

骨髓移植片に含まれる有核細胞数測定法の施設間差の検討

高橋 典子¹⁾¹²⁾ 田野崎隆二²⁾¹²⁾ 酒井 紫緒³⁾¹²⁾ 岸野 光司⁴⁾¹²⁾ 梶原 道子⁵⁾¹²⁾
 伊藤 経夫⁶⁾¹²⁾ 池田 和彦⁷⁾¹²⁾ 原口 京子⁸⁾¹²⁾ 渡邊 直英²⁾¹²⁾ 上田 恭典⁹⁾¹²⁾
 松本 真弓¹⁰⁾¹²⁾ 高梨美乃子¹¹⁾¹²⁾

非血縁者間骨髓移植においてドナー骨髓全有核細胞 (total nucleated cells, TNC) 数や生細胞率は重要な情報であるが、その測定方法は施設間で統一されていない。TNC 数および生細胞率測定に関して、各施設の方法の調査および施設間差の有無について検討した。日本輸血・細胞治療学会細胞治療委員会委員の所属施設 10 施設で行われた非血縁者間同種骨髓移植のために搬送された骨髓液について、容量と有核細胞数濃度の測定方法、生細胞率測定の有無および方法、採取施設で測定された TNC 数、移植施設で測定し直した TNC 数、抗凝固剤に関するアンケートを行い、計 797 件のデータが回収された。採取施設と移植施設で TNC 数算出に至る方法全てが一致している施設はなかった。

採取施設と移植施設双方のデータが揃っている 512 件について TNC 数の 2 群間比較を行ったところ、算出された TNC 数は採取施設と移植施設間で高い相関はあるものの、最大約 3 倍の施設間差がある症例もあった。この原因は TNC 数測定方法が施設ごとに様々であるためと考えられ、TNC 数測定方法標準化の必要性について検討が必要である。

キーワード：非血縁者間骨髓移植，骨髓有核細胞数，施設間差

はじめに

同種骨髓移植において輸注される全有核細胞 (total nucleated cells, TNC) 数は生着の因子として重要な情報である¹⁾。しかし、非血縁者間骨髓移植を実施する際に、骨髓液採取施設の記載した TNC 数が移植施設で再測定した数値と大きく異なる場合があるため、多施設での調査を計画した。施設間 TNC 数に有意な差があった場合にその原因を明らかにできるように対象施設における TNC 数算出方法についても調査した。

対象と方法

日本輸血・細胞治療学会細胞治療委員会委員の所属施設 10 施設において、非血縁者間骨髓移植を目的として 2004 年から 2015 年の間に採取・運搬された全骨髓液を調査対象とした。調査依頼および調査票回収は 2014 年 11 月から 2015 年 3 月に実施した。本調査研究では個人情報扱を扱わないこととした。対象施設の TNC 数算出方法に関する調査内容は骨髓液の容量と有核細胞数濃度の測定方法、生細胞率測定の有無および方法、採取施設で測定された TNC 数、移植施設で再測定した TNC

-
- 1) 国立がん研究センター中央病院病理・臨床検査科
 - 2) 慶應義塾大学病院輸血・細胞療法センター
 - 3) 千葉大学医学部附属病院輸血・細胞療法部
 - 4) 自治医科大学附属病院輸血・細胞移植部
 - 5) 東京医科歯科大学医学部附属病院輸血部
 - 6) 北海道大学病院臨床研究開発センター
 - 7) 福島県立医科大学医学部輸血・移植免疫学講座
 - 8) がん・感染症センター都立駒込病院輸血・細胞治療科
 - 9) 倉敷中央病院血液内科・血液治療センター
 - 10) 神鋼記念病院血液病センター
 - 11) 日本赤十字社血液事業本部
 - 12) 日本輸血・細胞治療学会細胞治療委員会
- [受付日：2016 年 10 月 29 日，受理日：2016 年 12 月 15 日]

表1 採取施設としての骨髓液 TNC 数算出方法

施設	有核細胞数濃度測定方法	有核赤血球	検体希釈	複数バッグの TNC 数測定方法	容量測定方法	バッグの風袋 (重量測定時)	比重 (重量測定時)
A	自動血球分析装置 (B社 AcTdiff)	含めない	なし	全体の有核細胞数濃度を測定してから複数バッグに分注	容積	-	-
B	自動血球分析装置 (S社 KX-21)	含めない	2×	代表1バッグの有核細胞数濃度×総容量	容積	-	-
C	血球計算盤 チュルク氏液	含む	10×~100×	代表1バッグの有核細胞数濃度×総容量	容積	-	-
D	自動血球分析装置 (S社 K-4500)	含む	なし	代表1バッグの有核細胞数濃度×総容量	重量	個々に測定	比重を考慮しない (×1.0)
E	自動血球分析装置 (N社 Celltacalpha)	含む	なし	それぞれのバッグの「有核細胞数濃度×容量」を総和	重量	600ml バッグ 40g 2,000ml バッグ 70g	比重を考慮しない (×1.0)
F	血球計算盤 チュルク氏液	含む	10×	1バッグにまとめてサンプル採取し、その後2バッグに分割する	容積	-	-
G	自動血球分析装置 (S社 XS-800i)	不明	なし	有核細胞数濃度×容量で総細胞数を算出してから量に応じて複数バッグに分割	重量	同じメーカーの空バッグの重さを予め測定しておく	比重を考慮しない (×1.0)
H	自動血球分析装置 (S社 XE モデル)	含めない	なし	それぞれのバッグの「有核細胞数濃度×容量」を総和	重量	個々に測定	比重を考慮しない (×1.0)
I	自動血球分析装置 (S社 XT-4000i)	含む	2×	それぞれのバッグの「有核細胞数濃度×容量」を総和	重量	個々に測定	比重を考慮しない (×1.0)
J	自動血球分析装置 (S社 XE-5000)	含む	なし	有核細胞数濃度×容量で総細胞数を算出 ※複数バッグに分割はしていない	重量	2,000ml バッグ 64g	比重を考慮しない (×1.0)

数、運搬された骨髓液に含まれていた抗凝固剤の種類と量、バッグ数などとした。これらについて、採取時と移植時の両立場から回答する形式とした。ただし、生細胞率測定の有無および方法の回答は移植時のみとした。

一方、施設間 TNC 数比較では、採取施設が測定した TNC 数 (以下、採取施設 TNC 数) とその骨髓の移植施設で再測定した TNC 数 (以下、移植施設 TNC 数) の両データが揃っている症例について、移植施設ごとに相関関係について解析し原点を通る回帰式を算出した。また、採取施設 TNC 数と移植施設 TNC 数の比を算出した。

結 果

1. 骨髓 TNC 数算出方法アンケート結果

アンケートの全回収データ数は 797 件であった。そのうち患者体重や採取 TNC 数が不明の 3 件を除いた 794 件中、採取施設で患者体重あたり採取 TNC 数が 3×10^8 個以上のものが 266 件 (33.5%)、 2×10^8 個以上 3×10^8 個未満のものが 335 件 (42.2%)、 2×10^8 個を下回ったのは 193 件 (24.3%) であった。また、移植施設で受け取ったバッグ数について回答のあった 552 件でのバッグ数の平均は 2.0 個であった (最小 1 個~最大 6 個)。抗凝固剤の種類は 790 件 (99%) がヘパリンを使用した。また、抗凝固剤としてヘパリン単剤を用いた骨髓液中のヘパリン含有量は、1ml あたりの力価を 1,000 単位で計算して、中央値は 10.3 単位/ml と日本骨髓バンクで推奨されている 10 単位/ml⁹⁾ に近かった。しかし、低濃度域では、ヘパリン濃度 0.08 単位/ml と骨髓採取

報告書の誤記載が疑われるデータが 1 件あり、0.5 以上 1 単位/ml 未満が 3 件、1 以上 3 単位/ml 未満が 9 件であった。一方、高濃度域では最高 100 単位/ml が 1 件、50 単位/ml が 2 件、30 以上 50 単位/ml 未満が 5 件であった。希釈液は回答のあった 565 件中 540 件 (96%) が生理食塩水を使用しており、RPMI 1640 培地を使用した骨髓液が 24 件、Medium 199 を使用した骨髓液が 1 件であった。

骨髓 TNC 数算出に至るまでの過程が各施設様々であり、その全ての過程が一致している施設はなかった (表 1, 2)。骨髓有核細胞数濃度の測定に自動血球分析装置を使用しているのが全 10 施設中 8 施設と大半を占め、残る 2 施設ではチュルク氏液で染色後に血球計算盤による目算を行っていた。自動血球分析装置を使用している施設のうち 3 施設では有核赤血球を TNC 数に含めない設定にしていた。

次に、移植施設としての骨髓 TNC 数再測定を毎回実施しているのは、10 施設中 4 施設であった。有核細胞数濃度は移植施設で再測定するが容量は採取施設から報告された値を使っているのが 2 施設、ABO 血液型不一致移植などの理由で骨髓液細胞処理が必要な場合のみ移植施設で TNC 数を再測定しているのが 3 施設、採取施設 TNC 数を正式なものとして採用し再測定していないのが 1 施設であった。

なお、移植時に受け取った骨髓の生細胞率を測定している施設は 2 施設で、それぞれ異なる測定方法を採用していた。

2. 施設間 TNC 数の 2 群間比較

移植施設 TNC 数データが無い施設 F を除く 9 施設に

表2 移植施設としての骨髓液 TNC 数算出方法*1

施設	検体希釈	複数バッグの TNC 数測定方法	容量測定方法	バッグの風袋 (重量測定時)	比重 (重量測定時)	生細胞率の測定
A*2	なし	それぞれのバッグの「有核細胞数濃度×容量」を総和	重量	定数を用意	1.05	測定しない
B*2	2×	代表1バッグの有核細胞数濃度×総容量	重量	個々に測定	比重を考慮しない (×1.0)	7-AAD*5 (フローサイトメーター)
C*3	10×~100×	代表1バッグの有核細胞数濃度×総容量	—	—	—	測定しない
D*3	なし	代表1バッグの有核細胞数濃度×総容量	—	—	—	測定しない
E	なし	各バッグ容量に比例する量をサンプリングし有核細胞数濃度測定を試料を作成, その細胞数に総容量を乗じる	重量	600ml バッグ 40g, 2,000ml バッグ 70g	比重を考慮しない (×1.0)	測定しない
F*4	—	—	—	—	—	—
G*2	なし	それぞれのバッグの「有核細胞数濃度×容量」を総和	重量	同じメーカーの空バッグの重さを予め測定しておく	比重を考慮しない (×1.0)	測定しない
H	なし	それぞれのバッグの「有核細胞数濃度×容量」を総和	重量	同じメーカーの空バッグの重さを予め測定しておく	比重を考慮しない (×1.0)	測定しない
I	2×	それぞれのバッグの「有核細胞数濃度×容量」を総和	重量	定数を用意	比重を考慮しない (×1.0)	Tripan Blue (光学顕微鏡)
J	なし	それぞれのバッグの「有核細胞数濃度×容量」を総和	重量	自施設で採取に使用しているバッグと同じメーカーなら2,000ml バッグ 64g, 異なるメーカーの場合は600ml バッグを40g, 2,000ml バッグを75gとして計算	比重を考慮しない (×1.0)	測定しない

*1 TNC 数測定方法, 有核赤血球の各施設の回答は表1と同じ (ただし, 施設Fはデータがない).

*2 血液型不適合時など, 細胞処理を必要とする場合のみ測定.

*3 容量は採取施設報告データを正式なものとし, 確認していない.

*4 基本的に採取施設報告データを正式なものとし, 確認していない. 血液型不適合時は自施設でも測定するが骨髓液希釈後に測定しているためアンケートの回答としては不適合と判断し回答せず.

*5 7-AAD, 7-amino-actinomycin D

において報告された TNC 数 770 件のうち, 採取施設 TNC 数と移植施設 TNC 数の両データが揃っていたのは 512 件だった. 施設 I と施設 J は各 2 件と少ないので解析から除外した. 各移植施設における採取施設 TNC 数と移植施設 TNC 数の相関関係では, 決定係数 (R^2) は平均 0.77 (範囲 0.66~0.89) であった (図 1).

各施設における「採取施設 TNC 数/移植施設 TNC 数 (%)」の中央値は平均 99.2% (範囲 85.9%~113.8%) であり, 最大値は平均 133.8% (範囲 109.2%~169.3%), 最小値は平均 66.7% (範囲 33.7%~95.9%) と移植施設で再測定した骨髓 TNC 数と採取施設から報告された骨髓 TNC 数の間に約 3 倍の開きがあるデータもあった (図 2).

考 察

骨髓移植において輸注 TNC 数は生着における重要な因子と考えられ, 骨髓採取の際には原則として患者体重 1kg あたり $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 個の有核細胞を採取することが通例とされてきた⁴⁾⁶⁾. にもかかわらず, 本調査研究では, 採取施設で測定した TNC 数と移植施設で再測定した TNC 数の間に最大約 3 倍の開きがあった. これは仮に採取施設から報告された TNC 数が 2×10^8 個/kg だったとしても移植施設で測定しなおしたら 0.7×10^8 個/kg ということも起こり得ることを示唆するデータで

あり, これにより移植後造血回復に影響が出る可能性がある¹⁾. TNC 数の施設間差の要因として考えられるものとして, 容量測定段階で生じる差 (容量の測定方法, 比重を考慮するか否か), 検体のサンプリング段階で生じる差 (検体採取時の骨髓液の攪拌方法, 複数バッグからの検体採取の方法の違い), 有核細胞数濃度測定段階で生じる差 (血球計算盤か自動血球分析装置を用いるか, 自動血球分析装置と測定モードの種類, 検体希釈の有無) などが挙げられる.

自動血球分析装置を使用している施設が 10 施設中 8 施設と多かったが, 自動血球分析装置は通常骨髓液を対象検体としておらず, 白血球 (有核細胞数) の測定結果を保証するものではない. 検体希釈の有無や有核赤血球を TNC 数に含める設定にするか否かの測定モードも各施設それぞれ異なる条件で測定していた. 骨髓液は末梢血と異なり脂肪や骨片, 有核赤血球などが多く含まれることもあり, 骨髓液を自動血球分析装置で測定すると分析機器の機種や測定モードによっては WBC 値に誤差が生じる可能性がある²⁾³⁾. 一方, 従来より骨髓有核細胞数の測定法であった血球計算盤による手法は測定者の手技に依る影響が不明である.

本調査研究において容量の測定方法も各施設多岐にわたっていることも判明した. 採取施設における骨髓液採取容量の算出は, 手術中に行う手技であることを

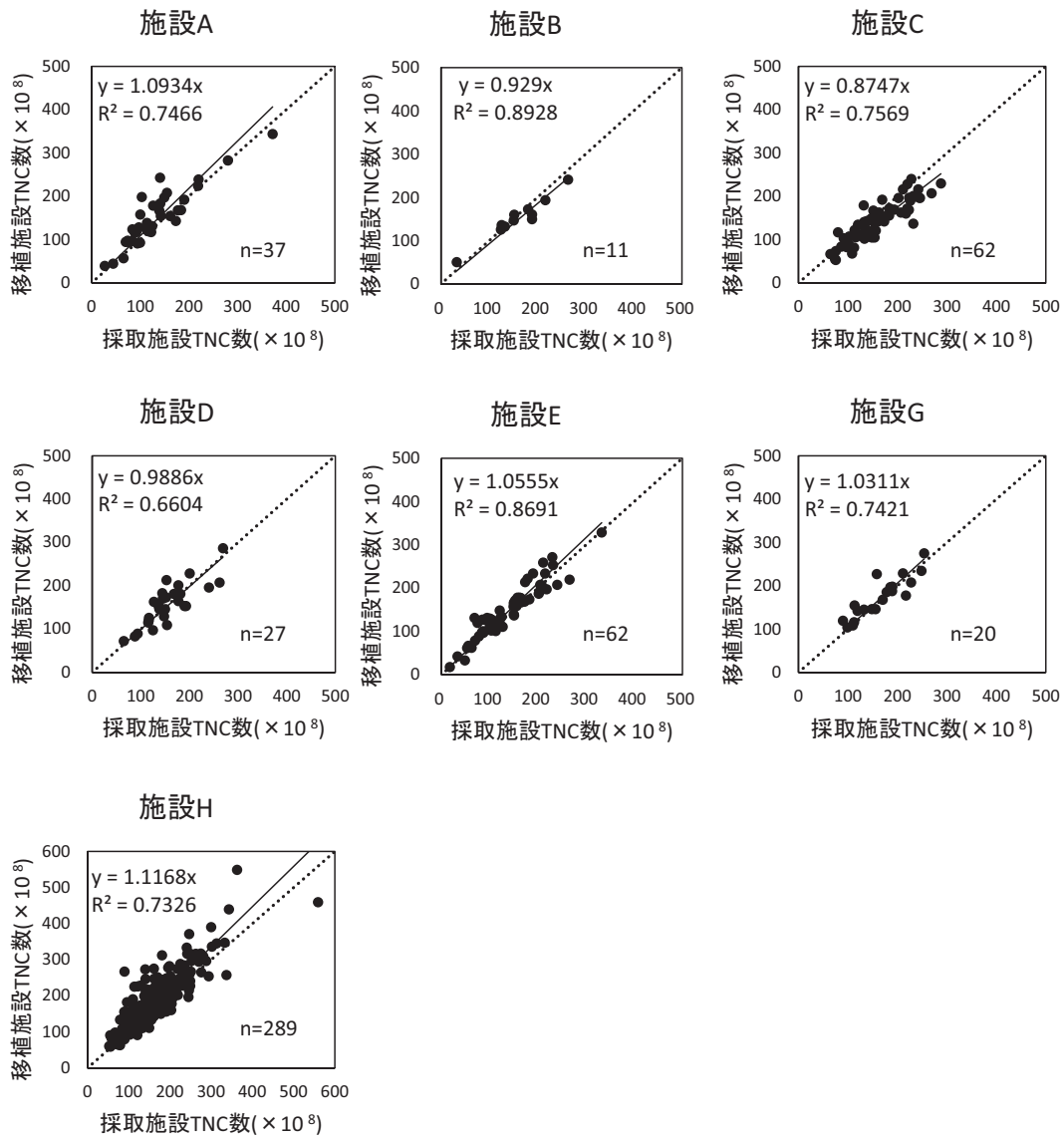


図1 骨髄液の採取施設 TNC 数と移植施設 TNC 数の相関関係
 施設 F は移植施設 TNC 数を測定しておらず、施設 I と施設 J は件数が 2 と小さいので、いずれも省いた。実線は採取施設 TNC と移植施設 TNC 数の原点を通る回帰直線、点線は Y = X を示す。

考慮すると簡便性や清潔度が優先されたと予測され、同じ条件で採取施設と移植施設の間で施設間差を比較するのは難しい。

本調査研究の結果、採取施設から報告されたデータを最終値とする移植施設もあったが、採取施設に対してどの程度の精度で TNC 数算出を求めるのか、移植施設でも算出すべきなのか、それらが規定されていないことが問題点として挙げられる。また、いずれの施設においても TNC 算出法を規定していないことも問題点のひとつである。

日本骨髄バンクでは患者体重 1kg あたり 3.0×10^8 個のドナー骨髄有核細胞を採取することが推奨されており採取施設は採取骨髄細胞数を移植施設と日本骨髄バンクへ報告しているが⁴⁵⁾、骨髄 TNC 数の測定方法や容量

測定方法に一貫性がない現状では各症例でどれだけの骨髄 TNC を移植したのかのデータは信頼性が低いと考える。

非血縁者間骨髄移植の生着の因子のひとつとして重要な指標¹⁾である骨髄 TNC 数の算出法に関して、正確に骨髄 TNC 数を算出するのに適した有核細胞数濃度測定方法や容量測定方法を精査し検討した上全国的に統一することが必要と思われる。また、移植施設において骨髄 TNC 数を算出することについても検討が必要と思われる。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：本研究は日本医療研究開発機構/厚労科学研究委託費(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業)「造血幹細胞移植に用い

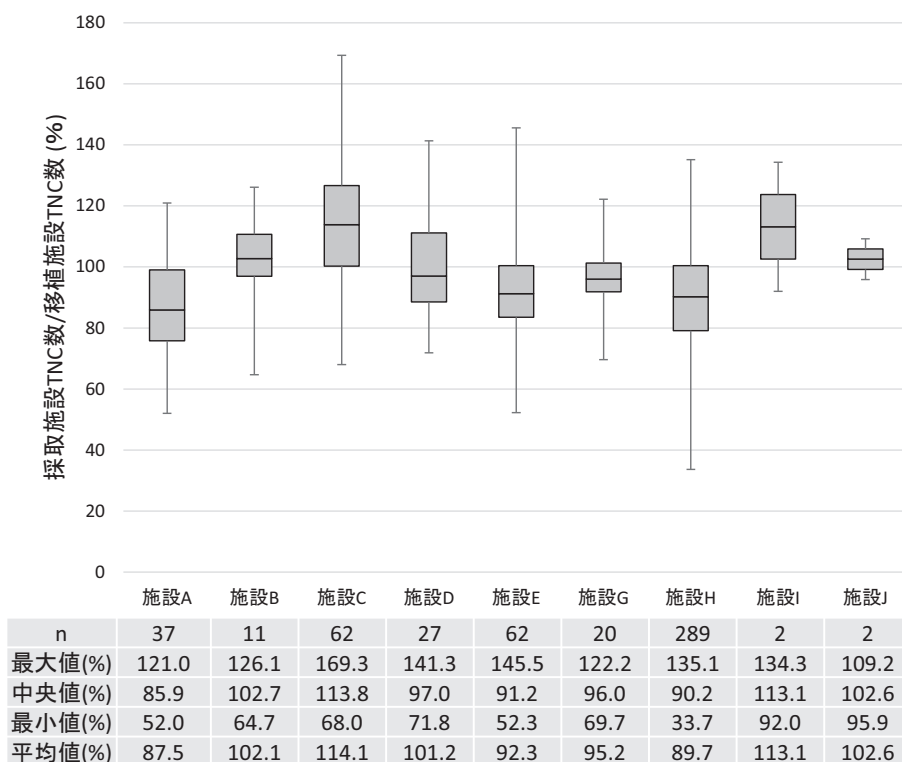


図2 骨髓液の採取施設 TNC 数と移植施設 TNC 数の比
箱ひげ図の上下のバーはそれぞれ最大値と最小値を示し、箱の上下はそれぞれ第3四分位点と第1四分位点を示す。箱の中央のバーは中央値である。

る細胞の安全な処理・保存・品質管理体制の確立に関する研究」の助成を受けた。

文 献

- 1) Davies SM, Kollman C, Anasetti C, et al: Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the national marrow donor program. *Blood*, 96: 4096—4102, 2000.
- 2) 鳥居国雄, 岡田敏春, 山野智子, 他: 自動血液学分析装置 CELL-DYN Sapphire を用いた骨髓有核細胞数(NCC)測定を試み. *日本臨床検査自動化学会誌*, 34: 929—932, 2009.
- 3) Mori Y, Mizukami T, Hamaguchi Y, et al: Automation of bone marrow aspirate examination using the XE-2100 automated hematology analyzer. *Cytometry B Clin Cytom*, 58: 25—31, 2004.
- 4) 日本骨髓バンクホームページ: 骨髓採取マニュアル第四版. <http://www.jmdp.or.jp/medical/work/manual.html> (2016年10月現在).
- 5) 日本骨髓バンクホームページ: 骨髓採取時における細胞数の途中カウントについて (お願い). http://www.jmdp.or.jp/medical/notice_f/post_273.html (2016年10月現在).
- 6) Koepsell SA, Jacob EK, McKenna DH Jr: The collection and processing of hematopoietic stem cells. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, et al, eds, *The Technical Manual*, 18th ed, the AABB, Bethesda, 2014, 713—728.

COMPARISON OF TOTAL NUCLEATED CELL COUNTS OF BONE MARROW GRAFTS AMONG TRANSPLANT-COLLECTION CENTERS IN JAPAN

Noriko Takahashi¹⁾¹²⁾, Ryuji Tanosaki²⁾¹²⁾, Shio Sakai³⁾¹²⁾, Koji Kishino⁴⁾¹²⁾, Michiko Kajiwara⁵⁾¹²⁾, Tsuneo Ito⁶⁾¹²⁾, Kazuhiko Ikeda⁷⁾¹²⁾, Kyoko Haraguchi⁸⁾¹²⁾, Naohide Watanabe²⁾¹²⁾, Yasunori Ueda⁹⁾¹²⁾, Mayumi Matsumoto¹⁰⁾¹²⁾ and Minoko Takanashi¹¹⁾¹²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratories, National Cancer Center Hospital

²⁾Center for Transfusion Medicine and Cell Therapy, Keio University Hospital

³⁾Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Chiba University

⁴⁾Division of Cell Transplantation and Transfusion, Jichi Medical University Hospital

⁵⁾Department of Transfusion Medicine, Tokyo Medical and Dental University

⁶⁾Clinical Research and Medical Innovation Center, Hokkaido University Hospital

⁷⁾Department of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, School of Medicine, Fukushima Medical University

⁸⁾Division of Transfusion and Cell Therapy, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital

⁹⁾Department of Hematology/Oncology, Transfusion and Hemapheresis Center, Kurashiki Central Hospital

¹⁰⁾Department of Hematology, Shinko Hospital

¹¹⁾Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

¹²⁾Cell Therapy Committee, The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Abstract:

The total nucleated cell (TNC) count of bone marrow grafts used for transplantation is crucial for successful engraftment of the bone marrow graft. However, transplant center physicians sometimes encounter cases where the TNC count of the delivered bone marrow graft reported by the collection center is significantly different from the TNC count measured at the transplant center. This motivated us to investigate the difference in TNC counts of each bone marrow graft for unrelated bone marrow transplants (BMTs) via the Japan Marrow Donor Program. We generated questionnaires about graft TNC counting methods, and collected 797 datasets for unrelated BM grafts from 10 transplant or collection centers. The data revealed a lack of uniform testing procedures among the participating centers to estimate the bone marrow graft TNC counts. The TNC counts from both the collection and transplant centers were comparable for 512 of the data pairs. However, for some data pairs, the discrepancy in TNC count by the collection and transplant centers was as much as three-fold. We speculate that these differences in TNC count among centers are due to the lack of standardized methods for estimating bone marrow TNC counts.

Keywords:

bone marrow transplantation, total nucleated cell counts, variance investigation

©2017 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>