8.38 (21.2-47.8)
CD34+ cells (× 10 ⁶)	166.1 ± 131.2 (30.8-484.4)	165.8 ± 94.7 (41.2-317.1)	112.3 ± 36.3 (50.4-163.0)

Table 3 Comparison of bone marrow processing techniques using the COBE Spectra cell separator

	Depletion (%) Red blood cells	Recovery rate (%)	
		Mononuclear cells	CD34+ cells
Koristek et al ¹¹⁾	98.2	35.8	77.2
Tsubaki et al ¹²⁾	97.6	40.6	100.0
Present study	98.4	34.0	112.3

濃縮骨髓移植後に溶血発作などの副作用は認めず, 全例において骨髓生着が確認された. 評価可能であった 8 症例における移植片生着日の中央値は 18 日で血液型一致同種骨髓移植症例と比較しても遅延する傾向は認めなかった (data not shown).

考 察

当院では 1988 年に同種骨髓移植を開始して以来, 血液型不適合骨髓移植における骨髓濃縮法は, 手動的な Ficoll を用いた比重遠心法で行っていた⁷⁾. すなわち, 骨髓液を 600ml の血液バッグに分割し, 大容量遠心機で比重遠心を行い, 下層の赤血球層と上層の血漿成分を除去することにより骨髓有核細胞が濃縮された buffy coat を得る. その後に buffy coat をクリーンベンチ内で 50ml 遠心分離用チューブを用いて単核球分離を行っていた. この方法では処理時間が約 6 時間程度と長時間に及び, 常に無菌的操作が必要とされるために細胞処理担当者は多大な精神的ストレスを感じていた.

2002 年より, 骨髓濃縮を COBE Spectra による単核球分画採取法に変更した. 処理時間は骨髓の受け取りから処理終了まで約 2 時間程度と短縮さ

れた。また、閉鎖ディスプレイ回路を用いることにより、細菌汚染の可能性は極めて低く、細胞処理担当者のストレスは大幅に軽減された。そのうえ、赤血球除去率は98.4%と高効率であり、輸注時には溶血など有害事象は認められなかった。また有核細胞回収率は34%であったが、CD34陽性細胞回収率は112%と造血幹細胞移植に必要とされる造血幹細胞・前駆細胞をほぼ全て回収可能であった。従来のFicollによる比重遠心法を用いた骨髄濃縮と比較しても、赤血球除去率、有核細胞回収率ともに明らかな差は認めなかった。またCOBE Spectraで濃縮した骨髄を移植された患者全例で骨髄生着が認められ、移植後造血回復も速やかであった。現在まで他施設からもCOBE Spectraを用いた骨髄濃縮法により、自験例とほぼ同等の有核細胞およびCD34陽性細胞の回収率が報告されている^{10)~12)}(Table3)。汎用性の高い機器であるCOBE Spectraを用いた単核球採取法を既に熟知している施設が多いので、骨髄濃縮においても普遍的な成果が得やすいことが示唆される。

当院では、1988年に自己末梢血幹細胞採取および移植術を開始して以来、COBE Spectraを用いて毎年年間約120例の末梢血幹細胞・単核球採取を行っている。従来までは、末梢血幹細胞採取のためのアフエレーシス、末梢血幹細胞の凍結保存、CD34測定、凍結幹細胞の管理、末梢血幹細胞移植の実際、COBE Spectraの管理・運用・メンテナンス、など全ての過程を医師のみが実行していた。2005年より、臨床検査技師と臨床工学士の協力を得て、臨床工学士はCOBE Spectraの管理・運用・メンテナンス、検査技師は末梢血幹細胞アフエレーシス・末梢血幹細胞保存・CD34測定を担当する分業制を施行し、さらに専門性を追及し、組織的な管理を行っている。将来的にはGMP基準に準拠した細胞プロセッシングセンターの確立を目指している。当院においては末梢血幹細胞採取の多数例の経験によりCOBE Spectraの操作には既に熟知しており、さらに他分野の熟練した医療従事者の協力により、骨髄液からの単核球分離も容易に行うことが可能であった。

近年、臍帯血移植やCD34陽性細胞移植など移植細胞源の多様化や移植対象疾患の拡大により同種造血幹細胞移植件数は増加傾向にある¹³⁾。移植細胞源として、ドナーのコーディネートの必要がなく移植まで短期間で可能である臍帯血移植数が飛躍的に増加する一方で、少子化のために同胞間におけるHLA一致血縁者間骨髄移植は減少している。さらには将来的に日本骨髄バンクにおいても非血縁者からの末梢血幹細胞採取が検討されている。これらによる骨髄移植の減少に伴い、血液型不適合骨髄濃縮の機会が減ることが予想される。しかしながら再生不良性貧血などのある特定の疾患では、末梢血幹細胞よりも骨髄移植の有効性が示されており、またドナー側の意向で骨髄採取が選択される可能性もある。たとえ症例数は減少しても、血液型不適合骨髄移植が不要になることはないので、骨髄濃縮による細胞操作は、GMP基準を遵守可能な細胞プロセッシングセンターへの一元集約化、または汎用性のある機器を用いた簡易なマニュアル化が強く望まれる。

結 語

COBE Spectraを用いた骨髄濃縮法は造血幹細胞・前駆細胞を高効率に回収できるうえ、短時間で処理可能である。ディスプレイ閉鎖回路を用いることにより汚染の可能性が低く、GMP基準に準拠した方法である。種々の細胞免疫療法用途で広く普及しているCOBE Spectraを用いた骨髄濃縮法は、ABO血液型不適合骨髄移植における骨髄濃縮法として標準的方法であると考えられた。

文 献

- 1) Benjamin RJ, McGurk S, Ralston MS, et al : ABO incompatibility as an adverse risk factor for survival after allogeneic bone marrow transplantation. *Transfusion*, 39 : 179—187, 1999.
- 2) Seebach JD, Stussi G, Passweg JR, et al : ABO Blood Group Barrier in Allogeneic Bone Marrow Transplantation Revisited. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11 : 1006—1013, 2005.
- 3) Dinsmore RE, Reich LM, Kapoor N, et al : ABH incompatible bone marrow transplantation : removal of erythrocytes by starch sedimentation. *Br J Haematol*, 54 : 441—449, 1983.

- 4) Ho WG, Champlin RE, Feig SA, et al. : Transplantation of ABH incompatible bone marrow : gravity sedimentation of donor marrow. *Br J Haematol*, 57 : 155—162, 1984.
- 5) Warkentin PI, Hilden JM, Kersey JH, et al. : Transplantation of major ABO-incompatible bone marrow depleted of red cells by hydroxyethyl starch. *Vox Sang*, 48 : 89—104, 1985.
- 6) Tsang KS, Li CK, Wong AP, et al. : Processing of major ABO-incompatible bone marrow for transplantation by using dextran sedimentation. *Transfusion*, 39 : 1212—1219, 1999.
- 7) Harada M, Aoyagi N, Kondo K, et al. : Allogeneic bone marrow transplantation from a major ABO-incompatible donor. Infusion of hemopoietic stem cells isolated by Ficoll-Hypaque method. *Transplantation*, 35 : 191—192, 1983.
- 8) English D, Lamberson R, Graves V, et al. : Semi-automated processing of bone marrow grafts for transplantation. *Transfusion*, 29 : 12—16, 1989.
- 9) Dragani A, Angelini A, Iacone A, et al. : Comparison of five methods for concentrating progenitor cells in human marrow transplantation. *Blut*, 60 : 278—281, 1990.
- 10) Davis JM, Schepers KG, Eby LL, et al. : Comparison of progenitor cell concentration techniques : continuous flow separation versus density-gradient isolation. *J Hematother*, 2 : 315—320, 1993.
- 11) Koristek Z, Mayer J : Bone marrow processing for transplantation using the COBE spectra cell separator. *J Hematother Stem Cell Res*, 8 : 443—448, 1999.
- 12) Tsubaki K, Ariyama T, Ueno T, et al. : Concentration of progenitor cells collected from bone marrow fluid using a continuous flow cell separator. *Ther Apher*, 5 : 46—48, 2001.
- 13) 日本造血細胞移植学会, 全国データ集計事務局. 日本造血細胞移植学会, 平成16年度全国調査報告書.

BONE MARROW PROCESSING IN ABO-INCOMPATIBLE BONE MARROW TRANSPLANTATION USING COBE SPECTRA CELL SEPARATOR

Tomoko Henzan¹⁾, Toshihiro Miyamoto¹⁾²⁾, Ken-ichi Izumi¹⁾²⁾, Akihiko Numata¹⁾²⁾,
Kenjiro Kamezaki¹⁾²⁾, Satoshi Yamasaki¹⁾²⁾, Kumi Kiyoshima¹⁾, Kyoko Miyamoto¹⁾,
Daigo Hashimoto¹⁾, Junko Iwasaki¹⁾, Hiromi Iwasaki¹⁾, Koji Nagafuji²⁾,
Mine Harada²⁾, Shoichi Inaba³⁾, Takanori Teshima¹⁾ and Koichi Akashi¹⁾

¹⁾Center for Cellular and Molecular Medicine, Kyushu University Hospital,

²⁾Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences,

³⁾Kanagawa Prefectural Red Cross Blood Center

In ABO major incompatibility between a donor and a recipient on bone marrow transplantation (BMT), red blood cells (RBC) and/or plasma containing anti-A and anti-B antibodies should be removed from collected marrow aspirates to prevent hemolytic reactions. We processed 20 marrow aspirates to concentrate mononuclear cells using a COBE Spectra cell separator. BM processing resulted in a mean recovery of $34.0 \pm 8.38\%$ of mononuclear cells and $112.3 \pm 36.3\%$ of CD34+ cells in the final product. A mean of 98.4% of RBC was removed, with a mean of $4.2 \pm 2.4\text{ml}$ of RBC in the final product. Twenty patients receiving allogeneic BMT showed no sign of hemolysis and a rapid hematopoietic recovery after BMT. BM processing using the COBE spectra cell separator proved to be a fast, safe, and effective procedure to remove RBC and plasma from the marrow harvest in ABO-incompatible BMT.

Key words : Bone Marrow Transplantation, ABO incompatibility, Cell processing, COBE Spectra Cell Separator