

## 自動血球分析装置を用いた効率的な CAR-T 細胞療法用リンパ球採取予測法の検討

山崎 理絵<sup>1)</sup> 上村 知恵<sup>1)</sup> 五十嵐靖浩<sup>1)</sup> 松橋 博子<sup>1)</sup> 鳥海 綾子<sup>1)</sup>  
浅尾裕美子<sup>1)</sup> 黒田 留以<sup>1)</sup> 藤村 亮介<sup>1)</sup> 弥永 侑子<sup>1)</sup> 加藤 淳<sup>2)</sup>  
嶋 晴子<sup>3)</sup> 平林 則行<sup>4)</sup> 片岡 圭亮<sup>2)5)</sup> 田野崎隆二<sup>1)</sup>

キムリア製造には、原料細胞として必要十分な CD3+リンパ球を採取する必要がある。本研究では、Tisagenlecleucel 治療を目的としたリンパ球採取を行った 30 例(小児 5 例・成人 25 例)を後方視的に解析し、血球自動分析装置で測定した採取途中産物中リンパ球数(CBC-Ly)と採取前末梢血 CD3+比率から最終産物の CD3+リンパ球数が予測可能であるか検討した。

採取 CD3+リンパ球数は  $2.39 \times 10^9$  個(範囲:  $1.05 \sim 6.07 \times 10^9$  個)で、全例で 1 回の採取で規定の細胞数を採取できた。採取開始約 1 時間の産物中 CBC-Ly と末梢血 CD3+比率から最終産物中の CD3+リンパ球数を算出すると、実測値と高い相関関係にあった ( $r = 0.854$ ,  $P < 0.001$ )。ただし、2 例で産物中 CBC-Ly が測定不能で、1 例で CD3+推定値と実測値で大きな乖離があった。

採取前の末梢血 CD3+比率と途中産物中 CBC-Ly から産物中の CD3+リンパ球数を推測することで、効率的に CAR-T 細胞療法の原料リンパ球採取ができる可能性があるが、更なる検討が必要である。

キーワード：CAR-T 細胞療法、リンパ球アフェレーシス、採取効率、フローサイトメトリー

## 緒 言

キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR) T 細胞療法は、遺伝子改変 T 細胞輸注療法の一つであり、患者からアフェレーシスによりリンパ球を採取し、CAR をコードする遺伝子を導入し、CAR-T 細胞として増殖させ、患者固有の製品を完成させる。CD19 を標的とした CAR-T 細胞製剤の一つ、Tisagenlecleucel (キムリア<sup>®</sup>)は再発難治性びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫(diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL)並びに形質転化濾胞性リンパ腫(transformed follicular lymphoma: tFL)、急性 B リンパ球性白血病(B-cell acute lymphoblastic leukemia: B-ALL)に対し良好な治療成績を示し、新しい治療の選択肢として注目されている<sup>1)2)</sup>。

当院では 2020 年 1 月より、キムリア<sup>®</sup>製造のためのリンパ球アフェレーシスを行っている。現在、採取開始後 1 時間毎に産物中 CD3+リンパ球数を測定し、規定量以上採取できたことを確認して終了としている。キムリア<sup>®</sup>の場合、最低限必要とされる CD3+リンパ球数

は  $1 \times 10^9$  個とされており、採取医療機関での CD3+リンパ球の測定が必須である。しかし、フローサイトメトリー法(flow cytometry: FCM)による解析には人手や費用、時間がかかるため、リアルタイムに実施するのは難しい。

本研究では、多項目自動血球分析装置で測定したリンパ球数(CBC-Ly)と採取前末梢血 CD3+比率を用いて、採取産物の CD3+リンパ球数が短時間で簡便に予測可能か検討した。また、CD3+リンパ球の採取効率(CE2)に影響を及ぼす因子について検討した。

## 対象および方法

当院で 2020 年 1 月から 2021 年 12 月に実施した 30 例(DLBCL 19 例、t-FL 6 例、B-ALL 5 例)(男性 19 例、女性 11 例)のキムリア<sup>®</sup>製造のためのリンパ球採取を対象とし、後方視的に診療情報を解析した。本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会にて承認済みである。

採取は Spectra Optia<sup>®</sup> (Terumo BCT) CMNC モー

- 1) 慶應義塾大学病院輸血・細胞療法センター
- 2) 慶應義塾大学医学部血液内科
- 3) 慶應義塾大学医学部小児科
- 4) 慶應義塾大学病院医用工学室
- 5) 国立がん研究センター研究所分子腫瘍学分野

[受付日: 2022 年 8 月 1 日, 受理日: 2022 年 11 月 4 日]

ドで行い、抗凝固剤は ACD-A 液を用いた。採取は処理時間 180 分を基本設定とし、1 時間ごとに採取産物の CD3+リンパ球数を測定し、確実に  $1 \times 10^9$  個以上の CD3+リンパ球が採取できるように終了時間を調整した。同時にリンパ球アフェレーシス前の末梢血の CD3+比率、採取中の採取産物の CBC-Ly も測定した。CBC-Ly のカウントにはシスメックス社多項目自動血球分析装置 XS-800i を用いた。採取産物については、細胞数が多いため 10 倍希釈の上カウントした。FCM での CD3+リンパ球数解析(末梢血および採取産物)には BD FACS Aria™あるいは FACS Lyric™を使用し、Multitest™CD 3/8/45/4 と BD TruCOUNT Tubes™を用いて、使用説明書に従って測定した。すなわち、TruCOUNT Tubes™に抗体を 20 $\mu$ l 加えた後、攪拌したサンプル原液を 50  $\mu$ l 加え、20~25℃ で 15 分インキュベートした後、10 倍希釈した FACS lysing solution™を 450 $\mu$ l 加え、20~25℃ で 15 分インキュベートした後、CD3+リンパ球の絶対数を測定した。CD3+リンパ球の採取効率(CE2) (%) は、

$$\frac{\text{採取産物 CD3+リンパ球数}(\mu\text{l}) \times \text{採取産物容量}(\text{ml}) \times 10^3}{\text{採取前末梢血 CD3+リンパ球数}(\mu\text{l}) \times \text{血液処理量}(\text{ml}) \times 10^3}$$

に 100 をかけて算出した。

2 つの因子の相関の評価には Spearman の順位相関係数を用いた。3 群間の解析には Kruskal-Wallis 検定および Friedman 検定を行った。統計解析には EZR version 1.55(Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用い<sup>3)</sup>、 $P$  値  $< 0.05$  を統計学的有意とした。

## 結 果

### (1) 患者背景およびリンパ球採取の実際

リンパ球採取を行った症例の概要を Table 1 に、採取に関する情報を Table 2 にまとめた。採取時の LDH 400 IU/l 以上の DLBCL 症例が 5 例存在した。末梢血中の CD3+リンパ球数は 300 個/ $\mu$ l 未満が 4 例、300 以上 900 個/ $\mu$ l 未満が 15 例、900 個/ $\mu$ l 以上が 11 例であった。小児の 5 例中 1 例で赤血球プライミングを実施し、成人症例で事前のヘモグロビン値が 8g/dl を下回る場合には、前日に赤血球輸血を実施した。

採取には TBV (Total Blood Volume) の中央値 1.75 倍(範囲: 0.69~3.15 倍)の血液量を要し、所要時間は中央値 190 分(範囲: 120~270 分)であった。

採取産物中の CD3+リンパ球数は中央値  $2.39 \times 10^9$  個(範囲:  $1.05 \sim 6.07 \times 10^9$  個)であり、全症例 1 日で、規定数以上の CD3+リンパ球の採取が可能であった。末梢血と採取産物の CD3+リンパ球数 (Fig. 1a,  $r = 0.876$ ,  $P < 0.001$ ) および末梢血と採取産物の CD3+比率 (Fig. 1b,  $r = 0.955$ ,  $P < 0.001$ ) は強く相関した。Fig.

Table 1 Patient characteristics (N = 30)

Median age at apheresis, years (range)	58 (9 - 74)
Sex, n	
Male	19
Female	11
Body weight, kg, median (range)	57.7 (22.4 - 90.1)
Underlying disease, n	
Diffuse large B-cell lymphoma	19
Transformed follicular lymphoma	6
B-cell acute lymphoblastic leukemia	5
Pre-apheresis peripheral blood data, median (range)	
WBC, / $\mu$ l	4,095 (2,120 - 10,690)
Hemoglobin, g/dl	9.6 (8.2 - 14.2)
Platelets, $\times 10^4$ / $\mu$ l	13.0 (3.0 - 41.1)
Lymphocytes, / $\mu$ l	819 (160 - 3,978)
CD3+ cells, / $\mu$ l	676 (108 - 2,418)
CD3+ cells, under 300/ $\mu$ l, n	4
CD3+ cells, %	80.3 (23.5 - 93.3)
LDH, IU/l	226 (158 - 770)

Table 2 Apheresis information (N = 30)

	Median (range)
Run time, min	190 (120 - 270)
Total blood volume processed, l	6.83 (3.13 - 14.99)
Collected total cell counts, $\times 10^9$	7.29 (3.24 - 12.48)
Collected lymphocytes, $\times 10^9$	4.67 (1.48 - 7.66)
Collected CD3+ cells, $\times 10^9$	2.39 (1.05 - 6.07)
Collected CD3+ cells, under $1.5 \times 10^9$ , n	4
Collected CD3+ cells, %	81.3 (26.3 - 95.6)
Collection efficiency of CD3+ cells, %	60.3 (39.1 - 108.2)

2 には CD3+リンパ球数と処理血液量の関係を示した。末梢血 CD3+リンパ球数が 300 個/ $\mu$ l 未満の場合には中央値 13.16l の処理量を必要とした。

CD3+リンパ球採取効率(CE2)は、中央値で 60.3% (範囲: 39.1~108.2%) であり、症例によりばらつきが大きかった。40% を下回る症例は 1 例であった。なお最終製品が規格外となった症例は 3 例であった。

### (2) 採取産物中の CD3+リンパ球濃度 (Fig. 3a) および CD3+比率 (Fig. 3b) の推移

採取開始後 1 時間ごとに採取産物の CD3+リンパ球数を測定し、推移を確認した。初回の検査は、開始後 60 分を基本として、開始後インターフェース形成に時間を要した場合は 90 分とした。2 回目の検査は開始から 120 分を基本とした。初回の結果からすでに十分な CD3+リンパ球数が採取できていると判断し 2 回目の検査を行わなかった症例が 2 例存在した。採取過程における採取産物中の CD3+リンパ球数、CD3+比率はほぼ一定であった。

### (3) CBC-Ly からの CD3+リンパ球数の推定値と実測値の相関 (Fig. 4)

末梢血および採取産物の CD3+比率は中央値 80% 程

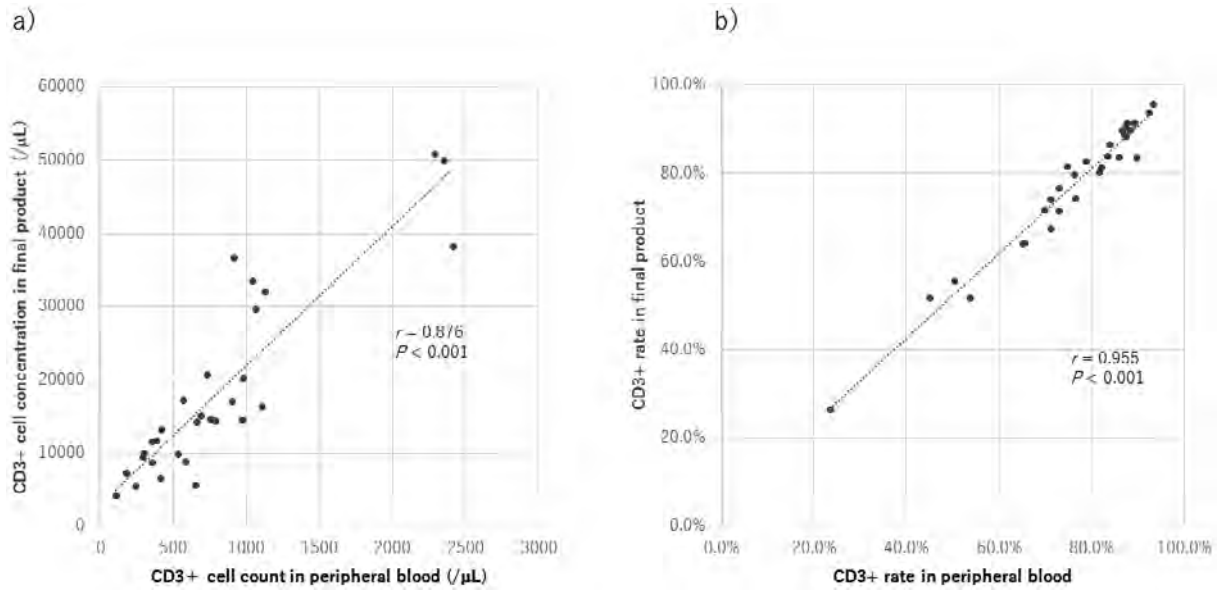


Fig. 1 (a) Correlation between CD3+ cell counts in peripheral blood and the concentration of CD3+ cells in the final product.  $r = 0.876$ ,  $P < 0.001$ . (b) Correlation between CD3+ rate in peripheral blood and that in the final product.  $r = 0.955$ ,  $P < 0.001$ .

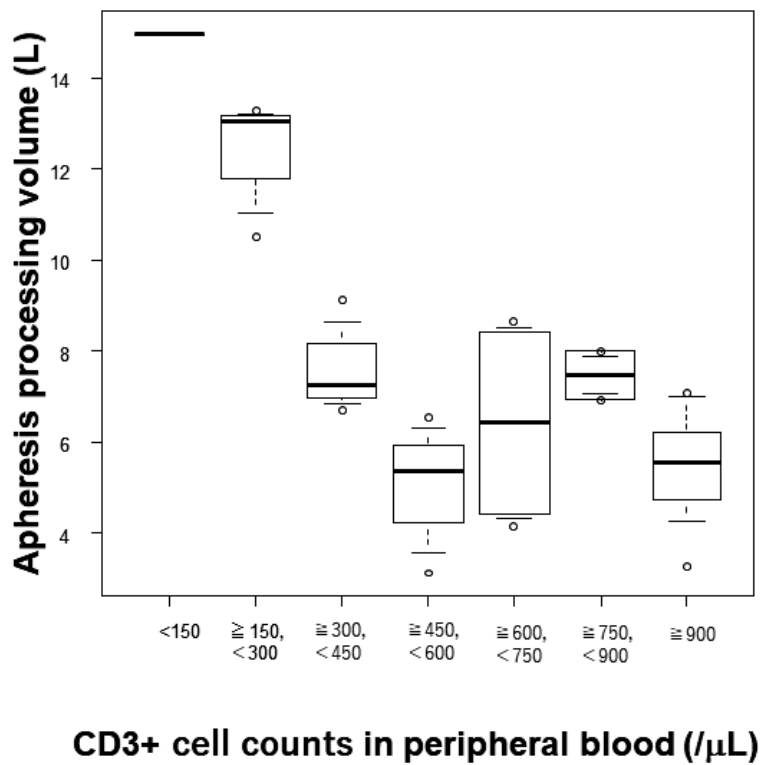


Fig. 2 Relationship between apheresis processing volume and CD3+ cell counts in peripheral blood.

度でほぼ一致したため、末梢血および採取産物中の CD3+リンパ球数を CBC-Ly を用いて下記のように算出した。

$$\text{推定 CD3+リンパ球数数 } (\mu\text{l}) = \text{CBC-Ly } (\mu\text{l}) \times$$

採取当日朝の末梢血 CD3+比率

採取産物の推定 CD3+リンパ球数は、採取中（開始約 1 時間）の採取産物の CBC-Ly を用い、上記に最終採取量を乗じて算出した。

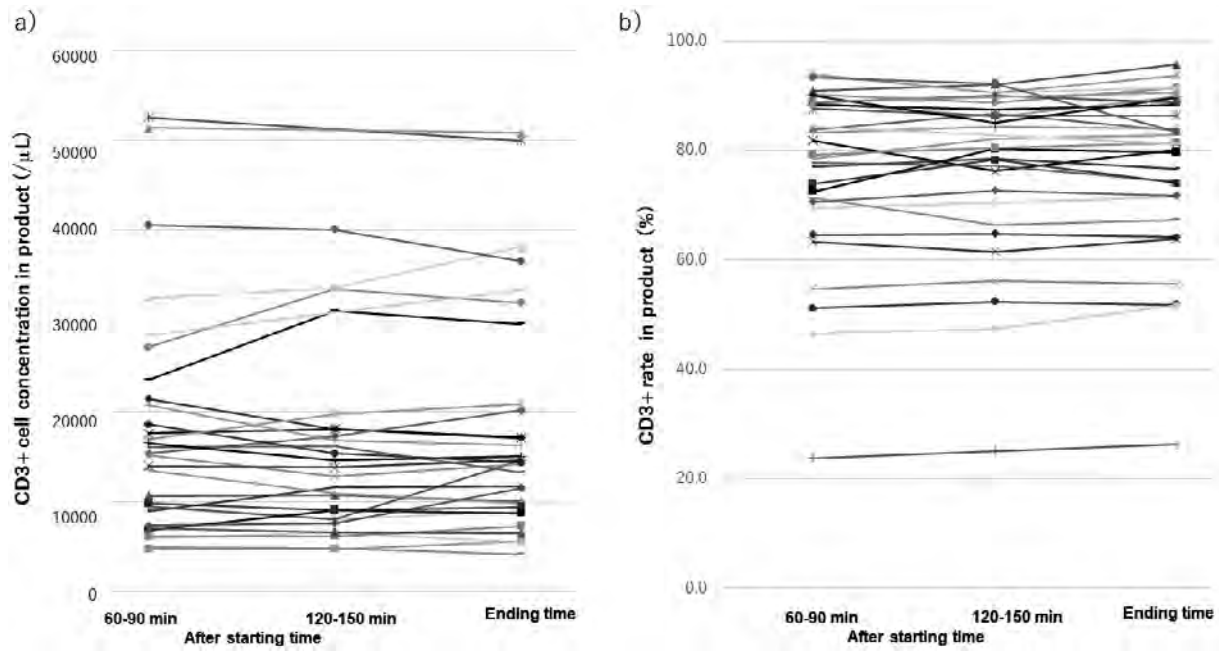


Fig. 3 Sequential change in the CD3+ cell concentration (a) and the CD3+ rate (b) in collection products during apheresis.

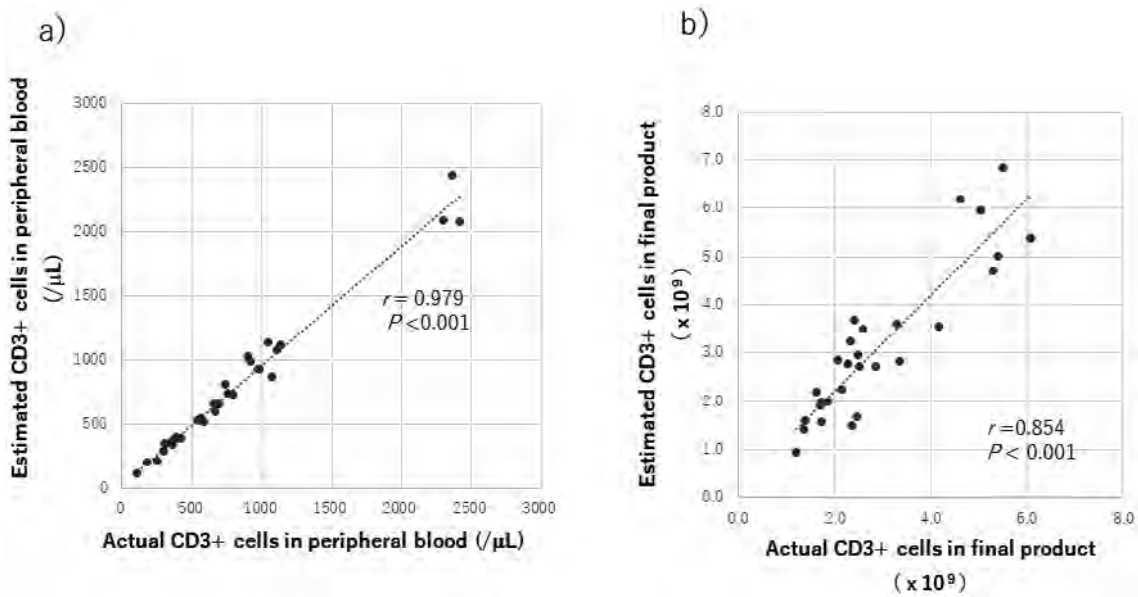


Fig. 4 Correlation diagrams between the estimated CD3+ cells and actual CD3+ cells in (a) peripheral blood and (b) the final apheresis product. The estimated CD3+ cells in apheresis products were calculated as follows: lymphocytes in intermediate products measured by an automated hematology analyzer (CBC-Ly) ( $\mu\text{L}$ )  $\times$  CD3+ rate in peripheral blood  $\times$  product volume (m)  $\times 10^3$ .

採取産物の CBC-Ly は、10 倍希釈検体を用いても分画判定ができなかった 2 例を除外し解析した。末梢血 CBC-Ly から算出した末梢血 CD3+リンパ球数は、実測値と強く相関した (Fig. 4a,  $r = 0.979$ ,  $P < 0.001$ )。採取途中の CBC-Ly を用いて推定した採取産物 CD3+リンパ球数も、FCM での実測値とほぼ相関した (Fig. 4 b,  $r = 0.854$ ,  $P < 0.001$ ) が、誤差率 50% 以上の症例

が 1 例存在した。採取産物の CBC-Ly と FCM のリンパ球数もよく相関した ( $r = 0.894$ ,  $P < 0.001$ )。

(4) CD3+リンパ球採取効率 (CE2) に寄与する要因 (Fig. 5)

末梢血 CD3+リンパ球数 (a)、末梢血リンパ球数 (b)、年齢 (c)、ヘモグロビン値 (d)、血小板数 (e)、採取前後の末梢血中リンパ球数の変化 (f) と採取効率



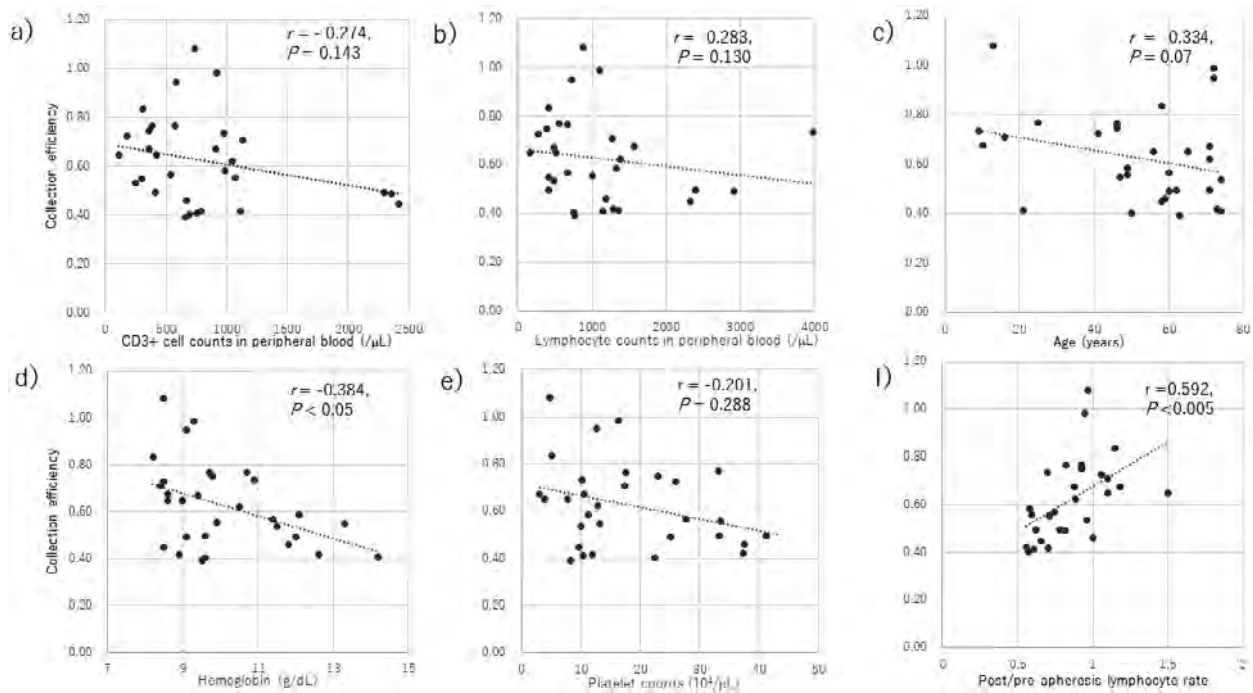


Fig. 5 Dot plot matrices with pre-apheresis parameters: CD3+ cells in peripheral blood (a), lymphocytes in peripheral blood (b), age (c), hemoglobin (d), platelets (e), and post/pre apheresis lymphocyte rate (f); and collection efficiency. The r-values are correlation coefficients calculated by Spearman's analysis.

の相関を確認した。採取前後のリンパ球数の変化と採取効率は正に相関し ( $r = 0.592$ ,  $P < 0.005$ ) ヘモグロビン値と採取効率は弱い負の相関を認めた ( $r = -0.384$ ,  $P < 0.05$ ) が、その他の因子については有意な相関を認めなかった。

## 考 察

CAR-T 細胞療法のためのリンパ球アフェレーシスの際に、目標とする細胞数のモニタリングをどのように実施すべきなのか、まだその標準的手法は確立していない。本検討では、リンパ球アフェレーシス産物について、血球分析装置を用いた簡易モニタリングが可能かを検討した。血球分析装置は基本的には末梢血検体の解析に用いるものであるが、サンプルを希釈することによりおおよその白血球分画を確認することが可能である。CD3+ 比率は、末梢血と採取産物でほぼ同一であり、採取時間経過に伴う変化も少ないため、採取産物の CD3+ リンパ球数は血球自動分析装置のリンパ球数から予測可能と理論上は考えられ、本検討でもほぼ相関することが示された。

リンパ球採取は、末梢血幹細胞採取と異なり非動員で行われるため、末梢血中のリンパ球数と採取効率からあらかじめ必要処理量を予測できる。末梢血中リンパ球が  $1,000/\mu\text{l}$  以下の場合には 12~15l の処理が必要との報告があるが<sup>4)</sup>、本検討では、CD3+ リンパ球数が

$300/\mu\text{l}$  未満の場合に 10~13l 程度の処理が必要であった。

また、当院の採取効率 (CE2) は、中央値で 60.3% であったが、採取効率 40% 以下の症例が 1 例存在した。この採取効率は、Ceppi の小児を対象とした解析の 83.4% に比べると低いが<sup>5)</sup>、国内外の報告 (51.3~63.1%)<sup>6)~8)</sup> とほぼ一致していた。Punzel M の健康人ドナーからのリンパ球アフェレーシスの報告ともほぼ同等と考えられる<sup>9)</sup>。彼らは、CD3+T リンパ球は、採取中に採取細胞数に応じて組織から血液中に 2 倍以上リクルートされると報告している。採取効率については、高年齢、ALL、採取前の血小板数高値<sup>10)</sup>、NK 細胞高値<sup>11)</sup> が効率低下のリスクとの報告があるが、これらの因子について、当院のデータでは相関がみられなかった。Hb 値については、低値の場合に効率が低下することが城らにより報告されている<sup>8)12)</sup> が、今回の 30 例の解析では、むしろ Hb の高い症例で採取効率が悪くなり、既報との相違が認められた。我々は、城らの報告を受けて Hb の低い症例に採取前に赤血球輸血を実施するようしており、今回の解析には Hb = 8.0g/dl を下回る症例は含まれない。この影響により既報と異なる結果となった可能性がある。今後症例数を増やして再検討する予定である。

採取効率を用いて処理量を決定することも可能であるが、当院の採取効率を最低の採取効率に合わせ 40%

として必要処理量を求め、その量で終了すると効率の良い症例では必要以上に採取時間が長く設定されてしまう。したがって末梢血リンパ球数と採取効率のみから処理量を決定し採取を終了するのではなく、簡便な採取産物のモニタリングによる補正が必要である。

この結果を踏まえて、リンパ球採取の際の簡便なモニタリング法として、下記を提唱する。採取当日朝の末梢血で、FCMにてCD3+比率を測定する。次に採取開始後1時間の時点で産物中のCBC-Lyを血球分析装置で測定し、CD3+比率と180分での予定採取量をかけて最終採取産物中のCD3+リンパ球数を予測し、過不足により採取終了時間を決定する。採取産物のモニタリングのための検体採取にはサンプリングポートを用い、コンタミネーションの原因にならないように留意する。当院では採取産物の培養検査を実施し、産物の無菌性を確認している。

Yamanakaらは、Sysmex社のpocH-100iのsmall cell ratio (SCR)を用いることで予測可能と報告しており<sup>7)</sup>、ALLで末梢血中に芽球が出現しているような症例でなければ、有用であるとしている。我々の結果はこの既報に概ね矛盾しないが、XS-800iをもちいた我々の検討ではDLBCLの1症例で採取産物の推定値と実測値の乖離を認めた。Linssenらも、Hematology analyzerとFCMの末梢血リンパ球分画が $r=0.979$ と強く相関することを報告している<sup>13)</sup>が、採取産物を測定する場合、細胞濃度が非常に高いため、10倍希釈としても得られる分画のデータが参照値となることが多い。今回誤差の大きかった症例では、XS-800iにおいてリンパ球集団が単球集団と接触し、単球集団の一部がリンパ球としてカウントされ、リンパ球数が過大評価されていた。必ずスキャッタグラムを確認しデータの信用性を確認する必要がある。またどのような症例でこのような乖離が起こりやすいのかについては症例を積み重ね、検討する必要がある。

我々の解析では、10倍希釈でCBC-Lyの測定できない症例が2例存在した。このような症例は、希釈倍率をあげ、至適細胞濃度に調整することで測定可能となる可能性がある。ただし過剰な希釈は誤差の拡大にもつながるため、推定値との乖離症例とともに今後の検討課題である。

加えて数日前のCD3+比率を参考にした解析が可能であるかどうか、症例数を増やし検討する必要がある。

## 結 語

CAR-T細胞療法のためのリンパ球アフェレーシスを効率よく確実に実施するには、採取産物中のCD3+リンパ球数を確実にモニタリングする必要がある。血球

分析装置のリンパ球分画を用いた採取中の簡易モニタリングは、リンパ球アフェレーシスの最適化に有用である可能性がある。

著者のCOI開示：田野崎隆二：講演料(シスメックス株式会社、ベクトン・ディッキンソン株式会社、ノバルティス・ファーマ株式会社、ブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社、オーソ・クリニカル・ダイアグノスティック株式会社)

山崎理絵：共同研究費(シスメックス株式会社)

片岡圭亮：講演料(ノバルティス・ファーマ株式会社)、研究費・助成金(ブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社)

## 文 献

- 1) Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al: Tisagenlecleucel in children and young adults with B-Cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 378: 439–448, 2018.
- 2) Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al: Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 380: 45–56, 2019.
- 3) Kanda YI: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, 48: 452–458, 2013.
- 4) Korell F, Laier S, Sauer S, et al: Current challenges in providing good leukapheresis products for manufacturing of CAR-T Cells for Patients with relapsed/refractory NHL or ALL. *Cells*, 9: 1225, 2020.
- 5) Ceppi F, Rivers J, Annesley C, et al: Lymphocyte apheresis for chimeric antigen receptor T-cell manufacturing in children and young adults with leukemia and neuroblastoma. *Transfusion*, 58: 1414–1420, 2018.
- 6) Jarisch A, Rettinger E, Sørensen J, et al: Unstimulated apheresis for chimeric antigen receptor manufacturing in pediatric/adolescent acute lymphoblastic leukemia patients. *J Clin Apher*, 35: 398–405, 2020.
- 7) Yamanaka I, Yamauchi T, Henzan T, et al: Optimization of lymphapheresis for manufacturing autologous CAR-T cells. *Int J Hematol*, 114: 449–458, 2021.
- 8) Jo T, Yoshihara S, Arai Y, et al: [Clinical experience of leukapheresis for CD19 CAR-T cell therapy]. *Rinsho Ketsueki*, 62: 163–169, 2021.
- 9) Punzel M, Kozlova A, Quade A, Schmidt AH, Smith R: Evolution of MNC and lymphocyte collection settings employing different Spectra Optia. *Vox Sang*, 112: 586–594, 2017.
- 10) Tuazon SA, Li A, Gooley T, et al: Factors affecting lymphocyte collection efficiency for the manufacture of chimeric antigen receptor T cells in adults with B-cell malignancies. *Transfusion*, 59: 1773–1780, 2019.

- 11) Allen ES, Stroncek DF, Ren J, et al: Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion*, 57: 1133–1141, 2017.
- 12) Jo T, Yoshihara S, Hada A, et al: A clinically applicable prediction model to improve T-cell collection in CAR-T cell therapy. *Transplant Cell Ther*, 28: 365.e1–365.e7, 2022.
- 13) Linssen J, Jennissen V, Hildmann J, et al: Identification and quantification of high fluorescence-stained lymphocytes as antibody synthesizing/secretory cells using the automated routine hematology analyzer XE-2100. *Cytometry B Clin Cytom*, 72: 157–166, 2007.

## LYMPHAPHERESIS FOR CAR-T CELL THERAPY: PREDICTION OF CD3+ CELL COUNTS USING AN AUTOMATED HEMATOLOGY ANALYZER

Rie Yamazaki<sup>1)</sup>, Tomoe Uemura<sup>1)</sup>, Yasuhiro Igarashi<sup>1)</sup>, Hiroko Matsuhashi<sup>1)</sup>, Ayako Toriumi<sup>1)</sup>, Yumiko Asao<sup>1)</sup>, Rui Kuroda<sup>1)</sup>, Ryosuke Fujimura<sup>1)</sup>, Yuko Iyanaga<sup>1)</sup>, Jun Kato<sup>2)</sup>, Haruko Shima<sup>3)</sup>, Noriyuki Hirabayashi<sup>4)</sup>, Keisuke Kataoka<sup>2)5)</sup> and Ryuji Tanosaki<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Center for Transfusion Medicine and Cell Therapy, Keio University Hospital

<sup>2)</sup>Division of Hematology, Department of Medicine, Keio University School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine

<sup>4)</sup>Office of Clinical Engineering, Keio University Hospital

<sup>5)</sup>Division of Molecular Oncology, National Cancer Center Research Institute

### Abstract:

For chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy which includes tisagenlecleucel (Novartis, Basel, Switzerland), it is necessary to collect enough CD3+ cells by lymphapheresis. The purpose of this study was to examine whether the CD3+ cell count in the final product could be predicted using the lymphocyte count (CBC-Ly) measured by an automated hematology analyzer and the CD3+ rate in peripheral blood before collection. We retrospectively analyzed lymphaphereses for tisagenlecleucel performed in 30 patients (5 children and 25 adults). The median total number of CD3+ cells in the final product was  $2.39 \times 10^9$  cells (range,  $1.05\text{--}6.07 \times 10^9$  cells). The estimated CD3+ cell counts in the final product, which were predicted by CBC-Ly in the product approximately 1 hour after starting and CD3+ rate in the pre-apheresis peripheral blood, correlated well with the measured values ( $r = 0.854$ ,  $P < 0.001$ ). However, CBC-Ly could not be determined in 2 cases, and the estimated value differed by  $< 50\%$  in another case. In conclusion, CD3+ cell count in the final product could be predicted by CBC-Ly in the intermediate product and CD3+ rate in the peripheral blood in most cases. However, further studies are needed to optimize lymphapheresis for CAR-T cell therapy.

### Keywords:

CAR-T cell therapy, lymphapheresis, collection efficiency, flow cytometry