

## 移植のために採取された骨髄液から自動細胞分離装置 SEPAX™ を用いた 単核細胞の分離

岸野 光司<sup>1)</sup> 中木 陽子<sup>1)</sup> 小野崎文子<sup>1)</sup> 進藤 聖子<sup>1)</sup> 大槻 郁子<sup>1)</sup>  
 小林 美佳<sup>1)</sup> 小幡 隆<sup>1)</sup> 田村 光子<sup>1)</sup> 菅野 直子<sup>1)</sup> 藤原慎一郎<sup>2)</sup>  
 松山 智洋<sup>1)2)</sup> 森 政樹<sup>1)2)</sup> 小澤 敬也<sup>1)2)</sup> 室井 一男<sup>1)2)</sup>

ABO 血液型主不適合同種骨髄移植では、溶血を防ぐためドナー骨髄液より赤血球を除去する必要がある。今回、自動細胞分離装置 SEPAX™ を用いて骨髄液から単核細胞を分離し、得られた単核細胞を移植（骨髄移植）したので報告する。SEPAX は、無菌閉鎖回路で自動的に細胞処理を行う卓上型の機器である。2009 年から 2011 年、ABO 血液型主不適合のため SEPAX を用いて単核細胞を移植した骨髄移植 13 例を解析した。骨髄液の容量が 880ml を超える場合、遠心後血漿を除き総量を 880ml 以下に調整した。まず、所定のキットを装着した SEPAX を用いて骨髄液からバフィーコートを分離した。次に、SEPAX を用いて Ficoll 比重遠心法によって単核細胞を分離した。得られた単核細胞は、直ちに移植前処置の終わった患者に輸注された。骨髄液処理前の CD34 陽性細胞数は  $154.6 \pm 74.1 \times 10^6$  個、分離した単核細胞中の CD34 陽性細胞数は  $73.6 \pm 47.8 \times 10^6$  個、CD34 陽性細胞回収率は  $49.1 \pm 22.8\%$  であった。移植された CD34 陽性細胞数は、患者体重あたり  $1.43 \pm 0.78 \times 10^6$  個/kg。骨髄移植後、1 例は生着前に感染症で早期死亡したが、残り 12 例は全例生着した。SEPAX は、骨髄液からの CD34 陽性細胞を含む単核細胞の分離に有用である。

キーワード：同種骨髄移植、ABO 血液型主不適合、単核細胞、CD34 陽性細胞

### はじめに

同種骨髄移植を行うに当たり、レシピエントとドナーに ABO 血液型主不適合がある場合は、レシピエント血漿中の抗 A 抗体または抗 B 抗体の何れかまたは両者がドナーの骨髄液に含まれる赤血球の A 抗原または B 抗原の何れかまたは両者に結合し、重篤な即時型の血管内溶血を起こす可能性がある。レシピエントが ABO 血液型以外の血液型に対する不規則抗体を有する場合には、不規則抗体がドナーの骨髄液の赤血球抗原に結合し、血管外溶血を起こす可能性がある。レシピエントが Rh<sub>0</sub>(D) 陰性で抗 D 抗体を保有していない場合、骨髄液に含まれる Rh<sub>0</sub>(D) 陽性の赤血球抗原によって感作され、抗 D 抗体が産生される可能性がある。上記の組み合わせの血液型不適合同種骨髄移植を行う場合は、ドナーの骨髄液から赤血球を除去する必要がある。

骨髄液から赤血球を除去する方法には、機器を使う方法<sup>1)~3)</sup>と手法がある。近年、血液成分分離装置を用いて赤血球除去が広く行われており、代表的な機器に COBE Spectra™ (CaridianBCT 社) や COM.TEC™

(Fresenius 社) 等がある。一方、手法には比重液の Ficoll 液を用いた比重遠心法<sup>4)5)</sup>と赤血球沈降促進剤の hydroxyl ethyl starch を用いた方法<sup>6)</sup>がある。血液成分分離装置を用いる方法は、閉鎖回路で処理するため無菌的である。造血幹細胞を含む単核細胞の回収に優れている等の利点があるが、操作に熟練を要する、骨髄液が少量の場合処理が困難である等の欠点もある<sup>1)~3)</sup>。今回我々は、Ficoll 液を用いて単核細胞を自動的に分離する自動細胞分離装置 SEPAX™ (医療機器製造販売届出番号 13B1X00072001053, Biosafe 社) を用いてドナーの骨髄液から単核細胞を分離し、その細胞を移植（骨髄移植）したので報告する。

### 対象および方法

#### 1. 対象

2009 年から 2011 年、自治医科大学附属病院の無菌治療部に入院し、ABO 血液型主不適合ドナーから採取された骨髄液から単核細胞を分離し、その単核細胞を移植（骨髄移植）した 13 例を対象とした (Table 1)。ド

1) 自治医科大学附属病院輸血・細胞移植部

2) 自治医科大学附属病院無菌治療部

[受付日：2011 年 10 月 17 日，受理日：2012 年 2 月 10 日]

Table 1 Characteristics of recipients and donors

NO.	Recipient					Donor				
	Age (yrs)	Sex	Disease	Conditioning	ABO type	Age (yrs)	Sex	ABO type	Relationship	ABO incompatible
1	33	M	AML	BU/CY	O	37	M	A	Unrelated	Major
2	21	M	AML	TBI/FLU/CY/ATG	O	46	F	A	Related	Major
3	22	F	CML	TBI/L-PAM	B	30	M	A	Unrelated	Major + Minor
4	12	M	AML	TBI/CY	A	33	M	AB	Unrelated	Major
5	50	M	AML	TBI/CY	O	33	M	A	Unrelated	Major
6	62	M	AML	TBI/FLU/BU	B	26	F	A	Unrelated	Major + Minor
7	60	F	AML	TBI/FLU/BU	O	24	M	B	Unrelated	Major
8	65	M	MCL	TBI/FLU/BU	O	24	M	A	Unrelated	Major
9	25	F	MDS	TBI/CY	A	29	M	AB	Related	Major
10	60	M	ATL	TBI/FLU/BU	A	35	M	B	Unrelated	Major + Minor
11	22	F	ALL	TBI/CY	O	28	F	A	Related	Major
12	7	F	ALL	TBI/VP-16/CY	O	33	F	AB	Unrelated	Major
13	54	M	AML	TBI/CY	B	44	M	A	Related	Major + Minor

yrs, years; M, male; F, female; AML, acute myeloblastic leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia; MCL, mantle cell lymphoma; MDS, myelodysplastic syndrome; ATL, adult T-cell leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; BU, busulfan; CY, cyclophosphamide; TBI, total body irradiation; FLU, fludarabine; L-PAM, melfalan; VP-16, etoposide.

ナーは、血縁4例、非血縁9例。ABO血液型不適合は、主不適合9例と主副不適合4例。

## 2. 自動細胞分離装置 (SEPAX)

SEPAXは、卓上型の自動細胞分離装置で、幅29cm×奥行36cm×高さ37cm、重量13Kgである。用途に応じたコンピュータ制御のプロトコルを有し、特定の血液成分を分離することができる。遠心分離法によって、血球成分の大きさ及び密度の違いから目的とする細胞を分離する。遠心分離チャンバー、ストップコック及び採取バッグ等が一体となった滅菌分離キットを用いるので、閉鎖性に優れている。血球成分は、個々の採取バッグに回収される。処理サイクルは最大4回、1サイクルの最大量処理が220mlのため、骨髓液の最大処理量は880ml以下となる。骨髓液が880mlを超える場合には、SEPAXで処理する前に、大型遠心機で1,170G (2,000rpm) 5分間骨髓液の入ったバッグを遠心し上清の血漿を除去し、骨髓液を約700ml~750mlに濃縮した。骨髓液の濃縮とSEPAXの操作は、臨床用細胞プロセッシング室で行った<sup>7)</sup>。

## 3. 単核細胞分離

バフィーコート分離用キットCS-490のラインにボリュームを調整した骨髓液を接続した(Fig. 1A)。SEPAX本体に円筒形の分離チャンバーを遠心部に装着し、チャンバーからのラインを光学センサーに装着した。フィルター付圧力モニタラインを圧力センサーポートに接続し、バッグ類を装置側面に吊した。SEPAXで濃縮プロトコルGVR (Generic Volume Reduction) を本体ボタンで選択し、以後SEPAXのディスプレイ表示に従い操作を実施した。自動テストが実施され、プライミングから自動遠心分離が開始された。血漿を除去した

骨髓液は、分離チャンバー内に1回当たり170~200ml充填され、自動遠心分離処理が実施された。この工程は、最大4サイクル行われ、最終的に100mlのバフィーコートが分離された。次に、CS-490キット装着と同様に、単核細胞分離用キットCS-900に500mlの生理食塩水バッグを接続し、100mlのFicoll液をバッグに充填した(Fig. 1B)。次に、最初の工程で分離されたバフィーコートをコネクタに接続し、キットをSEPAX本体に装着した。SEPAXのFicoll分離プロトコルDGBS (Density Gradient Based Separation) を選択し、チャンバー内でFicoll比重遠心法を用いてバフィーコートから単核細胞を分離した。分離された単核細胞をチャンバー内に2回引き込み、生理食塩水で2回除去洗浄しFicoll液を除き、約50mlの生理食塩水浮遊液として分離した。さらに生理食塩水50mlとACD15mlを加え総量115mlの単核細胞浮遊液とし、この細胞浮遊液を移植した。

## 4. 細胞数の測定

各工程おける有核細胞数、単核細胞数、CD34陽性細胞数、回収率を測定した。これらの測定は、分離した細胞と廃液の両方で行った。細胞数は、改良ノイバウエル白血球計算盤を用い、チュルク氏液で染色した細胞液を顕微鏡下で測定した。CD34陽性細胞数は、flow cytometer (FACSCalibur™; Becton Dickinson) を用いて測定した<sup>8)</sup>。骨髓液の赤血球量は、自動血球測定装置 (Beckman Coulter社) を用いて測定し、細胞処理前後の骨髓液中のヘマトクリット値から赤血球除去率を算出した。

## 5. CD34陽性細胞数の測定

検体測定チューブを2本用意、一方にCD34-PEとCD45-PerCPを20µl分注し、もう一方のチューブに陰性コン

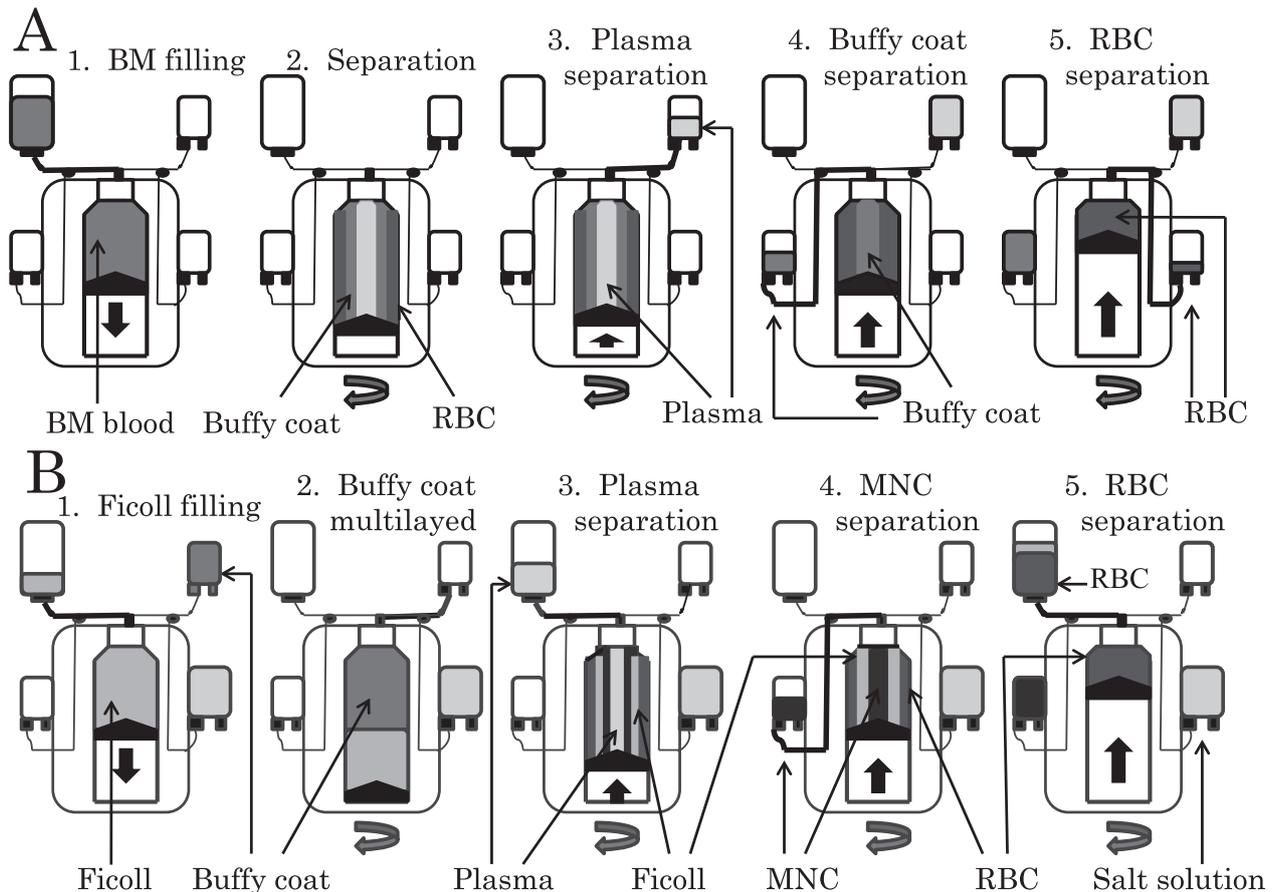


Fig. 1 Cell processing using SEPAX.

A, buffy coat preparation; B, mononuclear cell preparation. BM, bone marrow; MNC, mononuclear cell; RBC, red blood cell. Bone marrow blood is processed through steps 1 to 5 to obtain the buffy coat (A). The buffy coat is formed between the plasma and red blood cell layer. MNCs are prepared through steps 1 to 5 using Ficoll density gradient centrifugation (B).

トロールとして control-PE と CD45-PerCP を  $20\mu\text{l}$  加え、両チューブにサンプルを  $100\mu\text{l}$  ずつ添加した。混和後、冷温暗所 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) で 30 分間反応させ、次に 20 倍希釈した Erythrocyte-Lysing Reagent (Dako) を  $2\text{ml}$  ずつ分注し、室温 10 分間反応させた。溶血処理後、PBS Buffer で洗浄し測定した。FL3 (PerCP) vs. SSC (Side Scatter) で CD45-PerCP 陽性の白血球分画をゲート後、SSC が低値で CD45-PerCP 弱陽性の幹細胞分画の CD34-PE 陽性の細胞を最終的な CD34 陽性細胞とした。flow cytometer 解析により求めた CD34 陽性細胞率に白血球計算盤で得られた値を乗算し、CD34 陽性細胞数を算出した。

## 6. 生着

骨髄移植後、レシピエントの好中球が 3 日間連続して  $500/\mu\text{l}$  以上となった最初の日を骨髄生着日とした。血小板濃厚液の輸血なしに、3 日間連続して血小板数が  $2\text{万}/\mu\text{l}$  以上となった最初の日を血小板回復日とした。

## 結 果

結果の統計値は平均  $\pm$  標準偏差 (SD) を示し、その

後の括弧内数値は範囲を示す。

### 1. レシピエントとドナーの背景

レシピエントとドナーの年齢、性別、ABO 血液型、幹細胞ソース、レシピエントの疾患、前処置を Table 1 に示す。症例 1, 3, 4, 5, 9, 11, 12, 13 は、骨髄破壊的前処置が行われ、症例 2, 6, 7, 8, 10 は、骨髄非破壊的前処置 (ミニ移植) が行われた。全例、骨髄移植後顆粒球コロニー刺激因子が投与された。

### 2. COBE Spectra, 用手法との比較

他機種種の Spectra との赤血球除去率、赤血球残存量、単核細胞および CD34 陽性細胞の回収率の比較を Table 2 に示す。当院で処理された骨髄液中の赤血球量は、 $305.7 \pm 67.5\text{ml}$  ( $150.2 \sim 433.5$ ) ml であった。SEPAX で分離された最終の単核細胞浮遊液に含まれる赤血球量は、 $1.3 \pm 0.6\text{ml}$  ( $0.7 \sim 2.8$ ) ml と低値であり、赤血球除去率は  $99.6 \pm 0.2\%$  ( $99.0 \sim 99.8$ ) % であった。また、当院で比重液の Ficoll 液を用いた用手法で単核細胞を分離し移植した 21 例の単核細胞数、体重当たりの移植単核細胞数、回収率について SEPAX と比較した (Table 3)。SEPAX で最終的に分離された単核細胞数は  $2.4 \pm$

Table 2 Comparison of SEPAX and COBE Spectra with bone marrow processing

	Initial BM		Final product		Recovery (%)	
	Volume (ml)	RBCs (ml)	RBCs (ml)	RBC depletion (%)	NCs	CD34+ cells
SEPAX	1,083 ± 264 (650-1,700)	305.7 ± 67.5 (150.2-433.5)	1.3 ± 0.6 (0.7-2.8)	99.6 ± 0.2 (99.0-99.8)	16.0 ± 15.0 # (8.0-28.8)	49.1 ± 22.8 (12.6-90.0)
COBE Spectra <sup>1)</sup>	1,099 ± 385 (390-2,450)	309.9 ± 117.7 (107.3-647.2)	4.0 ± 1.8 (0-10.99)	98.6 ± 0.6 (95.1-100)	33.66 ± 12.2 (10.3-76.3)	82.2 ± 21.1 (26.7-159.8)
COBE Spectra <sup>11)</sup>	1,108 ± 261 (690-1,900)	272 ± 91 (162-503)	4.2 ± 2.4 (2.1-13.0)	98.4 ± 0.67 (96.6-98.9)	34.0 ± 8.38 (21.2-47.8)	112.3 ± 36.3 (50.4-163.0)

BM, bone marrow; RBCs, red blood cells; NCs, nucleated cells; # MNCs, mononuclear cells.  
Data are reported as the mean ± SD (range).

Table 3 Comparison of SEPAX and manual method with bone marrow processing

Method	Initial marrow	Final product		
	NCs (× 10 <sup>9</sup> )	MNCs (× 10 <sup>9</sup> )	× 10 <sup>8</sup> /RBW (kg)	Recovery (%)
SEPAX (n = 13)	13.7 ± 4.6 (6.7-21.6)	2.4 ± 1.8 (0.6-6.2)	0.45 ± 0.28 (0.11-1.02)	16.0 ± 15.0 (8.0-28.8)
Manual method (n = 21)	17.1 ± 6.7 (9.9-38.0)	3.5 ± 1.4 (1.6-6.7)	0.56 ± 0.19 (0.21-0.98)	22.0 ± 8.1 (9.7-40.7)

NCs, nucleated cells; MNCs, mononuclear cells; RBW, recipient body weight.  
Data are reported as the mean ± SD (range).

Table 4 Cell number before and after processing

	Initial BM		Buffy coat		Final product		
	NCs (× 10 <sup>9</sup> )	× 10 <sup>8</sup> /RBW (kg)	NCs (× 10 <sup>9</sup> )	× 10 <sup>8</sup> /RBW (kg)	MNCs (× 10 <sup>9</sup> )	× 10 <sup>8</sup> /RBW (kg)	Recovery (%)
Cell count	13.7 ± 4.6 (6.7-21.6)	2.73 ± 0.86 (1.28-4.02)	11.2 ± 3.5 (4.6-16.5)	2.20 ± 0.61 (1.04-3.37)	2.4 ± 1.8 (0.6-6.2)	0.45 ± 0.28 (0.11-1.02)	16.0 ± 15.0 (8.0-28.8)
CD34+ cells	(× 10 <sup>6</sup> )	× 10 <sup>6</sup> /RBW (kg)	(× 10 <sup>6</sup> )	× 10 <sup>6</sup> /RBW (kg)	(× 10 <sup>6</sup> )	× 10 <sup>6</sup> /RBW (kg)	Recovery (%)
	154.6 ± 74.1 (35.9-241.9)	3.54 ± 3.06 (0.68-12.53)	124.1 ± 61.4 (29.2-211.6)	2.82 ± 2.42 (0.55-9.85)	73.6 ± 47.8 (10.5-162.1)	1.43 ± 0.78 (0.20-2.67)	49.1 ± 22.8 (12.6-90.0)

BM, bone marrow; NCs, nucleated cells; MNCs, mononuclear cells; RBW, recipient body weight. Data are reported as the mean ± SD (range).

1.8 × 10<sup>9</sup>個、細胞の回収率は 16.0 ± 15.0% となり、移植された細胞数はレシピエントの体重当たり 0.45 ± 0.28 × 10<sup>8</sup>/kg であった。用手法によって分離された単核細胞の平均値は 3.5 ± 1.4 × 10<sup>9</sup>個で、処理前の有核細胞の 22.0 ± 8.1% が回収され、レシピエントの体重当たり 0.56 ± 0.19 × 10<sup>8</sup>/kg の細胞が移植された。また、単核細胞のコロニー形成能の CFU-GM (colony forming-unit granulocyte/macrophage) は 58.20 ± 38.54/1 × 10<sup>5</sup>個であった。

### 3. 各工程の有核細胞数と CD34 陽性細胞数

細胞処理の工程における有核細胞数と CD34 陽性細胞数を示す (Table 4)。採取された骨髓液 (希釈液を含む) の平均値は 1,083 ± 264ml、骨髓有核細胞数は 13.7 ± 4.6 × 10<sup>9</sup>個。分離された Buffy coat の有核細胞数は 11.2 ± 3.5 × 10<sup>9</sup>個、細胞の回収率は 82.6 ± 10.9% であった。Ficoll 液によって分離された単核細胞は 2.4 ± 1.8 × 10<sup>9</sup>個で、処理前の有核細胞の 16.0 ± 15.0% が回収された。処理前の骨髓液中の CD34 陽性細胞は 154.6 ± 74.1 × 10<sup>6</sup>個、バ

フィーコートそのものの平均値は 124.1 ± 61.4 × 10<sup>6</sup>個、回収率は 80.9 ± 11.2% であった。最終的に分離された CD34 陽性細胞は 73.6 ± 47.8 × 10<sup>6</sup>個で、CD34 陽性細胞の 49.1 ± 22.8% が回収された。移植された CD34 陽性細胞は、患者の体重当たり 1.43 ± 0.78 × 10<sup>6</sup>/kg であった。骨髓液の処理開始から Buffy coat 分離までと最終の単核細胞を得るまでに要する時間は、約 80 分間と約 75 分間であった。得られた単核細胞の浮遊液の量は、約 50 ml であった。

### 4. 排液との比較

Buffy coat 分離と単核細胞分離の過程で、バッグに採取された細胞数と廃液中の細胞数を比較した。Buffy coat 分離後、廃液に残された有核細胞は 0.6 ± 0.4 × 10<sup>9</sup>個で、全有核細胞の 5.1% に過ぎなかった。Ficoll 液を用いて Buffy coat から単核細胞分離後、廃液に残された有核細胞は 5.6 ± 1.9 × 10<sup>9</sup>個で、全有核細胞の 70% を占めた。CD34 陽性細胞では、Buffy coat

Table 5 Outcome of bone marrow transplantation

No.	Neut>500/ $\mu$ l (day)	Plat>20,000/ $\mu$ l (day)	Outcome
1	15	22	Death
2	ND	ND	Death
3	16	22	Alive (day 807)
4	15	19	Alive (day 757)
5	19	29	Death
6	15	22	Alive (day 691)
7	12	13	Alive (day 585)
8	13	15	Alive (day 564)
9	15	25	Alive (day 360)
10	14	16	Alive (day 318)
11	19	39	Alive (day 143)
12	16	20	Alive (day 130)
13	14	16	Alive (day 101)
Mean $\pm$ SD	15.3 $\pm$ 2.1	21.5 $\pm$ 7.1	

ND, not determined due to early death before engraftment.

ト分離後、廃液に残された CD34 陽性細胞は  $5.7 \pm 3.7 \times 10^6$  個で、全 CD34 陽性細胞の 4.4% に過ぎなかった。パフィーコートから単核細胞分離後、廃液に残された CD34 陽性細胞は  $15.6 \pm 12.8 \times 10^6$  個で、全 CD34 陽性細胞の 17.5% であった。

#### 5. 移植成績

骨髄移植の成績を Table 5 に示す。移植された CD34 陽性細胞数の平均値は、レシピエントの体重当たり  $1.43 \pm 0.78 \times 10^6/\text{Kg}$  であった。骨髄単核細胞の輸注に伴う副作用はみられなかった。12 例で骨髄細胞は生着した。症例 2 は生着前に感染症で死亡した。生着までの期間（好中球が連続 3 日間  $500/\mu\text{l}$  以上となる最初の日までの日数）は、平均  $15.3 \pm 2.1$  日であった。血小板数が  $2$  万/ $\mu\text{l}$  以上に回復するまでの期間は、平均  $21.5 \pm 7.1$  日であった。生着後の生存に関しては、症例 1 は、骨髄移植後 88 日目に GVHD で死亡した。症例 5 は、骨髄移植後 192 日目に原疾患で死亡した。現在、10 例が無病生存している。

#### 考 察

自動細胞分離装置 SEPAX を用いて臍帯血から有核細胞を分離した報告はあるが<sup>9)</sup>、骨髄液から比重液の Ficoll 液を用いて単核細胞を分離した報告はない。Ficoll 液を用いた SEPAX では、不適合赤血球を  $99.6 \pm 0.2\%$  とほぼ完全に除去し、移植細胞浮遊液中の残存赤血球量は  $1.3 \pm 0.6\text{ml}$  ( $0.7 \sim 2.8$ )  $\text{ml}$  と極めて低値であった。また、移植後の溶血性副作用は 13 例すべて認められなかった。一方、Spectra を用い、細胞比重の差を利用した遠心分離法によって、単核細胞分画を濃縮採取する方法が広く行われている<sup>110)~113)</sup>。Spectra は  $98.6 \pm 0.6\%$ 、 $98.4 \pm 0.67\%$  の赤血球除去率が得られ、赤血球残量は  $4.0 \pm 1.8\text{ml}$  ( $0 \sim 10.99$ )  $\text{ml}$ 、 $4.2 \pm 2.4\text{ml}$  ( $2.1 \sim 13.0$ )  $\text{ml}$  と報告<sup>111)</sup>

されており、SEPAX を用いた場合より高率である (Table 2)。Braine ら<sup>14)</sup> は血液分離装置 (Hemonetics Model-30<sup>TM</sup>) を用いて、赤血球を除去しパフィーコートを分離採取する方法を 25 例の ABO 主不適合骨髄移植に実施している。この方法にて赤血球除去率 95% 以上、単核細胞回収率 75%、CFU-GM 回収率 57% であったと報告している。しかし、8~38ml の残存した不適合赤血球が輸注され、発熱、悪寒戦慄、徐脈、高血圧、ヘモグロビン尿および昏迷などの合併症が 11 例にみられた。したがって、レシピエントの保有する抗 A、抗 B 抗体の抗体価にもよるが、Spectra 処理後の赤血球残量の範囲は  $0 \sim 10.99\text{ml}^{11)}$  と  $2.1 \sim 13.0\text{ml}^{11)}$  であり、上記の不適合赤血球の輸注量から、もし 10ml を超える場合は溶血性副作用が発生する可能性も否定できないと思われる。特に、循環血液量の少ない小児においては、赤血球を可能な限り除去する必要性があり、その点 SEPAX は優れている。しかし、Ficoll 液を用いた赤血球除去では、分離操作による造血幹細胞の回収率が低値を示した。原田ら<sup>15)</sup> は、Ficoll 液を用いて単核細胞を分離する方法は、赤血球除去率が 99% 以上と高値となるが単核細胞の回収率は 15~20% であり、血液分離装置を用いてパフィーコートを分離採取する回収率より低値を示すことを報告している。今回の SEPAX と Spectra の有核細胞回収率の比較においても同様な結果が認められた。しかし、これは Spectra が単核細胞分画層をターゲットして分離しているが、顆粒球の混入もあるため、SEPAX より単核細胞としての回収率が高値を示していることも考えられる。また、原田ら<sup>15)</sup> は、Ficoll 液を用いて、ほぼ完全に赤血球を除去し、我々と同等な体重当たり  $0.30 \times 10^8 \sim 0.86 \times 10^8/\text{kg}$  の単核細胞数を移植し、溶血性副作用を認めることなく全例に生着が得られ、ドナー型赤血球が出現したことを報告している。

最終的に, SEPAX で分離された単核細胞数は  $2.4 \pm 1.8 \times 10^9$  個, 回収率は  $16.0 \pm 15.0\%$ , 移植細胞数  $0.45 \pm 0.28 \times 10^8/\text{kg}$  となり, 我々が従来の Ficoll 液を用いた用手法で分離した 21 例の結果 (単核細胞数  $3.5 \pm 1.4 \times 10^9$  個, 回収率  $22.0 \pm 8.1\%$ , 移植細胞数  $0.56 \pm 0.19 \times 10^8/\text{kg}$ ) と比較しても大きな差は認められなかった. この用手法を用いて分離した単核細胞はレシピエントに輸注されたが, 移植後全例生着しドナー型の完全キメラとなったことを確認している<sup>16)17)</sup>.

一方, 最終的に SEPAX で分離された CD34 陽性細胞数は移植成績に影響を認めなかったが, CD34 陽性細胞数  $73.6 \pm 47.8 \times 10^6$  個, 回収率  $49.1 \pm 22.8\%$  ( $12.6 \sim 90.0\%$ ) とばらつきが生じ, 今後 CD34 陽性細胞の安定した回収の設定が必要と考えられた. また, 今回の CD34 陽性細胞測定法が dualplatform 法による測定誤差が生じ, 回収率に影響した可能性も考えられる. そのため, 今後さらに十分な評価の追加が必要と思われる.

骨髄移植後, 好中球の回復に比して血小板の回復がやや遅れる結果が得られたため, この点に関しても今後更なる症例の検討が必要である. 同様に Spectra においても CD34 陽性細胞の平均回収率は高値を示したが, 回収率の範囲は  $26.7 \sim 159.8\%$ <sup>1)</sup>,  $50.4 \sim 163.0\%$ <sup>11)</sup> と大きな差を示している (Table 2). これは希と思われるが Spectra で骨髄濃縮処理中に, 遠心槽内のインターフェースを目視で確認しながら断続的な観察と調整が必須であり, その操作が要因となっている可能性もある. また, CD34 陽性細胞の測定法による誤差が結果に影響していることも否定できないと考えられる.

SEPAX は, バフィーコート及び単核細胞の回収時間は各々約 80 分間と約 75 分間を要したが, この時間内に細胞の回収から Ficoll 液洗浄, 移植細胞浮遊液作成まで完全自動処理され, SEPAX を用いた単核細胞分離は大変優れていると考えられた. SEPAX の採取骨髄液処理可能な最大量は, 880ml である. 今回の 13 例の採取骨髄液量は,  $1,083 \pm 264\text{ml}$  ( $650 \sim 1,700\text{ml}$ ) であった. 小児科の 1 例を除いた 12 例の採取骨髄液は, 遠心後上清を除去する濃縮操作が必要であった. SEPAX の処理可能最大量の 880ml は, 成人ドナーの骨髄液の処理には不十分であり, 今後改善が望まれる. 一方, Spectra の処理量も骨髄液中の赤血球量が 125ml 以下である場合, 処理効率が低下するため事前にドナー適合濃厚赤血球をオーダして補充する必要がある. すなわち, 採取骨髄液全量が約 500ml 以下の小児移植の場合等は, この操作を考慮する必要がある. また, 約 300ml 以下は処理が困難であり, Ficoll 液を用いる用手法や SEPAX 等の少量処理可能な方法を視野に入れ対応しなければならない. SEPAX を用いた骨髄液からの単核細胞の分離は, 煩雑で熟練経験を要する用手法と比較し

て優れており, Spectra のそれに比して劣らないと考えられる.

## 結 語

自動細胞分離装置 SEPAX は, 小型の機器で操作性は簡便かつ完全自動化されており, 骨髄液からの赤血球除去に優れている. また, 移植成績に大きな影響はなく, SEPAX は ABO 主不適合同種骨髄移植における骨髄液からの単核細胞分離に有用と思われる. しかし, 今回の幹細胞回収率の評価については限界があり, 今後更なる検討が必要であると考えられた.

利益相反: 今回の発表に関して, SEPAX 製造元の Biosafe 社及び SEPAX 販売元の AMCO 社との間に, 利益相反はありません.

## 文 献

- 1) Larghero J, Rea D, Esperou H, et al: ABO-mismatched marrow processing for transplantation: results of 114 procedures and analysis of immediate adverse events and hematopoietic recovery. *Transfusion*, 46: 398—402, 2006.
- 2) 上田恭典, 大戸 齊: 輸血・細胞治療におけるアフエレーシスの役割—過去から現在—. 編者 大戸 齊, 室井一男, 医師と看護師によるアフエレーシスの理解と実践 末梢血幹細胞採取と成分採血, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2011, 12—23.
- 3) 面川 進: アフエレーシスの原理と操作. 編者 大戸 齊, 室井一男, 医師と看護師によるアフエレーシスの理解と実践 末梢血幹細胞採取と成分採血, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2011, 24—34.
- 4) English D, Lamberson R, Graves V, et al: Semiautomated processing of bone marrow grafts for transplantation. *Transfusion*, 29: 12—16, 1989.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 室井一男: 造血幹細胞採取プロセッシングガイドラインについて. *臨床血液*, 51: 1623—1629, 2010.
- 8) 日本臨床検査標準協議会血液検査標準化検討委員会: フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLSH3-PV1.0). 日本臨床検査標準協議会誌, 22: 18—30, 2007.

- 9) 大場亜樹, 高梨美乃子, 小川篤子, 他: 自動細胞分離装置 SEPAX による臍帯血調製の検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 55: 258, 2009.
- 10) 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.
- 11) 平安山知子, 宮本敏浩, 和泉賢一, 他: 血液型不適合移植での COBE Spectra を用いた骨髓濃縮法の検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 52: 693—697, 2006.
- 12) Soydan E, Ayyildiz E, Dalva K, et al: Impact of harvest product volume in erythrocyte depletion of allogeneic or autologous bone marrow using COBE spectra. *Transfus Sci*, 36: 269—273, 2007.
- 13) Marolleau JP, Vanneaux V, Rea D, et al: Quantification of Nucleated red blood cells in allogeneic marrow graft and Impact of processing on recovery. *Transfusion*, 47: 266—271, 2007.
- 14) Braine HG, Sensenbrenner LL, Wright SK, et al: Bone marrow Transplantation with major ABO blood group incompatibility Using erythrocyte depletion of marrow prior to infusion. *Blood*, 60: 420—425, 1982.
- 15) 原田実根, 中尾真二, 上田幹夫, 他: ABO 不適合ドナーからの同種骨髓移植. *臨床血液*, 25: 45—51, 1984.
- 16) Kishino K, Muroi K, Kawano C, et al: Evaluation of engraftment by ABO genotypic analysis of erythroid burst-forming units after bone marrow transplantation. *Leuk Res*, 26: 13—17, 2002.
- 17) 岸野光司, 室井一男, 中木陽子, 他: ABO 不適合骨髓移植後の赤血球における ABH 抗原型物質の解析. 日本輸血学会誌, 48: 335—341, 2002.

## ISOLATION OF MONONUCLEAR CELLS FROM BONE MARROW BLOOD FOR BONE MARROW TRANSPLANTATION USING SEPAX™

Koji Kishino<sup>1)</sup>, Yoko Nakaki<sup>1)</sup>, Fumiko Onozaki<sup>1)</sup>, Seiko Shindou<sup>1)</sup>, Ikuko Otsuki<sup>1)</sup>, Mika Kobayashi<sup>1)</sup>, Takashi Obata<sup>1)</sup>, Mistuko Tamura<sup>1)</sup>, Naoko Sugano<sup>1)</sup>, Shin-ichiro Fujiwara<sup>2)</sup>, Tomohiro Matsuyama<sup>1)2)</sup>, Masaki Mori<sup>1)2)</sup>, Keiya Ozawa<sup>1)2)</sup> and Kazuo Muroi<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Cell Transplantation and Transfusion, Jichi Medical University Hospital

<sup>2)</sup>Division of Cell Therapy, Jichi Medical University Hospital

### Abstract:

It is necessary to isolate mononuclear cells (MNCs) from bone marrow (BM) blood in major ABO mismatched bone marrow transplantation to prevent hemolysis. We report MNC preparation from BM blood using an automated cell separator, SEPAX™, and the infusion of isolated cells into patients who received conditioning. SEPAX is a desktop-type machine which works automatically in a sterile and closed system. From 2009 to 2011, 13 patients who received transplants of MNCs from BM blood using SEPAX because of major ABO mismatches were analyzed. When the volume of collected BM blood exceeded 880 ml, it was reduced to below 880 ml by removing plasma after centrifugation. First, the buffy coat was separated from BM using SEPAX connected to an appropriate kit. Second, MNCs were separated from the buffy coat by Ficoll density gradient centrifugation using SEPAX. Isolated MNCs were immediately infused into patients who had received conditioning. The numbers of CD34+ cells before and after processing were  $(154.6 \pm 74.1) \times 10^6$  and  $(73.6 \pm 47.8) \times 10^6$ , respectively. The recovery rate of CD34+ cells was  $49.1 \pm 22.8\%$ . After BM transplantation, 12 patients showed engraftment of the donor BM cells, while one died because of infection before engraftment. SEPAX is useful for the isolation of MNCs containing CD34+ cells from BM blood.

### Keywords:

Allogeneic bone marrow transplantation, major ABO mismatch, mononuclear cell, CD34-positive cell