

## 精度の高い末梢血幹細胞採取用収量予測計算式の構築

樋口 浩二<sup>1)</sup> 高野 勝弘<sup>1)2)</sup> 山中 浩代<sup>3)</sup> 坂本美穂子<sup>2)</sup> 遠藤 真澄<sup>2)</sup>  
金子 誠<sup>4)</sup> 桐戸 敬太<sup>5)</sup> 井上 克枝<sup>1)2)</sup>

これまで末梢血幹細胞採取において、末梢血 CD34<sup>+</sup>細胞数と血液処理量、体重を用いた収量予測計算式が用いられてきた。今回我々は、これに採取率を組込んだ新たな予測式を考案した。採取率(%)は、採取細胞数/処理血液に含まれる CD34<sup>+</sup>細胞数という式で表される。白血球数(WBC)、ヘマトクリット(Hct)、リンパ球数、単球数など、採取率への影響が予想される因子と、上記の式で実測した採取率の相関を検討したところ、WBC/Hctの累乗近似式「 $32.5 \times (\text{WBC}/\text{Hct})^{-0.364}$ 」が最も高い相関を示したため、これを採取率とした。このことは白血球数が高値になると採取率が低くなることを示している。これは遠心チャンバー内に流入した白血球は遠心力により沈降し buffy coat を形成するが、白血球数が多いほど沈降速度は低下するためと推測された。成人症例 23 例、48 回の PBSCH を検討したところ、従来の予測式と比較して、採取率を組込んだ予測式の方が高い予測精度を示した。本予測式により、事前に採取可能な CD34<sup>+</sup>細胞数の把握が出来、計画的な末梢血幹細胞採取の実施が可能となることが期待される。

キーワード：末梢血幹細胞採取、収量予測式、予測精度、粒子群干渉沈降現象、Poor mobilizer

### はじめに

末梢血幹細胞採取(peripheral blood stem cell harvest: PBSCH)の実施前に採取可能な CD34<sup>+</sup>細胞数の把握が出来れば、採取開始日や最善の採取条件を決定し、計画的な PBSCH の実施が可能となる。これにより、患者やドナー、採取に係わる医療スタッフの負担軽減に大きく寄与することができる。これまでの報告では、採取時の末梢血 CD34<sup>+</sup>細胞数<sup>1)2)</sup>、造血前駆細胞数<sup>3)</sup>などにより収量予測が試みられてきたが、ばらつきが大きいなど臨床での有効性は乏しいとする報告もある<sup>4)</sup>。また、PBSCH の途中で採取液の一部を測定し、その結果から収量予測を行う方法<sup>5)</sup>は有効と考えられるが、この場合には CD34<sup>+</sup>細胞数の迅速な測定が必要であり、検査スタッフに大きな負担が生じる。

我々は、新たな観点から PBSCH 用の収量予測計算式(予測式)を構築した。本論文では、予測式の概要、予測精度に関する後方視的および前方視的な検証結果を報告する。

### 方 法

#### 1) 対象

2016 年 3 月～2018 年 6 月までに当院で施行された PBSCH 成人症例 23 例 48 件を対象とした(Table 1)。このうち、Plerixafor を使用したのは 5 件であった。本研究は、山梨大学医学部倫理委員会の承認(承認番号 1587)を得ており、対象者に対する同意取得は、オプトアウトの形式として採血室と採取室に掲示した。

採取は、血液成分分離装置 COM.TEC<sup>®</sup>(Fresenius Kabi 社)を使用し、C4Y 回路、PBSC-Lymphocyte モードにて行った。CD34<sup>+</sup>細胞数の測定は、フローサイトメーター NAVIOS<sup>®</sup>および Stem-kit 造血幹細胞数測定キット(BECKMAN COULTER 社)を用いて、シングルプラットフォーム法にて行った。

#### 2) 予測式の作成方法

PBSCH 実施中の末梢血(循環血液)中の CD34<sup>+</sup>細胞数の推移状況は、予測式を作成するうえで重要な要素である。しかし、実際の推移状況を調べるのは難しいため、2通りの仮説を立てた。

1) 山梨大学医学部附属病院輸血細胞治療部  
2) 山梨大学医学部附属病院検査部  
3) 山梨大学医学部附属病院看護部  
4) 東京医科大学臨床検査医学科分野  
5) 山梨大学医学部血液・腫瘍内科学講座

[受付日：2018 年 9 月 18 日、受理日：2019 年 6 月 28 日]

Table 1 PBSCH 対象症例

		Rertrospective		Prospective	
症例数	件数	10	29	13	19
年齢	歳 median (range)	56.4 (40 ~ 68)		55.5 (40 ~ 68)	
性別	Male/Female	4	6	7	6
身長	cm median (range)	159.3 (144 ~ 173)		160.0 (150 ~ 169)	
体重	kg median (range)	57.0 (41 ~ 79)		55.0 (41 ~ 73)	
疾患別		人数	件数	人数	件数
	多発性骨髄腫	3	9	4	7
	ホジキンリンパ腫	1	5	0	0
	非ホジキンリンパ腫	6	15	6	8
	血縁ドナー	0	0	3	4

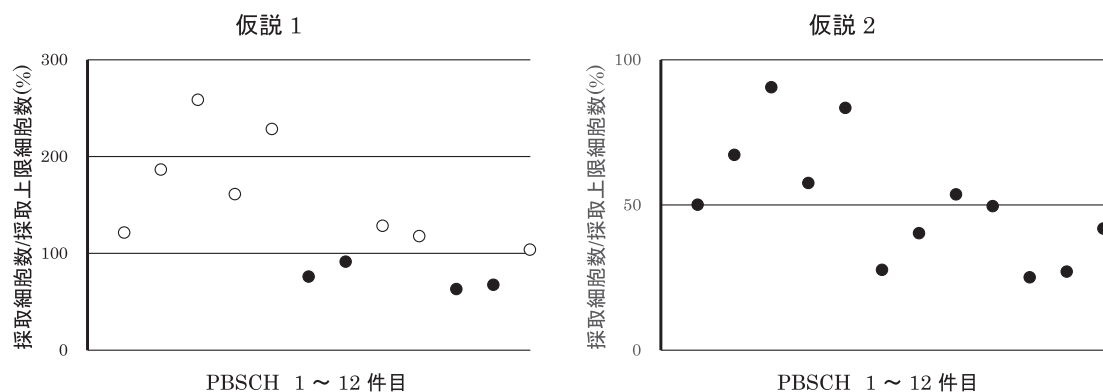


Fig. 1 仮説 1 および仮説 2 の採取上限細胞数 (100%) に対する採取細胞数の割合

仮説 1: 骨髄から末梢血に CD34<sup>+</sup>細胞の補充がない場合には, CD34<sup>+</sup>細胞数は採取によって徐々に減少する. よって, 採取可能な CD34<sup>+</sup>細胞数の上限 (採取上限細胞数) は循環血液量に含まれる CD34<sup>+</sup>細胞数と同数となるので,  $PBCD34 (\mu l) \times 10^3 \times \text{循環血液量 (ml)}$  で求めることができる.

仮説 2: 骨髄から末梢血に十分な CD34<sup>+</sup>細胞の補充がある場合には, CD34<sup>+</sup>細胞数はほとんど減少しない. よって, 採取上限細胞数は, 処理予定または処理した血液量 (血液処理量) に含まれる CD34<sup>+</sup>細胞数と同数となるので,  $PBCD34 \times 10^3 \times \text{血液処理量 (ml)}$  で求めることができる.

理論的には, 実際に採取した CD34<sup>+</sup>細胞数 (採取細胞数) が採取上限細胞数を越えることはない. そこで, 研究対象の 1~12 件目 (2016 年 3 月~同年 6 月) の PBSCH データを用いて各仮説の採取上限細胞数を計算したところ, 採取細胞数が採取上限細胞数以内であった件数は, 仮説 1 では 4 件, 仮説 2 では 12 件全てという結果になった (Fig. 1). このことから, PBSCH 実施中の末梢血の CD34<sup>+</sup>細胞数の推移状況は, 仮説 2 に近いことが示唆された.

採取上限細胞数に対する採取細胞数の割合を採取率とすると, 「採取率 (%) = 採取細胞数 / 採取上限細胞

数」の式が成り立つ. すなわち, 採取率が判れば「採取細胞数 = 採取上限細胞数 × 採取率」から収量予測が可能となる. そこで, 1~29 件目 (2016 年 3 月~同年 11 月) までのデータを用いて, 採取率に対して白血球数 (WBC), 単球数, リンパ球数, 単核球数 (単球数 + リンパ球数), ヘマトクリット (Hct), およびそれらの組合せの散布図および線形近似式と累乗近似式を作成し, 最も相関の高い項目の近似式を採取率計算式として予測式を構築した.

### 3) 予測式の検証方法

最初に, 全件の採取細胞数を体重 1kg あたりの収量 (採取 CD34) に換算した. 予測式作成に使用した 1~29 件目の該当データを挿入して収量予測値を算出, 採取 CD34 との散布図を作成し相関を調べた. 予測式確定後の 30~48 件目 (2017 年 1 月~2018 年 6 月) は前方視的に検証を行った. ただし, 当院では採血から PBCD 34 の結果が報告されるまで 2 時間程度を要する. そのため, 血液処理量の初期値を 200ml/kg として PBSCH を開始し, 途中で報告された PBCD34 から収量予測値を計算し, 当院の採取目標である  $2 \times 10^6 / \text{kg}$  に対して臨床的に必要だと判断した場合には血液処理量を増減して収量を調節した.

さらに, PBCD34 を基にした従来の計算法から予測

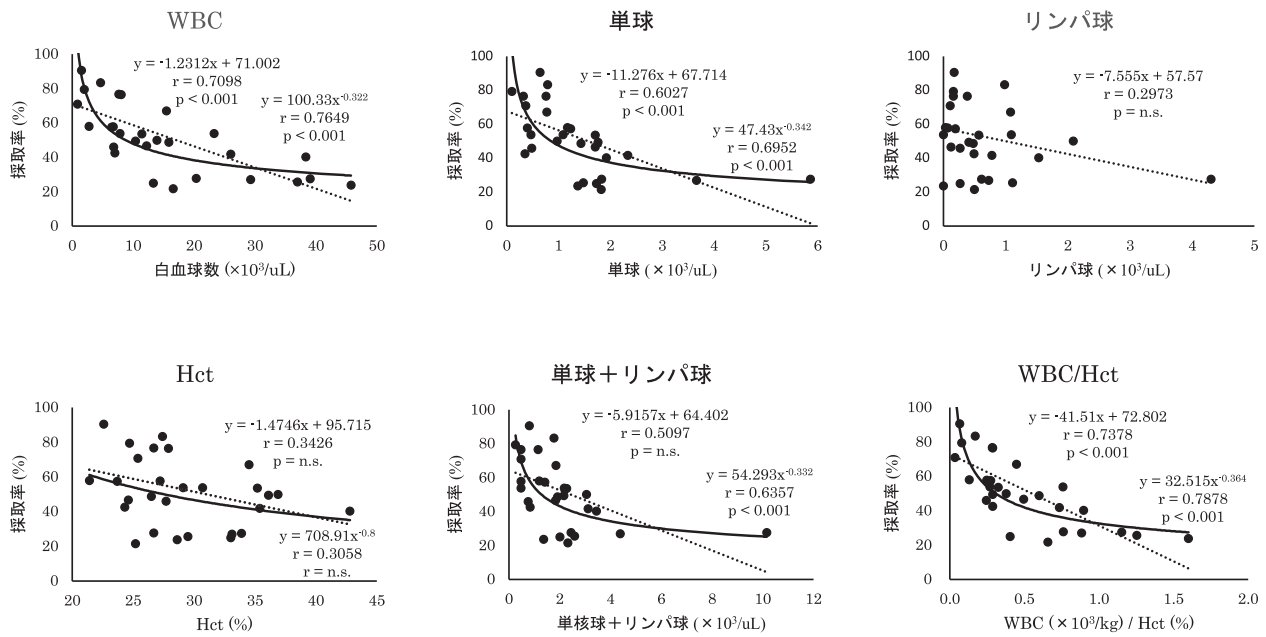


Fig. 2 採取率と各項目の散布図および線形近似式と累乗近似式  
対象症例データの1～29件目で検証した。線形近似式は点線、累乗近似式は実線で散布図に表記した。リンパ球は測定不能症例があったため累乗近似式は作成できなかった。

### 末梢血造血幹細胞採取用収量予測計算式 (予測式)

$$\text{収量予測値} = (\text{PBCD34} \times 10^3) \times \text{血液処理量} \times (\text{採取率}/100) / 10^6 / \text{体重}$$

$$\text{採取率計算式} \quad \text{採取率} = 32.5 \times (\text{WBC}/\text{Hct})^{-0.364}$$

\* 下記に各パラメータの単位を示す

収量予測値 (CD34<sup>+</sup>細胞数収量予測値) :  $\times 10^6/\text{kg}$

PBCD34 (採取前末梢血CD34<sup>+</sup>細胞数) :  $\mu\text{L}$

血液処理量 (処理予定の血液量) : mL

体重 : kg

採取率 : %

WBC (採取前末梢血白血球数) :  $\times 10^3/\mu\text{L}$

Hct (採取前末梢血Hematocrit) : %

Fig. 3 末梢血造血幹細胞採取用収量予測計算式 (予測式)

式の検証結果に対して比較対照が可能となる式 (対照式)を、全件の採取細胞数を血液処理量 1l あたりの収量に換算し、PBCD34 との散布図の線形近似式から既報<sup>1)2)</sup>を参照し作成した。対照式に1～29件目および30～48件目の該当データを挿入して収量予測値を算出、採取CD34との散布図を作成した。

散布図と近似式の作成、および相関、スチューデント t 検定、四分位数関数の解析には、Microsoft Excel<sup>®</sup>を用いた。

### 結 果

#### 1) 採取率と各項目との相関

採取率に対して各項目の散布図および線形近似式と累乗近似式を作成 (Fig. 2) し相関を調べると、単独の因子では WBC との相関が最も高く、WBC が低値ほど採取率は高くなる傾向を示した。Hct は単独では採取率と相関は認めなかった。しかし、これまでの報告<sup>6)</sup>等から採取率との正相関が示唆されたため「WBC/Hct」で再検証すると、この累乗近似式「 $32.5 \times (\text{WBC}/\text{Hct})^{-0.364}$ 」が最も高い相関を示したため (Fig. 2)、これを採取率計算式として予測式を構築した (Fig. 3)。

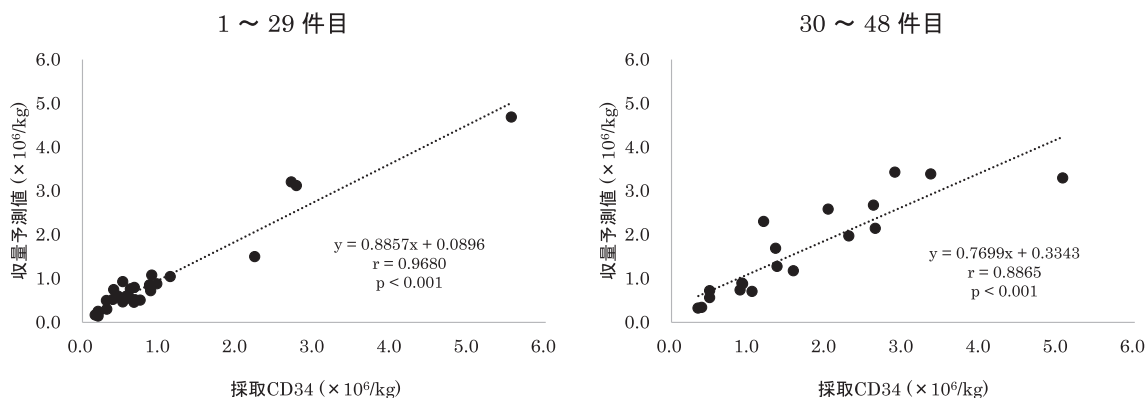


Fig. 4 予測式による収量予測値と採取CD34の散布図

## 対照式

$$\text{収量予測値} = (0.3399 \times \text{PBCD34} + 0.895) / 10^3 \times \text{血液処理量} / \text{体重}$$

収量予測値 (CD34<sup>+</sup>細胞数収量予測値) :  $\times 10^6/\text{kg}$

PBCD34 (採取前末梢血CD34<sup>+</sup>細胞数) :  $/\mu\text{L}$

血液処理量 (処理予定の血液量) : mL

体重 : kg

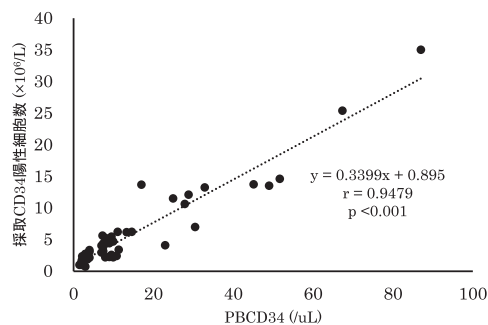


Fig. 5 対照式

### 2) 予測式の検証

予測式の作成に使用した1~29件目の収量予測値と採取CD34との散布図、および予測式確定後の30~48件目の収量予測値と採取CD34との散布図をFig. 4に示す。予測式確定後(前方視的)の相関がやや下がったが、どちらも高い相関を示した。

対照式をFig. 5に示す。対照式による1~29件目および30~48件目の収量予測値と採取CD34との検証では、予測式と同様に30~48件目の相関がやや下がったが、どちらも高い相関を示した(Fig. 6)。

予測式および対照式による収量予測値に対する採取CD34の割合をFig. 7に示す。予測式による収量予測値の $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 30\%$ 以内に採取CD34が入った割合は、後方視的解析(1~29件目)で、24.1%(7件)、62.1%(18件)、72.4%(21件)、前方視的解析(30~48件目)で31.6%(6件)、57.9%(11件)、78.9%(15件)であった。対照式による収量予測値の $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 、

$\pm 30\%$ 以内に採取CD34が入った割合は、1~29件目で10.3%(3件)、31.0%(9件)、51.7%(15件)、30~48件目で26.3%(5件)、42.1%(8件)、68.4%(13件)であった。さらに、四分位数関数による解析で四分位範囲を求めると、予測式では後方視的解析(1~29件目)で13%、前方視的解析(30~48件目)で16%であった。同様に対照式では、1~29件目で33%、30~48件目で19%であった。

## 考察

PBSCHの収量予測に関する報告では、PBCD34と採取CD34とは相関があり、回帰式を応用すると収量予測が可能だとされる<sup>1)2)</sup>。我々も対照式を作成し採取CD34と収量予測値の検証を行ったが、これまでの報告通り相関は高かった。しかし、各式の収量予測値の $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 30\%$ 以内に採取CD34が入った割合、および四分位範囲で比較したところ、予測式の方が予測精度

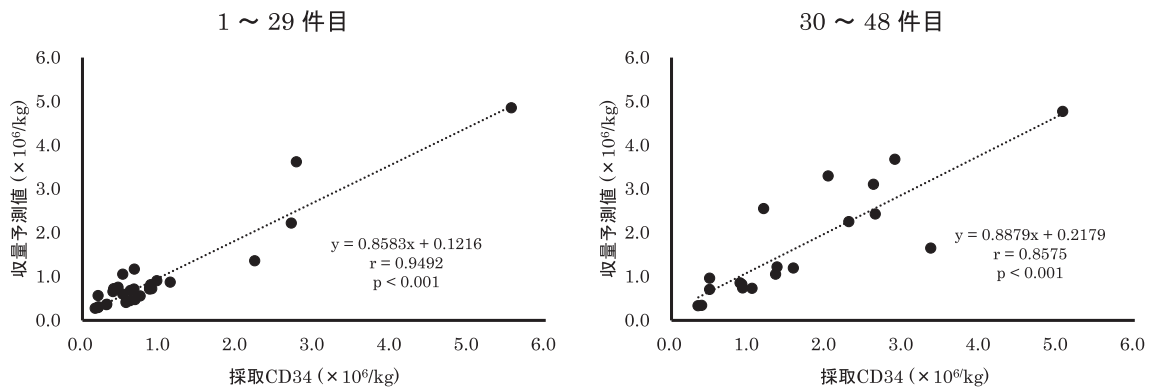


Fig. 6 対照式による収量予測値と採取 CD34 の散布図

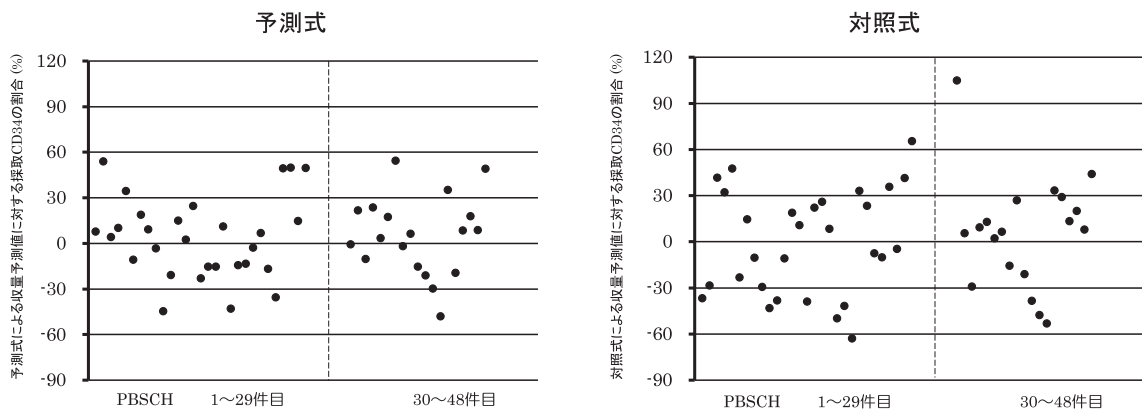


Fig. 7 収量予測値に対する採取 CD34 の割合を表した分布図

は高く、ばらつきも少なかった。ちなみに、1~29 件目のデータから作成した対照式（式は提示せず）で検証を行っても、結果は同様であった。これは、対照式が平均的な収量を予測したものであり、採取に影響を与える個別要因<sup>67)</sup>が考慮されていないことにより、症例ごとの予測誤差が大きいためだと考えられる。我々は、採取時の末梢血の WBC および Hct との組合せが採取率に影響することを見出し、予測式に組み入れた。その結果、採取 CD34 と収量予測値の相関は高く、検証でも高い予測精度が得られた。一方で、12 件(8 件が+30%以上、4 件が-30%以下)が予測から大きく外れた。この原因として、CD34<sup>+</sup>細胞数の測定由来、採取由来および予測式由来の可能性が挙げられる。

CD34<sup>+</sup>細胞数の測定由来：当院は、原口らが行った全国多施設共同研究<sup>10)</sup>に参加し、測定値が正規分布のほぼ中央に位置したという結果があり、基本的には大きな問題はないと考えている。しかし、CD34<sup>+</sup>細胞数が極端に少ない領域では、細胞数を正確に測定するのは困難であり、±30%を超える誤差が生じる危険性は否定できない（該当6件）。

採取由来：無理な血流量の増加などでチャンバー内の血流が乱れると、分離不全が生じる。過度な脱血不

良が発生した場合には、分離装置は自動で血流を停止しチャンバーの回転数を一時的に低下させる。その際に沈降した細胞の一部が遠心力の低下により再び浮遊し、血流の再開時に血漿とともに流出してしまう可能性がある。過度な脱血不良が頻発する症例では注意が必要である。さらに、buffy coat の採取タイミングが不適切な場合も採取細胞数が低下すると考えている（該当2件）。

予測式由来：採取率計算式では、WBC が少ないほど計算上の採取率は高くなる。特に WBC が  $2 \times 10^3 / \mu\text{l}$  以下では急速に上昇する。下限外になった1件は、WBC  $0.9 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 、Hct 25.4%、計算上の採取率 110%、実際の採取率 71%であった。実際の採取率が 100% を越えることは理論的にはありえないことや WBC が極端に少ない場合には実際に採取も困難であることを考慮し、この一例を契機に当院の採取基準に「WBC  $1 \times 10^3 / \mu\text{l}$  以上」を追加した（該当1件）。

なお、上記でも説明不可の+30%以上の3件については、その原因は解明できていない。

分離装置による採取の過程については、次のように推測している。遠心チャンバー内に流入した血液は、遠心力により最外側に赤血球層、その内側に採取対象

となる buffy coat, 最内側に血漿層を形成する。白血球は遠心力により沈降し buffy coat を形成するが, 細胞数が多いほど「粒子群干渉沈降現象」<sup>8)</sup>により沈降速度は低下する。チャンパー内の血液は常時流入出を繰り返しているため十分な沈降時間が確保できず, 細胞数の多少により沈降量(採取率)に差が生じる。血流量の増減も細胞がチャンパー内に留まる時間に関係するので, 採取率に影響する可能性は否定できない。ただし, データは提示していないが, 採取率と血流量の関りに相関は認めなかった。分離装置には, 血流量の増減に対してチャンパーの回転数(遠心力)が追従する仕組みがあり, それが影響を軽減させたと考える。また, チャンパー内での採取部位は常に一定であり, buffy coat の形成部位を採取部位に一致させるためには Hct で調節する必要がある。Hct が低値の場合には, チャンパー内の赤血球の流出を少なくし, CD34<sup>+</sup>細胞を含む血漿をより多く流出させる。Hct が高値の場合は, 赤血球の流出を多くし, その分血漿の流出を少なくする。チャンパー内のこのような関係が採取率に影響すると推測している。すなわち, 「WBC が少ないと採取率は高い」「Hct が低いと採取率は低い」と, 白血球と赤血球がそれぞれ逆方向に採取率に関連してくると考えられ, これらは既報<sup>9)</sup>とも一致している。我々の検証では WBC は採取率に逆相関が見られたが Hct 単独の相関は認められなかった。そこで両者を組合せて採取率との相関を見たところ, WBC/Hct が検討した中では最も高く採取率と相関を示したので, 予測式に用いた。なお, 採取モード(連続式または間欠式)の違いによる採取率への影響については, 当院では間欠式のみで採取を行っているため検証はしていない。

血液処理量は, 採取中に唯一変更することが可能な項目である。血液処理量の増量は, 採取細胞数の増加が期待できるが, 採取時間の延長, 抗凝固剤の多量投与など患者の負担となる。我々はブラッドアクセスカテーテルの大腿静脈への穿刺も選択肢としており, それにより血流量の増量(採取時間の短縮)は容易になるが, 穿刺部位からの出血など新たなリスクに注意が必要となる。その他に温風式体温加温装置を用いて患者の体温低下を予防し, 血流量の確保に努めるなどの工夫を行っている。

予測式を利用すれば収量シミュレーションも可能である。例えば, 体重 50kg, PBCD34 20/ $\mu$ l, WBC  $5 \times 10^6$ / $\mu$ l, Hct 30%, 血液処理量 200ml/kg の条件では, 収量予測値は  $2.5 \times 10^6$ /kg となる。PBCD34 が 10/ $\mu$ l の場合には収量予測値は半量となり, 2 度の採取が必要と予測される。この場合でも血液処理量を 1.5 倍増に変更できれば, 収量予測値は  $1.9 \times 10^6$ /kg となり 1 度の採取で目標値に達する確率が高くなる。実際に, 予測式

確定後の 30~48 件目では PBSCH の途中で報告された PBCD34 から収量予測値を計算し, 血液処理量を増減して収量を調節している。

PBCD34 の結果報告は PBSCH 開始前が理想であるが, 当院のように途中であっても最善の条件を模索することは可能である。近年では, PBCD34 が 10/ $\mu$ l 程度の症例に対して Plerixafor が使用可能になっているが, 予測式を利用することで従来であれば Poor mobilizer に分類される症例でも十分な CD34<sup>+</sup>細胞数が採取できる可能性があると考えている。

## 結 語

我々は, PBSCH 当日の PBCD34, WBC, Hct, 血液処理量を組入れた予測式を構築した。予測式は前方視的な解析でも臨床的に満足できる高い予測精度を示した。そのため収量シミュレーションが可能であり, 最善の採取条件の模索を行うことができた。このことは, PBSCH において医療資源の有効活用に関わり, 大きな価値を提供できると考えられた。

著者の COI 開示: 本論文発表内容に関連して特に申告なし

## 文 献

- 1) 佐藤典宏, 茂木祐子, 上田恵里奈, 他: 末梢血幹細胞採取における採取前 CD34 陽性細胞数測定の有用性. 日本輸血学会雑誌, 45: 436—441, 1999.
- 2) Leberfinger DL, Badman KL, Roig JM: Improved planning of leukapheresis endpoint with customized prediction algorithm: minimizing collection days, volume of blood processed, procedure time, and citrate toxicity. *Transfusion*, 57: 685—693, 2017.
- 3) 水村真也, 吉井真司, 水村麻衣子, 他: 末梢血幹細胞採取における Hematopoietic Progenitor cell (HPC) 測定の有用性. 日本輸血細胞治療学会誌, 64: 50—58, 2018.
- 4) Benjamin RJ, Linsley L, Fountain D, et al: Preapheresis peripheral blood CD34<sup>+</sup> mononuclear cell counts as predictors of progenitor cell yield. *Transfusion*, 37: 79—85, 1997.
- 5) 上田恭典: 第 2 章 末梢血幹細胞採取, 編者 室井一男, 田野崎隆二, 造血幹細胞移植の細胞取り扱いに関するテキスト, 初版, 日本輸血・細胞治療学会, 東京, 2015, 13—25.
- 6) Yoshizato T, Watanabe-Okochi N, Nannya Y, et al: Prediction model for CD34 positive cell yield in peripheral blood stem cell collection on the fourth day after G-CSF administration in healthy donors. *Int J Hematol*, 98: 56—65, 2013.

- 7) Suzuya H, Watanabe T, Nakagawa R, et al: Factors associated with granulocyte-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell yield in healthy donors. *Vox Sang*. 89: 229—235, 2005.
- 8) Kynch GJ: A theory of sedimentation. *Transactions of the Faraday Society*, 48: 166—176, 1952.
- 9) Accorsi P, Passeri C, Iacone A, et al: A multiple regression analysis on factors influencing haematopoietic progenitor cell collection for autologous transplantation. *Transfus Apher Sci*, 47: 223—227, 2012.
- 10) 原口京子, 奥山美樹, 高橋典子, 他: 固定血球を用いた CD34 陽性細胞数測定の外評価に関する全国多施設共同研究. *日本輸血細胞治療学会誌*, 63: 126—134, 2017.

## CONSTRUCTION OF A HIGHLY ACCURATE PREDICTION FORMULA FOR CD34<sup>+</sup> CELL YIELD IN PERIPHERAL BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELL HARVEST

Hiroji Higuchi<sup>1)</sup>, Katsuhiko Takano<sup>1)2)</sup>, Hiroyo Yamanaka<sup>3)</sup>, Mihoko Sakamoto<sup>2)</sup>, Masumi Endo<sup>2)</sup>, Makoto Kaneko<sup>4)</sup>, Keita Kirito<sup>5)</sup> and Katsue Suzuki-Inoue<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Transfusion Medicine and Cell Therapy, University of Yamanashi Hospital

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory, University of Yamanashi Hospital

<sup>3)</sup>Division of Nursing, University of Yamanashi Hospital

<sup>4)</sup>Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University

<sup>5)</sup>Department of Hematology and Oncology, University of Yamanashi

### Abstract:

The conventional prediction formula for CD34<sup>+</sup> cell yield in peripheral blood hematopoietic stem cell harvest (PBSCH) is composed of peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell number, the processed blood volume, and body weight. In the present study, we proposed a novel prediction formula that includes the collection efficiency. The collection efficiency is defined by the following: the number of collected cells/the total number of CD34<sup>+</sup> cells in the processed blood. We evaluated the correlation between several factors that may affect the actual collection efficiency and the collection efficiency calculated using the above formula and the actual CD34<sup>+</sup> cell number obtained by PBSCH. Among these,  $32.5 \times (\text{WBC}/\text{Hct})^{-0.364}$  showed the best correlation with collection efficiency. Therefore, we included it to represent collection efficiency in the prediction formula. These findings indicate that high WBC numbers leads to low CD34<sup>+</sup> cell yield, presumably because the WBC sedimentation rate is low in the presence of high WBC numbers. Based on analysis of 48 PBSCH from 23 adult patients, the new prediction formula containing the collection efficiency showed higher prediction accuracy than the conventional prediction formula. This prediction formula allows prediction of the number of CD34<sup>+</sup> cells before PBSCH and identification of the best conditions for PBSCH.

### Keywords:

peripheral blood hematopoietic stem cell harvest (PBSCH), CD34<sup>+</sup> yield prediction formula, high prediction accuracy, the particle hindered settling theory, poor mobilizer