

末梢血幹細胞採取における中間産物中 CD34 陽性細胞数測定の有用性に関する検討

中林 咲織¹⁾²⁾ 小島 稔²⁾³⁾ 竹岡 咲穂¹⁾ 岩下 奈央¹⁾ 坪倉 美里¹⁾
 加瀬 由貴¹⁾ 笠根 萌美¹⁾ 高橋 典子¹⁾²⁾ 竹内紗耶香¹⁾ 林 智晶¹⁾
 前澤 直樹¹⁾ 福本 秀知²⁾⁴⁾ 武田 航²⁾³⁾ 伊豆津宏二⁵⁾ 小川千登世⁶⁾
 松下 弘道¹⁾ 福田 隆浩²⁾³⁾

末梢血幹細胞採取(PBSCH)では効率よく目標とする造血幹細胞を採取することが重要である。そこで我々はPBSCH中に産物中CD34陽性細胞濃度で処理量を調節することが最適な採取に繋がったかを後方視的に検討した。対象は同種PBSCH28件、自家PBSCH24件の計52件で、PBSCH中の産物中CD34陽性細胞濃度(中間値)と終了後の産物中CD34陽性細胞濃度(最終値)の相関は、全体(R=0.986)、同種(R=0.973)、自家(R=0.996)で強い相関を認めた。中間値と最終値がどの程度変化したのか(CD34変化率)は同種PBSCH群では中央値101%(範囲79~129)であったが、自家PBSCH群では123%(85~192)であり、自家PBSCH群で有意に高値を呈した(p<0.001)。また、単核球(MNC)採取開始までの時間が11分以上だった群で有意に中間値よりも最終値が高値であった(p=0.025)。中間値を用いて適切なPBSCHが可能であったが、自家PBSCH例、MNC採取開始までに長時間を要する例などでは中間値より最終値が高値となる可能性があり測定時には考慮が必要である。

キーワード：末梢血幹細胞採取、末梢血幹細胞移植、CD34陽性細胞

緒 言

造血器腫瘍の治療として行われる造血幹細胞移植(hematopoietic stem cell transplantation; HSCT)には自家HSCTと同種HSCTがあり、移植ソースは末梢血幹細胞、骨髄、臍帯血から選択される。自家HSCTでは末梢血幹細胞移植(peripheral blood stem cell transplantation; PBSCT)が選択されており、同種移植では病勢、患者の全身状態、ドナー状況等により最も適切な移植ソースが選択される。同種HSCTにおける移植ソースの中で末梢血幹細胞は骨髄や臍帯血と比較して生着が早く、骨髄と比較するとドナー負担も少ないため世界ではPBSCTが大部分を占めるようになっており¹⁾、本邦においても年々件数が増加傾向にある²⁾。

PBSCTで輸注する幹細胞を採取する末梢血幹細胞採取(peripheral blood stem cell harvest; PBSCH)は、採取中に長時間の安静を強いて合併症のリスクもあるため採取される患者・ドナーに大きな身体的、精神的

負担をかける。また、1回のPBSCHで目標細胞数を採取できなかった際には複数回のPBSCHが必要となり、患者・ドナー負担が増大する。一方で、目標を大きく超える細胞数を採取した際には一部の細胞が破棄されたり、過剰な細胞を輸注することで合併症が増えるなどのリスクがある。これらは採取や細胞処理に用いられる資材や医療従事者の負担増など医療資源を浪費することになる。このため、適切なPBSCHを行うことは医療資源の有効活用につながると考えられる。

必要十分かつ最低限のPBSCHを行うために、我々の施設では自家PBSCHで末梢血中の造血前駆細胞(hematopoietic progenitor cell; HPC)を測定し採取CD34陽性細胞数を予測してPBSCHを行ってきた。HPCはsysmex社の多項目自動測定血球分析装置で測定することができ、CD34陽性細胞濃度と強い相関が認められ、フローサイトメーターを用いたCD34陽性細胞濃度測定に比べて安価で簡便に測定できる。我々の検討では採

1) 国立がん研究センター中央病院臨床検査科
 2) 国立がん研究センター中央病院細胞療法調製部門
 3) 国立がん研究センター中央病院造血幹細胞移植科
 4) 国立がん研究センター中央病院臨床工学室
 5) 国立がん研究センター中央病院血液腫瘍科
 6) 国立がん研究センター中央病院小児腫瘍科
 [受付日：2023年2月22日、受理日：2023年9月17日]

取前日の HPC $21/\mu\text{l}$ 以上で 88%、採取当日の HPC $41/\mu\text{l}$ 以上で 92% の症例で目標 CD34 陽性細胞数を採取できており、採取当日の HPC、性別、年齢を用いて採取 CD34 陽性細胞数の予測が可能であった³⁾。一方で HPC には CD34 陰性造血幹細胞が含まれる可能性も指摘されており⁴⁾、我々の経験では採取前 HPC のみで判断する方法で予測 CD34 陽性細胞数の半分以下しか採取できなかった症例もあり、その精度は改善の余地があると考えられていた。また、採取前の末梢血中 CD34 陽性細胞濃度を用いて採取 CD34 陽性細胞数を予測することが可能と報告されているが^{5)~8)}、一方でその有用性は十分ではないという報告もある⁹⁾。近年、採取中の産物中 CD34 陽性細胞濃度を用いた予測が採取前の末梢血中 CD34 陽性細胞濃度を用いた予測より正確に採取 CD34 陽性細胞数を予測できると学会報告された¹⁰⁾が、他の報告が少なく十分な検討がなされていない。そこで今回我々は中間産物中 CD34 陽性細胞と最終産物中 CD34 陽性細胞の関係、及びその精度に影響を与える因子について後方視的に検討した。

対象と方法

1. 対象

2021 年 1 月から 2022 年 3 月までに国立がん研究センター中央病院で行った PBSCH において、採取途中で産物中 CD34 陽性細胞を測定した症例のうち非血縁 PBSCH を除いた症例を対象として後方視的に診療情報を解析した。当院では体重 20kg 未満の症例に対して RBC プライミングを行っており、それらの症例は今回の解析から除外した。本研究は国立がん研究センターの研究倫理審査委員会にて承認を受け実施した（研究課題番号 2015-079）。

2. 使用機器

PBSCH は Spectra Optia (Terumo BCT) の CMNC モードを用いて臨床工学技士によって行われた。末梢血 HPC は多項目自動血球分析装置 XN-9000 (sysmex) を用いて測定した。CD34 陽性細胞測定は Stem cell enumeration kit (BD) を使用し、FACS CantII (BD) を用いて single platform 法で臨床検査技師が測定した。

3. PBSCH

目標処理量を体重 40kg 以上では 10l、体重 40kg 未満では 250ml/kg と設定した。目標細胞数は自家 PBSCH で $2 \times 10^6/\text{kg}$ (ただし、自家移植歴のない多発性骨髄腫症例は $4 \times 10^6/\text{kg}$)、同種 PBSCH では HLA 一致ドナーからの移植で $2 \times 10^6/\text{kg}$ 、HLA 半合致ドナーからの移植で $4 \times 10^6/\text{kg}$ とした。Plerixafor の使用に関しては、採取前日に末梢血中 HPC を測定し、 $21/\mu\text{l}$ 未満であれば積極的に使用し、 $21/\mu\text{l}$ 以上であれば過去の化学療法歴や HPC 変動などを考慮した上で採取困難が予測され

る症例において使用した。PBSCH 中の産物中 CD34 陽性細胞濃度 (中間値) 測定は採取産物量が 50ml 時点でサンプリングポートから検体を採取して測定した。コンタミネーションのリスクを軽減するために中間値測定は 1 回のみとし、使用したポートはクランプしたまま処理を行った。予測細胞数は中間値 \times 予測最終産物量で計算し、中間値より予測細胞数が目標細胞数を採取できない見込みの際は、自家 PBSCH では 300ml/kg、同種 PBSCH では 250ml/kg を上限として最終処理量を変更した。処理量の変更は、当院における過去の経験において予測細胞数よりも採取細胞数が 20% 程度低下することがあったため予測細胞数が目標細胞数よりも 20% 上回るように処理量を変更した。全例 Optia の CMNC モードで、採取プリファレンスは 50 で固定して採取産物の色調による採取層の調節をせずに行われた。Optia の採取バルブが自動で開いて採取され始めたタイミングを採取開始時間とした。PBSCH 中に起こったイベントは以下のような形で、採取終了後に Optia より印刷した採取記録及び電子カルテの診療記録より情報を収集した。

①インターフェイス形成時の Ht 変更：インターフェイス形成中に「インターフェイスが長時間形成されません」と表示され Ht 値を 3% 下げたもの。

②採血圧低下：カルテ記録で採取開始後に採血圧低下ありと複数回記載されたもの。

③一時停止：有害事象やトイレ離脱などのために PBSCH を一時停止したもの。

④mononuclear cell (MNC) 採取開始まで長時間：Optia の採取記録で開始から「システムが採取を開始しました」と記載された時間までに 11 分以上必要であったもの。

4. 中間値予測の有効性評価

中間値を測定し、最終的に採取された産物中 CD34 陽性細胞濃度 (最終値) との相関関係を検討した。また、CD34 陽性細胞濃度変化率 (CD34 変化率) を以下の計算式で算出した。

$$\text{CD34 変化率 (\%)} = [\text{最終値 } (\mu\text{l}) \div \text{中間値 } (\mu\text{l})] \times 100$$

5. 統計解析

解析は EZR (version 1.55) を用い、 p 値 < 0.05 を統計学的有意とした。相関は person の相関係数、CD34 変化率を比較する際には t 検定を用いて評価した。体重や年齢の影響に関しては中央値で 2 群に分けて検討した。

結 果

1. 背景

患者・ドナー背景を表 1 に示す。対象となったのは

表1 ドナー/患者背景

	全体 (n=52)	自家 (n=24)	同種 (n=28)
性別 男性/女性	34/18	15/9	19/9
採取時年齢 (範囲), 歳	46 (14~67)	56 (14~67)	39 (17~54)
採取時体重中央値 (範囲), kg	61 (32~86)	58.5 (32~83)	62 (42~86)
原疾患			
悪性リンパ腫	19	19	-
網膜芽細胞腫	2	2	-
多発性骨髄腫	3	3	-
血縁健常ドナー (HLA 完全適合, 一部不適合/半合致)	28 (10/18)	-	28 (10/18)
造血幹細胞移植歴 あり/なし	2/50	2/22	0/28
造血幹細胞動員手法			
化学療法+G-CSF	5	5	0
化学療法+G-CSF+plerixafor	9	9	0
G-CSF 単独	29	1	28
G-CSF+plerixafor	9	9	0
中間値測定日			
採取1日目	43	19	24
採取2日目	8	4	4
採取3日目	1	1	0

PBSCH を行った 44 症例において中間値測定を行った 52 件で、年齢の中央値は 46 歳 (範囲: 14~67), 男性 34 件 (65%), 女性 18 件 (35%) であった。採取時体重の中央値は 61kg (32~86) であった。自家 PBSCH は 24 件 (46%) で、原疾患は悪性リンパ腫が 19 件 (37%), 網膜芽細胞腫が 2 件 (4%), 多発性骨髄腫が 3 件 (6%) であった。血縁ドナーは 28 件 (54%) であり、HLA 一致が 10 件 (19%), HLA 半合致が 18 件 (35%) であった。また、末梢血への造血幹細胞動員手法は、同種 PBSCH では全例高容量 G-CSF のみであり、自家 PBSCH では定常状態で高容量 G-CSF を開始した症例が 10 例 (19%), 化学療法後の血球回復期に高容量 G-CSF を開始した症例が 14 例 (27%) であった。Plerixafor は 21 件 (35%) で使用されていた。中間値を測定したタイミングは、採取 1 日目が 43 件 (83%), 2 日目が 8 件 (15%), 3 日目が 1 件 (2%) であった。

2. 中間値, 最終値, 末梢血 HPC の相関

中間値と最終値の相関に関しては、全体で $R=0.986$ (図 1A), 同種 PBSCH で $R=0.973$ (図 1B), 自家 PBSCH で $R=0.996$ (図 1C) と同種、自家に関わらず強い相関が認められた。末梢血 HPC と中間値の相関は $R=0.598$ (図 1D), 末梢血 HPC と最終値の相関は $R=0.585$ (図 1E) と相関が認められた。

3. 中間値予測の有用性

CD34 変化率は性別 ($p=0.816$, 図 2A), 体重 ($p=0.998$, 図 2B), 年齢 ($p=0.188$, 図 2C) で有意差は認めなかった。自家 PBSCH と同種 PBSCH の 2 群では、自家 PBSCH では 123% (85~192), 同種 PBSCH では 101% (79~129) であり、同種 PBSCH よりも自家 PBSCH で CD34 変化

率が有意に大きかった ($p<0.001$, 図 2D)。自家 PBSCH において plerixafor 使用の有無では有意差を認めなかった ($p=0.069$, 図 2E)。また、自家 PBSCH において高容量 G-CSF を開始したタイミングで比較したが有意差を認めなかった ($p=0.48$, 図 2F)。

4. 中間値予測に影響を与えるイベントの検討

PBSCH 中に起こったイベントの影響について CD34 変化率に関する比較を行った。インターフェイス形成時 Ht 変更の有無 ($p=0.159$, 図 3A), 採血圧低下 ($p=0.56$, 図 3B), 一時停止 ($p=0.792$, 図 3C) では有意差が得られなかった。MNC 採取開始までの時間に関しては 11 分未満群に比べて、11 分以上群のほうが有意に高値であった ($p=0.025$, 図 3D)。また、同種 PBSCH と自家 PBSCH で MNC 採取開始までの時間に有意差は認めなかった ($p=0.072$, 図なし)。

5. PBSCH の最適化

中間値測定によって初期処理量から処理量の変更を行ったのは 31 件 (60%) であり、増量が 21 件 (40%), 減量が 10 件 (19%) であった (図 4)。処理量を増量した採取において 10 件 (19%) は当日で採取終了することが可能であり、そのうち変更前の処理量で目標細胞数を達成できなかったのは 3 件 (6%) であった。減量された採取 10 件は全例が当日で目標細胞数を達成できていた。

考 察

今回の我々の検討では、中間値による予測は効率的に目標とする CD34 陽性細胞数を採取する上で有効であった。採取当日の末梢血中 CD34 陽性細胞濃度は測定

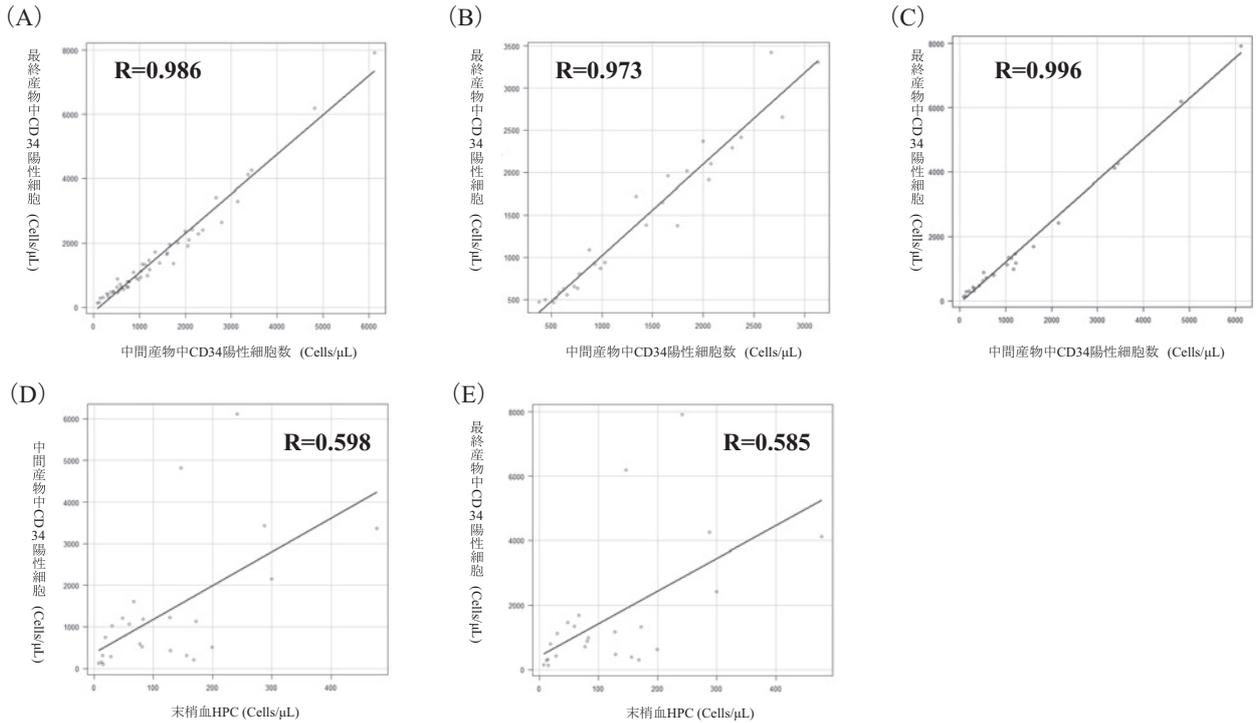


図1 中間値, 最終値, 末梢血 HPC の相関 (Pearson 相関係数の検定)

(A) 全体で中間値と最終値 (n=52) (B) 同種 PBSCH で中間値と最終値 (n=28) (C) 自家 PBSCH で中間値と最終値 (n=24) (D) 自家 PBSCH で中間値と末梢血 HPC (n=24) (E) 自家 PBSCH で最終値と末梢血 HPC (n=24)

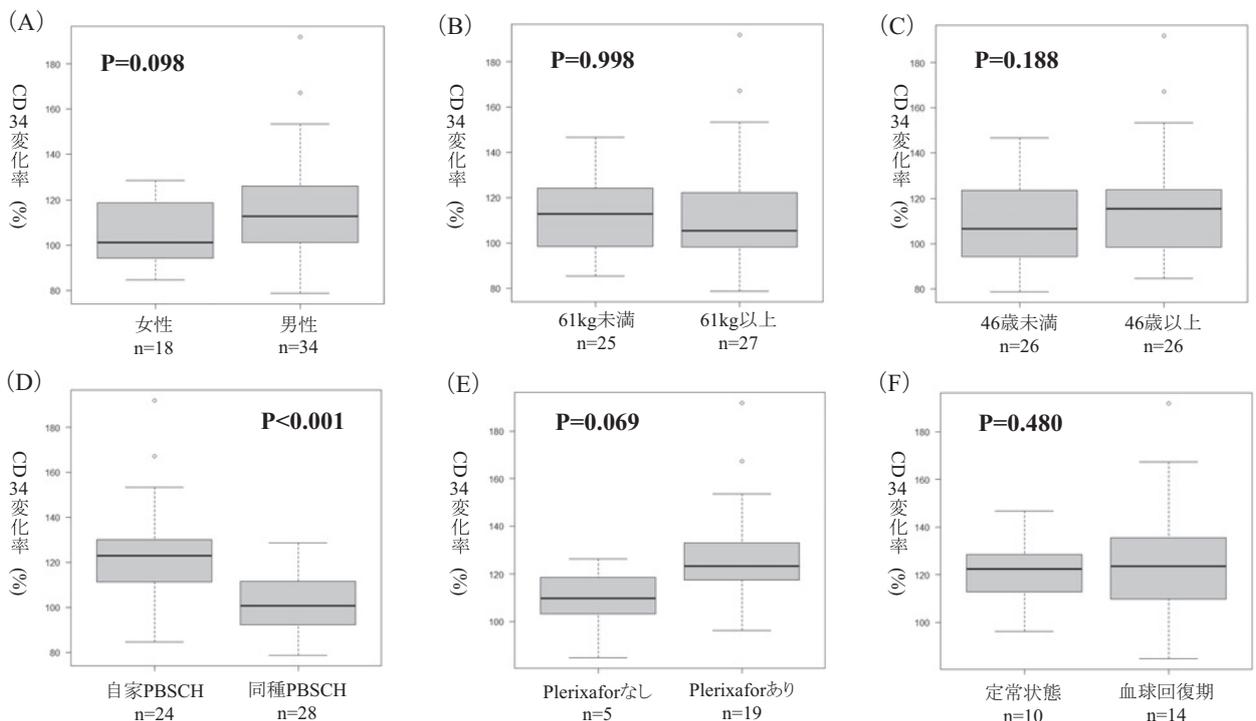


図2 背景による CD34 変化率の平均値の比較 (t 検定)

(A) 患者・ドナーの性別 (B) 患者・ドナーの体重 (C) 患者・ドナーの年齢 (D) 自家 PBSCH と同種 PBSCH (E) 自家 PBSCH における plerixafor 有無 (F) 自家 PBSCH における高容量 G-CSF 開始時期

していないため採取前末梢血と中間産物の CD34 陽性細胞濃度どちらが有用であるか結論付けることができない

いが, 採取当日末梢血 HPC と最終値よりも中間値と最終値でより強い相関が認められていたこと, 過去の報

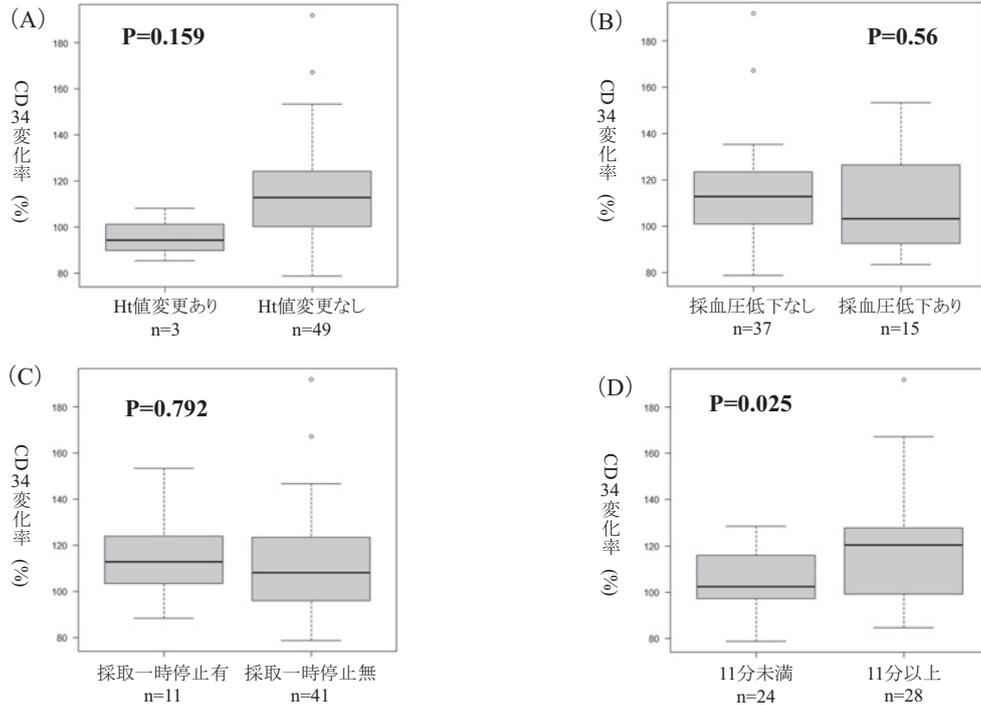


図3 採取中イベントによる CD34 変化率平均値の比較 (t 検定)
 (A) 初期インターフェイス形成時 Ht 変更の有無 (B) 採血圧低下の有無 (C) 採取中一時停止の有無
 (D) MNC 採取開始までに要した時間

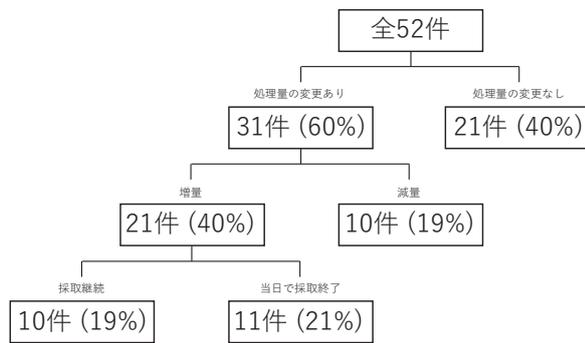


図4 中間値測定後の採取処理量変更

告では採取当日末梢血 HPC と採取当日末梢血 CD34 陽性細胞濃度が強い相関を認められていたことから末梢血 CD34 陽性細胞濃度よりも中間値のほうが有用性に欠ける可能性は低いと示唆される³⁾¹¹⁾。また、板垣らは採取直前の末梢血 CD34 陽性細胞濃度も測定して中間産物中 CD34 陽性細胞濃度のほうがより正確な予測ができたと報告している⁹⁾。末梢血 CD34 陽性細胞濃度を用いた予測では採取効率を一定の値と仮定するため症例毎に異なる採取効率を正確に反映することは難しいが、中間産物中 CD34 陽性細胞濃度を用いた予測では症例毎の採取効率を反映させることが可能であるためにより正確な予測となることが期待される。

同種 PBSCH は中間値と最終値がほぼ同等であったが、

自家 PBSCH では CD34 変化率が約 20% 大きくなった。原疾患や化学療法による造血機能への影響などの背景が同種 PBSCH と自家 PBSCH では大きく異なることによってこの違いが認められた可能性がある。過去の報告では自家 PBSCH でも中間値と最終値は同等であると報告されており⁹⁾、施設ごとの採取方針の影響など更なる検討が必要である。自家 PBSCH において plerixafor の使用有無で CD34 変化率に有意差は認められなかったが、plerixafor 使用症例は採取困難が予測される例に使用されているために結果には選択バイアスが影響している可能性がある。

採取中の様々なトラブルが中間値の正確性に影響すると考えられる。インターフェイス形成時の Ht 低下、採血圧低下や一時停止の有無は影響しなかったが、MNC 採取開始までの時間 11 分以上の群では CD34 変化率が有意に高値であった。MNC 採取開始までに長時間を要するような症例は血管径が細いなどの要因があると考えられ、そのような症例において中間値を用いた予測をする際には注意が必要である。

中間値を用いた最終処理量の変更は一部の症例で医療資源の有効活用につながった。一方で処理量を増量したものの予定されていた処理量でも目標 CD34 陽性細胞数を採取できていた症例も認められた。原因としては自家 PBSCH では中間値よりも最終値が高値となったこと、中間値による予測の時点では目標 CD34 陽性細胞

数を採取できる見込みであったが採取当日で確実に採取を終了させるために処理量を増やしていたことが考えられる。どのような症例で中間値と最終値が異なるのかに関しては今回の検討では指摘できていないが、今後更なる検討によりそれらを同定できれば中間値をもとにより適切な対応ができると考えられる。

本研究からは、中間値を用いた処理量の調節は適切なPBSCHを可能とし、患者・ドナーの負担軽減、及び医療資源の有効活用につながると考えられる。また、自家PBSCHや採取開始からMNC採取開始までに長時間を要する症例では中間値よりも最終値が高値となる可能性がある。単施設の限られた症例数での後方視的検討であるため、今後は多施設で多くの症例数により更なる検討が必要である。

著者のCOI開示：松下弘道；研究費（積水メディカル）

謝辞：本研究を進めるにあたり、国立がん研究センター中央病院においてPBSCHに関わっていただいた造血幹細胞移植科医師、血液腫瘍科医師、小児腫瘍科医師、臨床検査技師、臨床工学技士、看護師、移植コーディネーターの皆様のご尽力に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR US summary slides, 2020. <https://www.cibmtr.org/ReferenceCenter/SlidesReports/SummarySlides/pages/index.aspx> (2023 / 5 accessed).
- 2) Hematopoietic Cell Transplantation in Japan. Annual Report of Nationwide Survey 2020. <http://www.jdchct.or.jp/data/report/2020/> (2023/5 accessed).
- 3) Kasane M, Kurosawa S, Kojima M, et al: Usefulness of hematopoietic progenitor cell monitoring to predict autologous peripheral blood stem cell harvest timing: A single-center retrospective study. *Transfus Apher Sci*, 60 (4): 103150, 2021. doi: 10.1016/j.transci.2021.103150. Epub 2021 Apr 24.
- 4) Wang FS, Rowan RM, Creer M, et al: Detecting human CD34+ and CD34- hematopoietic stem and progenitor cells using a Sysmex automated hematology analyzer. *Lab Hematol*, 10 (4): 200—205, 2004.
- 5) Yu J, Leisenring W, Bensinger WI, et al: The predictive value of white cell or CD34+ cell count in the peripheral blood for timing apheresis and maximizing yield. *Transfusion*, 39 (5): 442—450, 1999.
- 6) Haas R, Möhle R, Frühauf S, et al: Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood*, 83 (12): 3787—3794, 1994.
- 7) Schots R, Van Riet I, Damiens S, et al: The absolute number of circulating CD34+ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. *Bone Marrow Transplant*, 17 (4): 509—515, 1996.
- 8) 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. *日本輸血学会誌*, 45 (4) : 436—441, 1999.
- 9) Benjamin RJ, Linsley L, Fountain D, et al: Preapheresis peripheral blood CD34+ mononuclear cell counts as predictors of progenitor cell yield. *Transfusion*, 37 (1): 79—85, 1997.
- 10) 板垣浩行, 中塩屋千絵, 今泉満明, 他：当院における目標CD34陽性細胞数と採取時間を考慮した末梢血幹細胞採取について(会議録). *日本輸血細胞治療学会誌* (1881-3011), 66 (2) : 338, 2020.
- 11) Tanosaki R, Kumazawa T, Yoshida A, et al: Novel and rapid enumeration method of peripheral blood stem cells using automated hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*, 36 (5): 521—530, 2014.

USEFULNESS OF MEASUREMENT OF CD34-POSITIVE CELL COUNT AT MID-APHERESIS PRODUCT SAMPLING IN PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTION

Saori Nakabayashi¹⁾²⁾, Minoru Kojima²⁾³⁾, Sakiho Takeoka¹⁾, Nao Iwashita¹⁾, Misato Tsubokura¹⁾, Yuki Kase¹⁾, Moemi Kasane¹⁾, Noriko Takahashi¹⁾²⁾, Sayaka Takeuchi¹⁾, Chiaki Hayashi¹⁾, Naoki Maezawa¹⁾, Hidetomo Fukumoto²⁾⁴⁾, Wataru Takeda²⁾³⁾, Koji Izutsu⁵⁾, Chitose Ogawa⁶⁾, Hiromichi Matsushita¹⁾ and Takahiro Fukuda²⁾³⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine, National Cancer Center Hospital

²⁾Division of Cellular Therapy Processing, National Cancer Center Hospital

³⁾Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, National Cancer Center Hospital

⁴⁾Clinical Engineering Section, National Cancer Center Hospital

⁵⁾Department of Hematology, National Cancer Center Hospital

⁶⁾Department of Pediatric Oncology, National Cancer Center Hospital

Abstract:

We retrospectively examined whether adjusting the amount of apheresis using the number of CD34-positive cells in the product during peripheral blood stem cell collection (PBSCH) led to optimal collection. A total of 52 subjects, including 28 allogeneic and 24 autologous PBSCH, were analyzed. We observed a correlation between the number of CD34-positive cells in the product during PBSCH (mid-apheresis) and after PBSCH (final product): total (R = 0.986), allogeneic (R = 0.973), autologous (R = 0.996).

Additionally, the median value was 101% (range 79-129) in the allogeneic group and 123% (85-192) in the autologous group. The autologous group showed a significantly higher intermediate value. For events that occurred during collection, the value was significantly higher in the case group which waited 11 min or longer to start MNC collection. Although more appropriate PBSCH could be performed using the intermediate value, the final value was higher than the intermediate value with autologous PBSCH, and waiting 11 min or longer before starting MNC collection.

Keywords:

peripheral blood stem cell harvest, peripheral blood stem cell transplantation, CD34 positive cell